



Universitat Autònoma de Barcelona

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**ESTRATÈGIES D'OPERACIÓ EN EL PROCÉS DE
PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES EN
PICHIA PASTORIS:**

**APLICACIÓ DE TÈCNiques DE MONITORITZACIÓ
I CONTROL**

Memòria de Tesi Doctoral

Ramon Ramon Real

Bellaterra, Febrer 2007

Títol: Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*: Aplicació de tècniques de monitorització i Control

Tesi realitzada per: Ramon Ramon Real
Dirigida per: Francisco Valero Barranco i José Luis Montesinos Seguí

Programa de Doctorat de Biotecnologia
Departament d'Enginyeria Química
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 2007

FRANCISCO VALERO BARRANCO i JOSÉ LUIS MONTESINOS SEGUÍ, professors titulars del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que l'enginyer químic Ramon Ramon Real ha dut a terme, sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball amb el títol "Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*: Aplicació de tècniques de monitorització i Control" que es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria (ETSE) de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant aquesta certificació.

Bellaterra, 5 de febrer 2007

Dr. Francisco Valero Barranco

Dr. José Luis Montesinos Seguí

Agraïments

He esperat durant molt de temps aquest moment i resulta difícil expressar la gratitud que vull mostrar a tots aquells que d'una manera o altra, han format part del treball experimental que ha donat lloc a aquesta memòria.

Primerament vull donar les gràcies als meus amics i directors, en Paco i en José Luis, que han estat infinitament pacients amb les meves iniciatives i per haver estat el referent per a la realització d'aquest treball.

També vull recordar a tots els meus companys i amics del grup de lipases, el Manuel, la Noelia, la Carol, l'Anna U., la Kristin, la Dolors, el Pau i especialment als que han participat de les llargues i eternes nits de fermentació, el David i la Surribas.

D'altra banda seria injust no recordar a tots aquells pacients companys de despatx que han tolerat l'innombrable nombre de visites que he tingut durant aquest temps, l'Aitor, la Laura, l'Albert, la Maite, el Juan, l'Ernest, la Neus, la Núria, l'Engràcia, la Trinitat, la M^a Eugènia, en Torà i l'Irene.

A d'altres "personatges" que m'han acompanyat durant aquest moments, la Núria, la Cristina, el Marcos, el Marc, la Vane, la Lorena, el Marcel, el Bartru, l'Anna M, la Lúcia, el Jero, el Juanmi, l'Eduard, l'Ernest, el Jaume, la Xandra...

Als grans més grans, Javier, Julian, Julio, el David, el Josep L. i en Goyo

"Agrair" la pressió que m'han realitzat el meu pitjor mal son, la Teresa, les Glòries i la Dolors. Algun dia m'explicareu què us he fet.

A tots els que han estat compartint carmanyoles i hores de menjador i que han fet que la conversa de sobretaula sempre es dirigís al mateix tema.

Al Fernando, la Belongs i l'Oriol que han format part d'aquest període universitari des dels inicis i que sempre hi han estat.

Al nous amics que he fet darrerament, al Marcos, al Jose i l'Esther, l'Emma, les Mercès, la Yolanda i al Ricard.

Al Miguel Ángel i a l'Anna, al Jordi, a l'Angus, a la Sandra, a la Grids, al Pere, al Martu, a la Berta, al Pieres i a l'Anna, al Sarate, al Litus, a l'Uri, al Catxi, al Xavi, i tots els meus amics, amb qui he passat els grans caps de setmana que m'ha donat aquesta tesi.

Als meus sogres, amb qui he compartit molts moments de brases abans de cada capítol.

Als "Lopes" que han adornat el meu esbarjo amb infantesa.

A l'Antonio, capaç d'arrencar un somriure per qualsevol cosa.

A la Rocio i al David que han patit en primera persona els efectes secundaris d'aquest treball.

Al Santi, "que gran que ets".

Als meus pares que sempre m'han fet costat sigui quina sigui la decisió que hagi pres.

A la Blanks, la millor companya i la més crítica dels meus col·legues. Sempre cal que algú aporti una mica de sentit comú a una família. Moltes gràcies GUAPA.

Índex

Índex.....	vii
Capítol 1. Resum.....	1
Capítol 2. Objectius.....	3
Capítol 3. Introducció.....	5
3.1. Els llevats metil·lotròfics. <i>Pichia pastoris</i>	5
3.2. El medi de fermentació i les condicions operacionals.....	7
3.3. Estratègies operacionals en semicontinu sota el promotor <i>PAOXI</i>	9
3.3.1. Fase discontinua amb glicerol (FDG).....	10
3.3.2. Fase de Transició (FT).....	10
3.3.3. Fase d'inducció amb metanol (FIM).....	11
3.4. Tecnologies analítiques de procés (PAT).....	12
3.5. BIOPAT. Aplicació de les PAT als bioprocessos.....	14
3.6. ROL – <i>Rhizopus oryzae</i> lipasa.....	16
3.7. Treballs realitzats amb ROL.....	17
Capítol 4. Materials i mètodes.....	19
4.1. Soques.....	19
4.2. Equipament emprat.....	19
4.2.1. Fermentadors (F – 01).....	21
4.2.2. Analitzador de gasos (A – 01).....	21
4.2.3. Llaç de control de metanol(A – 02).....	22
4.2.4. Llaç de control de pressió.....	22
4.2.5. Addicions programades de substrat.....	23
4.2.6. Equipament informàtic.....	23
4.3. Medis de cultiu.....	23
4.3.1. Medi per a cultius en discontinu.....	23
4.3.2. Medi per a cultius en semicontinu <i>AOX</i>	24
4.3.3. Medi per a cultius en semicontinu <i>FLD</i>	25
4.3.4. Micronutrients.....	25
4.4. Tècniques microbiològiques.....	26
4.4.1. Preparació plaques de Petri (YPD).....	26

4.5.	Mètodes analítics.....	26
4.5.1.	Determinació de la concentració de biomassa total	26
4.5.2.	Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular.....	27
4.5.3.	Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular	28
4.5.4.	Determinació de la concentració de glicerol i sorbitol.....	29
4.5.5.	Determinació de la concentració de metilamina	29
4.5.6.	Determinació de la concentració de metanol	30
4.5.7.	Determinació de la concentració d'amoni.....	30
4.6.	Càlculs.....	31
4.6.1.	Càlcul de l'OUR,CER i RQ	31
4.6.2.	Càlcul de la μ , q_s i q_p	36
4.6.3.	Cultiu en discontinu	36
4.6.4.	Cultiu en semicontinu.....	40
4.6.5.	Càlcul de les derivades.....	44
4.6.6.	Càlculs dels valors mitjans	46
4.6.7.	Càlcul dels rendiments	46
4.6.8.	Càlcul de les productivitats	48
4.6.9.	Correcció dels paràmetres en funció del volum	48
Capítol 5.	Sistema d'extracció de mostres	51
5.1.	Introducció	51
5.1.	Requeriments de la instal·lació.....	52
5.2.	Components de la instal·lació.....	53
5.3.	Protocol de funcionament i automatització.....	58
5.4.	Conclusions	59
Capítol 6.	Eliminació d'interferències en el sensor de metanol.....	61
6.1.	Introducció	61
6.1.1.	El funcionament de l'analitzador de metanol.....	62
6.2.	Resultats	66
6.2.1.	Efecte de la humitat i la temperatura en el corrent d'entrada al mesurador de metanol.	66
6.2.2.	Eliminació del soroll associat a la mesura realitzada pel sensor.....	67
6.2.3.	Eliminació de la interferència d'altres compostos volàtils.....	69
6.2.4.	Calibratge del sensor de metanol	71
6.3.	Conclusions	75

Capítol 7. Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut ⁺ _s de <i>Pichia pastoris</i>	77
7.1. Introducció.....	77
7.2. Presentació i discussió dels resultats	79
7.3. Conclusions	87
Capítol 8. Determinació de la velocitat específica de creixement mitjançant un estimador adaptatiu	89
8.1. Introducció.....	89
8.1.1. Estimadors basats en observadors no lineals.....	93
8.1.2. Estimadors basats en algorismes adaptatius emprant identificació per mínims quadrats.....	96
8.2. Resultats i discussió.....	99
8.2.1. Comparació dels estimadors proposats en simulació.	102
8.2.2. Selecció de l'estimador a aplicar sobre dades experimentals.....	109
8.2.3. Utilització d'un algorisme RLS amb factor d'oblit variable per identificar la velocitat específica de creixement.....	111
8.3. Conclusions	113
Capítol 9. Estratègies de cultiu amb addició mixta de substrats	115
9.1. Introducció.....	115
9.2. Presentació i discussió dels resultats	118
9.2.1. Experiments en discontinu	119
9.2.2. Selecció de la soca per a cultius en semicontinu	126
9.2.3. Estratègia per realitzar els cultius en semicontinu.....	126
9.2.4. Experiments en semicontinu.....	128
9.2.5. Proposta de futur.....	131
9.3. Conclusions	132
Capítol 10. Sistema automàtic per a l'anàlisi de compostos nitrogenats	135
10.1. Introducció.....	135
10.1.1. Sistema basat en un elèctrode selectiu d'amoníac.....	137
10.2. Presentació i discussió dels resultats	140
10.2.1. Capacitat del sensor per mesurar les espècies nitrogenades.....	141
10.2.2. Muntatge i desenvolupament del sistema automàtic de mesura d'espècies nitrogenades.....	142

10.2.3.	Realització de calibratges per a mostres amb el medi de fermentació emprat en experiments reals. Anàlisi del temps de resposta, estabilitat i mesura.....	144
10.2.4.	Experiments de validació i caracterització de funcionament del sensor ...	150
10.3.	Conclusions	151
Capítol 11.	Conclusions generals.....	153
Capítol 12.	Bibliografia.....	155
Capítol 13.	Apèndix	163
13.1.	Nomenclatura	163
13.2.	Simbologia emprada en el diagrames de procés	165
13.3.	Esquemes elèctrics del sistema de presa de mostra.....	166
13.4.	Publicacions vinculades a aquest treball	167

Capítol 1. Resum

El document que aquí es presenta, sota el títol “Estratègies d’operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*: Aplicació de tècniques de Monitorització i Control”, recull la tasca realitzada en el camp de la instrumentació, control i desenvolupament d’eines per facilitar l’operació i millorar l’eficàcia i productivitat dels bioprocessos amb *Pichia pastoris*.

El treball realitzat cobreix un ampli ventall de temes que requereixen el desenvolupament de tècniques en diferents àrees de coneixement, corroborant la necessitat de la multidisciplinarietat en el camp de la biotecnologia.

Els experiments realitzats han suposat diferents etapes que han recollit, primerament, el desenvolupament d’eines per a la millora de la instal·lació existent. El primer dels capítols que tracta aquesta temàtica recull el disseny i construcció d’un col·lector de mostres que permet obtenir-les de forma repetitiva i amb elevada freqüència. Aquesta presa de mostra es realitza de forma automàtica, mitjançant un autòmat programable que permet fer els cicles necessaris per garantir l’estanquitat del sistema.

Seguidament s’aborda la problemàtica de la sensibilitat dels sensors de metanol emprats en el procés de fermentació de *P. pastoris* sota el promotor *PAOXI*. Aquest sensor presenta interferències per la presència d’espècies volàtils, com l’amoníac, en els gasos de sortida del cultiu. Com a conseqüència es falseja la mesura i dificulta la realització d’accions de control sobre els substrats que garanteixin la reproductibilitat dels resultats.

Un cop solucionats els problemes relacionats amb la mesura del substrat, es procedeix a estudiar la soca Mut⁺ del llevat d’interès, realitzant una sèrie d’experiments per veure l’efecte de la concentració de metanol sobre el creixement i la producció de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL). S’ha provat una estratègia d’addició basada en el balanç de matèria entorn al cultiu i un control proporcional integral. Els resultats han demostrat la capacitat del controlador per mantenir la concentració de metanol constant i l’existència d’unes condicions òptimes per al creixement del microorganisme i la producció que són properes als 2 g l⁻¹. S’han observat dos fenòmens que s’han considerat rellevants i que han portat a desenvolupar dues línies de treball diferents: la velocitat específica de creixement no es manté constant per a una mateixa concentració, al llarg del temps, i es detecta una nul·la producció de ROL quan els nivells de metanol són baixos de l’ordre de 0.5 g l⁻¹.

La primera de les apreciacions fa plantejar una estratègia per poder fer el seguiment de la velocitat específica de creixement al llarg del cultiu. Per poder monitoritzar-la s’han aplicat

diferents estimadors matemàtics (lineals i no lineals) que permeten la estimació d'aquesta variable mitjançant la velocitat de generació de CO₂ calculada a partir de les anàlisis del gasos de sortida del cultiu. Els resultats han permès seleccionar l'estimador recursiu per mínims quadrats amb factor d'oblit variable, com el més adient per estimar la velocitat específica de creixement a partir de dades reals. Fruit d'això, s'ha obtingut un seguiment de la velocitat específica de creixement que permet, mitjançant el balanç de matèria, obtenir l'evolució de la concentració de biomassa en temps real.

Respecte les limitacions de *P. pastoris* per produir ROL a baixes concentracions de metanol, s'observa que a l'inici de la fase de producció la q_p (velocitat específica de producció) presenta un pendent més elevat. Això implica que la velocitat de síntesi és màxima a baixes concentracions d'agent inductor. No obstant això, la seva producció s'atura a sobtadament a les poques hores. Aquesta aturada pot ser deguda a una deficiència energètica per poder seguir amb els processos de síntesi i secreció. Per validar aquesta hipòtesis es planteja l'aplicació d'una estratègia d'addició mixta de substrats (amb sorbitol i metanol) que supleixi les possibles deficiències energètiques que tingui el microorganisme per baixos nivells de metanol i que pugui mantenir l'alta velocitat de producció observada en aquestes concentracions. L'estratègia proposada s'ha implementat exitosament i ha implicat el desenvolupament d'una nova línia de investigació que està donant fruits molt interessants.

Finalment s'ha desenvolupat un sistema d'anàlisi automatitzat per a la mesura de compostos nitrogenats que pot ser de gran interès en bioprocessos relacionats amb el promotor *PFLDI* de *P. pastoris*. Aquest promotor s'indueix en presència d'amines que són detectades amb un sistema de mesura en línia que fa servir un elèctrode específic d'amoniac que també detecta aquests compostos.

Capítol 2. Objectius

Els objectius establerts en aquesta memòria són el reflex de les necessitats resultants de la iniciativa de la FDA (*Food and Drug Administration*), presentada a la guia PAT (*Process Analytical Technology*). Aquesta proposta recull la importància d'operar amb un coneixement ampli dels processos mitjançant la monitorització, l'anàlisi i el control.

Per això, s'ha plantejat treballar en la detecció de les necessitats de monitorització dels bioprocessos, en general, i de la producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metil·lotròfic *P. pastoris*, en particular. Això permetrà ampliar el coneixement i la identificació dels paràmetres associats a la qualitat i quantitat del producte final. Mitjançant el desenvolupament de estratègies de control per maximitzar el producte final i fer-lo reproducible.

Per tant, l'objectiu final d'aquest treball experimental és desenvolupar i millorar eines de monitorització i control a través de:

- Un sistema automàtic de presa de mostra.
- L'eliminació d'interferències per un sensor en línia de metanol.
- El desenvolupament d'un sistema d'anàlisi en línia de metilamina, dimetilamina i trimetilamina.
- Aconseguir un sistema de control per mantenir la concentració de substrat en cultius en semicontinu amb el fenotip Mut⁺ de *P. pastoris*.
- El desenvolupar un analitzador per programari, “software sensor” que permeti determinar la velocitat específica de creixement en línia per bioprocessos.
- I finalment, implementar estratègies de producció que permetin facilitar la operació i la productivitat específica en cultius amb *P. pastoris* (estratègies amb substrats mixtes).

Capítol 3. Introducció

3.1. Els llevats metil·lotròfics. *Pichia pastoris*

Al final de la dècada dels 60, davant dels excedents de l'indústria petroquímica, es planteja la utilització del metanol com a font de carboni pel creixement de microorganismes. Els microorganismes capaços de créixer amb aquest substrat són bacteris i llevats on els segons destaquen per un contingut superior en vitamines, lípids, àcids nucleics i aminoàcids.

Aquests llevats són anomenats metil·lotròfics per la seva capacitat d'emprar el metanol com a única font de carboni. L'estudi d'aquests es desenvolupa per poder realitzar la comercialització dels mateixos en forma de proteïna unicel·lular (SCP - single cell protein) (Cereghino i Cregg 2000) i per poder estudiar els compartiments específics de degradació d'aquests substrats, els peroxisomes (Faber *et al.*, 1995).

Un d'aquests llevats és *Pichia pastoris* que és el microorganisme protagonista del treball experimental presentat en aquesta memòria.

Posteriorment, amb la crisi del petroli dels 70, disminueix l'interès per a la producció de biomassa amb *P. pastoris* degut a l'encariment del metanol, no fent viable econòmicament el bioprocés. Però els estudis realitzats, durant la dècada dels 80, per la Phillips Petroleum Co. en col·laboració amb el Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates Inc (SIBIA, La Jolla, CA, USA) que aconsegueixen aïllar els gens i promotors d'aquest llevat, permetent plantejar protocols de manipulació genètica per a l'expressió i producció de proteïnes heteròlogues. Fent de *P. pastoris* un sistema alternatiu d'expressió als clàssics de *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir d'aquests avanços sorgeix l'interès per part de l'empresa Invitrogen Co per aquest sistema d'expressió i aconsegueix una llicència per poder explotar-lo comercialment fins a data d'avui (Cereghino i Cregg 2000)

Fins a l'actualitat, emprant aquest sistema biològic, s'han expressat més de 500 proteïnes (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Cregg 2004).

P. pastoris combina la capacitat de créixer en un medi mínim a elevades densitats cel·lulars amb la secreció de la proteïna produïda al medi de cultiu, simplificant de forma important el seu procés de purificació. A més a més, permet realitzar algunes de les modificacions posttraduccionals dels organismes eucariotes com són el plegament de proteïnes, la

glicosilació i la formació de ponts disulfur. Dins de totes aquestes capacitats cal destacar la que potser fa de *P. pastoris* un microorganisme hoste diferenciat, l'existència d'un promotor fortament regulat, el corresponent al gen de l'alcoholoxidasa 1, *PAOX1* (Cregg *et al.*, 2000).

L'alcohol oxidasa és el primer enzim responsable de l'assimilació del metanol i té com a funció la reacció enzimàtica d'oxidació del metanol a formaldehid (Harder i Veenhuis 1989). *P. pastoris* té dos gens de l'alcohol oxidasa que codifiquen la producció d'aquest enzim. El primer és el gen de l'alcohol oxidasa 1 (*AOX1*), responsable del 90% de l'enzim produït per la cèl·lula, i el gen de l'alcohol oxidasa 2 (*AOX2*) que és responsable de la resta. Hi ha tres tipus de soques de *P. pastoris* depenent del grau d'assimilació del metanol. La primera és la salvatge o també anomenada fenotip Mut⁺ (methanol utilization plus) i la resta depenen del grau de deleció dels gens descrits: Mut^s per deleció del gen *AOX1* i Mut⁻ (methanol utilization minus) per la deleció d'ambdós gens.

Tot i que s'ha descrit una elevada producció en alguns casos amb el fenotip Mut^s (Mochizuki *et al.*, 2001) les màximes produccions descrites corresponen a la soca sense deleció del gen *AOX1*.

En els darrers anys s'ha treballat amb promotors que permeten evitar la utilització de metanol, és a dir alternatius al *PAOX1*. El promotor constitutiu de gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (*PGAP*) va ser aïllat per Waterham *et al.*, (1997) i tot i que ha permès expressar un bon nombre de proteïnes, fa inviable la producció de totes aquelles que siguin tòxiques per al llevat. Una altra alternativa ha estat la derivada de l'aïllament del gen de la formaldehid deshidrogenasa i del seu promotor (*PFLDI*) (Shen *et al.*, 1998). El *FLDI* codifica l'expressió d'un enzim que a més de jugar un paper molt important en el catabolisme del metanol com a font de carboni, s'utilitza en les vies metabòliques d'altres espècies com són les amines metilades (Shen *et al.*, 1998). Resina *et al.*, (2004) han demostrat la importància d'aquest promotor obtenint produccions similars de lipasa del fong *Rhizopus oryzae* (ROL) emprant sorbitol i metilamina, com a fonts de carboni i de nitrogen respectivament, que les obtingudes amb el promotor *PAOX1* emprant el metanol com a única font de carboni.

Recentment, a l'any 2003, s'ha descrit la utilització del promotor de ICL1 (isocitrate lyase) per a la producció de dextranasa de *Penicillium minoluteum* (Menendez *et al.*, 2003), emprant com a agent inductor l'acetat.

La productivitat d'un sistema recombinant depèn de molts factors genètics i fisiològics com són: el codó emprat pel gen expressat, el nombre de còpies del gen, una transcripció

eficient resultat de la utilització de promotors forts, els senyals de translació, translocació determinada pel pèptid de secreció de senyal, el procés de producció en el reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi i finalment la secreció a l'exterior de la cèl·lula.

Per tant, la simple inserció del gen de la proteïna d'interès en un vector i la transformació a l'hoste no és una garantia de tenir un procés viable. El nivell d'expressió per a una determinada proteïna d'interès està condicionat per propietats inherents a la mateixa com son la seqüència d'aminoàcids, la seva estructura terciària i el lloc on s'expressa (Hohenblum *et al.*, 2004). Com aquests factors són independents, és difícil optimitzar el sistema per obtenir la perfecta expressió.

Un cop salvades aquestes dificultats s'ha de plantejar la producció a escala industrial per poder fer rendible la comercialització del producte i en aquesta situació s'han de tenir en compte altres factors claus per obtenir una bona rendibilitat: optimització de les estratègies operacionals, la composició del medi, la definició de paràmetres claus de producció, etc.

Una anàlisi introductòria de la importància d'aquests factors es descriuen a continuació a través dels apartats: El medi de fermentació i les condicions operacionals, estratègies operacionals en semicontinu sota el promotor *PAOXI* i les tecnologies analítiques de procés (PAT).

Les PAT són una aposta de la “*Food and Drug Administration*” americana (FDA) per garantir l'eficàcia i la qualitat en la fabricació de productes farmacèutics. Aquesta iniciativa permet tenir una eficàcia més gran en el seu sistema mitjançant la introducció de sistemes de seguiment i control al llarg del procés.

3.2. El medi de fermentació i les condicions operacionals

La realització d'una revisió bibliogràfica sobre la producció amb *P. pastoris* indica que les millors condicions (composició del medi, T, pH, etc.) per dur a terme un cultiu varien significativament depenent del tipus de soca i del tipus de proteïna expressada (Boze *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2003). Tot i així, hi ha algunes indicacions o guies que permeten millorar de forma substancial la producció quan es realitza un cultiu en fermentador.

El medi que s'empra més habitualment per a cultius amb elevada densitat cel·lular amb *P. pastoris* és el “basal salt medium” (BSM) proposat per Invitrogen Co. (Cregg *et al.*, 1993) Aquest és considerat el medi de referència tot i tenir una elevada càrrega iònica i formació de precipitats.

Com a alternativa a aquest s'han proposat d'altres medis com són el de d'Anjou *et al.*, (2000) i el proposat per Stratton *et al.*, (Stratton *et al.*, 1998), anomenat FM22. Ambdós medis han estat pensats per aconseguir elevades densitats cel·lulars en cultius semicontinus. Si es comparen el FM22 amb el BSM (Taula 3.1) es poden detectar variacions en les composicions de fòsfor i potassi. El medi BSM, en general, és el que té concentracions més elevades de tots els elements i ratlla el límit màxim establert per Wegner (1983). Aquest autor ha determinat el millor rang de concentració dels elements presents en un medi de fermentació per al creixement de llevats. Si bé el medi BSM es troba ratllant el màxim, el medi de d'Anjou és molt proper al mínim.

Un altre paràmetre important dins de la formulació del medi és la font de nitrogen que en el cas del medi BSM i FM22 és afegida en forma d'hidròxid amònic quan es realitza el control de pH i d'Anjou proposa una addició inicial de la font de nitrogen des de l'inici del cultiu.

Taula 3.1. Composició elemental dels medis de fermentació més habituals per fermentacions amb elevada densitat cel·lular amb *P. pastoris*.

Element	BSM (g l ⁻¹)	FM22 (g l ⁻¹)	D'Anjou (g l ⁻¹)
N	NH ₄ OH (Control de pH)	1.06 + NH ₄ OH (Control de pH)	4.24
P	12.27	9.76	2.73
K	11.05	18.74	3.45
Mg	1.47	1.15	0.46
Ca	0.27	0.12	0.10
S	5.51	5.46	5.47
Cl	-	-	0.17

Cos *et al.*, (2006b), emprant el medi BSM, han determinat la composició elemental del microorganisme en la producció de ROL (CH_{1.78}O_{0.62}N_{0.18}S_{0.0006}) per cultius semicontinus, estimant que el nitrogen s'exhaureix a partir d'una concentració de biomassa d'uns 50g l⁻¹. Si tenim en compte que la manca de nitrogen està directament relacionada amb l'increment de l'activitat proteolítica i en conseqüència amb la degradació de la proteïna heteròloga extracel·lular, és convenient realitzar addicions puntuals de la font de nitrogen per garantir-ne el no exhauriment. Aquest suplement convé realitzar-lo amb cura perquè una concentració excessiva de nitrogen pot provocar la inhibició del creixement cel·lular (Yang *et al.*, 2004).

Tots els medis presentats porten un suplement de micronutrients com són Fe, Mn, Cu i biotina, formant part de la composició de les sals traça PTM1 proposades per Invitrogen. La influència d'aquests micronutrients en els cultius amb *P. pastoris* no ha estat estudiada en profunditat. Només Boze *et al.*, (2001) han demostrat que l'addició de set vitamines i dues sals traça (PTM1) en el medi BSM permeten millorar la producció respecte als resultats que s'obtidrien amb la combinació BSM + PTM1 (*Capítol 4. Materials i mètodes*).

En cultius amb elevada densitat cel·lular, la formació d'escumes és una problemàtica habitual per les necessitats d'agitació i cabal d'aire associades als requeriments de transferència d'oxigen. Generalment, solucions de tipus mecànic són insuficients per poder eliminar les escumes pel que cal addicionar en el medi algun agent antiescumejant. S'ha generalitzat l'ús d'aquests en base a silicones però cal anar en compte amb les concentracions i tipus escollits per evitar efectes negatius en el creixement del llevat i en la transferència d'oxigen.

Les condicions òptimes per al creixement i la producció en *P. pastoris* són 30°C, per sobre dels 32°C l'expressió de les proteïnes s'atura i el creixement disminueix. Alguns autors proposen treballar a temperatures inferiors per afavorir la producció de proteïnes heteròlogues. Entre ells, Li *et al.*, (2001) treballant a 23°C han augmentat tres vegades la producció de la proteïna d'anticongelant de l'areng i Jahic *et al.*,(2003) han demostrat que implementant un perfil decreixent de temperatura aconseguen disminuir l'activitat de les proteases i la lisi cel·lular.

Pel que fa al pH, el rang de treball habitual està entre les 5 i 6 unitats, tot i que *P. pastoris* pot créixer en un rang de pH entre 3 i 7 (Cregg *et al.*, 1993). Sovint s'escull un pH de 5.5 per minimitzar l'efecte de les proteases en el medi (Kobayashi *et al.*, 2000b) i afavorir l'estabilitat de la proteïna heteròloga.

L'ús del medi BSM a un pH superior a 5.0 causa la precipitació d'algunes de les sals presents al medi que provoca problemes operacionals com és el no accés dels nutrients al microorganisme i interferències en algunes mesures òptiques.

3.3. Estratègies operacionals en semicontinu sota el promotor PAOX1

L'empresa Invitrogen Co, autoritzada per RCT (Research Corporation Technologies, USA) per explotar el sistema d'expressió de *Pichia* per a l'àmbit de recerca, només facilita un manual d'operació per al cultiu en semicontinu de *Pichia* (<http://www.invitrogen.com>)

derivat dels estudis realitzats per Brierley *et al.*, (1990). Aquest protocol inclou tres fases en ordre cronològic: una fase en discontinu amb glicerol (FDG), una fase de transició (FT) i finalment una fase d'inducció amb metanol (FIM).

3.3.1. Fase discontinua amb glicerol (FDG)

L'objectiu d'aquesta fase es l'obtenció ràpida de la quantitat de biomassa, prèvia a la inducció, per assolir la màxima productivitat possible. La velocitat específica màxima de creixement de la soca salvatge de *P. pastoris* creixent amb glicerol (0.23 h^{-1}) (Cos *et al.*, 2005a) és més gran que creixent amb metanol (0.14 h^{-1}) (Cos 2005) i aquesta diferència s'accentua quan aquest llevat està produint una proteïna heteròloga, per l'efecte negatiu que té aquesta producció sobre el creixement microbià.

La concentració de glicerol en aquesta fase s'escull a 40 g l^{-1} perquè concentracions superiors podrien inhibir el creixement (Invitrogen Corporation CA USA 2006). Brierley *et al.*, (1990) recomanen una concentració màxima del 6% i Chiruvolu *et al.*, (1998) han detectat concentracions d'etanol en el medi compreses entre el 0.5 i el 2.4% quan la concentració de glicerol supera el 7%.

En aquesta fase el rendiment biomassa substrat ($Y_{X/S}$) és de 0.5 g de biomassa (pes sec) per cada gram de glicerol, per tant, s'acostuma a obtenir una concentració final de 20 g l^{-1} de biomassa.

La finalització d'aquesta fase es pot observar per un augment sobtat del oxigen dissolt en el medi de cultiu o per una disminució de la velocitat específica de producció de diòxid de carboni (CER) o de la velocitat específica de consum d'oxigen (OUR).

3.3.2. Fase de Transició (FT).

La fase de transició té com a objectiu l'assoliment final de la concentració de biomassa desitjada prèvia a la inducció i facilitar, el més ràpidament possible, el canvi metabòlic per començar la degradació del substrat inductor (Curvers *et al.*, 2001). S'han descrit moltes estratègies per aconseguir aquest propòsit: alguns autors mantenen un cabal d'addició de glicerol fix (Chiruvolu *et al.*, 1998), altres mantenen un nivell de glicerol de zero per no tenir desactivat el promotor *AOXI* (Minning *et al.*, 2001) i altres realitzen una addició exponencial decreixent de glicerol per obtenir un nivell de creixement limitat (Kobayashi

et al., 2000b). Per tot això, cal tenir en compte que *Pichia* té una velocitat específica de consum de glicerol de $0.0688 \text{ g g}^{-1} \text{ X h}^{-1}$ (Invitrogen Corporation CA USA 2006).

Segui quina sigui l'estratègia seguida, la majoria dels autors aturen aquesta fase quan s'assoleixen els 30 g l^{-1} de biomassa.

Tal i com s'ha indicat al paràgraf anterior, l'addició de glicerol es complementa amb un cabal de metanol per afavorir l'activació del promotor *AOX1*.

S'han descrit diferents estratègies d'addició de metanol per aquesta fase: la primera es basa en una addició creixent com a resposta a la variació de l'oxigen dissolt, fins assolir un cabal màxim de $7.6 \text{ ml h}^{-1} \text{ l}^{-1}$ (Invitrogen Corporation CA USA 2006). La segona estratègia es basa en mantenir la concentració de metanol constant a diferents nivells, 4 g l^{-1} (Chiruvolu *et al.*, 1998) i entre 1 i 2 g l^{-1} (Zhang *et al.*, 2000a). La tercera consisteix en deixar que s'exhaureixi completament el glicerol (d'Anjou i Daugulis 2001). Quarta, programar una rampa d'addició decreixent de glicerol i mantenir un cabal constant de metanol (Chen *et al.*, 1996; Cos *et al.*, 2005a). L'experiència del grup d'investigació ha permès constatar que una de les millors estratègies passa per fer una addició pre-programada de glicerol, en condicions de substrat limitants, simultàniament a una addició constant de metanol.

3.3.3. Fase d'inducció amb metanol (FIM)

L'estratègia adoptada en la FIM, que està directament vinculada a la velocitat específica de creixement, és un dels paràmetres més importants per maximitzar la producció de proteïnes heteròlogues, ja que totes les reaccions bioquímiques per a la producció estan lligades de forma directa o indirecta al creixement cel·lular (Zhang *et al.*, 2000b; Minning *et al.*, 2001). Però aquesta producció depèn també de les condicions d'operació a les que es realitzin les fermentacions (temperatura, pH, medi de cultiu, etc.), del fenotip i de les característiques específiques del producte. A més, la síntesi, el processat i la secreció de la proteïna, poden afectar també al creixement de *Pichia*. Per això, s'han descrit diferents estratègies de control per poder optimitzar aquesta fase. La descripció d'aquestes estratègies s'ha realitzat al Capítol 6. *Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinuos amb la soca Mut⁺_s de P. pastoris.*

3.4. Tecnologies analítiques de procés (PAT)

Per poder dur a terme el procés descrit de forma eficient cal desenvolupar una sèrie d'eines per al control, l'anàlisi i la monitorització del mateix. Aquest desenvolupament es realitza dins d'un marc que ha establert la *Food and Drug Administration* en una de les seves iniciatives de cara a les "Pharmaceutical GMPs for the 21st Century". Dins d'aquesta hi apareix la iniciativa PAT (2004) que pretén crear un espai d'entesa entre els requeriments de la FDA i la indústria.

Aquesta proposta està recolzada per la *European Agency for the Evaluation of Medical Products* (EMA) que ha estat representada en les comissions que han redactat la normativa en qüestió i que en conseqüència seran, en un futur propè, d'aplicació a Europa. Amb aquesta aposta, la FDA pretén que la qualitat no s'estableixi, únicament, per una sèrie d'anàlisis físic – químics i microbiològics d'un producte. De manera que s'introdueix en el procés industrial conceptes com són la qualitat per al disseny, l'adquisició de dades i la monitorització del procés i del producte emprant instrumentació i anàlisi de la informació.

La FDA defineix PAT com "un sistema per a l'anàlisi i el control dels processos productius basat en mesures dels paràmetres crítics vinculats a la qualitat de les matèries primeres i productes i dels vinculats a l'execució del procés, de forma periòdica".

Per poder dur a terme aquesta tasca cal, segons la FDA, la realització de l'aplicació òptima d'eines d'anàlisi química del procés, estratègies de control retroalimentat, eines de gestió de la informació i/o estratègies d'optimització dels processos productius.

Alguns exemples de les PAT són:

- La utilització de mesures en línia per poder fer un seguiment del procés i per poder garantir la seva qualitat.
- Aproximacions de tipus quimiomètriques com són l'estadística multivariable i mètodes d'identificació per patrons de comportament.
- L'adquisició de dades en temps real i la utilització de sistemes de gestió per al control del procés.

L'avantatge que suposa disposar de molta informació sobre el procés porta implícit el tenir que tractar una quantitat molt important de dades que s'ha de poder vincular a la qualitat i quantitat del producte que es vol produir i a més realitzar estudis previs que permetin extrapolar-ne la informació.

En base a aquesta filosofia de treball es pot proposar una implementació seguint els passos següents (Ganguly J. i Vogel G. 2006):

- **Identificació.** Aquest pas requereix recollir tota la informació coneguda fins el moment i les persones amb experiència vinculades al procés. Aquest recull permet identificar aquells paràmetres crítics de qualitat i de procés que necessitaran ser monitoritzats i controlats.
- **Monitorització.** A partir dels paràmetres aïllats es procedeix a cercar un sistema que els permeti monitoritzar. La monitorització es procura realitzar de manera directa i en línia, sempre i quan sigui possible. Aquest pas és crític si es parteix de la premissa de que si no es pot monitoritzar no es controlar.
- **Anàlisi.** Aquesta etapa permet que després d'identificar els paràmetres crítics i monitoritzar-los, s'emprin eines estadístiques d'anàlisi per poder establir una relació quantitativa entre cada un dels paràmetres monitoritzats i l'eficàcia general del procés. Aquesta etapa inclou el desenvolupament, la verificació i la validació de qualsevol model estadístic que pugui definir el procés.
- **Control.** Un cop analitzada la relació entre els paràmetres crítics i l'eficàcia global del procés i haver desenvolupat models estadístics del procés, cal desenvolupar una eina que permeti mantenir els paràmetres crítics dins d'uns límits establerts durant tota l'etapa de producció. Aquest és el pas més important del procés d'implementació de PAT perquè implica una garantia de la qualitat "en temps real".
- **Generació d'informes.** S'ha de desenvolupar una eina que permeti recollir tota la informació vinculada al procés de producció i que permeti comprovar que s'ha realitzat sota les condicions preestablertes, a més de servir de registre històric per registrar excepcions i situacions anòmales no contemplades inicialment i que permetran acceptar o refusar el producte obtingut.

Aquest procés porta implícit un sistema de millora continua que, en base a la informació obtinguda dels diferents processos productius, permet aconseguir dades que fan que es pugui ampliar la població sobre la qual es realitzen les anàlisis estadístiques i així anar augmentant el marge de confiança del model, amb el coneixement del procés productiu que això implica.

3.5. BIOPAT. Aplicació de les PAT als bioprocessos

Les PAT han estat aplicades als processos de producció (indústria paperera, química i petrolera) des de fa dècades. L'indústria farmacèutica i per proximitat els processos biotecnològics no han realitzat una implementació generalitzada d'aquestes eines per la no necessitat de tenir una alta rendibilitat degut a l'elevat valor afegit dels productes i per la no existència d'una normativa que obligui a la seva aplicació. La iniciativa proposada per la FDA vol aconseguir determinar la qualitat dels productes a través del procés de producció i d'altres productes intermedis, pel que cal establir una relació directa entre la informació relacionada per la matèria primera i el procés productiu amb la qualitat del producte final.

A partir d'aquesta proposta s'ha definit BIOPAT (Känsäkoski *et al.*, 2006) com les PAT aplicades al desenvolupament, escalat i producció de productes d'origen biotecnològic.

Dins d'aquest nou concepte s'engloba el seguiment de molts paràmetres vinculats a les matèries primeres, el procés de producció, el de purificació, etc.

La qualitat de les matèries primeres i els excipients per a la producció de productes per l'indústria farmacèutica està clarament regulada i hi ha test de control de qualitat que comproven que els requeriments necessaris siguin establerts. Però el fet de que hi hagi aquest seguiment no treu que sovint la metodologia emprada sigui prou específica i/o ràpida perquè sigui operativa. Per això és convenient el desenvolupar eines ràpides i sensibles que aprofitin les avantatges de la moderna biologia molecular, la bioquímica i la química analítica. Nous tests de tipus “lab – on – chip” podrien ser força interessants.

Si s'analitza la situació actual dels bioprocessos de cara a la implementació de les PAT es pot comprovar com tant la monitorització com el control dels mateixos ha evolucionat poc perquè s'han destinat molts recursos a la creació i desenvolupament de productes i eines de caràcter genètic i molecular, i s'han deixat de banda aspectes tant importants, en d'altres sectors, com són el seguiment del procés i la necessitat d'obtenir-ne una òptima rendibilitat.

Generalment només es disposa de mesures bàsiques de caràcter físic (temperatura, pes, pressió, conductivitat, cabal, nivell d'escumes, agitació i potència aplicada) i de caràcter químic (pH, pO₂, redox i concentracions de O₂ i de CO₂) *in - situ*.

Pràcticament no s'han desenvolupat equips per obtenir informació en temps real del procés productiu. La aplicació d'alguns sistemes de mesura analítiques “on – line” o “at – line” com són els sistemes d'infraroig proper (NIR) per glucosa o densitat cel·lular, sistemes

d'anàlisi per injecció de flux (FIA) i sistemes fluorimètrics han estat més una excepció que una regla a seguir.

Els processos de purificació són la fase que suposa una despesa econòmica més elevada i a més, són processos molt més fàcils de comprendre que no pas els que es donen dins d'un cultiu cel·lular, per això és molt fàcil implementar les PAT. Aquests poden permetre l'optimització de la purificació per poder minimitzar les despeses variables generades en aquesta etapa.

Centrant-nos en el procés productiu que és del qual forma part el treball d'aquesta memòria, s'han desenvolupat diferents eines per a la seva aplicació a la monitorització de bioprocessos però que només han tingut aplicació a nivell de recerca. El NIR i l'espectroscòpia d'infraroig (IR) son eines força interessants per a l'anàlisi quantitativa química per la seva especificitat. Una altra eina potent pot ser la utilització de l'ús de la fluorescència per al seguiment de espècies contingudes en el medi de cultiu com són la glucosa, etanol, biomassa i antibiòtics (Känsäkoski *et al.*, 2006). Els biosensors instal·lats en sistemes FIA també poden ser una solució altament específica per a la mesura enzimàtica de glucosa, sacarosa i lactat.

D'altra banda hi ha una nova generació de sensors que han sorgit de l'alt desenvolupament de la electrònica que ha permès desenvolupar sensors virtuals que són, típicament, ordinadors amb programari específic per poder estimar i predir els valors de les variables d'estat basant-se en la mesura d'una variable més accessible.

Totes aquestes eines poden facilitar una informació davant d'un procés que sovint és difícil de reproduir i molt sensible a petites variacions i que per això requereix ser entès i controlat per garantir un producte final de qualitat.

La necessitat d'aquest obliga al desenvolupament d'eines específiques per a cada una de les fases del procés de producció però en aquest punt cobra una gran rellevància el control i l'optimització, requerint el desenvolupament de models i eines de simulació en combinació amb estratègies de control per processos dinàmics, amb mesures analítiques "at – line" i "on – line" i amb anàlisi de flux metabòlic.

Un dels casos més representatius d'aquesta necessitat es veu reflectit amb el complicat i llarg (entre 4 i 6 dies) procés de producció de proteïnes recombinants emprant el llevat *P. pastoris* (Känsäkoski *et al.*, 2006). Recentment, s'han publicat estudis que presenten propostes per millorar l'estabilitat i productivitat de les fermentacions amb *Pichia* com són (Jahic *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Resina *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

En conclusió, l'aplicació de les PAT als bioprocessos pot suposar una millora dels processos productius en tots els seus àmbits però per això caldrà desenvolupar moltes eines i sistemes específics per al món de la biotecnologia que en un futur immediat requerirà que es facin treballs de recerca com el que aquí es presenta.

3.6. ROL – *Rhizopus oryzae* lipasa

Els fongs del gènere *Rhizopus* són productors naturals d'enzims lipolítics. S'han descrit més de 30 lipases diferents produïdes per aquests, de les quals en destaquen la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL), la lipasa de *Rhizopus delemar* (RDL) i la lipasa de *Rhizopus javanicus* (RJL) i que tenen un alt grau d'homologia (Minning *et al.*, 1998).

La lipasa amb la qual es duu a terme el treball descrit en aquesta memòria és la del fong *Rhizopus oryzae* que creix en el fruit de la palma. Aquest enzim es produeix de forma extracel·lular i es caracteritza per tenir un pes molecular de 32kDa, 392 aminoàcids (Beer *et al.*, 1998), tres ponts disulfur i quatre llocs potencials de N-glicosilació (Bensalah *et al.*, 1994). Aquesta és, a més a més, una excepcional proteïna model perquè obliga al microorganisme a realitzar modificacions posttraduccionals perquè la proteïna sigui activa. S'han descrit diverses aplicacions industrials per a la ROL, entre les quals destaquen la utilització per a síntesi de metil esters, a partir de l'oli de soja, per a la obtenció de biodiesel (Kaieda *et al.*, 1999) i la purificació de determinats compostos a través de la seva regioespecificitat.

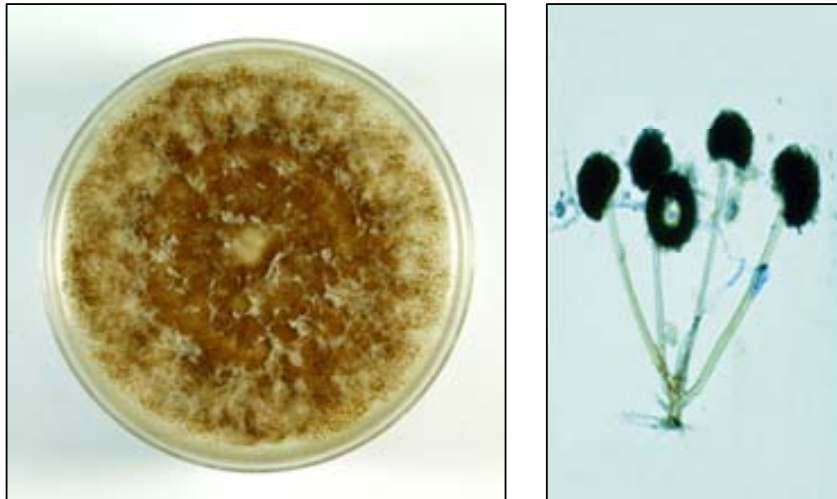


Figura 3.1. Llevat *Rhizopus oryzae*

3.7. Treballs realitzats amb ROL

Els treballs previs realitzats amb ROL comencen amb l'expressió aconseguida per Beer, *et al.*, (1996) emprant el sistema d'expressió de *E. coli*. Aquest sistema d'expressió provoca la formació de cossos d'inclusió que no fan detectar l'enzim. La formació dels cossos d'inclusió és una resposta davant de la toxicitat de ROL per al microorganisme. La purificació posterior permet assolir una concentració de 10 a 15 mg de ROL activa per litre, però encareix substancialment el procés productiu.

Posteriorment, s'ha pogut vèncer aquesta limitació mitjançant els treballs de Di Lorenzo, *et al.*, (2005) que han permès obtenir una ROL activa i correctament plegada amb la soca de *E. coli origami* (DE3).

Resultats semblants s'han obtingut amb el llevat *S. cerevisiae* que ha permès obtenir de forma extracel·lular la ROL però assolint nivells de producció activa inferiors (Takahashi *et al.*, 1998).

Els primers en produir ROL en *P. pastoris* han estat Minning *et al.*, (1998). Aquest han produït, sota el control del promotor *AOX1*, 60 mg per litre de cultiu en un volum de fermentació de cinc litres. Les característiques de la proteïna obtinguda són 30kDa, un pH òptim d'activitat de 8.1 a 30°C i un punt isoelèctric al voltant de 9.3.

En els darrers anys, aquest procés ha estat àmpliament estudiat en el grup de bioprocessos del departament d'enginyeria química de la UAB, intentant identificar i optimitzar el

bioprocés per a poder reduir els seus colls d'ampolla, tocant des d'aspectes genètics i fisiològics a operacionals i de monitorització i control (Cos *et al.*, 2006a; Cos *et al.*, 2006b; Resina *et al.*, 2004; Resina *et al.*, 2005; Ramon *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 2006; Cos *et al.*, 2005b; Minning *et al.*, 2001).

Cos *et al.*, (2006a) han realitzat experiments, demostrant la importància de mantenir una determinada concentració de metanol en el cultiu per poder incrementar la productivitat del procés. Han comprovat que la concentració de substrat és un dels paràmetres claus en la producció de ROL emprant *P. pastoris* i el promotor *AOX* per a una soca Mut^s.

Capítol 4. Materials i mètodes

Aquest capítol recull el material, equipament i protocols emprats de forma genèrica al llarg del treball experimental descrit en aquesta memòria.

4.1. Soques

Les soques emprades per a la realització d'aquest treball experimental es recullen a la taula 4.1.

Taula 4.1. Soques emprades en les diferents etapes del treball experimental.

Soca	Nomenclatura emprada	Fenotip	Nombre de còpies de ROL	Auxotròfia his
X33 clon 7	Mut ⁺ _s	Mut ⁺	una	his ⁺
X33500_1	Mut ⁺ _m	Mut ⁺	múltiples	his ⁺
KM100_1	Mut ^s _s	Mut ^s	una	his ⁺
KM1500_3	Mut ^s _m	Mut ^s	múltiples	his ⁺

Els subíndexs “s” i “m” emprats en aquesta taula fan referència a l'inicial de les sigles en anglès de una còpia o múltiples còpies, single copy i multicopy, respectivament.

4.2. Equipament emprat

L'equipament emprat per a la realització del treball experimental descrit en aquesta memòria es recull a la figura 4.1.

En aquesta figura s'inclou tot l'equipament que ha estat necessari per poder realitzar la monitorització i estratègies de control que es descriuran a continuació. Part dels elements han estat descrits de forma més concreta als resultats.

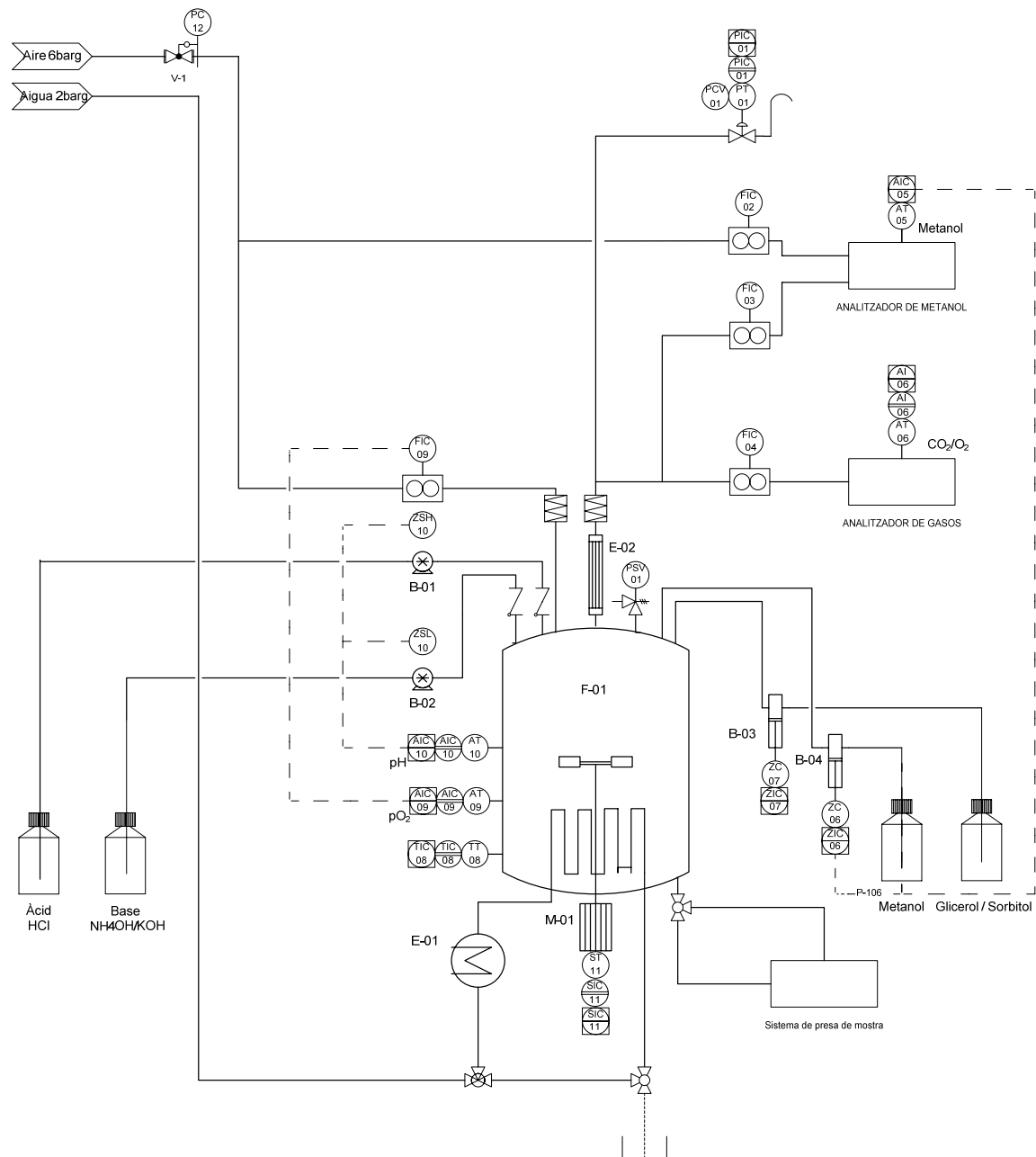


Figura 4.1 Diagrama de procés del muntatge experimental.

4.2.1. Fermentadors (F – 01)

Aquest és l'element principal del sistema en qüestió, espai físic on es realitzen els cultius. Aquest equip (F-01), per raons de caire tècnic, ha estat durant un període de temps un Biostat ED (B. Braun, Melsungen, Alemanya) i durant d'altres un Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya), ambdós equips comercials i de característiques conegudes (figura 4.2). Ambdós equips consten de tres mòduls: un de cultiu que inclou la cuba de fermentació, les sondes que monitoritzen el procés i el sistema d'agitació; els segon mòdul, la DCU, on s'adquireix la informació corresponent a les sondes i on es troben implementats els controladors de pH (AIC-03), pO₂ (AIC-04), temperatura (TIC-01) i agitació (SIC-01) i finalment el mòdul de maniobra, que inclou tot l'aparellatge elèctric, pneumàtic i hidràulic que permet mantenir constants els paràmetres bàsics del cultiu i en el cas del primer dels fermentadors, la seva esterilització *in – situ*.



Figura 4.2. Els fermentadors Biostat B (B. Braun, Melsungen, Alemanya) –esquerra - i Biostat ED (B. Braun, Melsungen, Alemanya) – dreta.

A més a més, hi ha una sèrie d'equips associats que permeten realitzar la resta de la monitorització, llaços i accions de control que són:

4.2.2. Analitzador de gasos (A – 01)

Per poder monitoritzar les concentracions d'oxigen i diòxid de carboni presents en els gasos de sortida del cultiu biològic, s'empra l'equip Multor 610 (Mahiak, Hamburg, Alemanya). Aquest equip (A-01) permet la mesura de l'oxigen mitjançant una cel·la

paramagnètica i la del diòxid de carboni mitjançant una mesura de l'absorció d'infraroig no dispers (NDIR).

Aquest analitzador rep un cabal constant de gasos de sortida del fermentador que s'aconsegueix mitjançant un mesurador / controlador de flux màssic (FIC-04)

4.2.3. Llaç de control de metanol(A – 02)

El llaç de control de substrat per als cultius realitzats amb soques que empenen el metanol com a font de carboni utilitza el sensor MC – 168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA), descrit amb profunditat al *Capítol 5. Eliminació d'interferències en la mesura de metanol*. Aquest mesurador rep un cabal constant de gasos de sortida del fermentador mitjançant el mesurador / controlador de cabal FIC-03 que es mescla amb un corrent d'aire de xarxa a un cabal determinat pel mesurador / controlador de cabal FIC-02. El corrent resultant permet obtenir una mesura de la concentració de metanol en el medi de cultiu, a través de l'analitzador de metanol. Aquesta mesura es recollida per un ordinador que aplica una llei de control determinada i que envia l'acció corresponent a una microbureta motoritzada (B-04) model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya). Aquesta dispensa la quantitat corresponent per fer realitat l'objectiu de control.

4.2.4. Llaç de control de pressió

El llaç de control de pressió permet mantenir una petita sobrepressió constant de 0.1 bar a l'interior del fermentador que garanteix un equilibri líquid – gas estable i una solubilitat més elevada del metanol i de l'oxigen presents.

Aquest llaç de control funciona mitjançant una mesura de la pressió a la línia de sortida del fermentador realitzada mitjançant un transmissor de pressió (PT-01) MCR- P/U/I-0-1000/DC (Phoneix Contact, Blomberg Alemanya). Aquesta mesura és enviada a un controlador (PIC-01) Trovis 6496 (Samson, Rubí, Espanya) que mitjançant un algorisme de control PID envia un senyal elèctric a un conjunt d'actuació (PCV-01). Aquest està constituït per un transmissor – posicionador Samson 3760 (Samson, Rubí, Espanya) que permet convertir el senyal elèctric a pneumàtic, aquest és rebut per l'actuador Samson 3277 (Samson, Rubí, Espanya) que modifica l'obertura de la vàlvula Samson 3510 (Samson, Rubí, Espanya) i que fa possible mantenir la sobrepressió a l'interior del fermentador.

4.2.5. Addicions programades de substrat

Per a la realització d'algunes de les etapes vinculades al procés fermentatiu (addició pre – programada per mantenir una velocitat de creixement constant i etapes de transició) s'ha de poder realitzar una addició controlada en llaç obert d'alguns dels substrats. Amb aquesta finalitat es disposa de les microburetes motoritzades (B-03 i B-04) model microBUR 2031 (Crison, Alella, Espanya) que mitjançant l'ordre donada des d'un ordinador dispensen de forma periòdica les quantitats establertes per l'estratègia programada.

4.2.6. Equipament informàtic

Tots els anteriors equips estan monitoritzats i controlats per un maquinari que fa de suport per poder implementar tot el programari necessari per poder dur a totes les estratègies de control proposades i per poder recollir en forma de base de dades la informació vinculada a cada cultiu.

El programari emprat per poder realitzar la implementació de les diferents estratègies és el programari Visual Basic 6.0 i el potent programari de càlcul MATLAB 6.5.0.1.80913a Release 13.

4.3. Medis de cultiu

4.3.1. Medi per a cultius en discontinu

Per a la preparació d'un litre de medi per un cultiu discontinu s'empren les quantitats tabulades a la taula 4.2.

Taula 4.2. Composició del medi per cultius discontinus

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Sulfat amònic - (NH ₄) ₂ SO ₄	25	Panreac	141140	P
Metanol - CH ₃ OH	10	Panreac	161091	P
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.7	DIFCO	223054	
Antiescumejant J673	1 gota	Strucktol	02041	

Per controlar el pH s'utilitza una solució estèril de KOH (1 M) subministrat per les bombes peristàltiques. Abans d'inocular s'introdueixen 4.35 ml l⁻¹ de micronutrients (4.3.4. *Micronutrients*) i 2 ml l⁻¹ de la solució de biotina 500X.

4.3.2. Medi per a cultius en semicontinu AOX

Extret del manual que subministra Invitrogen (2000), medi sintètic utilitzat per a cultius en semicontinu. La composició del medi per litre és la inclosa a la Taula 4.3.

Taula 4.3. Composició del medi per a cultius en semicontinu per AOX

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Àcid ortofosfòric (85%) – H ₃ PO ₄	26.7 ml	Panreac	131032	P
Sulfat de calci – CaSO ₄	0.93	Panreac	121253	PA
Sulfat de potassi – K ₂ SO ₄	18.2	Panreac	141532	P
Sulfat de magnesi heptahidratat – MgSO ₄ · 7H ₂ O	14.9	Panreac	131404	P
Hidròxid de potassi – KOH	4.13	Panreac	141515	P
Glicerol – HOCH ₂ -CHOH-CH ₂ OH	40	Panreac	141339	P
Hidròxid amònic(30%) - NH ₄ OH	Control pH	Panreac	141130	P

Observacions: alguns d'aquests components són insolubles i la solució presenta una mica de terbolesa. El medi és completat amb 4.35 ml de solució de micronutrients (4.3.4. *Micronutrients*) per litre de medi i 2 ml l⁻¹ de la solució de biotina 500X. Per controlar el pH s'utilitza la solució d'amoníac al 30 % durant la fase discontinua de creixement amb glicerol i KOH 5M per la fase d'inducció amb metanol

4.3.3. Medi per a cultius en semicontinu *FLD*

Composició inicial del medi utilitzat en alguns estudis en cultiu en semicontinu (d'Anjou i Daugulis 2001). La composició per litre és la de la Taula 4.4.

Taula 4.4. Composició del medi per cultius en semicontinu per *FLD*

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Glicerol – HOCH ₂ -CHOH-CH ₂ OH	40	Panreac	141339	P
Sulfat d'amoni – NH ₄ OH	20	Panreac	141140	P
Potassi dihidrogen fosfat – KH ₂ PO ₄	12	Panreac	141509	P
Sulfat de magnesi heptahidratat – MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.7	Panreac	131404	P
Clorur de calci anhidre – CaCl ₂	0.36	Panreac	121221	PA

Observacions: medi sense precipitats i sense terbolesa. El medi és completat amb 4.35 ml de solució de micronutrients (4.3.4. *Micronutrients*) per litre de medi. El pH es manté a 5.5 amb l'addició controlada d'hidròxid de potassi 5 M.

4.3.4. Micronutrients

Per a la preparació d'un litre de solució de micronutrients s'empren les quantitats tabulades a la taula 4.5.

Taula 4.5. Composició de la solució de micronutrients

Nom	Pes (g) Volum (ml)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Sulfat de coure pentahidratat – CuSO ₄ · 5H ₂ O	6.0	Merck	2790	PA
Iodur de sodi – NaI	0.08	Panreac	141726	P
Sulfat de manganès monohidratat – MnSO ₄ ·H ₂ O	3.0	Panreac	131413	PA
Molibdat de sodi dihidratat – Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2	Panreac	141701	P
Àcid bòric – H ₃ BO ₃	0.02	Panreac	131015	PA
Clorur de covalt – CoCl ₂	0.5	Merck	2539	PA
Clorur de zinc – ZnCl ₂	20.0	Panreac	141779	P
Sulfat de ferro heptahidratat – FeSO ₄ ·7H ₂ O	65.0	R. Haen	31236	PA
Biotina	0.2	Sigma	B4501	
Àcid sulfúric – H ₂ SO ₄	5.0	Panreac	211058	QP

4.4. Tècniques microbiològiques

4.4.1. Preparació plaques de Petri (YPD)

Per preparar un total d'1 litre (aprox. 20 – 30 plaques):

- Dissoldre 10 g. d'Extracte de Llevat, 20 g. de Peptona i 20 g. d'Agar en 900 ml d'aigua destil·lada.
- Esterilitzar durant 30 minuts a 121°C.
- Amb l'ampolla calenta (35-40 °C), afegir 100 ml de solució de Dextrosa 10 X.
- Omplir les plaques de Petri, en condicions estèrils, i esperar que solidifiquin en refredar-se.

4.5. Mètodes analítics

4.5.1. Determinació de la concentració de biomassa total

Per a la mesura de la concentració de biomassa total (suma de la viable i no viable) existent al fermentador s'han emprat dos mètodes, per pes sec i per densitat òptica.

— Pes sec

- Recollir en un tub 5 ml de mostra i centrifugar a 12000 rpm durant 5 minuts.
- Separar la solució del pèl·let.
- Resuspendre el pèl·let en 5 ml de solució isotònica (NaCl 0.9% en pes) i tornar a centrifugar-la.
- Repetir els passos de separació, centrifugació i separació.
- Resuspensió del pèl·let resultant en 5 ml d'aigua destil·lada.
- Passar la solució resultant per un filtre de microfibra de vidre (Whatman GF/F, Maidstone, Regne Unit), prèviament tarat en sec.
- Rentar amb 10 ml d'aigua destil·lada per assegurar que només queda la biomassa i per que es dissolguin les possibles sals d'alguns components del medi.
- Assecament, durant 24 hores, en una estufa a 100°C. Temps suficient per arribar a pes constant.
- Refredat en un dessecador amb sílica gel.

- La concentració de biomassa es pot calcular com la diferència de pes entre la tara del filtre i el pes final amb biomassa dividint aquest valor pel volum de mostra utilitzat.

La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és entorn al 5% del rang de mesura.

— *Densitat òptica*

La densitat òptica consisteix en una mesura de l'opacitat d'una mostra a la longitud d'ona de màxima absorbància per *P. pastoris*, 600 nm. Per fer la mesura de la densitat òptica cal.

- Recollir una mostra fresca.
- Resuspendre emprant el vòrtex
- Fer dilucions de la mostra fins que la lectura obtinguda quedi dins del rang de linealitat (establert entre 0 i 0.8 unitats d'absorbància)
- El valor resultant es correlaciona amb una corba de calibratge feta amb pes sec.

4.5.2. Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular

Aquesta anàlisi està basada en una modificació del test (nº 1821792, Roche, Mannheim, Alemanya) desenvolupat per a la detecció de la lipasa humana. El pH i la temperatura fixades pel test han estat modificats atesa la diferent naturalesa de la lipasa, utilitzant les condicions on la lipasa de ROL presenta la màxima activitat (pH: 7.4 i 30 °C) (Minning *et al.*, 1998).

Las lipases es defineixen com triacilgliceridohidrolasas que catalitzen la degradació dels triglicèrids a diglicèrids (alguns inestables) amb la posterior formació de monoglicèrids i àcids grassos, com a productes finals. El mètode utilitzat es basa en la degradació d'un substrat cromòfor específic per a la lipasa, el 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-àcid glutàric-(6-metilresorfurna)-ester.

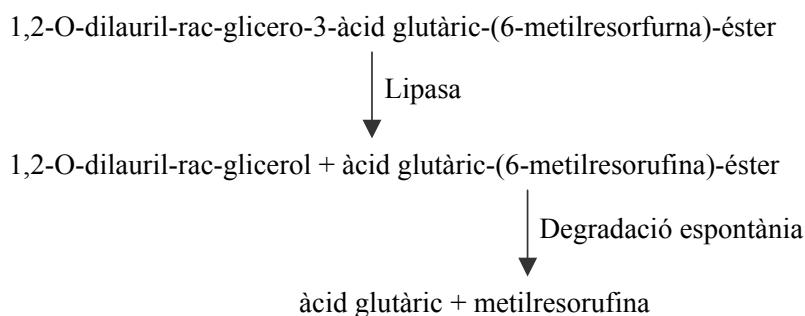


Figura 4.3. Reacció utilitzada per a la quantificació de l'activitat lipolítica.

En solució alcalina, l'èster es degrada sota l'acció catalítica de la lipasa formant-se el 1,2-O-dilauril-rac-glicerol i l'àcid glutàric-(6-metilresorufina)-èster, producte intermedi inestable. Aquest últim es degrada espontàniament en àcid glutàric i metilresorufina, compost de color vermell, el qual és directament proporcional a l'activitat lipolítica existent a la mostra. L'aparició del producte de color és mesura fotomètricament.

L'activitat lipolítica de la lipasa es calcula com la velocitat d'aparició del producte de color, la metilresorufina. Per tant, es correlacionarà el pendent de la recta d'aparició de producte amb l'activitat lipolítica del medi.

La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és entorn al 3% del rang de mesura.

4.5.3. Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular

Es recullen entre 5 i 10 ml de mostra, en funció de la fase de creixement on es trobi el microorganisme, i es centrifuguen a 5000 xg (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa) durant 10 min. Les cèl·lules es resuspenen en tampó Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 i es tornen a centrifugar. Un cop separat el sobrenedant, les cèl·lules es resuspenen en un volum final de 5 ml amb el tampó utilitzat en el pas anterior. D'aquí es prenen 600 µl per a la desintegració ultrasònica de les cèl·lules en suspensió, en un sonicador BRAUN Labsonic 2000 (Melsungen, Alemanya). Tot el procés cal realitzar-lo a 4 °C.

L'amplitud d'ona utilitzada en la sonicació es troba entre 170 – 176W min⁻¹ i el temps de sonicació total és de 7 minuts en intervals d'un minut. Durant tot el procés es manté la mostra entre 0-4 °C, mitjançant un bany de gel i sal. El sobrenedant és recollit per determinar l'activitat lipolítica intracel·lular utilitzant el mateix mètode que per l'extracel·lular.

L'activitat lipolítica intracel·lular ve expressada com unitats d'activitat lipolítica per mil·ligram de biomassa seca ($UA\ mg^{-1}$) i es calcula a partir de la concentració de biomassa en pes sec, obtinguda a partir d'una mostra extreta al mateix temps que la mostra emprada en la determinació de l'activitat intracel·lular, amb la equació 4.1.

$$UA\ mg\ de\ biomassa^{-1} = \frac{UA\ ml^{-1} \cdot Vf_{inal}}{V_{MOSTRA} \cdot X} \quad (\text{eq. 4.1})$$

on:

UA: Unitats d'activitat lipolítica.

V_{MOSTRA} : Volum de la mostra utilitzada per a la determinació de l'activitat lipolítica (ml).

X: Valor en pes sec de la biomassa de la mostra ($mg\ ml^{-1}$).

4.5.4. Determinació de la concentració de glicerol i sorbitol

El glicerol és determinat per HPLC amb l'equip HP 1050 líquid chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna de bescanvi iònic Aminex HPX-87H (Bio-rad). Com a fase mòbil s'utilitza una solució d'àcid sulfúric 15 mM amb un volum d'injecció de 20 μ l.

Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millenium 2.15.10 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA).

La desviació estàndard resisual (RSD) d'aquest mètode és del 3 % .

4.5.5. Determinació de la concentració de metilamina

La metilamina s'ha quantificat per HPLC amb l'equip HP 1090 líquid chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna per anàlisi d'aminoàcids de bescanvi iònic Hypersil AA-ODS (Agilent Technologies Avondale, PE, USA). Com a eluents s'empren una solució 20 mM d'Acetat sòdic, 0.3% THF i 0.017% de trietilamina i una solució 20mM d'acetat sòdic + acetonitril + metanol.

Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millenium 2.15.10 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA).

La desviació estàndard resisual (RSD) d'aquest mètode és del 7 % .

4.5.6. Determinació de la concentració de metanol

El metanol és analitzat per cromatografia gasosa per l'equip HP 5890 gas chromatography (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) utilitzant una columna capil·lar Tracil TR-FFAP de 25m x 0.53 mm X 1 µm (Tracer-Teknokroma, St. Cugat del Vallès, Barcelona, Espanya) i equipat amb un injector automàtic (HP 7376) i un detector de tipus FID. Les condicions d'operació són 200°C i 280°C per a l'injector i el detector, respectivament. La temperatura interior del forn segueix un perfil que comença a 40 °C (2 min), amb un increment constant de 20°C min⁻¹ fins arribar a 200 °C, mantenint-se a aquesta temperatura final durant 5 minuts. El temps total de mesura és d'uns 15 minuts. S'utilitza un cabal gasós de 9 ml min⁻¹ d'heli per arrossegar la mostra per l'interior de la columna. El gas combustible del detector és l'hidrogen.

La mesura es porta a terme amb un patró intern d'isopropanol de concentració coneguda (4 g l⁻¹) barrejat al 50 % (v/v) amb la mostra prèviament filtrada amb un filtre de 0.45 µm (Durapore, Millipore, Bedford, USA). Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millennium 32 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és entorn al 2% del rang de mesura.

4.5.7. Determinació de la concentració d'amoni

L'elèctrode selectiu d'amoni disposa d'una membrana hidrofòbica permeable a gasos per separar la mostra d'una solució interna de l'elèctrode que conté clorur d'amoni.

El mètode de l'elèctrode selectiu de d'amoníac és basa en un elèctrode que té una membrana hidrofòbica i permeable a gasos que separa la solució mostra de una solució interna de l'elèctrode de clorur d'amoni.

L'amoníac NH₃(aq) i l'NH₄⁺ són convertits a NH₃(g) portant la solució a pH 11 amb una base forta. Llavors NH₃(g) difon a través de la membrana i canvia el pH de la solució interna. Aquest canvi és detectat per un elèctrode de pH. La concentració de clorurs a la solució interna es mesura mitjançant un elèctrode selectiu que s'empra com a elèctrode de referència.

Aprofitant que les amines són un possible interferent d'aquest tipus de sensors s'empra per fer mesures que es descriuen al *Capítol 9. Sistema automàtic d'anàlisi de compostos nitrogenats*.

El procediment emprat per dur a terme l'anàlisi consisteix en posar la mostra a analitzar en un recipient agitat i amb l'elèctrode submergit, afegir la quantitat suficient d'una solució

10M de NaOH per assolir un pH de 11 i esperar fins l'estabilització de la lectura del sensor.

La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és entorn al 4 % del rang de mesura.

4.6. Càlculs

En aquest apartat es presenten les bases teòriques i les eines utilitzades per al càlcul d'alguns paràmetres que ajuden a interpretar i obtenir més informació dels cultius.

4.6.1. Càlcul de l'OUR, CER i RQ

Dinàmica de l'oxigen dissolt:

Una de les principals característiques de les fermentacions aeròbies és el subministrament d'oxigen per als requeriments energètics dels microorganismes. Aquest fenomen, anomenat respiració, es pot donar per diferents vies metabòliques, en funció del tipus de substrat i/o microorganisme.

Per tal d'aconseguir la transferència de l'oxigen gasós en el sí de la fase líquida es bombolleja aire per la part inferior del fermentador mitjançant un difusor o "sparger". La quantitat i les dimensions de les bombolles que passen a través del líquid determinen l'eficàcia de la transferència de l'oxigen.

El balanç d'oxigen dissolt en un fermentador en cultiu en discontinu o semicontinu es regeix per la següent equació:

$$\frac{dO_2}{dt} = OTR - OUR \quad (\text{eq. 4.2})$$

on:

OTR : ("Oxygen Transfer Rate") Velocitat de transferència d'oxigen de la fase gasosa cap a la fase líquida ($\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

O_2 : Concentració d'oxigen dissolt en el reactor ($\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$).

OUR: ("Oxygen uptake rate") Velocitat de consum d'oxigen per part del microorganismes. ($\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

Si es vol modelitzar la transferència de l'oxigen de la fase gasosa cap a la fase líquida, es pot fer servir la següent equació:

$$OTR = k_{La} \cdot (O_2^{sat} - O_2) \quad (\text{eq. 4.3})$$

on:

k_{La} : Coeficient global de transferència d'oxigen referit a la fase líquida.

O_2^{sat} : Concentració de saturació d'oxigen dissolta a la fase líquida.

El k_{La} depèn directament de les variables que poden millorar la transferència d'oxigen des de la fase gasosa cap a la fase líquida. Algunes d'aquestes variables poden ser entre d'altres, el cabal d'aire subministrat, la temperatura i la quantitat i grandària de les bombolles de gas en contacte amb el líquid.

A l'estat estacionari si es considera que la variació de l'oxigen dissolt de la fase gas amb el temps són aproximadament zero, es pot calcular la velocitat de consum d'oxigen ($\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) com:

$$OUR = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{ent,O_2} - X_{sort,O_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O_2} - X_{ent,CO_2})}{(1 - X_{sort,O_2} - X_{sort,CO_2})} \right] \quad (\text{eq. 4.4})$$

on:

k' : Factor de conversió ($2.65 \text{ mol total min l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (P: 1.1 bar i T: 303 K)(Per un gas ideal).

V_R : Volum del reactor (l).

F_{ent} : Cabal d'aire d'entrada (l min^{-1}).

X_{ent,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent d'aire d'entrada ($\text{mol O}_2 \text{ mol total}^{-1}$).

X_{sort,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent de gas de sortida. ($\text{mol O}_2 \text{ mol total}^{-1}$)

X_{ent,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent d'aire d'entrada. ($\text{mol O}_2 \text{ mol total}^{-1}$)

X_{sort,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent de gas de sortida. ($\text{mol O}_2 \text{ mol total}^{-1}$)

OUR: velocitat de consum d'oxigen. ($\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

La velocitat de consum d'oxigen (OUR) depèn directament de la velocitat de creixement dels microorganismes. Aquesta dependència es pot aproximar experimentalment a una equació lineal de la següent forma:

$$OUR = \left(\frac{1}{Y_{x/o}} \cdot \mu + m_{o/x} \right) \cdot X \quad (\text{eq. 4.5})$$

on:

$Y_{x/o}$: Rendiment (g X mol O₂ consumit⁻¹).

μ : Velocitat específica de creixement. (h⁻¹).

OUR: velocitat de consum d'oxigen. (mol O₂ l⁻¹ h⁻¹).

X: Concentració de biomassa (g X l⁻¹).

$m_{o/x}$: Coeficient de manteniment (mol O₂ g X⁻¹ h⁻¹).

El coeficient de manteniment té en compte la respiració endògena del microorganisme no associada al creixement.

— *Dinàmica del diòxid de carboni dissolt*

El diòxid de carboni també desenvolupa un paper important en les fermentacions aeròbies com a producte de les reaccions de descarboxilació.

Si es realitza el balanç de matèria per al diòxid de carboni a la fase líquida en el fermentador s'obté la següent expressió:

$$\frac{dCO_2}{dt} = CER - CTR \quad (\text{eq. 4.6})$$

on:

CO₂: Concentració de diòxid de carboni a la fase líquida (mol CO₂ l⁻¹).

CER: (CO₂ Evolution rate) Velocitat de producció de CO₂ a causa del creixement del microorganisme (mol CO₂ l⁻¹ h⁻¹).

CTR: (CO₂ Transfer rate) Velocitat de transferència de diòxid de carboni de la fase líquida cap a la fase gasosa (mol CO₂ l⁻¹ h⁻¹).

El diòxid de carboni és molt més soluble en l'aigua que l'oxigen (aproximament tres vegades més). A diferència de l'oxigen, el diòxid de carboni reacciona amb l'aigua, formant àcid carbònic (H₂CO₃) que es dissocia en hidrogen carbonat (HCO₃⁻) i carbonat (CO₃²⁻).

A la figura 4.4 es descriu el seguit de reaccions d'associació i dissociació que tenen lloc en el procés.

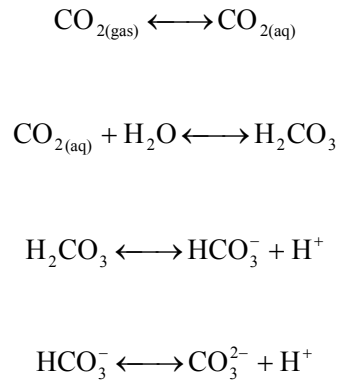


Figura 4.4. Reaccions del diòxid de carboni a la fase líquida.

La velocitat de formació de l'àcid carbònic a partir del diòxid de carboni en la fase aquosa es força lenta comparada amb les seves reaccions de dissociació a hidrogen carbonat i carbonat. Es pot tenir una idea d'aquesta magnitud a partir de la relacions d'equilibri de cadascuna de les reaccions a la fase líquida.

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_{2(\text{aq})}]} = 10^{-3} \quad (\text{eq. 4.7})$$

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{2.5 \cdot 10^{-4}}{[\text{H}^+]} \quad (\text{eq. 4.8})$$

$$\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{6 \cdot 10^{-11}}{[\text{H}^+]^2} \quad (\text{eq. 4.9})$$

Com es pot observar a les diferents relacions d'equilibri, la concentració de carbonat depèn de la concentració de protons en el medi. Per tant, a pHs àcids la concentració de les espècies derivades de l'àcid carbònic és menor que a pHs bàsics. En fermentacions amb llevats normalment es treballa amb un rang de pH entre 4 i 7. En aquest rang de pH es poden ignorar les diferents reaccions cap a la formació de carbonat, sempre i quan no hi hagi canvis molt sobtats de pH (Royce 1992).

Si es considera que el pH és constant, és a dir, que no hi ha pràcticament reacció del CO_2 en fase aquosa per formar carbonat, llavors es pot definir la velocitat de producció de CO_2 (CER mol $\text{CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) com:

$$CER = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{ent,CO_2} - X_{sort,CO_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O_2} - X_{ent,CO_2})}{(1 - X_{sort,O_2} - X_{sort,CO_2})} \right] \quad (\text{eq. 4.10})$$

on:

k' : Factor de conversió (2.65 mol total min $\text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (P: 1.1 atm i T: 303 K) (Per un gas ideal)

V_R : Volum del reactor (l).

F_{ent} : Cabal d'aire d'entrada (l/min).

X_{ent,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent d'aire d'entrada (mol CO_2 mol total $^{-1}$).

X_{sort,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent de gas de sortida (mol CO_2 mol total $^{-1}$).

X_{ent,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent d'aire d'entrada (mol CO_2 mol total $^{-1}$).

X_{sort,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent de gas de sortida (mol CO_2 mol total $^{-1}$).

A l'igual que en el cas de l'oxigen la velocitat de producció de diòxid de carboni (CER) depèn directament de la velocitat de creixement dels microorganismes. Aquesta dependència es pot aproximar experimentalment a una equació lineal de la següent forma:

$$CER = \left(\frac{1}{Y_{x/CO_2}} \cdot \mu + m_{CO_2/X} \right) \cdot X \quad (\text{eq. 4.11})$$

on:

Y_{x/CO_2} : Rendiment (g X mol CO_2 produït $^{-1}$).

μ : Velocitat específica de creixement. (h^{-1}).

CER: Velocitat de producció de diòxid de carboni. (mol $\text{CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

X: Concentració de biomassa (g X l^{-1}).

$m_{CO_2/X}$: Coeficient de manteniment (mol CO_2 g X $^{-1} \text{ h}^{-1}$).

El coeficient de manteniment té en compte la respiració endògena del microorganisme no associada al creixement.

— *Quocient respiratori (RQ)*

Per a la generació d'energia per al manteniment i creixement del microorganisme les cèl·lules oxiden la matèria orgànica a aigua, diòxid de carboni i subproductes, per tant al mateix temps que consumeixen oxigen, produeixen diòxid de carboni a velocitats

determinades per l'OUR i la CER, respectivament. Aquestes velocitats estan directament relacionades i la seva relació constitueix un indicador de l'activitat metabòlica anomenat quocient respiratori, RQ (Respiration Quotient).

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (\text{eq. 4.12})$$

És conegut que el RQ varia segons la naturalesa del substrats consumits i els productes resultants de l'activitat del microorganisme. Alguns autors (Royce 1992; Bonarius *et al.*, 1995) utilitzen el quocient respiratori com a paràmetre metabòlic a partir del qual es pot identificar quin és el substrat que utilitza el microorganisme per créixer.

4.6.2. Càlcul de la μ , q_s i q_p

A partir de les principals variables de seguiment durant la fermentació, la concentració de biomassa, de substrat i d'enzim es poden calcular les velocitats específiques de creixement (μ), de consum de substrat (q_s) i de producció d'activitat lipolítica (q_p), respectivament.

Aquestes variables poden donar informació molt valuosa per analitzar a posteriori l'evolució de la fermentació, per relacionar-les amb l'estat fisiològic del microorganisme i per a la detecció de canvis de comportament.

A continuació es dedueixen cadascun d'aquests paràmetres dels corresponents balanços, per al cultiu discontinu i semicontinu.

4.6.3. Cultiu en discontinu

— Biomassa

Fent un balanç de matèria per a la biomassa en un reactor en discontinu:

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

Els termes d'entrada (E) i de sortida (S) són nuls ja que no s'introdueix ni s'extreu biomassa durant el cultiu, únicament es genera a partir dels substrats acumulant-se en el seu interior.

$$0 + r_X \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.14})$$

Reordenant els diferents termes s'obté:

$$r_X \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot X \quad (\text{eq. 4.15})$$

L'expressió de la velocitat de producció de biomassa es pot substituir per la seva expressió dependent de la velocitat específica de creixement sense tenir en compte la desaparició de la biomassa al llarg del cultiu, terme que es considerat menyspreable.

$$r_X = \mu \cdot X \quad (\text{eq. 4.16})$$

En un cultiu en discontinu el volum no varia al llarg del temps,

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (\text{eq. 4.17})$$

Així doncs, l'expressió del balanç es pot expressar com,

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{eq. 4.18})$$

Finalment, aïllant la velocitat específica de creixement s'obté l'expressió matemàtica que possibilita el seu càlcul.

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.19})$$

— *Substrat*

Realitzant un balanç de matèria per al substrat en el reactor discontinu, equació 4.13

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

El substrat ja està inicialment a l'interior del reactor, per tant, el terme d'entrada i sortida de substrat són nuls.

$$0 - r_s \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.20})$$

Reordenant l'equació

$$-r_s \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot S \quad (\text{eq. 4.21})$$

La velocitat de desaparició del substrat es pot expressar en funció del rendiment biomassa substrat, la velocitat específica de creixement i la biomassa.

$$r_s = Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X \quad (\text{eq. 4.22})$$

Si no s'afegeix cap component durant la fermentació, la variació del volum al llarg del cultiu és nul,

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (\text{eq. 4.23})$$

Substituint les equacions 3.7.23 i 3.7.24 al balanç de matèria s'obté,

$$-Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V \quad (\text{eq. 4.24})$$

Simplificant el terme del volum,

$$-r_s = -Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X = \frac{dS}{dt} \quad (\text{eq. 4.25})$$

Per definició la velocitat específica de consum de substrat pot ser substituïda per la multiplicació del rendiment substrat biomassa per la velocitat específica de creixement (μ).

$$q_s = Y_{s/x} \cdot \mu \quad (\text{eq. 4.26})$$

Finalment, la variació de substrat a l'interior del reactor discontinu es calcula com,

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \quad (\text{eq. 4.27})$$

Aïllant el valor de la velocitat específica de consum de substrat,

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.28})$$

— *Producte*

Realitzant el balanç de matèria per a l'aparició de producte en el reactor en discontinu,

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

El producte es genera i s'acumula a l'interior del reactor, sense entrada ni sortida d'aquest component durant el cultiu,

$$0 + r_p \cdot V = 0 + \frac{d(P \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.29})$$

Reordenant els termes

$$r_p \cdot V = \frac{dP}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot P \quad (\text{eq. 4.30})$$

La velocitat d'aparició de producte al reactor es pot associar al creixement mitjançant el rendiment producte/biomassa,

$$r_p = Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X = q_p \cdot X \quad (\text{eq. 4.31})$$

En tractar-se d'un cultiu en discontinu, la variació de volum és nul·la,

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (\text{eq. 4.32})$$

Substituint les eq. 4.31 i eq. 4.32 a l'expressió del balanç,

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X \quad (\text{eq. 4.33})$$

Finalment, aïllant el valor de la velocitat específica de producció d'enzim a l'interior del reactor en discontinu es pot calcular de la següent forma,

$$q_P = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.34})$$

4.6.4. Cultiu en semicontinu

El procés en semicontinu es caracteritza per l'entrada de substrat amb la corresponent variació de volum ja que no hi ha cap corrent de sortida.

— *Biomassa*

Realitzant el balanç de matèria per a la biomassa per al cultiu en semicontinu,

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

Les cèl·lules van creixent i acumulant-se a l'interior del bioreactor a mesura que passa el temps, no hi ha cap entrada ni sortida de biomassa durant el cultiu,

$$0 + r_X \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.35})$$

Reordenant els termes,

$$r_X \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot X \quad (\text{eq. 4.36})$$

La velocitat de generació de la biomassa es pot simbolitzar com la velocitat específica de creixement (μ) per la quantitat de biomassa.

$$r_X = \mu \cdot X \quad (\text{eq. 4.37})$$

La variació del volum al llarg del cultiu és el cabal d'entrada addicionat al reactor,

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (\text{eq. 4.38})$$

Substituint aquestes dues últimes equacions al balanç de matèria, s'obté la següent expressió matemàtica

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F \cdot X}{V} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot X \quad (\text{eq. 4.39})$$

Aïllant el valor de la velocitat específica de creixement,

$$\left(\mu - \frac{F}{V} \right) = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.40})$$

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} + \frac{F}{V} \quad (\text{eq. 4.41})$$

El càlcul de la μ per a un cultiu en semicontinu depèn del cabal de substrat addicionat, el volum, la biomassa i la variació d'aquesta última al llarg del temps.

— *Substrat*

Realitzant el balanç de matèria del substrat consumit pel microorganisme en un reactor en semicontinu,

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

A més del terme de generació (en aquest cas negatiu ja que es tracta d'un substrat que és consumit) i de l'acumulació o exhauriment a l'interior del reactor, apareix l'entrada de substrat. El cultiu en semicontinu es caracteritza per l'entrada d'un cabal (F) de substrat de concentració (S_0) diferent a l'interior del tanc.

$$F \cdot S_0 - r_S \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.42})$$

Reordenant els termes del balanç,

$$F \cdot S_0 - r_s \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot S \quad (\text{eq. 4.43})$$

La velocitat de consum de metanol es proporcional a la quantitat de biomassa existent al medi.

$$r_s = Y_{s/X} \cdot \mu \cdot X = q_s \cdot X \quad (\text{eq. 4.44})$$

El cabal addicionat de substrat és la variació de volum al llarg del temps,

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (\text{eq. 4.38})$$

Substituint les equacions de 4.44 i 4.45 al balanç de matèria s'obté la següent expressió,

$$F \cdot S_0 - q_s \cdot X \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + F \cdot S \quad (\text{eq. 4.45})$$

Dividint l'equació anterior pel volum

$$\frac{F \cdot S_0}{V} - q_s \cdot X = \frac{dS}{dt} + \frac{F \cdot S}{V} \quad (\text{eq. 4.46})$$

Finalment, aïllant la velocitat de consum de substrat s'obté l'expressió matemàtica pel seu càlcul,

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X - \frac{F \cdot (S - S_0)}{V} \quad (\text{eq. 4.47})$$

$$q_s = -\left(\frac{dS}{dt} + \frac{F \cdot (S - S_0)}{V}\right) \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.48})$$

Per al càlcul de q_s s'ha de conèixer el valor de la biomassa, el cabal addicionat, el volum, la diferència de concentracions de substrat entre l'aliment i a l'interior del bioreactor, i la variació de la concentració d'aquesta al llarg del temps.

— *Producte*

El balanç de matèria de producte per a un cultiu en semicontinu,

$$E + G = S + A \quad (\text{eq. 4.13})$$

No hi entrada directe de producte ni cap cabal de sortida, l'enzim només es genera i s'acumula a l'interior del reactor,

$$0 + r_P \cdot V = 0 + \frac{d(P \cdot V)}{dt} \quad (\text{eq. 4.49})$$

Reordenant els termes del balanç,

$$r_P \cdot V = \frac{dP}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot P \quad (\text{eq. 4.50})$$

La velocitat d'aparició de producte es pot deixar en funció del creixement del microorganisme multiplicat per rendiment producte/biomassa.

$$r_P = Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X = q_P \cdot X \quad (\text{eq. 4.51})$$

La variació del volum és directament el cabal de substrat addicionat al llarg del cultiu,

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (\text{eq. 4.38})$$

Substituint les dues últimes equacions al balanç de matèria,

$$q_P \cdot X = \frac{dP}{dt} + \frac{F \cdot P}{V} \quad (\text{eq. 4.52})$$

Finalment, s'obté l'expressió matemàtica per al càlcul de la velocitat de producció d'enzim

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X - \frac{F \cdot P}{V} \quad (\text{eq. 4.53})$$

$$q_P = \left(\frac{dP}{dt} + \frac{F \cdot P}{V} \right) \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{eq. 4.54})$$

Per determinar la q_P és necessari conèixer la concentració de producte a l'interior del fermentador, juntament amb la seva evolució al llarg del temps, el cabal d'alimentació, el volum i la concentració de la biomassa.

4.6.5. Càlcul de les derivades

En totes les expressions per al càlcul instantani d'alguna de les velocitats específiques sigui de creixement, consum de substrat o producció d'enzim és necessari conèixer la derivada de la principal variable del balanç al llarg del temps $\left(\frac{dX}{dt}, \frac{dS}{dt}, \frac{dP}{dt} \right)$.

Aquest requisit complica el càlcul de les velocitats ja que aproximar la derivada a un increment, només és numèricament acceptable per a valors d'increment de temps prou petits, molt propers a zero, i amb un error de mesura gairebé nul. Aquest no és el cas dels valors de les variables de partida per al càlcul de les derivades on l'espai de temps entre dues variables és normalment superior a dues hores. Així doncs, cal buscar algun procediment que permeti el càlcul d'aquestes derivades d'una forma més fiable. La solució que sembla més factible és buscar una funció que segueixi la tendència dels punts i calcular posteriorment la seva derivada.

Els polinomis són principalment utilitzats com a funcions d'aproximació quan la variació del valors experimentals és suau en l'interval escollit. Quan es volen aproximar uns valors en un interval llarg, el grau del polinomi d'aproximació pot arribar a ser extremadament gran i en conseqüència, es desaconsella la seva utilització per la seva complexitat. Com alternativa davant d'aquest problema, una possible solució és subdividir aquest interval en petits trams i per cadascun d'aquests aproximar un polinomi de grau relativament baix. L'aproximació pot ser força bona si els diferents polinomis que integren l'aproximació s'uneixen suament entre ells. Això s'aconsegueix si s'optimitza que el valor de la primera derivada sigui contínua en aquests punts d'unió.

La utilització d'aquesta tècnica per realitzar l'aproximació d'uns valors experimentals s'anomena aproximació per "splines" (Curve Fitting Toolbox, MATLAB documentation) (Hutchinson 1986).

La solució proposada per calcular el valor de les derivades de forma més exacte és seguir els següents dos passos:

- 1.- Traçar una funció de "splines" suavitzada que approximi els punts de l'evolució temporal de cadascuna de les variables a derivar (X,S,P).
- 2.- Realitzar la derivada de la funció de "splines"
- 3.- Calcular el valor puntual de la derivada per cadascun dels punts de les variables d'origen.

Seguint aquests passos s'aconsegueixen valors de les derivades força exactes, podent calcular en tots els casos les velocitats específiques d'una forma més precisa (Exemple a la figura 4.5).

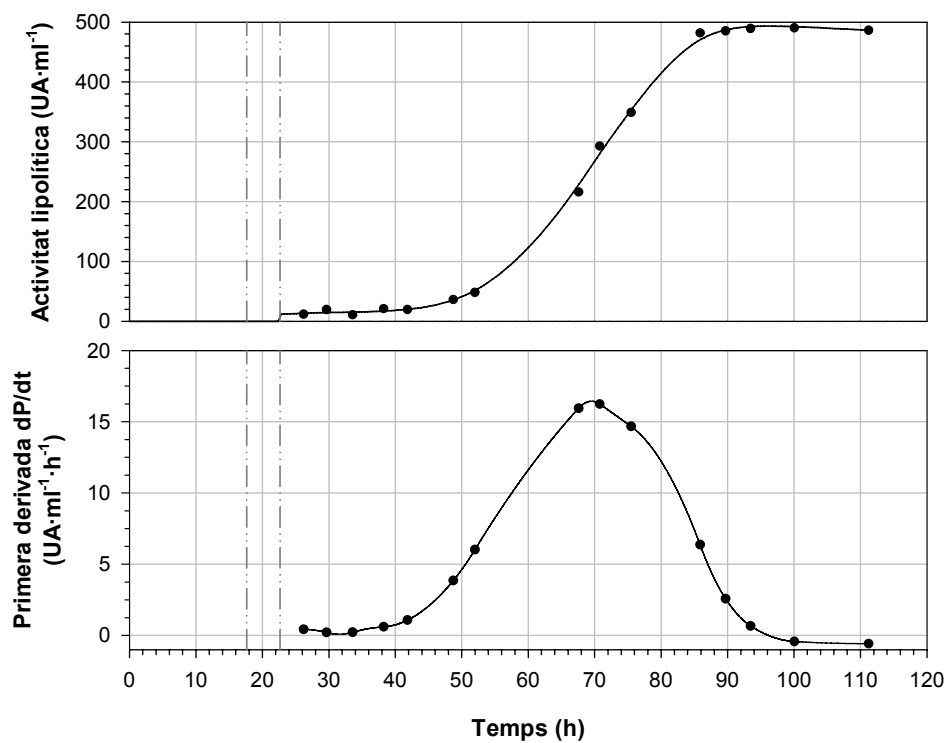


Figura 4.5. Exemple de càlcul de la derivada dP/dt utilitzant l'aproximació per splines.

Tots aquests passos es realitzen utilitzant les subrutines programades del paquet matemàtic de càlcul “Curvefit” integrat dins el programari comercial MATLAB (The Mathworks, Natick, USA).

4.6.6. Càlculs dels valors mitjans

En molts casos serà de gran ajut conèixer els valors mitjans d’algunes d’aquestes variables calculades en un període o etapa de la fermentació. La metodologia de càlcul és integrar l’evolució d’aquesta variable en el temps pel període desitjat i dividint aquest valor per l’increment de temps, com s’indica a l’equació 4.62.

$$\bar{x} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \int_{t_1}^{t_2} x(t) dt \cong \frac{1}{(t_2 - t_1)} \sum x_i \Delta t_i \quad (\text{eq. 4.55})$$

En molts casos però, només es disposa de valors puntuals a certs moments del cultiu i no com es requereix per aquest càlcul, una funció que depengui del temps. Per tant, en aquests casos s’ha d’aproximar els valors puntuals mitjançant una equació i posteriorment realitzar la integració d’aquesta en el període de temps desitjats. El procediment utilitzat doncs, és molt similar al seguit per al càlcul de les derivades. Igualment cal traçar una funció de “splines” suavitzada que approximi els punts de l’evolució temporal de la variable que es desitja conèixer el valor mig. A partir d’aquest moment ja es pot calcular mitjançant l’equació 4.55 el valor mitja de la variable.

4.6.7. Càlcul dels rendiments

Els rendiments són paràmetres molt importants ja que representen l’eficàcia de conversió d’una variable respecte una altre. Per exemple, el rendiment substrat/biomassa, ens dona la idea en quin tant per u de cada gram de substrat passa directament a biomassa.

Es poden calcular en un interval determinat de la fermentació, sent rendiments parcials o pel contrari per tota la fermentació, anomenant-se rendiments globals.

És important entendre que aquests coeficients no es mantenen constants durant tota la fermentació, ja que canvien amb rapidesa segons les necessitats energètiques del microorganisme. Alguns autors (Bailey i Olis 1986) han deduït l’estreta relació existent entre el rendiment biomassa/substrat i el coeficient de manteniment.

A continuació es presenta la forma de càlcul dels diferents rendiments, en tots el casos per a cultius en discontinu o semicontinu.

— **Rendiment biomassa / substrat ($Y_{X/S}$)**

El rendiment biomassa substrat es defineix com la quantitat de biomassa per unitat de massa de substrat consumit.

Així,

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{X/S} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (\text{eq. 4.56})$$

No obstant això, el mètode usual per calcular aquest rendiment és mesurar la quantitat de biomassa formada i substrat consumit per a un determinat període de temps.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{eq. 4.57})$$

— **Rendiment producte / biomassa ($Y_{P/X}$)**

El rendiment producte-biomassa es defineix com la quantitat de producte generat per unitat de massa cel·lular.

Així,

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{eq. 4.58})$$

No obstant això, el mètode usual per calcular aquest rendiment es mesurar la quantitat de biomassa formada i producte produït per un determinat període de temps.

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (\text{eq. 4.59})$$

També es poden calcular els rendiments teòrics amb l'únic requisit que s'ha de conèixer l'estequiometria que relacioni les variables de les quals es vol calcular el rendiment.

4.6.8. Càlcul de les productivitats

La productivitat es pot definir com la relació entre la quantitat de producte obtingut amb els factors per obtenir-la en un determinat període de temps.

De forma més concreta en el cas dels bioprocessos la productivitat volumètrica es defineix com la quantitat de producte format per unitat de volum i temps. Anàlogament, la productivitat específica es calcula com la quantitat de producte format per unitat de massa cel·lular i temps.

Evidentment, i de manera semblant als rendiments, es pot calcular el seu valor per un període de temps o per tot el cultiu, tot i que és aquest últim el que potser és més útil ja que conté una informació més valuosa.

La metodologia de càlcul és senzilla,

$$Productivitat Volumètrica = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (\text{eq. 4.60})$$

$$Productivitat específica = \frac{\Delta P}{\Delta X \cdot \Delta t} \quad (\text{eq. 4.61})$$

on

ΔP : Increment de productivitat (UA l⁻¹).

Δt : Increment de temps (h).

ΔX : Increment de la concentració de biomassa (g l⁻¹).

4.6.9. Correcció dels paràmetres en funció del volum

Com s'ha vist anteriorment, en el procés de càlcul de paràmetres de fermentació s'utilitzen paràmetres com la concentració de substrat i biomassa que depenen significativament del volum del cultiu.

El continu increment de biomassa en un cultiu en discontinu i semicontinu provoca la progressiva reducció del volum de la fase aquosa. Així doncs, quan es mesuren les concentracions de substrat o producte al reactor, cal tenir en compte que només es realitza a la fase líquida.

En la majoria d'estudis on s'empra el càlcul dels paràmetres que caracteritzen el sistema es menysprea aquesta variació, perquè es creu erròniament que el volum ocupat per les cèl·lules és insignificant davant de la resta de volum.

Com s'ha demostrat en cultius on s'arriba a nivells de biomassa al voltant de 60 g l^{-1} , les variacions en la mesura dels paràmetres poden significar fins un 20% del valor (Wang 1979). Així doncs, és especialment important tenir en compte aquesta variació de volum quan s'arriben a altes concentracions de biomassa.

Es pot calcular el volum ocupat pel microorganisme amb l'equació 4.62.

$$V_b = \frac{X \cdot V}{\sigma \cdot \rho} \quad (\text{eq. 4.62})$$

on:

V_b : Volum total de cèl·lules (l).

σ : Fracció de matèria seca a la biomassa ($\text{g X seca g X humida}^{-1}$)

ρ : Densitat del microorganisme (g l^{-1})

Per tant, el volum de la fase aquosa es calcula per la diferència entre el volum total i el volum ocupat per les cèl·lules (eq. 4.63).

$$V_a = V - V_b = V \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad (\text{eq. 4.63})$$

S'han emprat els valors bibliogràfics de la fracció de matèria seca i de densitat de $0.3 \text{ g X seca g X humida}^{-1}$ i $1.07 \cdot 10^3 \text{ g l}^{-1}$, valors mitjans per llevats (Borzani 2003; Borzani i Perego 1976).

D'aquesta forma totes les variables mesurades directament a la fase líquida del cultiu són recalculades en funció del nivell de biomassa existent al reactor per referir-les al volum total. Per exemple, les equacions 4.64 i 4.65 mostren com es modifica la concentració de substrat i producte en funció del moment en que s'ha realitzat el cultiu.

$$S' = S \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad (\text{eq. 4.64})$$

$$P' = P \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad (\text{eq. 4.65})$$

Capítol 5. Sistema d'extracció de mostres

5.1. Introducció

L'extracció de mostres en un sistema biològic és un procediment delicat perquè suposa exposar el sistema a un entorn, a priori, no estèril que pot ser una font de contaminació del mateix.

D'altra banda, la necessitat de poder fer un seguiment dels paràmetres i variables que intervenen en un procés semicontinu i la dificultat de poder tenir una mesura dels mateixos en línia, obliga que s'hagi de realitzar l'extracció de mostres de forma regular que permeti garantir el seguiment dels bioprocessos mitjançant l'anàlisi de les mostres d'una manera automàtica i estèril. Per aquest motiu es va desenvolupar un sistema automàtic i estèril d'extracció de mostres per cultius biològics.

En el cas que ens ocupa, un sistema de producció de proteïnes recombinants amb *Pichia pastoris*, el disposar d'un sistema d'extracció de mostres que pugui funcionar de manera autònoma i emmagatzemar les mostres en condicions d'una reduïda activitat biològica permet alleugerir la càrrega per a l'investigador i l'operador del procés.

Només s'ha pogut trobar un subministrador que comercialitzi un equip amb característiques semblants al que requereix el sistema. Aquest és el BioMate2000A (Lokas Automation Co., Corea) que està format per un mòdul integrat que porta un sistema d'adquisició que fa pensar que s'haurà d'adaptar a les necessitats particulars de cadascun dels usuaris, obligant a fer una peça adaptada al fermentador on s'instal·li i que probablement no estigui desenvolupat per treballar a pressió positiva. S'ha contemplat l'adquisició de l'equip però l'elevat cost del mateix (7500€) i la necessitat d'adaptar-lo de totes maneres ha portat a plantejar la possibilitat de fer un muntatge amb la mateixa funcionalitat.

El muntatge d'un sistema d'aquestes característiques es fa automatitzant l'extracció manual de les mostres, això implica la necessitat de tenir un element de construcció específic per aquesta utilitat, la vàlvula d'extracció estèril, que és l'element central de tot el sistema. El mercat de vàlvules estèrils és ampli i s'han desenvolupat moltes vàlvules per aplicacions específiques. Les vàlvules pensades per a la seva utilització en fermentadors han estat desenvolupades per les mateixes empreses que els fabricaven (Sampling valve, Bioengineering AG, Wald, Suïssa ; SVC 25 Sartorius AG, Goettingen, Alemanya) però

darrerament s'han començat a comercialitzar per d'altres empreses vinculades a l'indústria farmacèutica i de procés que han permès fer-les més assequibles (Sampling valve I, GEA Tuchenhangen, Büchen, Alemanya; Aseptic Sampling Valves – VPA Series, Biotechnic, Windernere, Florida; KEOFITT M4® Sampling Valve, Odense NV Denmark). A més a més, s'ha pogut observar que la tecnologia que s'ha emprat és molt similar i fins i tot més acurada en el cas de les segones.

El sistema d'extracció de mostres que s'ha dissenyat per a la seva implementació en un fermentador BIOSTAT ED (BRAUN BIOTECH, Melsungen, Alemanya) s'ha desenvolupat a partir d'una vàlvula (KEOFITT M4® Sampling Valve, Odense NV Denmark) amb un actuator neumàtic per a l'automatització del bioprocés. Aquesta vàlvula (figura 5.1) ha estat dissenyada per minimitzar la existència de racons que puguin ser font de contaminació i amb una construcció que permet garantir la completa esterilització química o tèrmica de la mateixa.

La seqüència de funcionament del sistema en qüestió consta d'una etapa de neteja de la vàlvula i una d'extracció de mostra que es gestiona emprant un mòdul d'entrades i de sortides que permet actuar sobre un joc de vàlvules i un col·lector de mostres on es recull el medi extret. Aquestes mostres es recullen i es conserven en una nevera a 4°C, apartat 5.3 *Protocol de funcionament i automatització.*

5.1. Requeriments de la instal·lació

Per garantir l'esterilitat del procés cal realitzar una neteja del sistema i aprofitar les condicions de pressió positiva a les que opera el fermentador *Capítol 4. Materials i mètodes.*

El sistema ha d'ésser de fàcil instal·lació, robust i que minimitzi el nombre d'elements no comercials que en formin part. Tots aquests elements han de tenir el mínim contacte amb el fluid de procés per evitar el risc de contaminació.

A més a més, per garantir la representativitat de les mostres extretes s'ha d'emmagatzemar a una temperatura que minimitzi l'activitat biològica de les mateixes. I el sistema ha de tenir capacitat de recollir les mostres preses en una jornada de fermentació.

Finalment ha de constar de mesures de seguretat perquè el mal funcionament del sistema no permeti la inundació del col·lector i/o el buidat del fermentador.

5.2. Components de la instal·lació

El sistema de presa de mostra es compon dels elements inclosos al llistat d'equips i instruments de la taula 5.1 que es poden relacionar amb el diagrama de procés (figura 5.1) i amb l'esquema elèctric (*Capítol 13. Annex*).

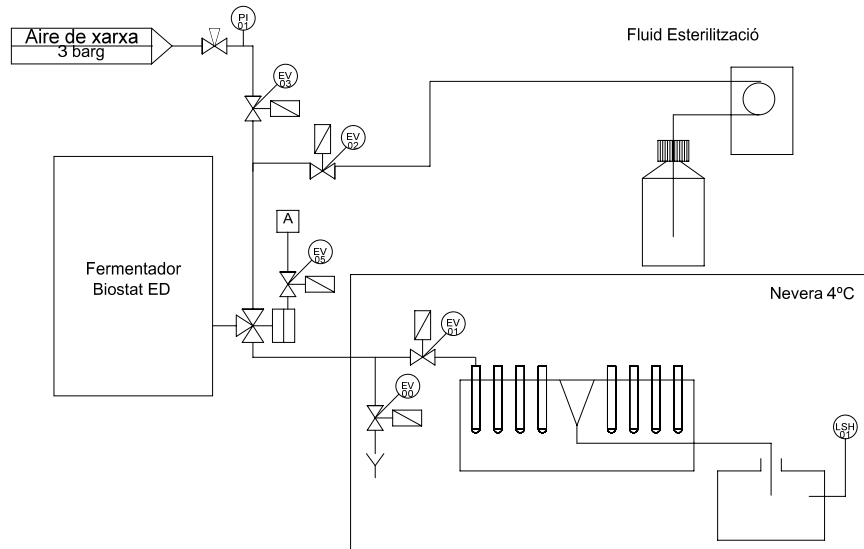


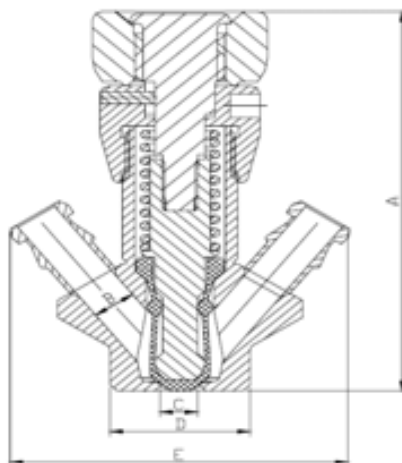
Figura 5.1. Diagrama de procés del sistema automàtic de presa de mostra automàtic

La presa de mostra es fa emprant electrovàlvules de pinçament (Pinch solenoid valves, SIRAI Elettromeccanica Srl, Milà, Itàlia) en tots els punts on pot haver-hi contacte amb el fluid de procés i emprant vàlvules de membrana (Total separation solenoid valves, SIRAI Elettromeccanica Srl, Milà, Itàlia) en les conduccions on circulen fluids de servei (aigua i aire estèril). D'aquesta manera es garanteix que no hi ha mai un contacte directe entre el fluid de procés i qualsevol component mecànic de la instal·lació que pugui ser una font de contaminació.

Taula 5.1. Llistat d'equips i instrumentació

Equips / Instruments	Descripció	Tipus	Material	Potència (W/V)	Temperatura (°C)	Observacions
B-01	Bomba esterilització	Peristàltica	AISI 304	0.37/220VAC		B.BRAUN FE-411
CM-01	Col·lector	--	PP	/220VAC	4 / 30	LKB-BROMMA, LKB 2112
EV-01	Alimentació CM-01	Pinçament	--	8/12VDC	T. Amb	SIRAI Z230A
EV-02	Fluid esterilització	Pinçament	--	8/12VDC	T. Amb	SIRAI Z230A
EV-03	Aire esterilització	2 vies	PP	6/24VDC	T. Amb	SIRAI Z823A
EV-04	Actuació FV-01	3 vies	PP	6/24VDC	T. Amb	SIRAI Z823A
EV-05	Purga	Pinçament		8/12VDC	T. Amb	SIRAI Z230A
EX-01	Nevera 4°C			/220VAC	4	
FV-01	Vàlvula de presa de mostra	Membrana	AISI 316L Silicona			Keofitt M4
D-01	Dipòsit de purga	Ampolla	PP		4	Adaptat per LSH

Els materials d'aquesta vàlvula AISI 316L (cos de la vàlvula) i PTFE (membrana de l'obturador) i el seu acabat estan pensats per poder garantir els requeriments de estanquitat i esterilitat d'aquest tipus de procés.

**Figura 5.2.** Vàlvula Keofitt M4®

La vàlvula de presa de mostra FV-01 (figura 5.2) està especialment dissenyada per aquesta funció i juga amb una cambra comuna que aprofitant l'efecte de la gravetat per la neteja i

la presa de mostres permet minimitzar el risc de contaminació. Aquest disseny permet l'obertura de la vàlvula sortint la mostra pel connector inferior i un cop tancat el pas, la circulació de vapor o de qualsevol fluid que en permeti fer la neteja pel connector superior i la recollida pel mateix tub inferior per on ha sortit la mostra (figura 5.3).

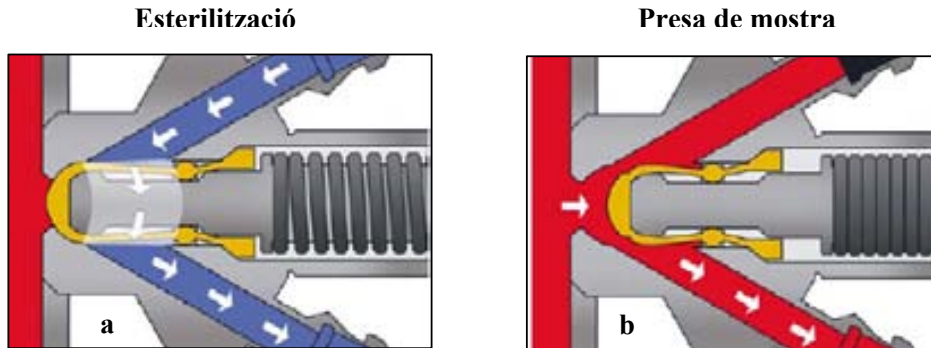


Figura 5.3. Descriptiu de les fases operatives de la vàlvula de presa de mostra. (a) Esterilització.
(b) Presa de mostra.

La vàlvula s'obre automàticament amb aire a 3 barg que permet garantir la completa estanquitat per la presència d'una molla que actua en l'acció de tancar. A l'igual que aquesta, la resta de vàlvules són normalment tancades per poder tenir un sistema prou segur davant de possibles circumstàncies que poguessin portar al buidat del fermentador.

Tal i com s'ha indicat no hi ha cap part mecànica a part de la vàlvula d'extracció que entri en contacte amb la mostra però sí que hi ha uns tubs que fan de conducció des de la vàlvula al col·lector de mostres (LKB Bromma 2112 Redirac) que està situat a l'interior d'una nevera a 4°C que permet minimitzar l'activitat cel·lular fins el moment en que es treuen les mostres per al seu anàlisi manual. Aquest col·lector es fa girar de forma periòdica per recollir les mostres i el fluid procedent de la neteja del sistema.

Finalment, es disposa d'un dipòsit d'emmagatzemament de rebuig que en el cas d'un mal funcionament del col·lector o de la vàlvula de presa de mostra recolliria la fuita fins el moment en que s'activés un contacte de nivell alt (LSH – 01) que faria aturar el procés fins el rearmament del sistema.

Tot el sistema funciona amb aire estèril a 3 barg i aigua estèril. El primer serveix per activar la vàlvula de presa de mostra i eixugar el sistema del procés de neteja i el segon com a fluid de neteja per evitar la acumulació del fluid de procés en qualsevol dels punts del sistema.

Per finalitzar, es disposa d'un element essencial per a l'automatització del procés, un mòdul lògic programable. Aquest element és molt semblant a un autòmat programable però tant per les seves limitacions físiques com de capacitat del seu espai de memòria rep aquest altre nom. Les característiques tècniques d'aquest aparell són a la taula 5.2.

Taula 5.2. Característiques del mòdul lògic programable ZEN-10-C1DR-D i la seva expansió ZEN-8EDR

Nom	ZEN-10-C1DR-D	ZEN-8EDR
Tipus	CPU	Ampliació
Alimentació	24 VDC	--
Nombre entrades /Alimentació	6 / 24VDC	4 / 24 VDC
Nombre sortides / Tipus	4 /Relé	4 /Relé
Botons i Pantalla de cristall líquid	Si / Si	--
Calendari i rellotge	Si	--
Entrada analògica	No	--

Aquest mòdul consta d'una unitat principal model ZEN-10-C1DR-D i d'una extensió ZEN-8EDR de entrades i sortides físiques necessàries per realitzar la funció per la que ha estat escollit (figura 5.4).



Figura 5.4. Mòdul lògic programable ZEN-10-C1DR-D i la seva expansió ZEN-8EDR i el quadre elèctric que alimenta el sistema

Les entrades i sortides que s'han escollit pel procés d'extracció de mostres són a la taula 5.3.

Taula 5.3. Taula d'associació entre les entrades i sortides del mòdul lògic programable i els elements que componen la instal·lació.

Entrada	Element associat	Sortida	Element associat
Q0	EV-00	I0	LSH-01
Q1	EV-01		
Q2	EV-02		
Q3	EV-03		
OUT 0	CM-04		
OUT 1	EV-05		
OUT 2	BM-06		

Amb tot aquest equipament es realitza el muntatge que permet extreure mostres de forma estèril i automatitzada. La figura 5.4 permet veure el detall del quadre elèctric on està instal·lat el mòdul lògic.

5.3. Protocol de funcionament i automatització

El protocol d'actuació d'aquest sistema es basa en la seqüència lògica d'operació descrita a la figura 5.5.

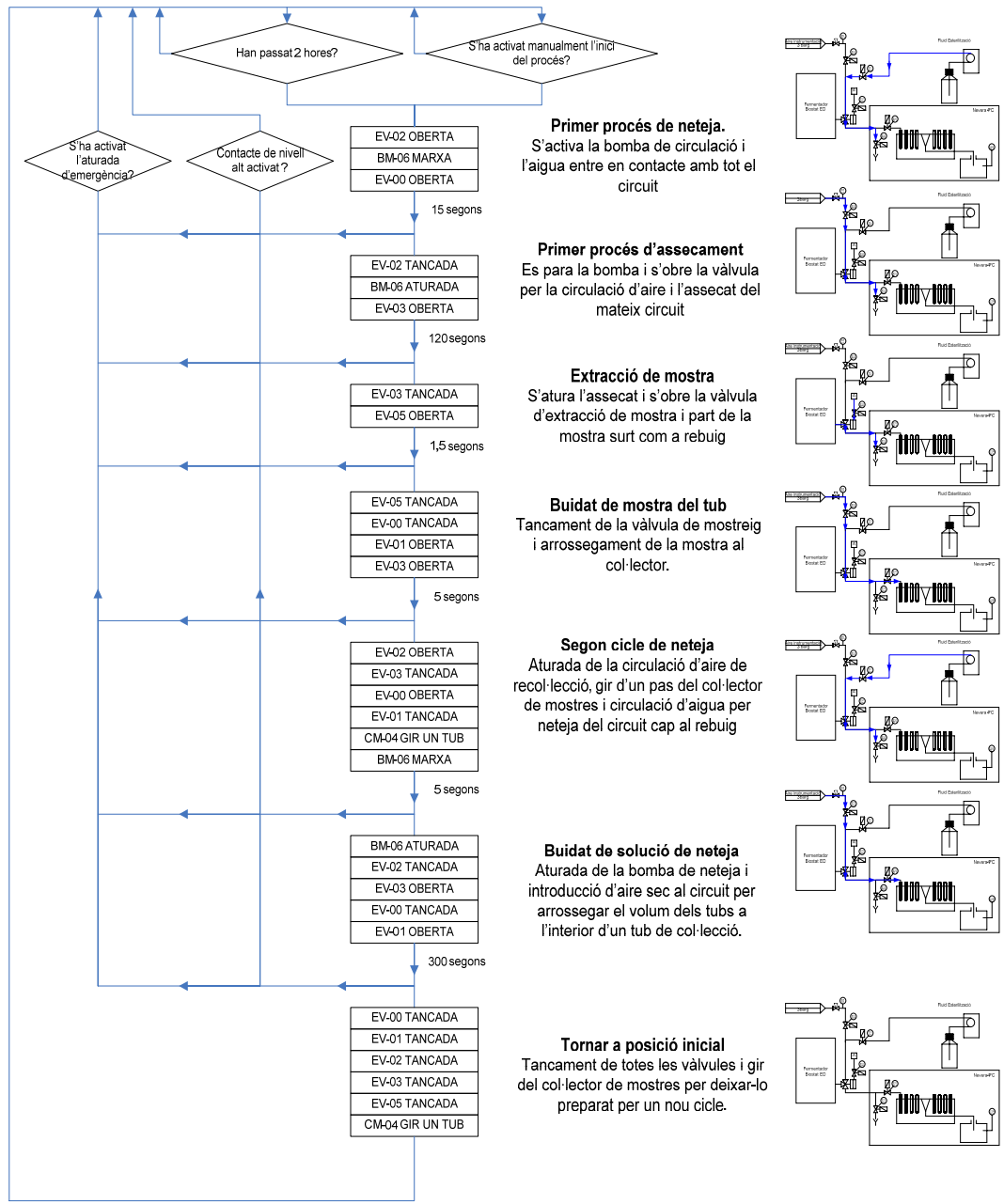


Figura 5.5. Seqüència operativa del sistema d'extracció de mostres

5.4. Conclusions

Aquest capítol recull el desenvolupament d'un sistema de presa de mostres automàtic que ha estat pensat per tenir les següents característiques:

- Un cost de l'equip relativament baix en comparació als preus obtinguts.
- Un equipament capaç d'agafar una mostra amb una freqüència mínima de 15 minuts.
- Un sistema automàtic, amb una autonomia de 80 hores de cultiu , per una freqüència de mostreig de dues hores.
- Un sistema esterilitzable químicament i amb seqüències de neteja abans i després de cada mostreig.
- Un sistema amb un manteniment baix i que només requereix ser netejat abans de cada cultiu.
- Equipament format per equips estandarditzats i de fàcil accés comercial.
- Amb aplicacions possibles per qualsevol sistema biològic i amb una construcció que permet emprar-lo a diferents fermentadors adaptant el primer component de la línia de flux, la vàlvula.

Capítol 6. Eliminació d'interferències en el sensor de metanol

6.1. Introducció

Tal com s'ha descrit a la introducció el promotor que més freqüentment s'ha emprat per a la producció de proteïna recombinant en *Pichia pastoris* és l'alcohol oxidasa 1 (PAOX1). La inducció de la expressió gènica emprant aquest promotor es realitza mitjançant la presència de metanol en el medi de cultiu. Per tant, la concentració de metanol en la fase d'inducció, que determina la velocitat específica de creixement, és un paràmetre clau per maximitzar la producció de proteïnes recombinants (Cos *et al.*, 2006b).

Per aquest motiu cal anar amb molta cura a l'hora d'establir les condicions d'operació en les que es realitza el procés productiu i en conseqüència tenir un bon sistema per garantir la concentració de metanol present en el medi de fermentació. Per poder aconseguir-ho cal emprar sistemes de control que es descriuran posteriorment (Capítol 7. *Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut⁺_s de P. pastoris*) i disposar d'una mesura, a poder ser directa i en línia, de la concentració de metanol present.

Per poder dur a terme la mesura en qüestió s'han emprat diferents eines analítiques que permeten mesurar la concentració de metanol en el medi de fermentació. Dins d'aquestes cal remarcar-ne alguns com són la "Fourier transform mid-infrared spectroscopy" (FT-MIRS) (Crowley *et al.*, 2000) i l'automatització d'un sistema anàlisi seqüencial per injecció (SIA), basat en una doble reacció enzimàtica catalitzada pels enzims alcoholoxidasa i peroxidasa (Surribas *et al.*, 2003).

Aquests sensors i d'altres descrits per Cos (2005) es caracteritzen perquè, tot i ser efectius tenen un muntatge complex i sovint poc robust, requereixen una instrumentació força cara i cap d'ells ha estat emprat com a una tecnologia de referència. Per aquestes raons, la utilització de la mesura de la concentració de metanol en els gasos de sortida del fermentador (Guarna *et al.*, 1997) i en el vapor en equilibri en el medi de cultiu (Hellwig *et al.*, 2001) s'han de contemplar com alternatives atractives i força viables.

La utilització de qualsevol d'aquestes últimes tècniques permet tenir una mesura robusta de la concentració de metanol en el medi de fermentació, un muntatge, una posada en marxa i una operatòria relativament senzilles i permeten la seva implementació en un sistema com

és el de la monitorització i control d'una fermentació a altes densitats cel·lulars amb *P. pastoris*.

Aquest sistema permet tenir una configuració força senzilla i robusta que integra la utilització de instruments de baix cost econòmic (sensores comercials de metanol, filtres de cotó) amb la monitorització del procés emprant ordinadors personals.

6.1.1. El funcionament de l'analitzador de metanol

L'instrument emprat per poder dur a terme la monitorització de la concentració del metanol és el sensor comercial MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA) ja pensat per a la seva utilització en la mesura de metanol en el corrent gasós de sortida per a fermentacions amb *P. pastoris*.

Aquest equip (figura 6.1) mesura el metanol d'un corrent gasós provinent de la sortida de gasos del fermentador que es diluït amb aire de xarxa en una relació de cabals proposada pel subministrador, taula 6.1.

Taula 6.1. Recomanació de la relació de cabals proposada per la mesura de metanol a diferents rangs de concentracions d'operació.

Rang de concentració desitjat (g l^{-1})	0 – 10	10 – 20	20 – 30
Cabal aire comprimit dilució (1 min^{-1})	0.5	0.7	0.8
Cabal mescla (1 min^{-1})	1.0	1.0	1.0

El corrent gasós, un cop entra a l'instrument és escalfat per una manta calefactora per disminuir la presència de condensats, seguidament es mescla amb l'aire de dilució i passa per un rotàmetre que permet quantificar i ajustar el cabal que arriba al sensor de metanol.

Aquest equip incorpora una sèrie de consells per a la posada en marxa per minimitzar els problemes que poden haver associats en el sistema en el qual es vol implementar:

- Instal·lació del sensor molt proper al fermentador per minimitzar el temps mort.
- Utilització d'un filtre de cotó per minimitzar la presència de partícules i escumes. Les condicions d'operació recomanades són entre 4 - 45°C i 10 – 80% d'humitat relativa.
- Realització d'un calibratge emprant com a medi l'aigua perquè els resultats són els mateixos que emprant medi de fermentació.

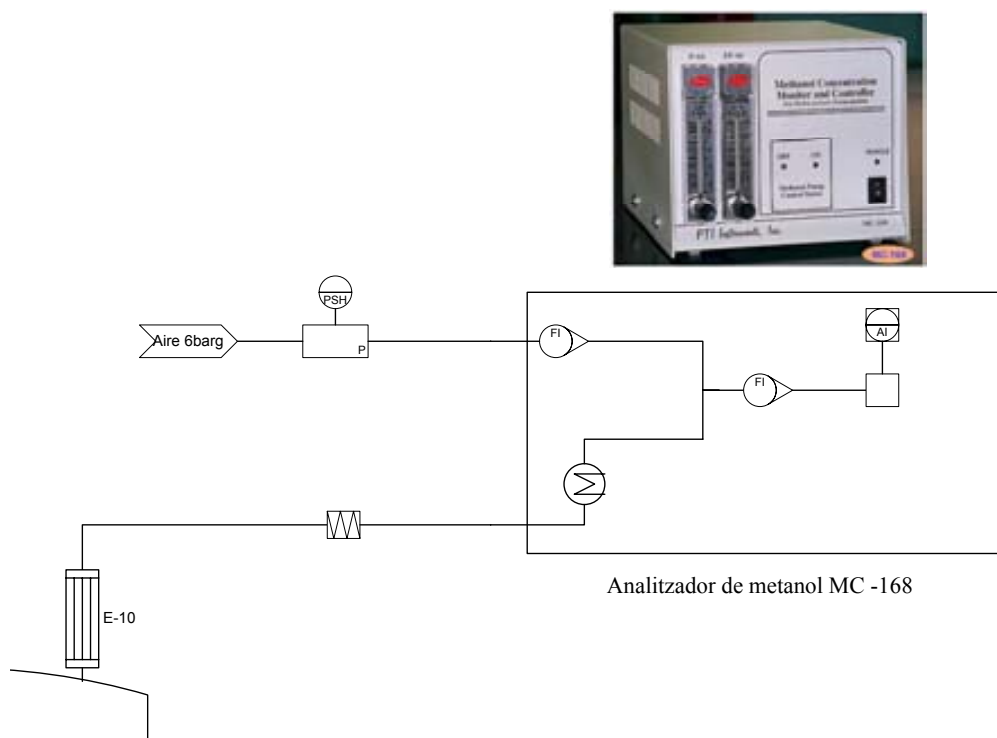


Figura 6.1. Muntatge proposat per PTI Instruments per a la mesura de metanol.

El fonament de mesura d'aquest instrument està determinat per un sensor comercial amb un semiconductor de diòxid d'estany i diòxid de titani (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó). El seu funcionament està descrit al manual de l'equip que es pot obtenir a <http://www.ptiinstruments.com/products.htm> i a <http://www.figaro.co.jp/en/top.html>. Aquest sensor està format per microcristalls d'un òxid metàl·lic que quan s'escalfa a elevades temperatures (400°C), emprant un escalfador elèctric (figura 6.2), en presència d'aire provoca una adsorció de l'oxigen a la superfície de cada un dels microcristalls.

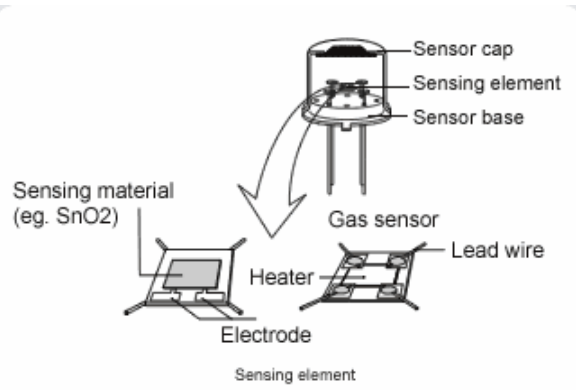


Figura 6.2. Esquema constructiu del sensor de metanol emprat.

Aquesta adsorció provoca una densitat de càrrega positiva que limita la circulació dels electrons entre cristalls, aquest increment de la diferència de potencial es tradueix en un increment de la resistència elèctrica (figura 6.3).

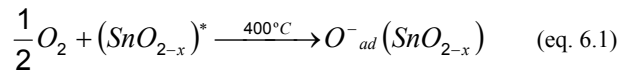
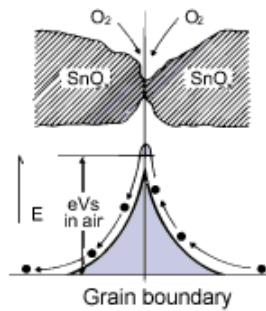


Figura 6.3. Model de la barrera de potencial intercrystallina en presència d'aire. (•) Electrons (eVs) energia per superar la barrera de potencial intercrystallina..

D'altra banda, en presència d'un gas reductor, la concentració d'oxigen a la superfície del cristall disminueix i en conseqüència el salt energètic que l'electró ha de vèncer per passar d'un cristall a l'altre és més petita i en conseqüència la resistència elèctrica disminueix (figura 6.4).

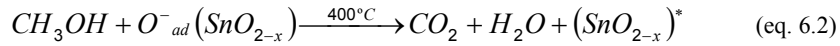
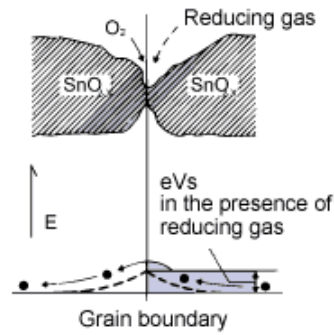


Figura 6.4. Model de la barrera de potencial intercristalina en presència d'aire. (•) Electrons (eVs) energia per superar la barrera de potencial intercristalina.

La relació entre la resistència del sensor i la composició d'agent reductor es pot expressar descriure segons la equació 6.3:

$$R_s = A[C]^{-a} \quad (\text{eq. 6.3})$$

on,

R_s = Resistència elèctrica del sensor

A, a = Constants

[C]= Concentració del gas

Aquesta relació logarítmica entre la resistència dels sensor i la concentració del gas permet treballar amb molta sensibilitat a la zona de concentracions més petites.

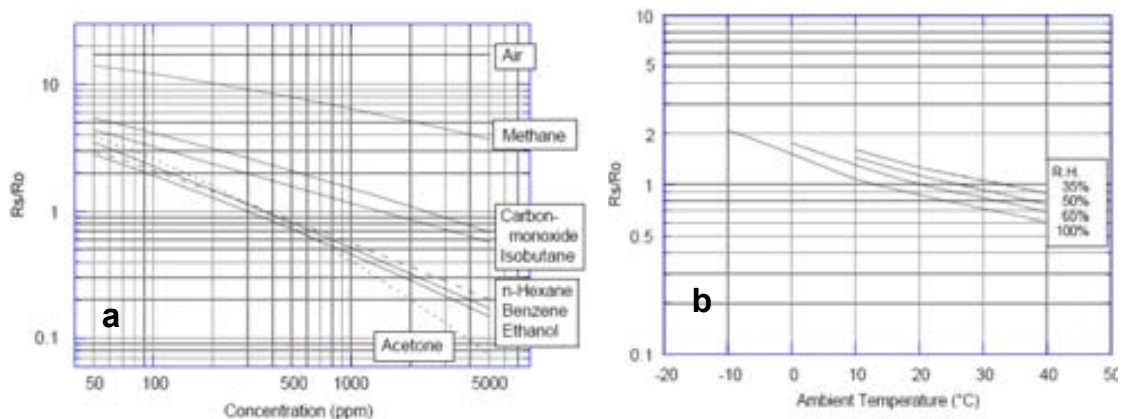


Figura 6.5. (a) Resposta del sensor (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó) davant de la presència de diferents compostos. (b) Resposta del sensor (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó) en funció de la temperatura i de la humitat.

A la figura 6.5a es pot apreciar com la presència de determinats compostos provoquen una disminució de la resistència elèctrica a mesura que augmenta la concentració i en conseqüència un senyal més elevat.

D'altra banda la presència d'humitat al corrent de sortida del fermentador (figura 6.5b) pot variar de forma considerable el senyal del sensor i interferir en la mesura presa. De la mateixa manera es pot observar que convé treballar a una temperatura suficientment elevada i constant per poder treballar amb un mínim de garanties.

6.2. Resultats

S'han realitzat una sèrie d'experiments per poder determinar la posada en marxa i muntatge dels sensors de metanol que s'empraran durant tot el treball. Per això, es descriu la realització del calibratge amb les recomanacions que cal tenir en compte en base a l'experiència acumulada, l'anàlisi de possibles interferències amb el medi de fermentació i les millores proposades per eliminar els efectes associats al senyal de la mesura.

La informació sobre el funcionament del sensor i de l'equip i la experiència acumulada treballant amb la producció en *P. pastoris* i amb el sensor descrit, permeten proposar una sèrie de propostes de cara a la millora del funcionament i posada a punt.

6.2.1. Efecte de la humitat i la temperatura en el corrent d'entrada al mesurador de metanol.

Tal i com s'ha vist a la figura 6.5b la presència d'humitat en el corrent de sortida, a part d'espallar el sensor en cas d'inundació, provoca una alteració de la mesura presa pel sensor (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó). Aquesta podrà anar canviant amb el temps si s'utilitza, únicament, el filtre de cotó que proposa el fabricant, per això es proposa el treballar amb un cabal d'aigua elevat en el condensador de gasos de sortida i en els casos que fos possible emprar aigua de refrigeració a baixa temperatura. També es proposa introduir diferents elements de protecció per al sensor que permeten recollir els possibles condensats i escumes presents en el corrent de sortida. Aquests són una trampa de condensats i un filtre de PTFE de 0.2 µm (Millex – FG 50, Millipore Bedford, USA).

Pel que fa a la temperatura no cal preocupar-se excessivament perquè la temperatura dels gasos de sortida del fermentador és aproximadament constant i l'equip MC-168 (PTI

Instruments Inc., Kathleen, USA) porta un sistema de calefacció en forma de manta calefactora que permet minimitzar de la humitat en el corrent d'entrada.

6.2.2. Eliminació del soroll associat a la mesura realitzada pel sensor.

Davant d'una mesura amb soroll, sovint es cau en l'error d'eliminar-lo sense considerar en profunditat el motiu de l'existència del mateix. Quan es contempla el senyal produït pel sensor de metanol amb una instal·lació com la proposada per l'empresa PTI Instruments Inc. (Kathleen, USA) sembla que es deu a un soroll blanc associat a l'element mesurador. Una anàlisi més profunda permet comprovar que les variacions en la pressió del tanc (equilibri líquid – vapor) i la variabilitat en els cabals d'entrada al instrument de mesura poden provocar variacions considerables en la mesura del senyal i fer pensar que estem parlant d'un soroll a una freqüència més baixa que la pròpia del sensor. Aquest efecte no es eliminable amb un filtre de senyal i per això és convenient buscar elements que permetin eliminar aquest efecte.

Com a millores que permetin garantir un sistema que treballi sempre en les mateixes condicions i que sigui el més estable possible es pot: instal·lar una sistema automàtic de control de pressió a la capçalera del sensor que permet mantenir la estabilitat de l'equilibri gas – líquid de metanol en el fermentador (Ramon *et al.*, 2004).

A més a més, l'elevada sensibilitat del sensor a la variació de la dilució del seu gas d'entrada implica tenir dos mesuradors / controladors de $0-1 \text{ lN min}^{-1}$ que garanteixin una mescla fixa dels gasos d'entrada a l'instrument(figura 6.6).

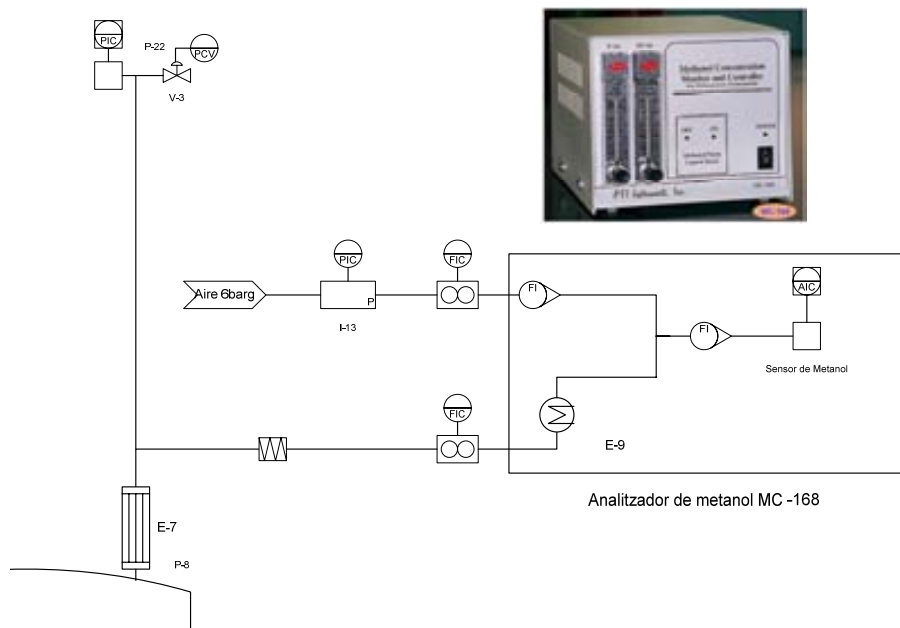


Figura 6.6. Muntatge experimental per minimitzar l'efecte del soroll associat a les condicions d'operació del sistema.

Pel que fa a l'eliminació del soroll implícit a la mesura del sensor s'ha estudiat la possibilitat d'implementar diferents tipus de filtres digitals però s'ha descartat per evitar el retràs del senyal. A més a més, el senyal obtingut té un soroll que varia de forma exponencial, que fa difícil eliminar-lo de igual forma per totes les condicions de treball. Per aquest motiu convé treballar en un rang d'operació prou definit perquè la mesura es prengui en la zona baixa del calibratge i així no es vegi massa afectat per l'efecte descrit. Aquesta variabilitat pot garantir que la mesura realitzada emprant aquest esquema oscil·li respecte el valor promig $\pm 0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Aquest muntatge ha estat emprat al llarg de tots els experiments presentats en aquest document i ha suposat una millora substancial respecte al muntatge proposat pel subministrador (Ramon *et al.*, 2004).

6.2.3. Eliminació de la interferència d'altres compostos volàtils.

El sensor en el qual es basa el funcionament de l'instrument en qüestió no és específic de metanol. És sensible, també, a d'altres dissolvents orgànics com l'etanol i a compostos nitrogenats, on destaca clarament la seva resposta davant la presència d'amoniac (figura 6.7).

La figura 6.7 permet apreciar la sensibilitat del sensor respecte la que té amb aire per diferents compostos permetent quantificar la interferència que es produeix en presència de determinades espècies.

El procés sobre el qual es treballa no produeix etanol, ni cap altre producte volàtil que pugui interferir en la mesura del sensor. Però la utilització d'un medi de cultiu com el descrit per a la producció de proteïnes recombinants amb *P. pastoris* (Invitrogen Corporation CA USA 2006), on s'empra l'hidròxid amònic per al control del pH, provoca la generació d'interferències suficient perquè el sensor rebi concentracions d'amoniac per sobre del seu límit de detecció, 3 ppm (Figaro USA Inc., Glenview, USA).

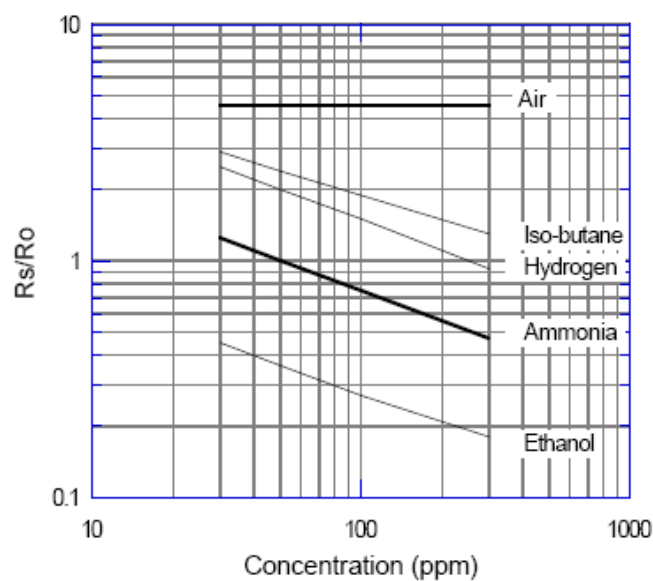


Figura 6.7. Sensibilitat del sensor TGS-822 davant de diferents compostos químics. Informació facilitada per Figaro USA

Aquest efecte s'ha observat en cultius semicontinus per a la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL), on durant l'etapa d'inducció de la producció per a una concentració de consigna de 4 g l^{-1} (figura 6.8a) es poden produir falsos increments sobtats en la concentració de metanol. Aquests són fàcilment associables a les addicions puntuals

d'hidròxid amònic en el moment en que el controlador de pH actua per mantenir el pH a 5.5. L'addició de la base en qüestió es realitza per la capçalera del fermentador. El temps de caiguda a través de l'espai buit del fermentador és suficient per permetre una parcial evaporació de l'amoniàc que és arrossegat en el corrent de sortida. La magnitud de la interferència depèn de diferents factors com són: el volum de capçalera del fermentador, el volum mort entre la sortida del fermentador i l'element mesurador, la quantitat d'hidròxid d'amoni addicionat i de forma molt important el cabal d'aire introduït al fermentador.

Aquesta interferència dificultarà qualsevol intent de controlar la concentració de metanol perquè provoca la saturació del sensor i una recuperació lenta del mateix que implica una lectura errònia que desestabilitza el controlador durant varies hores.

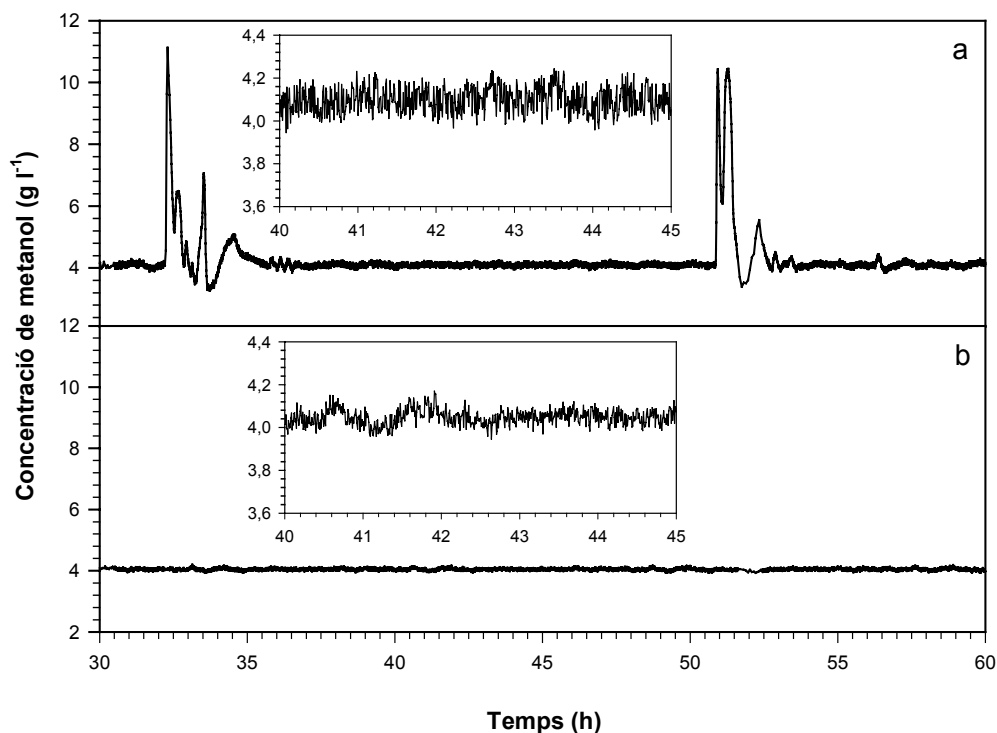


Figura 6.8. Fermentació realitzada per a la producció de ROL amb metanol controlat a 4g l^{-1} amb addició d'hidròxid d'amoni com a base per: (a) capçalera; (b) introduït directament en el brou de cultiu.

Hi ha diferents alternatives possibles per evitar aquest efecte:

- La primera i més senzilla passa per la introducció del hidròxid amònic directament en el brou de fermentació. A la figura 6.8b s'han produït addicions semblants en el mateix interval de temps sense un efecte apreciable sobre la mesura. Per tant, s'aconsegueix mantenir una mesura fiable del metanol que permet l'aplicació d'un sistema de control amb garanties. Aquesta solució ha

estat provada però moltes vegades hi ha una precipitació de la base en contacte amb el medi i obtura el conducte d'entrada.

- Una alternativa és la utilització d'altres bases (hidròxid de sodi i potassi) per controlar el pH de la fermentació. Aquesta s'ha aplicat en moltes de les fermentacions descrites en aquest document per evitar problemes de precipitació que obturin el conducte d'introducció.
- Finalment la última alternativa és la utilització d'un altre instrument que faci la mesura sobre el mateix brou de cultiu i que en el moment de fer l'estudi no es tenia. Aquest és el Methanol Sensor Model 2.1 (Raven Biotech, Inc., Canada) que mesura la concentració de la fase gas en equilibri amb el medi de cultiu. Aquest instrument porta una membrana permeable al pas d'aquest compost cap a un corrent d'aire que arrossega el metanol fins a un sensor específic d'alcohols (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó).

Per a la realització de les fermentacions descrites en aquest document s'ha emprat KOH com a base en moltes de les fermentacions i s'ha començat a utilitzar aquest nou sensor en les darreres però sempre combinat amb aquesta base potàssica.

6.2.4. Calibratge del sensor de metanol

Segons el subministrador de l'analitzador MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA), el calibratge de l'equip es pot realitzar de forma molt senzilla i emprant un muntatge sense masses complicacions. Però els experiments realitzats han permès detectar la necessitat d'algunes millores en la instal·lació i en les condicions d'operació per realitzar el calibratge.

Els usuaris poden realitzar el calibratge de l'instrument tal i com es proposa a les instruccions de l'analitzador, emprant aigua com a substitutiu del medi de fermentació i sense biomassa. Però tot i que alguns autors (Guarna *et al.*, 1997) han afirmat que no es detecta un efecte interferent, s'ha comprovat que és de vital importància reproduir les condicions de treball per poder garantir la màxima fiabilitat dels resultats obtinguts (figura 6.9).

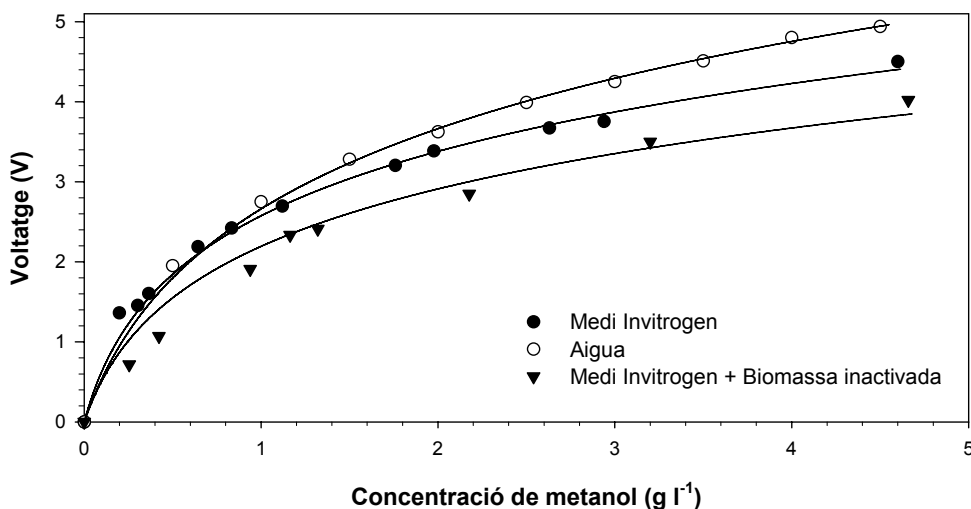


Figura 6.9. Evolució de la mesura del sensor de metanol en funció de la concentració i de les condicions d'operació (Ramon *et al.*, 2004).

S'ha comparat la resposta del sensor davant de les diferents condicions possibles a l'hora de fer el calibratge (amb aigua, amb medi de fermentació i amb biomassa inactivada + medi de fermentació), obtenint diferents corbes (figura 6.9) que permeten apreciar una variabilitat en els resultats obtinguts en el interval de treball. La utilització de biomassa inactivada es deu a la necessitat de reproduir les condicions d'operació en un estadi representatiu de la fermentació però evitant que hi hagi un consum del substrat que falsegi les dades obtingudes pel calibratge. La inactivació es fa emprant àzida sòdica (20 mg l⁻¹), fet que permet mantenir les cèl·lules mortes però íntegres i sense interferir de forma rellevant en el medi de fermentació.

La diferència obtinguda entre les diferents corbes s'accentua a mesura que augmenta la concentració de metanol degut, en bona manera, al comportament exponencial de la resposta del sensor. Per tant, si es treballa a la zona més sensible l'efecte no es tant accentuat i els possibles errors experimentals es minimitzen. Es veu a més, que la presència de solucions amb contingut salí tenen un efecte sobre la solubilitat del metanol en la fase aquosa i disminueixen la concentració de metanol a la fase gas.

Per tant, serà molt important fer el calibratge de l'aparell en les condicions més semblants a les d'operació, és a dir, amb medi de cultiu i biomassa inactivada.

El calibratge realitzat (figura 6.9) s'ha dut a terme emprant una nova proposta de resposta del sensor perquè li permeti mantenir una coherència física respecte a les mesures preses.

En comptes d'emprar una resposta com la de l'equació 6.4.

$$[MeOH] = A \exp(bV) \quad (\text{eq. 6.4})$$

S'empra una resposta com la de l'equació 6.5 que permet donar un significat físic més complet al senyal en qüestió. Així, tot i descriure la resposta del sistema permet una restricció per concentracions de metanol nul·les.

$$[MeOH] = A(\exp(bV) - 1) \quad (\text{eq. 6.5})$$

on ,

V: Voltatge (V)

[MeOH]: Concentració de metanol en (g l^{-1})

A i b: Constants del sistema.

L'aplicació de la equació 6.5 és una bona opció per treballar en bioprocessos on el rang de mesura és gran però sembla que no és una bona funció matemàtica per descriure amb precisió la concentració de metanol en un rang de concentració entre 0 i 1 g l^{-1} . Per això cal plantejar possibles alternatives per fer el calibratge que poden passar per definir rangs d'operació més petits que el graficat (figura 6.9) i que permetin un ajust més acurat que impliqui menys error alhora de fer el control. Aquesta opció ha estat aplicada per poder fer els experiments descrits al *Capítol 7. Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut⁺_s de P. pastoris*.

Aquests experiments han estat realitzats fixant un rang de concentracions d'operació i fent que aquest s'ajusti a un rang de mesura de 0 a 2V. De manera que es realitza un calibratge ajustat, amb un senyal amb un soroll blanc que no té excessiva importància. El fet de treballar en aquest interval, a més de garantir la minimització dels interferents elèctrics, permet treballar en una zona força lineal, que és la zona de màxima sensibilitat del sensor. Per l'obtenció de cada un dels punts de la figura 6.9 es realitzen polsos de metanol per poder determinar la resposta del sensor i poder caracteritzar-la (figura 6.10).

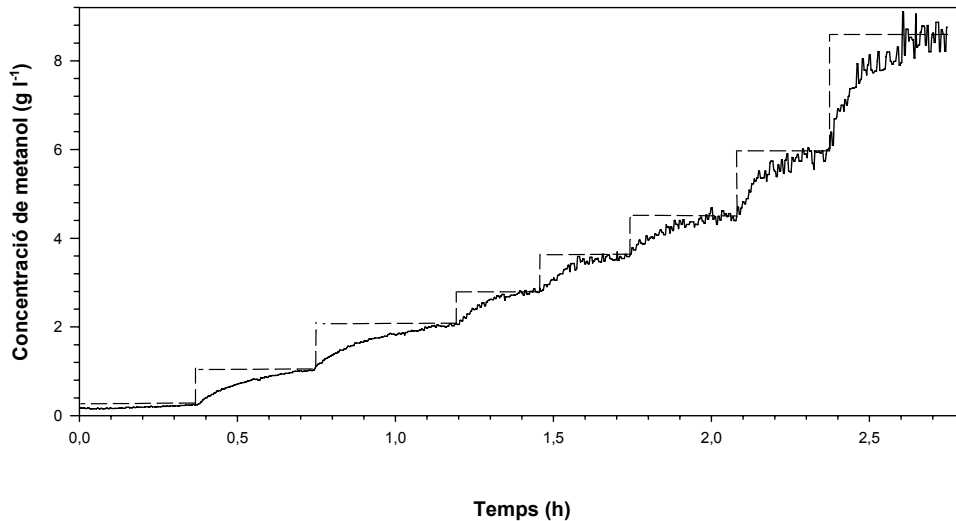


Figura 6.10. Evolució de la resposta del sensor de metanol en funció del temps per a diferents concentracions en la fase aquosa del fermentador.

El fet de treballar en aquest rang a més de garantir la minimització dels interferents elèctrics, permet treballar en un interval força lineal que és la zona de major sensibilitat. Tal i com es pot apreciar en la figura 6.11, si es realitza un esglaó per passar dels 0.5 als 1.75 g l⁻¹ de metanol, la resposta del sensor és fàcilment associable a un sistema de primer ordre amb temps mort que tendeix a la saturació un cop s'assoleix una mesura estacionària.

$$G(s) = \frac{K e^{-t_d s}}{\tau s + 1} \quad (\text{eq. 6.6})$$

Emprant el mètode de Cohen Coon (eq. 6.6), s'obté un temps mort d'uns 7 minuts, una constant del sistema de 0.121 g minuts⁻¹ i una constant de temps de 24.1 minuts.

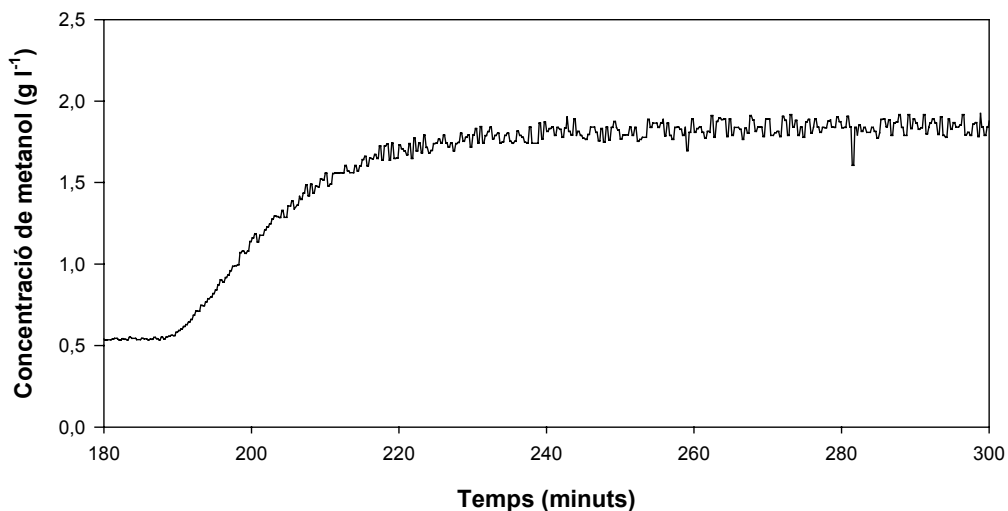


Figura 6.11. Resposta del sensor davant d'un pols de metanol

6.3. Conclusions

L'esquema proposat permet l'obtenció d'una mesura estable i sense interferències que pot ser emprada per al control de la concentració de metanol.

El procediment experimental i el muntatge proposats permeten aconseguir una solució viable, robusta i de cost raonable per a la seva aplicació en processos de producció de proteïnes recombinants amb *P. pastoris*.

Aquesta proposta permet, per tant, l'estudi de les millors condicions d'operació per a la optimització de la producció amb *P. pastoris* emprant el promotor *AOX* i un cop determinades garantir la repetibilitat dels experiments de cara a la seva aplicació industrial.

Capítol 7. Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut^s de *Pichia pastoris*

7.1. Introducció

Quan l'objectiu de la recerca és l'obtenció de petites quantitats de proteïnes heteròlogues per estudis de caràcter estructural, l'estratègia d'addició de metanol, proposada per Invitrogen Co. (San Diego, CA, USA) al seu protocol "*Pichia* fermentation process guidelines", emprant flascons "erlenmeyer" agitats pot ser satisfactòria (Daly i Hearn 2005). Quan l'objectiu és maximitzar la productivitat i reproductibilitats, és necessari fer una bona selecció de l'estratègia d'addició de metanol i controlar perfectament les condicions en les quals es desenvolupa el procés.

Quan no es disposa d'una mesura en línia de la concentració de substrat, s'han descrit dues estratègies d'addició basades en el "DO spike method" o en una addició de metanol en llaç obert (Stratton *et al.*, 1998).

En la primera de les estratègies, el cabal de metanol addicionat es modifica depenent del consum de metanol que es pot extrapolar de la sobtada pujada de la mesura d'oxigen dissolt. Rodríguez – Jiménez *et al.*, han provat tres estratègies diferents en cultius amb un clon Mut^s de *Pichia pastoris* productor de dextranasa (Jimenez *et al.*, 1997). Comparant les metodologies proposades, la que empra un sistema en base a la mesura de l'oxigen dissolt dóna millors resultats en quant a creixement i producció que la utilització de un control manual de metanol, obtenint 56.2 g de biomassa i 5.14 g de dextranasa per litre.

Lim *et al.*, (2003) han emprat un DO – stat per dues de les variables d'estat en la producció de rGuamerina en un cultiu semicontinu. La pressió parcial d'oxigen al fermentador i el cabal de metanol es controlen simultàniament. Emprant aquesta estratègia de control, s'aconsegueixen concentracions cel·lulars que superen els 140 g l⁻¹ i concentracions de rGuamerina que són un 40% superiors a les obtingudes en semicontinu emprant un control manual de metanol. Tots aquests controladors basen el seu funcionament en una estratègia d'addició de metanol que permeti respondre davant de variacions de la concentració d'oxigen dissolt en el fermentador.

Seguint en la mateixa línia, Oliveira ha emprat un control adaptatiu d'oxigen dissolt (Oliveira *et al.*, 2005) i Chung ha dissenyat un controlador basat en un criteri d'estabilitat

de Bode (Chung 2000) però tot i ser un mètode millor que el control manual, no s'aconsegueix mantenir constant la concentració de metanol ni la velocitat específica de creixement, cosa que fa molt difícil el poder concloure els efectes de qualsevol d'aquestes variables a la producció de proteïnes heteròlogues.

A més, els sistemes basats en la concentració d'oxigen dissolt tenen un problema afegit. Si el microorganisme atura el seu creixement o està operant a concentracions de metanol inhibidores, el controlador detecta una disminució en el consum d'oxigen dissolt, augmentant el pO_2 , i en conseqüència es produeix una addició que pot assolir nivells inhibitoris que malbaratin el cultiu.

Davant d'aquesta problemàtica s'han desenvolupat estratègies en llaç obert que varien l'addició del metanol al llarg del temps basant-se en les equacions del balanç de matèria per mantenir una velocitat específica de creixement (μ) constant. Aquesta estratègia en llaç obert ha estat desenvolupada per Zhang *et al.*, (2000b) en base al protocol d'addició proposat per Invitrogen. D'Anjou i Daugulis (2001) han aplicat aquesta estratègia per una addició combinada de glicerol i metanol en semicontinu, obtenint nivells de productivitat força interessants per cultius amb *P. pastoris*. Trinh *et al.*, (2003) han provat tres estratègies sobre la producció d'endostatina, que consisteixen en: la mesura del consum de substrat en base a un sensor de metanol, la concentració de metanol i per últim una basada en una estratègia amb addició exponencial preprogramada a una μ de $0.02h^{-1}$. El resultat de les tres estratègies fou molt similar en tots els casos ($133mg\ l^{-1}$ d'endostatina) però la quantitat de metanol consumida i la biomassa produïda es més baixa en la última de les estratègies. Això ha implicat una productivitat dues vegades més elevada en el cas de l'addició preprogramada.

Sinha (2003) ha desenvolupat un model de creixement amb metanol per a la producció del interferó- τ oví recombinant (r -oIFN- τ), que ha servit de base per definir una estratègia d'addició en llaç obert i que ha permès determinar unes condicions òptimes de producció associades a una μ de $0.025h^{-1}$.

Les estratègies descrites fins el moment no permeten una mesura directa de la variable que s'intenta controlar i qualsevol pertorbació o variació en el comportament del microorganisme poden ser suficients per no poder garantir les condicions en les quals es desitja que es desenvolupi el procés. A més, cal recordar que tot i ser, a priori, un mètode tant vàlid com els demás, l'addició preprogramada té com a limitació que no permet treballar amb un excés constant de metanol residual en el medi de cultiu. Aspecte que no permet explorar el comportament del microorganisme davant de l'excés de substrat.

Per poder garantir una resposta del sistema cal tenir una mesura directa del mateix i amb retroalimentació. Els elements que es poden emprar per aquesta finalitat han estat descrits al Capítol 6. *Eliminació d'interferències en la mesura de metanol.*

El sistema més senzill proposat i que empra el control retroalimentat i la mesura del metanol, és un control de tipus tot-o-res (Zhang *et al.*, 2000b; Katakura *et al.*, 1998; Guarna *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997). Aquest tipus de control difícilment funcionarà de forma correcta per l'elevada no linealitat dels bioprocessos i en particular del sistema d'expressió de *P. pastoris*.

La següent proposta en ordre de complexitat es un algoritme de tipus PI o PID però la dinàmica canviant d'aquest sistema biològic fa que s'hagin d'anar modificant els paràmetres associats a aquest tipus de controlador, podent arribar a desestabilitzar-se. La selecció d'aquests paràmetres cal fer-se per prova i error i és difícil poder calcular-los. A més, la natura d'aquest tipus de controladors no permet respondre de forma adequada davant de sistemes amb temps mort com el proposat. En aquesta línia, s'ha desenvolupat un controlador PID basat en un criteri d'estabilitat de Bode que permet assolir bons resultats a temps de cultius curts (Chung 2000).

El tipus de dinàmica del sistema fa que els paràmetres de control siguin variables amb el temps i que els temps de resposta sigui prou llarg com per a no menysprear-lo. Per aquest motiu s'han desenvolupat alternatives al control clàssic com l'estimació de paràmetres basada en models i la utilització d'algorismes d'optimització en línia per poder determinar els cabals de substrat inductor per optimitzar la producció en cultiu (Chae *et al.*, 2000). Kobayashi *et al.*, (2000a) han investigat la velocitat específica de creixement òptima, emprant programació dinàmica.

Finalment, com a precedent a aquest treball experimental, Cos *et al.*, (2006a) ha treballat en la producció de *Rhizopus oryzae* Lipasa (ROL) amb la soca Mut^s de *Pichia pastoris* amb un controlador combinat. Aquest està format per dos blocs, el primer basat en el balanç de substrat en torn al cultiu que permet establir el consum de metanol que té el microorganisme i el segon de tipus PI per poder respondre davant de pertorbacions i de canvis de consigna.

7.2. Presentació i discussió dels resultats

En base a solventar les problemàtiques associades a la no utilització d'un sistema prou robust de mesura i control del metanol, s'ha aplicat el sistema de control desenvolupat per

cultius en semicontinu amb la soca Mut_s^s de *Pichia pastoris* (Cos *et al.*, 2006a) amb la soca Mut_s⁺. La major dinàmica d'aquest sistema, velocitats de consum de metanol i de biomassa més elevades, posaran a prova l'algorisme desenvolupat. Aquesta estratègia permetrà estudiar l'efecte de la concentració del metanol sobre la producció de la proteïna d'interès, la *Rhizopus oryzae* Lipasa (ROL).

Els experiments realitzats han seguit l'esquema proposat a l'apartat de materials i mètodes amb una primera fase de creixement en discontinu, emprant com a substrat glicerol. Una segona fase de transició on es busca augmentar la concentració de biomassa i fer que el microorganisme adequi el seu metabolisme al consum de metanol, de cara a escurçar al màxim la etapa de latència que es produeix en canviar de substrat. Durant la segona fase, la transició, es manté una addició decreixent de glicerol i una constant de metanol que permet fer la aclimatació del microorganisme a l'agent inductor i només requereix una addició programada.

Finalment l'etapa d'inducció, on tal i com s'ha descrit a la introducció, cal emprar un llaç de control, anomenat controlador predictiu PI basat en model, que garanteixi la robustesa del sistema emprant l'analitzador comercial de metanol MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA) descrit al *Capítol 6. Eliminació d'interferències en la mesura de metanol* (Ramon *et al.*, 2004) i un algorisme de control basat en el consum de metanol (Cos *et al.*, 2006a). La estratègia emprada es pot observar a la figura 7.1.

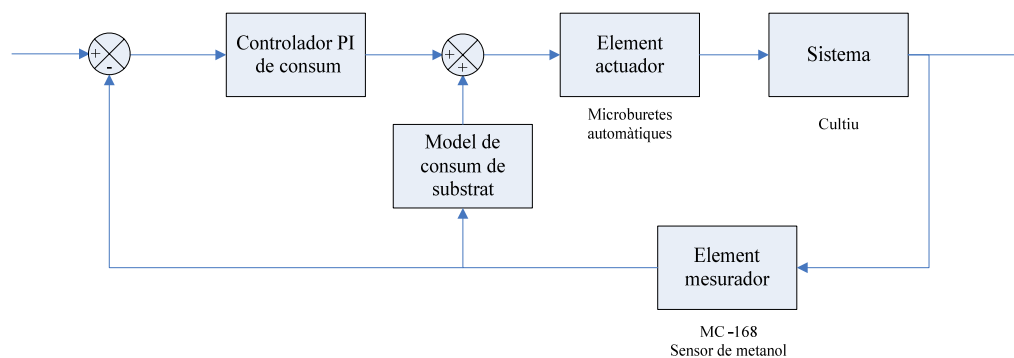


Figura 7.1. Llaç de control proposat per controlar la concentració de metanol en un cultiu en semicontinu de *P. pastoris*.

Per poder aplicar aquest esquema cal desenvolupar el model que descriu el consum de metanol i que permet determinar el cabal de metanol necessari. Aquest s'obté del balanç de substrat en torn al cultiu, equació 7.1.

$$F \cdot M_0 - r_M \cdot V = V \cdot \frac{dM}{dt} + M \cdot \frac{dV}{dt} \quad (\text{eq. 7.1})$$

on: F: Cabal d'alimentació ($l \cdot h^{-1}$).

M_0 : Concentració de metanol al aliment ($g \cdot l^{-1}$).

M: Concentració de metanol a l'interior del bioreactor ($g \cdot l^{-1}$).

r_M : Consum de metanol ($g \cdot h^{-1}$).

V: Volum de medi a l'interior del bioreactor (l).

Reordenant aquest balanç es pot aïllar la variació de la concentració de metanol al llarg del temps (equació 7.2)

$$\frac{dM}{dt} = -r_M + \frac{F(M_0 - M)}{V} \quad (\text{eq. 7.2})$$

i expressant els termes en forma de variables de desviació, s'obté la equació 7.3.

$$\frac{dM'}{dt} = -r_M' + \frac{F'(M_0 - M')}{V'} \quad (\text{eq. 7.3})$$

Considerant que, per intervals prou curts de temps, la variació de la concentració de metanol, la variació de volum i la velocitat de consum de metanol no són significatives, es pot calcular el cabal d'addició amb la equació 7.4.

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt} \quad (\text{eq. 7.4})$$

Per poder calcular en línia la equació 7.4, cal poder calcular la derivada de la concentració de metanol per cada un dels intervals de temps, el problema que es presenta és que aquest càlcul és molt sensible a variacions de baixa freqüència en la mesura del sensor de metanol. Per realitzar aquest càlcul s'aplica una eina numèrica que permet establir la tendència de la corba de forma suavitzada, anomenada aproximació per "splines", veure *capítol 4. Materials i mètodes*. Aquesta aproximació s'ha realitzat emprant una finestra temporal de pocs minuts que permet treballar respondre ràpidament a variacions en la dinàmica del sistema.

La equació 7.4 només considera l'addició de metanol per suplir el consum de metanol realitzat pels microorganismes però l'algorisme no es prou flexible per respondre en el cas de que es produeixi alguna desviació no desitjada o que simplement es vulgui canviar la concentració residual de metanol en el medi de cultiu. Per això cal modificar aquest

algorisme i així garantir la capacitat de resposta del mateix. Per fer-ho s'inclou un terme de control retroalimentat de tipus PI de velocitat (equació 7.5)

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \underbrace{\frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt}}_{\text{consum}} + \underbrace{K_p \left((\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \varepsilon_t \right)}_{\text{PI}} \quad (\text{eq. 7.5})$$

La combinació d'aquesta estratègia permet fixar els paràmetres de control al llarg de tota la fermentació, cosa força difícil en el cas d'altres controladors provats pel nostre equip (Cos 2005) que davant d'un sistema no – lineal com el proposat obliguen a modificar els paràmetres del controlador en funció del temps.

Experimentalment, s'ha comprovat que es poden establir uns valors fixes sigui quina sigui la consigna desitjada, per aquesta soca, $K_p=800 \mu\text{l l g}^{-1} \text{min}^{-1}$ i de $\tau_i = 5 \text{ min}$. Si aquests valors es comparen amb els obtinguts amb la soca Mut_s^- , $K_p=8 \mu\text{l l g}^{-1} \text{min}^{-1}$ i de $\tau_i = 30 \text{ min}$ (Cos 2005), es pot comprovar com cal sintonitzar els paràmetres amb valors de guany i efecte integral més elevats per poder respondre a la dinàmica del sistema.

Un cop demostrada l'eficàcia del controlador s'ha utilitzat per poder comprovar l'efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL per una soca Mut_s^+ de *P. pastoris* i la capacitat de mantenir la concentració del controlador. Les concentracions escollides es presenten a la taula 7.1.

Taula 7.1. Taula recull dels experiments realitzats

Nom de referència	Concentració de metanol
FB – A	0.5 g l ⁻¹
FB – B	0.7 g l ⁻¹
FB – C	3.0 g l ⁻¹
FB – D	4.8 g l ⁻¹

Els resultats d'aquests experiments es poden apreciar a les figures 7.2, 7.3, 7.4 i 7.5, on es representen l'evolució de les variables associades al producte, a la biomassa i al substrat inductor, el metanol, al llarg del cultiu semicontinu realitzat.

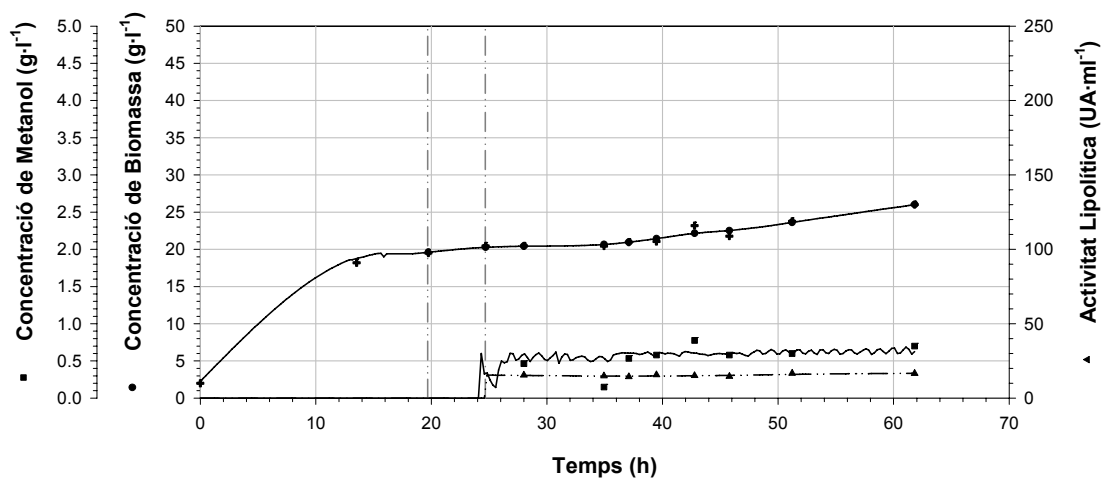


Figura 7.2. Evolució de la concentració de biomassa, substrat inductor i de producte en un cultiu per a la producció de ROL la soca Mut^+_s de *P. pastoris* amb una concentració de consigna de 0.5g l^{-1} .

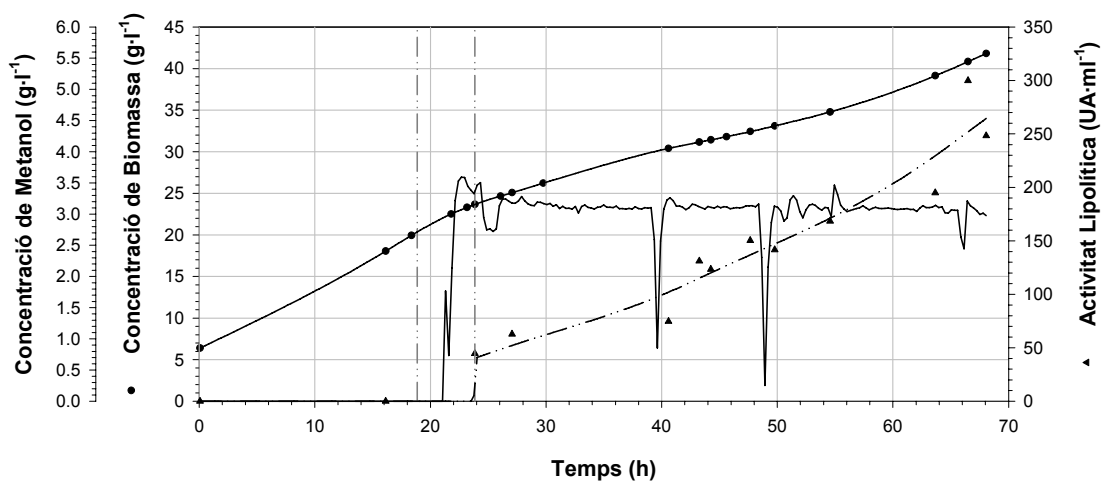


Figura 7.3. Evolució de la concentració de biomassa, substrat inductor i de producte en un cultiu per a la producció de ROL la soca Mut^+_s de *P. pastoris* amb una concentració de consigna de 0.7g l^{-1} .

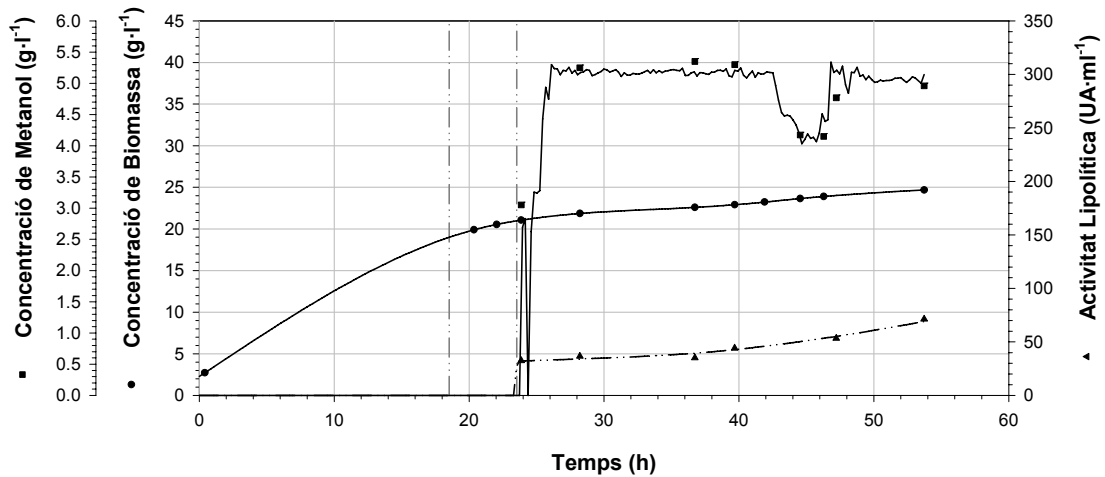


Figura 7.4. Evolució de la concentració de biomassa, substrat inductor i de producte en un cultiu per a la producció de ROL la soca Mut^+_s de *P. pastoris* amb una concentració de consigna de $3,0 \text{ g l}^{-1}$.

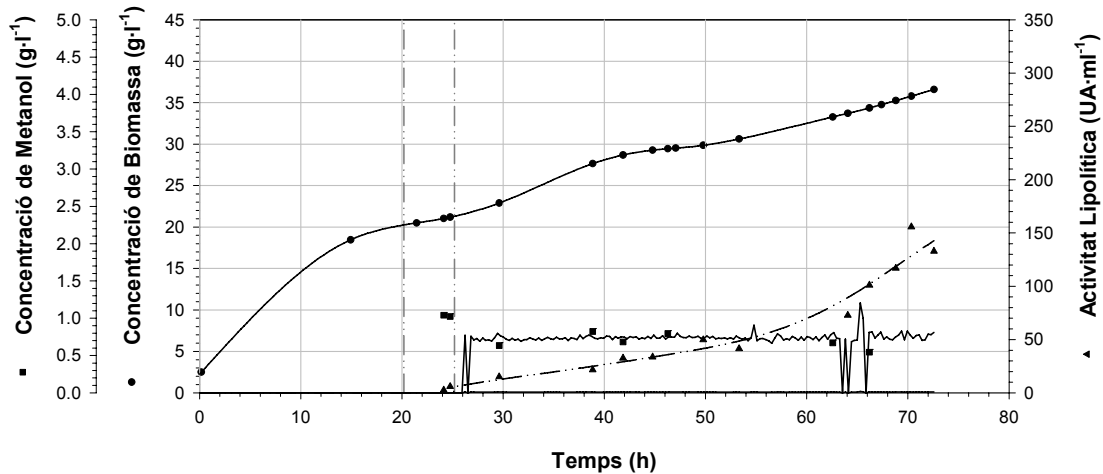


Figura 7.5. Evolució de la concentració de biomassa, substrat inductor i de producte en un cultiu per a la producció de ROL la soca Mut^+_s de *P. pastoris* amb una concentració de consigna de 4.8 g l^{-1} .

En aquestes figures es pot observar la bona resposta del controlador de metanol proposat i la capacitat del mateix per mantenir la concentració de consigna al llarg de la fermentació. Només s'han de lamentar alguns problemes de caire operatiu que tenen com a font els elevats cabals d'aire amb els que s'ha d'operar per poder cobrir la demanda d'oxigen que té aquest microorganisme i la conseqüent generació d'escumes i estabilització de les pressions a l'interior del bioreactor. Aquest efecte és més notable en el cas de les

fermentacions de 3 i 4.8 g l⁻¹, on el microorganisme creix més ràpidament (figures 7.3 i 7.4).

A la figura 7.4 no s'afegeixen els punts de les mesures de metanol fetes amb cromatògraf de gasos per malfuncionament d'aquest.

Al contrari del que s'ha detectat en els experiments realitzats amb la soca Mut^s_s (Cos *et al.*, 2006a) per a la producció de ROL al final de la fase de transició, no hi ha una acumulació de metanol. S'ha consumit tot el subministrat en aquesta fase, és a dir, la soca Mut⁺_s comença l'etapa d'inducció amb el sistema metabòlic a punt. D'aquesta manera, s'escurça quasi a zero el temps de latència que es detecta al inici de la fase d'inducció treballant amb les soques Mut^s_s.

En vista d'això i de cara a futurs experiments es pot pensar en millorar la fase de transició perquè el microorganisme tingui un excés de metanol que li permeti entrar en la fase d'inducció sense haver estat en cap moment sense substrat.

Taula 7.2. Taula dels paràmetres representatius de les fermentacions realitzades

Paràmetres	Concentracions (g l ⁻¹)			
	0.5	0.7	3	4.8
Activitat màx., (UA ml ⁻¹)	20	140	250	75
Y _{P/X} (UA g X ⁻¹)	769	3888	5952	3000
Productivitat (UA l ⁻¹ h ⁻¹)	800	2000	3571	1340
Productivitat específica (UA gX ⁻¹ h ⁻¹)	30.76	55.54	85.02	53.57

A partir d'aquests experiments amb control de metanol, considerant un estat pseudoestacionari, s'ha pogut desenvolupar un model cinètic que descriu el comportament d'aquesta soca davant de la concentració de metanol. Aquest creixement es pot associar a un model cinètic de tipus monod amb inhibició per substrat que és part d'una tesi de modelització del procés que s'esta desenvolupant dins del mateix grup d'investigació.

Si s'analitzen les figures subministrades es pot apreciar que les concentracions de producte més elevades tenen un màxim en una concentració de metanol entre els 0.7 i els 3 g l⁻¹ (Taula 7.2). Aquest òptim es correspon també amb la zona de màxima productivitat i productivitat específica.

Experiments realitzats per un component del grup en una estada en el departament de biotecnologia del Royal Institut of Technology de Estocolm (Suècia), situen aquest òptim a

2.5 g l⁻¹, obtenint una activitat màxima de 400 UA ml⁻¹. A mesura que ens allunyem d'aquest valor disminueix el màxim obtingut. En un sentit, de concentració creixent, es fa patent l'efecte de la inhibició (FB-C i FB-D) i en l'altre, l'activitat màxima disminueix fins arribar un nivell similar al de 0.5g l⁻¹ (FD-A) en que el microorganisme no es capaç de produir ROL durant la etapa d'inducció.

Aquest punt de màxima producció, l'experiment a 2.5 g l⁻¹, coincideix amb el punt on la velocitat específica mitjana de creixement és més gran ($\mu_{mitjana}$) 0.03 h⁻¹ (μ_{max} de 0.04 h⁻¹) i que es corresponen amb les velocitats específiques de producció més elevades, 242 UA gX⁻¹ h⁻¹.

Alguns autors (Gorgens *et al.*, 2004) han documentat la influència de la producció d'alts nivells de proteïna heteròloga influeixen sobre la fisiologia del microorganisme i sovint es reflexa en forma d'una reducció de la velocitat específica de creixement. Aquest fenomen es conegut com a "protein burden" – estrès produït per la producció de la proteïna – (Snoep *et al.*, 1995). Aquest efecte s'ha observat en diferents proteïnes heteròlogues amb el fenotip Mut⁺ de *P. pastoris*. En la producció d'un fragment d'una neurotoxina botulínica s'assoleix una μ_{max} de 0.07 h⁻¹ (Zhang *et al.*, 2000b). Pel cas de la producció de la hirudina heteròloga s'assoleix una μ_{max} de 0.046 h⁻¹ (Zhou i Zhang 2002). En tots dos casos està molt lluny de la μ_{max} obtinguda de 0.14 h⁻¹ obtinguda amb la soca salvatge (Brierley *et al.*, 1990). Si a aquests resultats bibliogràfics se li afegeixen els resultats obtinguts en aquest treball experimental, on s'assoleix una μ_{max} de 0.04 h⁻¹ per la producció de ROL, queda clar que la producció de la proteïna heteròloga afecta negativament al creixement.

D'altra banda, Cereghino i Cregg (2000), han demostrat que el nivell de transcripció obtingut treballant amb una limitació de metanol pel creixement de *P. pastoris* permet obtenir produccions entre 3 i 5 vegades superiors a les que s'obtenen amb excés de substrat inductor. En el cas que aquí ens ocupa, aquest efecte no es pot apreciar per l'aturada de la producció produïda per concentracions baixes de metanol.

Això implica que no hi ha una estratègia comuna per la producció de proteïnes heteròlogues amb *P. pastoris* i tot i que alguns autors (Lin Cereghino i Cregg 2000) proposen treballar a concentracions de metanol quasi limitant per obtenir la màxima productivitat, el cas aquí plantejat s'escapa d'aquesta línia, ja que implica operar a μ_{max} per aconseguir la màxima productivitat. No obstant això, caldria una un anàlisi de proteïna intracel·lular per saber el motiu de l'aturada.

Finalment, i per fer patent la necessitat d'aquest tipus de control si es vol optimitzar la producció de ROL, cal remarcar els resultats obtinguts per Cos *et al.*, (2006a), on emprant

un control manual, amb aquesta soca Mut⁺, s'aconsegueix menys de la meitat de la màxima producció obtinguda (205 UA ml⁻¹). Aquesta diferència no només és rellevant en el que fa referència a la producció si no que també s'ha de tenir en compte respecte a la part operativa on es requereix un seguiment constant de la fermentació, dubtosa robustesa i impossible reproductibilitat, aspectes que fan impossible dur-ho a nivell industrial.

7.3. Conclusions

La dinàmica no – lineal del sistema d'expressió de *P. pastoris* fa molt difícil la implementació d'algorismes de control que permetin mantenir controlades les variables d'estat. L'ús de sistemes retroalimentats de control basats en desviacions d'una consigna no permeten aconseguir resultats prou satisfactoris i per això és necessari emprar un control estable i precís que permeti actuar davant dels temps morts, temps de latència i demés vinculades a aquest sistema (Zhang *et al.*, 2002).

Un sistema com el proposat, mesurador en línia de metanol i controlador PI predictiu basat en model d'addició, permet realitzar els experiments necessaris per poder estudiar l'efecte de la concentració de metanol sobre la producció de ROL amb la soca Mut⁺_s de *P. pastoris*. Els resultats obtinguts són la via per poder treballar de forma robusta i reproduïble amb el sistema d'expressió en qüestió i reproduir-lo amb d'altres proteïnes que puguin ser d'interès.

Pel que fa al procés en qüestió, els resultats han permès obtenir una primera aproximació de la resposta del microorganisme davant de la concentració de metanol. Podent descriure el sistema amb una cinètica de creixement amb inhibició per substrat, on s'obtenen els millors nivells de producció quan es treballa a una concentració de metanol de 2.5 g l⁻¹.

La manca d'una estratègia comuna per treballar amb *P. pastoris* planteja la necessitat de desenvolupar un model que permeti descriure en profunditat les característiques de creixement del microorganisme i d'altra banda planteja la necessitat d'estudiar el comportament del microorganisme a μ controlada. Per aquest últim cas s'ha desenvolupat un estimador que es desenvolupa al *Capítol 8. Determinació de la velocitat específica de creixement de P. pastoris mitjançant un estimador adaptatiu.*

Capítol 8. Determinació de la velocitat específica de creixement mitjançant un estimador adaptatiu

8.1. Introducció

La velocitat específica de creixement (μ) és un dels paràmetres més importants en els processos fermentatius. Normalment, hi ha una relació directa entre els rendiments, el consum de substrat, la síntesi de bioproductes i la velocitat específica de creixement. Per tant, aquest paràmetre té un paper fonamental en la monitorització i control dels diferents processos biotecnològics.

La velocitat específica de creixement és funció de diferents factors biològics i físic – químics que normalment depenen de la concentració de substrat, la concentració de biomassa i de la de producte.

La determinació de la velocitat específica de creixement és un dels passos limitants del procés fermentatiu degut a la dificultat de realitzar una mesura directa de la mateixa i per tant la seva estimació es converteix en un pas indispensable.

L'elecció d'una descripció matemàtica apropiada i la identificació d'aquest paràmetre en base a dades experimentals és complicada, degut a la complexa dinàmica del sistema i la dificultat d'obtenir una reproductibilitat experimental suficient.

Un dels mètodes que permeten realitzar una aproximació més flexible i que no requereix un model cinètic és l'ús d'un algorisme adaptatiu de l'estimació de la velocitat específica de creixement, considerada com un paràmetre variable en el temps.

En base a aquest raonament s'ha analitzat la funcionalitat i rendiment de les diferents eines matemàtiques per poder determinar, mitjançant un sistema híbrid, el paràmetre d'interès i la concentració de biomassa per a un llevat d'interès biotecnològic com és *Pichia pastoris*.

Per poder optimitzar la producció d'un producte biotecnològic cal pensar en el control de bioreactors i en la identificació de la velocitat específica de creixement. Això suposa un delicat problema si es parteix de la idea de que els models biològics són aproximacions vàlides per explicar comportaments genèrics i la seva implementació per a l'aplicació en sistemes de control difícilment pot respondre a variacions sobtades dels paràmetres físics que intervenen en els processos.

Al llarg de les darreres dècades s'han desenvolupat diferents metodologies adaptatives, entre les quals destaca l'aplicació de el "Extended Kalman Filter" (EKF) (Stephanopoulos i San 1984; San i Stephanopoulos 1984) que requereixen el coneixement del model cinètic de creixement la qual cosa el fan difícilment aplicable. Aquests dos autors assumeixen que la velocitat específica de creixement és un paràmetre variable amb el temps amb una dinàmica variable i de característiques semblants a un soroll blanc. Aquest raonament no té un estricte fonament biològic i la seva generalització té una dubtosa validesa.

L'aplicació de l'EKF és difícil en sistemes no lineals, com en el qual es basa aquest treball, degut a problemes associats a la seva convergència i a la seva estabilitat.

Per minimitzar aquesta problemàtica s'han desenvolupat algorismes en dues etapes que permeten estimar els paràmetres i les variables d'estat per separat. Aquests mètodes permeten eliminar l'efecte de paràmetres que variïn lentament amb el temps però en contrapartida tenen grans dificultats de sintonització (Park i Ramirez 1990).

Com alternativa a l'aplicació de l'EKF a sistemes biològics, Bastin i Dochain, desenvoluparen observadors determinístics adaptatius no lineals emprant, com a mínim, una mesura en línia d'una de les variables d'estat (concentracions de biomassa, producte o substrat). Aquests algorismes tenen una estructura més senzilla que els EKF i una comprovada estabilitat. Autors posteriors han treballat per a la millora de la resposta i permetre una resposta més ràpida (Oliveira *et al.*, 1996). Però tot i les millores proposades i disposant de moltes avantatges sobre els anteriors, tenen una difícil implementació pràctica per la difícil obtenció de sensors que permetin obtenir mesures repetitives, directes i en temps real (sense retràs) de les variables d'estat (Cazzador i Lubenova 1995).

D'aquesta manera, s'han proposat diferents aproximacions per a l'estimació de les cinètiques de creixement en bioprocessos basats en l'estructura teòrica general desenvolupada per Dochain i Bastin (Dochain i Bastin 1990). Farza i Cazzador (Farza *et al.*, 1997; Cazzador i Lubenova 1995) proposen treballar amb Observadors basats en estimadors - Observed Based Estimators (OBE), els fonaments dels quals es troben descrits a la teoria de sistemes no lineals. Aquests dos treballs estimen les velocitats específiques de creixement a través de mesures d'algunes de les variables més assequibles com són la velocitat de consum d'oxigen (Oxygen Uptake Rate - OUR) i la velocitat de generació de diòxid de carboni (Carbon dioxide Evolution Rate - CER) per a l'estimació de la velocitat específica de creixement.

Davant de la necessitat de millorar aquests observadors, alguns autors han estudiat els OBE per a l'estimació dels paràmetres cinètics i aconseguir millorar l'estabilitat de les

dinàmiques de convergència relacionades amb la sintonització dels paràmetres de disseny (Perrier *et al.*, 2000).

Paral·lelament al desenvolupament dels estimadors descrits s'han implementat sistemes d'identificació per mínims quadrats que permeten operar sense dependre de models cinètics, podent convergir quasi independentment de la història del procés (Estler 1995). Aquest identificadors es basen en una resposta lineal del sistema analitzat dins de l'interval de temps on es realitza la identificació.

L'objectiu del present treball es realitzar l'estimació de la velocitat específica de creixement i de la concentració de biomassa d'un sistema biològic operant amb una estratègia semicontinua per a la producció de proteïnes heteròlogues en el sistema d'expressió de *P. pastoris*. Per dur-ho a terme s'han provat diferents estimadors i s'han realitzat les modificacions corresponents fins a trobar un estimador robust, aplicable i de resposta ràpida que permeti respondre davant de possibles pertorbacions en cultius que emprin aquest sistema d'expressió.

El primer que s'ha realitzat és l'estudi del comportament dels estimadors davant de simulacions basades en el balanç de matèria (equacions 8.1, 8.2, 8.3, 8.4 i 8.5) i l'aplicació d'un model de mesura que relaciona la CER amb la velocitat específica de creixement i la concentració de biomassa (equació 8.6) (Montesinos *et al.*, 1995).

$$\frac{dX(t)}{dt} = \mu(t)X(t) - X(t)\frac{u(t)}{V} \quad (\text{eq. 8.1})$$

$$\frac{dS(t)}{dt} = -Y_{x/s} \mu(t)X(t) - (S_0 - S(t))\frac{u(t)}{V(t)} \quad (\text{eq. 8.2})$$

$$D(t) = \frac{u(t)}{V(t)} \quad (\text{eq. 8.3})$$

$$\frac{dV(t)}{dt} = u(t) \quad (\text{eq. 8.4})$$

$$\mu(t) = \mu_{\max} \frac{S(t)}{K_s + S(t)} \quad (\text{eq. 8.5})$$

$$CER(t) = Y_{CO_2/X} \mu(t)X(t) + m_{CO_2/X} X(t) \quad (\text{eq. 8.6})$$

Com a segona pas, s'han simulat experiments en semicontinu que es componen d'una etapa en discontinu, on el microorganisme creix amb glicerol com a font de carboni i una etapa on s'indueix la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) emprant metanol, *Capítol 4. Materials i mètodes*. Aquesta segona etapa s'ha realitzat simulant una addició exponencial que permet hipotèticament mantenir el valor de μ en un valor aproximadament constant (Resina *et al.*, 2005). Si es considera que hi ha un pseudoestat estacionari per a cada instant de temps, a partir del balanç de substrat a la fase d'inducció, es pot obtenir la relació entre la velocitat específica de creixement, el cabal de substrat addicionat i la biomassa en cada instant (equació 8.7).

$$\mu(t) = \frac{Y_{X/S} u(t) S_0}{V(t) X(t)} \quad (\text{eq. 8.7})$$

Si a més s'integra el balanç de biomassa en la fase d'inducció s'obté la equació 8.8.

$$X(t)V(t) = X(t_0)V(t_0) \exp[\mu(t - t_0)] \quad (\text{eq. 8.8})$$

I combinant i reordenant les equacions 8.7 i 8.8, s'obté el cabal que cal addicionar per poder mantenir la velocitat específica de creixement constant (equació 8.9).

$$u(t) = \frac{\mu(t)[X(t_0)V(t_0)]}{Y_{X/S} S_0} \exp[\mu(t - t_0)] \quad (\text{eq. 8.9})$$

Aquest cabal depèn del volum inicial $V(t_0)$, de la concentració de biomassa inicial $X(t_0)$ i de $Y_{X/S}$ que es considera constant al llarg de la fermentació.

Els observadors emprats es basen en la mesura dels gasos de sortida del fermentador en el qual s'ha dut a terme l'operació. Realitzant proves prèvies s'ha detectat que la CER és la variable que permet detectar de forma més sensible als canvis fisiològics produïts a les cèl·lules, característica que la fa més idònia per avaluar de forma més fidedigne l'evolució del paràmetre d'interès, la velocitat específica de creixement.

8.1.1. Estimadors basats en observadors no lineals

La velocitat específica de creixement és una funció no lineal, variable en el temps, de la concentració de diferents espècies i factors ambientals com són la temperatura, el pH, etc.

La utilització d'estimadors no requereix conèixer la relació entre la μ i la resta de variables d'estat, és a dir la cinètica de creixement. Això implica, a la vegada, que no cal saber els valors de part dels paràmetres associats a aquesta estructura i la seva possible variació temporal.

El fonament per al disseny dels estimadors que s'utilitzaran per a la determinació de μ és la suposició de que es treballa amb una sèrie de paràmetres variables amb el temps que engloben les possibles variacions associades a les variables d'estat que difícilment són contemplables en la seva totalitat.

Els primers observadors provats, els d'estructura no lineal, es basen en la definició general d'observador proposada per Dochain i Bastin (1990) que queda recollida a l'equació 8.10 (Farza *et al.*, 2000).

$$\dot{\hat{z}} = F(s, \hat{z})\hat{z} + G(u, s, \hat{z}) - \Lambda^{-1}(s, \hat{z})S_{\theta}^{-1}C^T(C\hat{z} - y) \quad (\text{eq. 8.10})$$

— *Estimador I*

El primer estimador no lineal (Estimador I) es basa en un desconeixement de la dinàmica de μ però la considera acotada en un interval conegut (entre 0 i μ_{\max}) (Farza *et al.*, 2000).

Llavors defineix CER com la seva variable de mesura (equació 8.11) i considera una relació entre aquesta variable i la μ a través del model de mesura (equació 8.6).

$$z_1 = \text{CER} \quad (\text{eq. 8.11})$$

Si s'empra el model de mesura (equació 8.6) i el balanç de biomassa entorn al cultiu (equació 8.1) s'obté la dinàmica de z en funció de μ (equació 8.12).

$$\dot{z}_1 = \left(\mu + \frac{\dot{\mu}}{\mu + \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}}} \right) z_1 - Dz_1 \quad (\text{eq. 8.12})$$

Aquesta dinàmica depèn bàsicament de μ i de la seva derivada respecte al temps ($\dot{\mu}$) i dels valors de les constants del model de mesura.

$$z_2 = \mu + \frac{\dot{\mu}}{\mu + \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}}} \quad (\text{eq. 8.13})$$

S'han realitzat experiments que demostren que la definició d'un observador en base a aquestes dues variables és insuficient per poder aconseguir una estimació sense problemes d'adaptació (és manté una desviació fixa de la estimació de μ a més de tenir problemes de convergència inicials).

Aquests problemes es minimitzen definint una tercera variable que té en compte la dinàmica de la segona variable i que considera de dinàmica desconeguda i acotada, cosa que permet descriure el sistema d'equacions que descriu la suposada dinàmica del sistema biològic (equacions 8.14, 8.15 i 8.16).

$$\dot{z}_1 = z_2 z_1 - Dz_1 \quad (\text{eq. 8.14})$$

$$\dot{z}_2 = z_3 \quad (\text{eq. 8.15})$$

$$\dot{z}_3 = \varepsilon(t) \quad (\text{eq. 8.16})$$

Llavors es defineix l'observador I (equacions 8.17, 8.18 i 8.19) que s'obté de l'aplicació d'observador no lineal (equació 8.6) al sistema definit (equacions 8.14, 8.15 i 8.16)

$$\dot{\hat{z}}_1 = \hat{z}_2 \hat{z}_1 - D\hat{z}_1 - 3\delta(\hat{z}_1 - z_1) \quad (\text{eq. 8.17})$$

$$\dot{\hat{z}}_2 = \hat{z}_3 - 3\frac{\delta^2}{z_1}(\hat{z}_1 - z_1) \quad (\text{eq. 8.18})$$

$$\dot{\hat{z}}_3 = -\frac{\delta^3}{z_1}(\hat{z}_1 - z_1) \quad (\text{eq. 8.19})$$

Podent obtenir el valor de μ de l'equació 8.20.

$$\dot{\hat{\mu}} = (\hat{z}_2 - \hat{\mu}) \left(\hat{\mu} + \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} \right) \quad (\text{eq. 8.20})$$

L'estimador proposat convergeix sempre que z_2 no sigui negatiu durant un llarg període de temps i si es compleix la següent condició (equació 8.21) en tot l'espai temporal.

$$\forall t \geq 0 \quad \dot{\mu}(t) \geq - \left(\mu(t) + \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} \right)^2 \quad (\text{eq. 8.21})$$

— *Estimador II*

Treballant en la mateixa línia que l'estimador I (Farza *et al.*, 2000), Cazzador (1995) proposa un canvi de variable en la variable mesurada perquè considera que l'estimació de μ serà millor que si es fes directament (equacions 8.22 i 8.23).

$$w_1 = \ln(z_1) \quad (\text{eq. 8.22})$$

$$w_2 = \ln \left(\mu + \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} \right) \quad (\text{eq. 8.23})$$

A partir d'aquesta definició es segueix el mateix procediment que el descrit per l'estimador I obtenint un sistema d'equacions (equacions 8.24, 8.25 i 8.26) que determina la dinàmica del sistema biològic:

$$\dot{w}_1 = w_3 + \exp(w_2) - \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} - D \quad (\text{eq. 8.24})$$

$$\dot{w}_2 = w_3 \quad (\text{eq. 8.25})$$

$$\dot{w}_3 = \varepsilon(t) \quad (\text{eq. 8.26})$$

que aplicant la definició d'un observador no lineal proposada per Dochain i Bastin (equació 10) descriu l'estimador II (equacions 8.27, 8.28 i 8.29)

$$\dot{\hat{w}}_1 = \hat{w}_3 + \exp(\hat{w}_2) - \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} - D - 2\delta(\hat{w}_1 - w_1) \quad (\text{eq. 8.27})$$

$$\hat{w}_2 = \hat{w}_3 - 2\delta(\hat{w}_1 - w_1) \quad (\text{eq. 8.28})$$

$$\hat{w}_3 = -\delta^2(\hat{w}_1 - w_1) \quad (\text{eq. 8.29})$$

Podent obtenir el valor de la μ estimada a través de la expressió (equació 30):

$$\hat{\mu} = \exp(\hat{w}_2) - \frac{m_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} \quad (\text{eq. 8.30})$$

8.1.2. Estimadors basats en algorismes adaptatius emprant identificació per mínims quadrats.

A més dels estimadors no lineals s'han desenvolupat altres estimadors de caire lineal que permeten operar sense considerar models cinètics de creixement, podent convergir independentment de la història del procés (Estler 1995).

Aquests estimadors es basen en una identificació recursiva per mínims quadrats (*Recursive Least Squares – RLS*) que pressuposa una resposta lineal del sistema per a l'interval de temps on es realitza cada una de les identificacions. Aquesta suposició ha estat comprovada per Roux *et al.*, (1996) que demostra la capacitat dels estimadors lineals a l'hora d'estimar paràmetres en un procés fermentatiu, i s'ha corroborat en els estudis realitzats per Carrier i Stephanopoulos (1998) on s'ha comprovat la seva eficiència a l'hora de dur a terme identificacions d'aquest tipus.

— *Estimador III*

Aquest tipus d'identificació s'ha descrit per models biològics emprant simulacions (Estler 1995), on partint del balanç de matèria entorn a un cultiu discontinu (equacions 8.1, 8.2, 8.3, 8.4 i 8.5), el model de mesura (equació 8.6) i la mesura de la OUR, s'ha pogut identificar el valor de la μ (Estimador III). Aquest mateix estimador s'ha aplicat en un cultiu semicontinu, per a l'estimació de la velocitat específica de creixement per fermentacions aeròbies en base a les mesures de la concentració d'oxigen i diòxid de carboni en els gasos de sortida del fermentador (Golobic *et al.*, 1999). No obstant això, la realització del cultiu semicontinu s'ha dut a terme sense una estratègia d'addició, podent afirmar que l'aplicació realment descrita es correspon més a cultius discontinus on s'han

realitzat addicions puntuals del substrat que a més, és el mateix en la fase de creixement que en la fase d'inducció.

El model descrit pels dos autors (Estler 1995; Golobic *et al.*, 1999) per a l'identificació de μ és molt semblant i es basa en un desenvolupament de la definició del model de mesura (equació 8.6) i el balanç de matèria (equació 8.1).

Per poder aplicar-lo al sistema que ens ocupa, per a un cultiu semicontinu, i per poder emprar la mesura de la CER en les unitats amb les quals s'opera habitualment es presenta un model adaptat del proposat pels dos autors de referència (equacions 8.31, 8.32, 8.33, 8.34 i 8.35).

$$CER(t) = Y_{CO_2/X} \mu(t) X(t) + m_{CO_2/X} X(t) \quad (\text{eq. 8.31})$$

$$\frac{dCER(t)}{dt} = \frac{d(\mu(t))}{dt} X(t) Y_{CO_2/X} + \frac{dX(t)}{dt} Y_{CO_2/X} \mu(t) + m_{CO_2/X} \frac{d(X(t))}{dt} \quad (\text{eq. 8.32})$$

$$\frac{dCER(t)}{dt} = \frac{d(\mu(t))}{dt} X(t) Y_{CO_2/X} + (\mu(t) X(t) - D(t) X(t)) \mu(t) Y_{CO_2/X} + m_{CO_2/X} (\mu(t) X(t) - D(t) X(t)) \quad (\text{eq. 8.33})$$

$$\frac{dCER(t)}{dt} = \frac{d(\mu(t))}{dt} X(t) Y_{CO_2/X} + (\mu(t) - D(t)) CER(t) \quad (\text{eq. 8.34})$$

$$\frac{dCER(t)}{dt} = \frac{d(\mu(t))}{dt} X(t) Y_{CO_2/X} + (\mu(t) - D(t)) CER(t) \quad (\text{eq. 8.35})$$

Si es considera que l'interval de mostreig és suficientment petit i que en aquest la μ varia lentament, considerant que la seva dinàmica és negligible en el balanç de CER (estat pseudoestacionari), es pot menysprear el primer terme de la equació 8.35. Aquesta consideració provoca que la dinàmica de CER sigui funció d'aquesta mateixa i de la diferència entre μ i el factor dilució.

Si llavors es procedeix a equiparar la diferenciació de la variable mesurada a una discretització emprant una forma de diferenciació central d'Euler s'obté la equació 8.36

$$\frac{CER(n+1) - CER(n-1)}{t(n+1) - t(n-1)} = (\mu(n) - D(n)) CER(n) \quad (\text{eq. 8.36})$$

reordenat l'equació 8.36 es pot definir una variable $\theta(n)$ (equació 8.37) que recull els termes no associats a la mesura de CER i que és el paràmetre a identificar. D'aquesta manera, amb la mesura de la CER al llarg del temps, del valor del factor de dilució i d'un mètode recursiu d'identificació per mínims quadrats podem determinar el valor del paràmetre d'interès (equació 8.39).

$$\frac{CER(n+1) - CER(n-1)}{CER(n)} = \theta(n) = (\mu(n) - D(n))(t(n+1) - t(n-1)) \quad (\text{eq. 8.37})$$

$$CER(n+1) = \hat{\theta} CER(n) + CER(n-1) \quad (\text{eq. 8.38})$$

$$\mu(n) = \frac{\hat{\theta}(n)}{t(n+1) - t(n-1)} + D(n) \quad (\text{eq. 8.39})$$

A partir d'aquest model es defineixen dos estimadors que difereixen en el sistema d'identificació emprat. El primer (Estimador III) basat en la proposta realitzada per Estler (1995) treballa amb un algorisme recursiu d'identificació per mínims quadrats clàssic que varia la seva sensibilitat depenent d'un factor d'oblit fix (λ) (Åstrom i Wittenmark 1990) i es basa en la següent definició de variables (equacions 8.40, 8.41, 8.42, 8.43 i 8.44).

$$\hat{\theta}(n) = \hat{\theta}(n-1) + K(n)(y(n) - \hat{y}(n)) \quad (\text{eq. 8.40})$$

$$\hat{y}(n) = \Psi^T(n) \hat{\theta}(n-1) \quad (\text{eq. 8.41})$$

$$K(n) = Q(n) \Psi(n) \quad (\text{eq. 8.42})$$

$$Q(n) = \frac{P(n-1)}{\lambda(n) + \Psi(n)^T P(n-1) \Psi(n)} \quad (\text{eq. 8.43})$$

$$P(n) = \frac{1}{\lambda(n)} \left(P(n-1) - \frac{P(n-1) \Psi(n) \Psi(n)^T P(n-1)}{\lambda(n) + \Psi(n)^T P(n-1) \Psi(n)} \right) \quad (\text{eq. 8.44})$$

On $\theta(t)$ és el paràmetre estimat, $P(t)$ és la matriu de covariança, $y(t)$ és el vector de valors resultants de l'estimació ($CER(n)$) i Ψ és la matriu de valors d'entrada i de sortida.

— *Estimador IV*

Tal i com s'ha descrit, el factor d'oblit pot ser fix i per tant se li estableix un valor inicial que no varia al llarg de tot el procés d'identificació. Però si d'altra banda, es pot tenir una variabilitat del mateix per poder incloure la dinàmica de la velocitat específica de creixement, menyspreada a partir de la equació 8.35 (Golobic *et al.*, 1999). I perquè això permeti que s'adapti a les necessitats del procés identificatiu, cal recalculer el valor del factor d'oblit (equació 8.45), definint una eina (Estimador IV) que fa que l'algorisme tingui una sensibilitat més gran a les variacions de la CER i al mateix temps a la dinàmica del procés (Isermann *et al.*, 1992).

$$\lambda(n) = 1 - \frac{(y(n) - \hat{y}(n))^2}{\Sigma_0} \left(1 - \frac{\Psi(n)^T P(n-1) \Psi(n)}{\lambda(n) + \Psi(n)^T P(n-1) \Psi(n)} \right) \quad (\text{eq. 8.45})$$

Aquesta adaptació del factor d'oblit és funció de la mesura de l'error realitzat en la estimació. Si l'error és petit hi ha poca excitació i la variació de λ és petita però si l'error és gran fa baixar el valor del factor d'oblit per permetre una ràpida adaptació.

L'equació 8.45 recull un paràmetre nou que no apareix en l'algorisme recursiu de mínims quadrats, l' Σ_0 , que és l'únic coeficient del procés d'identificació i per tant es manté invariable. Un valor baix d'aquest paràmetre provoca que λ variï força, permetent una adaptació ràpida però més inestable (per a sistemes amb forta variació del paràmetres) i si pel contrari es gran produeix un efecte invers, tenint menys capacitat d'adaptació.

En base a la bibliografia emprada i a les adaptacions proposades, es procedeix a realitzar un estudi en base a simulacions de l'efectivitat dels quatre estimadors proposats de cara a escollir-ne un per poder realitzar l'estimació de la velocitat específica de creixement en cultius semicontinus emprant *P. pastoris* com a sistema d'expressió per a la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL).

8.2. Resultats i discussió

Per poder determinar quin és l'observador més adient per a la identificació de la velocitat específica de creixement es comparen els diferents estimadors descrits per la simulació de cada un d'ells amb l'eina matemàtica de simulació de processos MATLAB 6.5.0.180913a. Release 13

La simulació dels diferents processos s'ha realitzat amb la finalitat de poder caracteritzar i analitzar la capacitat d'adaptació, els requeriments, la deriva dels sistemes davant de canvis sobtats i la velocitat de resposta de cada una dels estimadors emprats.

Tal i com s'ha descrit, els observadors I i II empen un estimador no lineal que està basat en l'adaptació de la definició d'un observador genèric al model de mesura (equació 8.6), definint una sèrie de canvis de variable per tenir en compte la dinàmica de la velocitat específica de creixement.

Pel que fa als estimadors III i IV, empen un mètode recursiu basat en mínims quadrats (RLS – Recursive Least Squares) que permeten obtenir els paràmetres i variables d'estat que defineixen el procés, com són la velocitat específica de creixement i la concentració de biomassa. La diferència entre ambdós estimadors radica en la necessitat de definir un factor d'oblit que en el primer cas té un valor fix i en el segon és variable.

S'han realitzat simulacions considerant estratègies en discontinu i en semicontinu, simulant una addició exponencial que permet mantenir la velocitat específica de creixement, aproximadament constant, al llarg del temps per a un cultiu emprant la soca Mut^s_s (soca KM100_1 – Mut^s singlecopy his⁺) de *P. pastoris* que empra el promotor PAOX per la producció de ROL (Resina *et al.*, 2005). Per això s'han emprat els paràmetres de la taula 8.1.

Taula 8.1. Recull dels paràmetres emprats per realitzar les simulacions que permeten analitzar la viabilitat de la implementació dels observadors i identificadors estudiats en sistemes reals.

Paràmetres	PAOX	
	Discontinuu	Semicontinu
Substrat	Glicerol	Metanol
μ_{\max} (h ⁻¹)	0.26	0.054
$\mu_{\text{pre-programada}}$ (h ⁻¹)	--	0.02
K_s (g l ⁻¹)	0.2	0.218
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0.45	0.215
S_i (g l ⁻¹)	980	790
$Y_{\text{CO}_2/X}$ (mols CO ₂ g ⁻¹)	1.31e-2	1.44e-1
$m_{\text{CO}_2/X}$ (mols CO ₂ h ⁻¹ g ⁻¹)	2.22e-4	3.94e-4

S'han fet proves per cada un dels paràmetres i variables associats als estimadors, obtenint els valors més adients que permeten aconseguir una estimació òptima de la velocitat específica de creixement en tots els casos. A partir d'aquest valors, s'ha procedit a fer variacions de cada un dels paràmetres i del valor inicial de les variables per poder estudiar la seva sensibilitat als canvis produïts.

Per a cada un dels casos s'ha realitzat el procés de càlcul de la concentració de biomassa al llarg del temps per poder veure amplificat l'efecte produït per cada un dels paràmetres modificats.

Cada un dels estimadors ha estat analitzat permetent discernir quin dels observadors era el més adequat per poder identificar el paràmetre en qüestió en una fermentació per a la producció de ROL en *P. pastoris*.

8.2.1. Comparació dels estimadors proposats en simulació.

— Estimadors basats en observadors no lineals. Estimador I

Per l'estimador I (equació 8.17, 8.18 i 8.19), s'ha realitzat l'anàlisi variant els valors inicials de les variables o els valors dels paràmetres a les simulacions. Primerament s'han fet les simulacions sobre les variacions aplicades als paràmetres propis de l'observador, obtenint la figura 8.1 on s'aprecia l'efecte d'aquests sobre la μ .

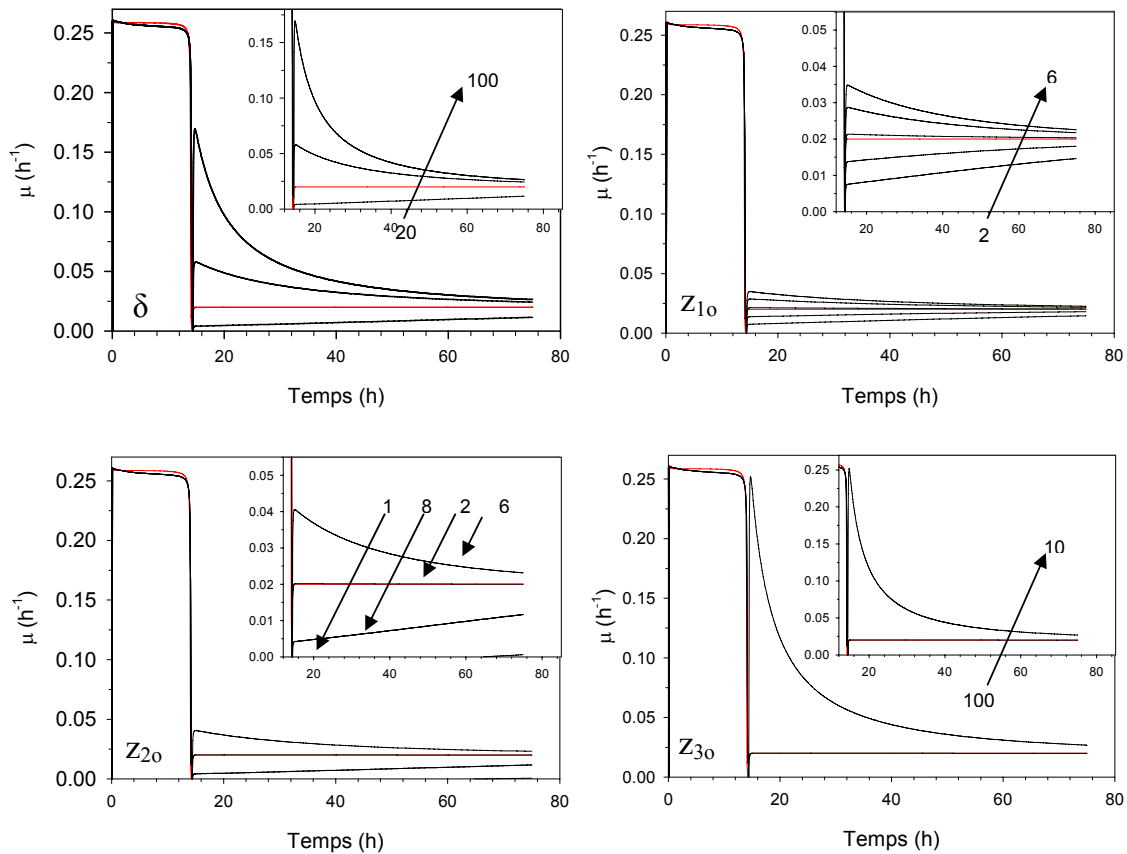


Figura 8.1. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres implicats en la identificació de la velocitat específica de creixement amb l'estimador I. (a) variació de θ , (b) variació del valor inicial de z_{10} , (c) variació del valor inicial de z_{20} , (d) variació del valor inicial de z_{30} . (—) simulació del model, (—) estimacions.

Les estimacions realitzades s'han fet variant els paràmetres en dos trams, un primer associat a l'etapa discontinua i un segon per a la semicontinua, que ha portat implícit una reinicialització dels paràmetres per adaptar-los a les dinàmiques de cada una de les fases.

La figura 8.2 recull l'efecte produït per la variació dels esmentats paràmetres i valors inicials de les variables en la concentració de biomassa resultant del balanç de matèria .

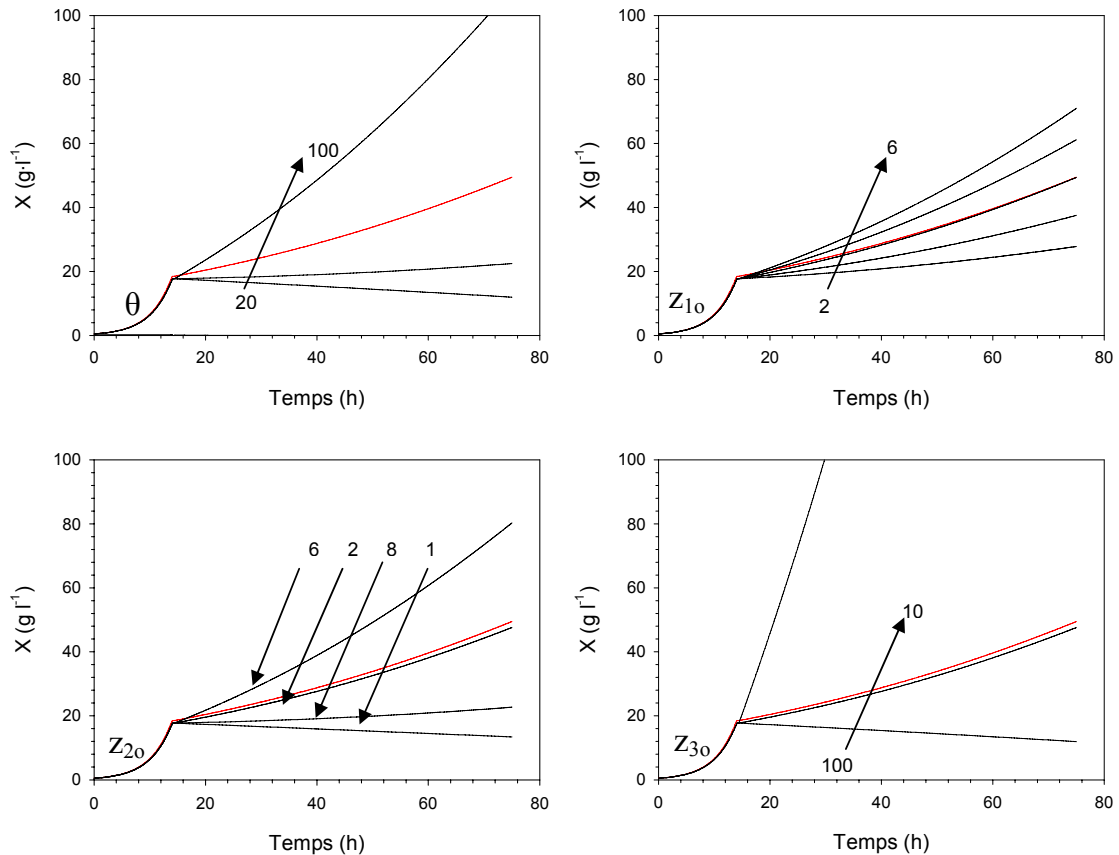


Figura 8.2. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres analitzats davant de la concentració de biomassa present amb l'estimador I. (a) variació de θ , (b) variació del valor inicial de z_{10} , (c) variació del valor inicial de z_{20} , (d) variació del valor inicial de z_{30} . (—) simulació del model, (—) estimacions.

La línia vermella marca el resultat obtingut de la simulació realitzada del procés fermentatiu i la resta de línies són el resultat de la variació dels diferents paràmetres contemplats.

L'anàlisi realitzat permet comprovar que en tots els casos es pot obtenir un rang de valors per a cada un dels paràmetres que garanteixi la correcta identificació de la velocitat específica de creixement. Però si analitzem el conjunt dels paràmetres proposats podem apreciar com la simulació és relativament poc sensible als valors de δ i z_{30} per l'elevat grau de variació que cal aplicar per poder veure l'efecte. El motiu d'aquesta resposta es deu a

que la δ que es pot considerar el guany de l'observador, per a un sistema relativament lent, no afecta sensiblement a la estimació. Quan es tracta el valor inicial de z_3 , es veu com de nou es té un valor inicial que no afecta gaire pel tipus de procés en estudi. El fet de tenir un sistema amb una dinàmica poc variant i que la variable hagi estat definida per eliminar un offset que l'autor en qüestió (Farza *et al.*, 2000) associava a la necessitat de tenir una variable observada que descriués la dinàmica de la derivada de la velocitat específica de creixement amb el temps permet pensar que és el motiu pel que no s'aprecia el seu efecte. Pel contrari, quan s'avaluen els efectes dels valors inicials de z_1 i z_2 s'aprecia com tenen un efecte determinant sobre la estimació de μ i que en el cas de z_{20} , la resposta de l'observador és sensible i quadràtica, fet que provoca que s'hagi d'establir molt bé aquest valor inicial per poder garantir que l'estimador actua de forma eficient.

Una estimació poc precisa de μ afecta molt sobre el valor estimat de X per l'efecte integral de la seva definició, tal com es pot apreciar a la figura 8.2. Mentre que uns valors inicials poden semblar acceptables per estimar μ , no són vàlids per l'estimació de X .

A més dels quatre paràmetres presentats, s'ha treballat sobre l'efecte del soroll que pot portar associada la variable mesurada (CER), que s'ha comprovat que és un soroll blanc de l'ordre del 2% sobre el valor mitjà del senyal, i s'ha pogut comprovar que no hi ha excessius problemes per poder garantir-ne la correcta estimació.

Una altra simulació que s'ha realitzat ha estat la que permet detectar l'efecte de disposar d'uns valors de $Y_{CO_2/X}$ i de $m_{CO_2/X}$ sobre l'estimació de μ . Desviacions en la certesa d'aquests paràmetres provoquen una desviació inicial que progressivament va tendint al valor real. Aquesta desviació inicial provoca que la concentració de biomassa final pugui diferir en 10 g l^{-1} respecte a la de referència per errors de determinació de $Y_{CO_2/X}$ i de $m_{CO_2/X}$ del 50%.

— *Estimadors basats en observadors no lineals. Estimador II*

Per l'estimador II (equacions 8.27, 8.28 i 8.29), s'ha realitzat el mateix plantejament, obtenint les figures 8.3 i 8.4. Tal i com es podia preveure, els resultats tenen tendències molt similars a les observades per l'Observador I. En aquest cas es reproduïx la limitada sensibilitat del sistema davant dels valors inicials de δ i w_{30} que els fan fàcilment sintonitzables, i la necessitat d'escollir uns acurats valors de w_{10} i w_{20} per evitar tenir una resposta més lenta i/o desviada de la de referència. L'observador II, al tenir una estructura

equivalent a la de primer, obliga a reinicialitzar els valors dels paràmetres al passar de la fase discontinua a la continua.

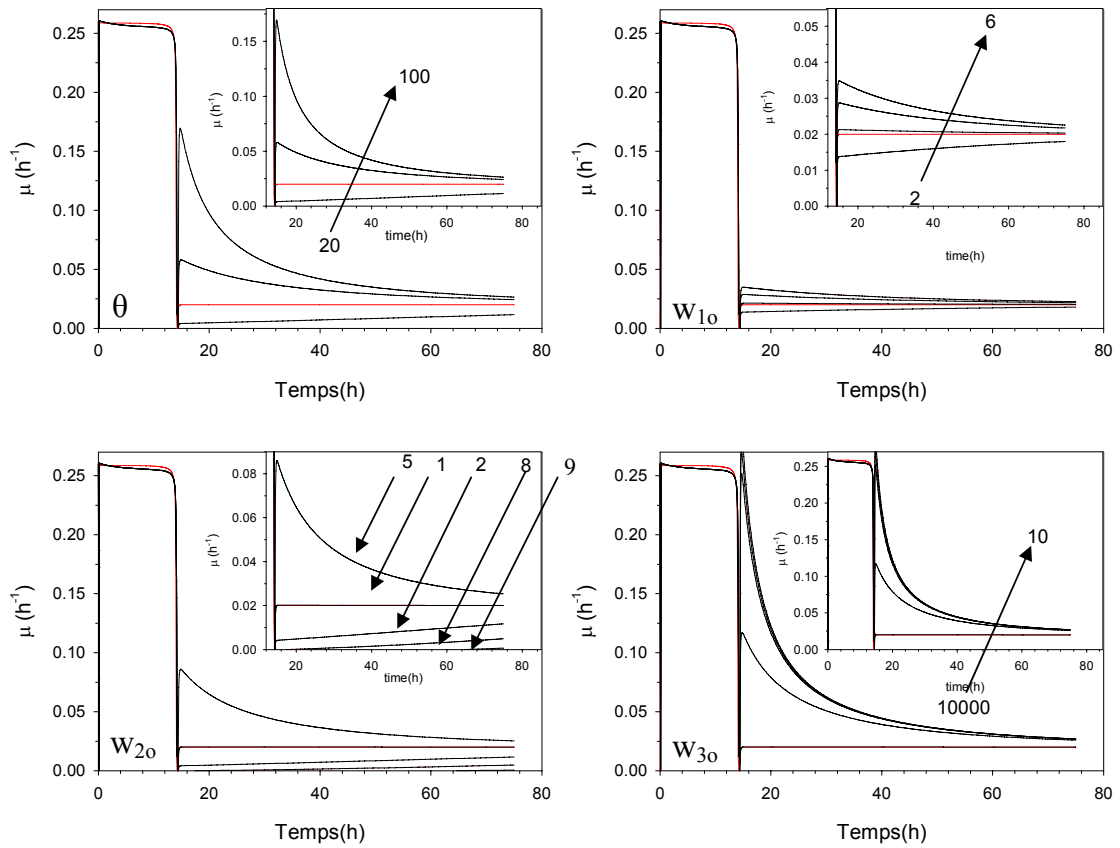


Figura 8.3. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres implicats en la identificació de la velocitat específica de creixement amb l'estimador II. (a) variació de δ , (b) variació del valor inicial de w_{10} , (c) variació dels valor inicial de w_{20} , (d) variació dels valor inicial de w_{30} . (—) simulació del model, (—) estimacions.

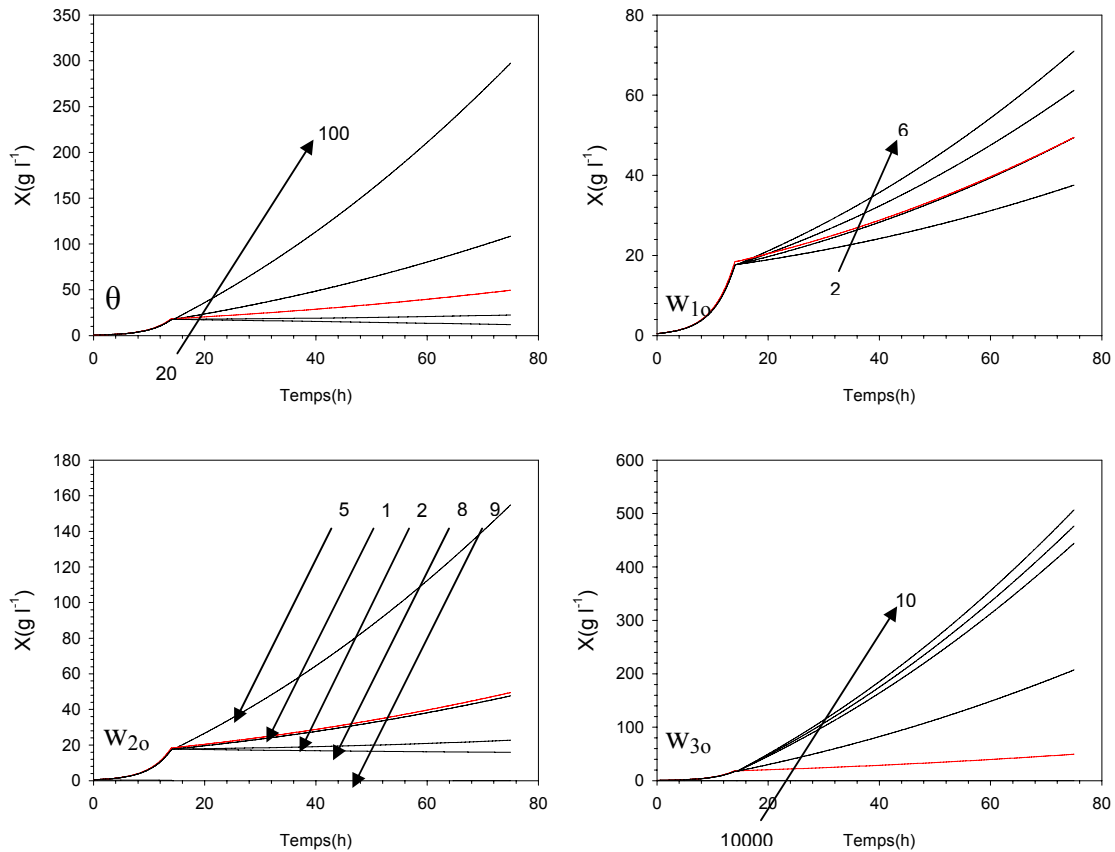


Figura 8.4. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres analitzats davant de la concentració de biomassa present amb l'estimador II. (a) variació de δ , (b) variació del valor inicial de w_{10} , (c) variació dels valor inicial de w_{20} , (d) variació dels valor inicial de w_{30} . (—) simulació del model, (—) estimacions.

Pel que fa al soroll, no s'ha detectat una limitació en quant al soroll esperat per la variable mesurada. I respecte a errors en els valors dels coeficients, $Y_{CO_2/X}$ i $m_{CO_2/X}$, es reproduïx el descrit amb l'observador I i s'obté un error en la biomassa final d'uns 5 g l^{-1} per un error del 50% en la determinació dels paràmetres. Cal remarcar que l'error comés amb aquest estimador per l'estimació de la biomassa és més petit que l'obtingut amb l'estimador I.

— *Estimadors basats en algorismes adaptatius emprant identificació per mínims quadrats. Estimador III.*

S'ha començat realitzant simulacions per comprovar l'efectivitat de l'estimador III modificat per semicontinu, i treballant sobre l'efecte de una bona selecció del valor inicial de θ i per seleccionar un valor de λ que permeti poder identificar la velocitat específica de creixement al llarg del temps.

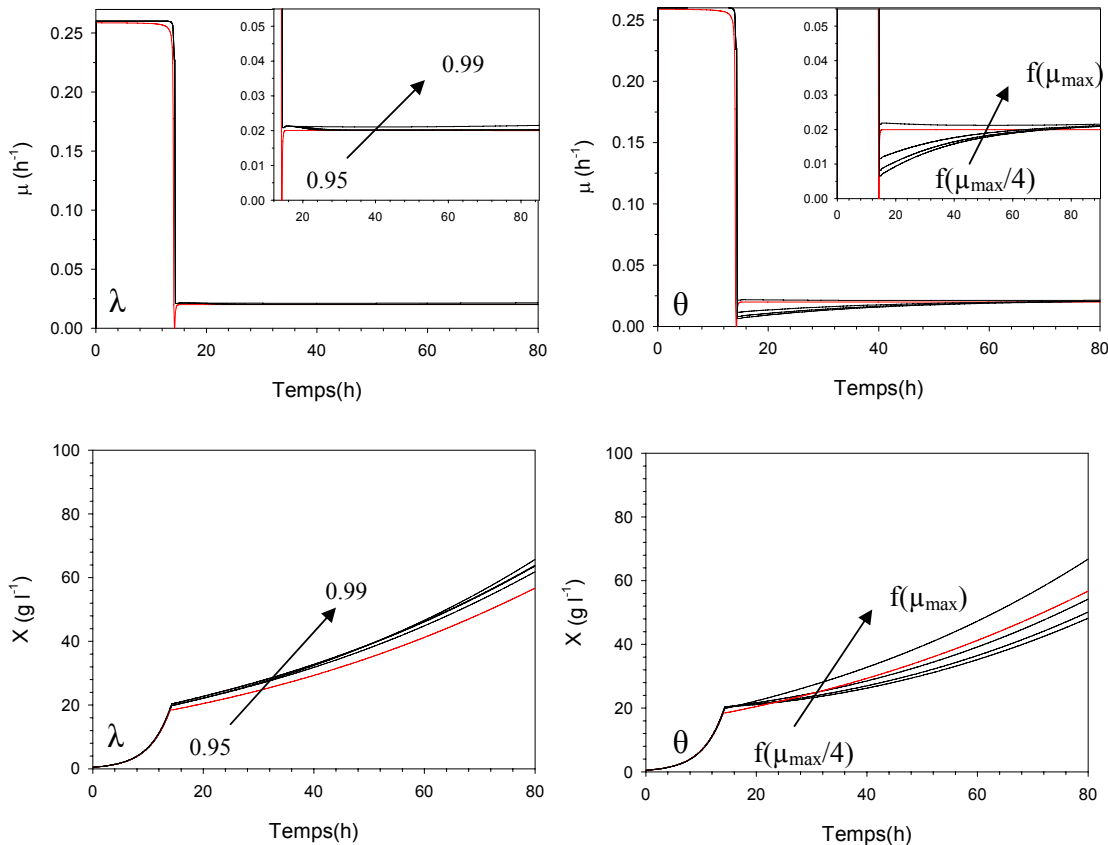


Figura 8.5. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres implicats en la identificació de la velocitat específica de creixement amb l'estimador III. (a) variació de λ i (b) variació del valor inicial θ . Variació de la concentració de biomassa resultant de les variacions de (c) λ i (d) del valor inicial θ . (—) simulació del model, (—) estimacions.

Per poder analitzar l'efecte de θ , per definició, és interessant associar el seu valor inicial a la velocitat específica de creixement, obtenint els millors resultats quan es parteix del valor més proper equivalent a la velocitat específica de creixement consignada a la simulació. Aquesta relació és interessant establir-la per la directa relació entre θ i μ . D'altra banda,

s'aprecia un "offset" (figura 8.5b) que l'estimador no es capaç d'eliminar si no és mitjançant la disminució del factor d'oblit. Obligant a fer que λ sigui més petit i en conseqüència tenint un estimador més vulnerable al soroll de la variable mesurada.

En aquest cas es pot tornar a apreciar que hi ha valors dels paràmetres que poden permetre desenvolupar estimadors que són consistents però que provoquen petites desviacions que s'amplifiquen a l'estimar μ .

— *Estimadors basats en algorismes adaptatius emprant identificació per mínims quadrats. Estimador IV.*

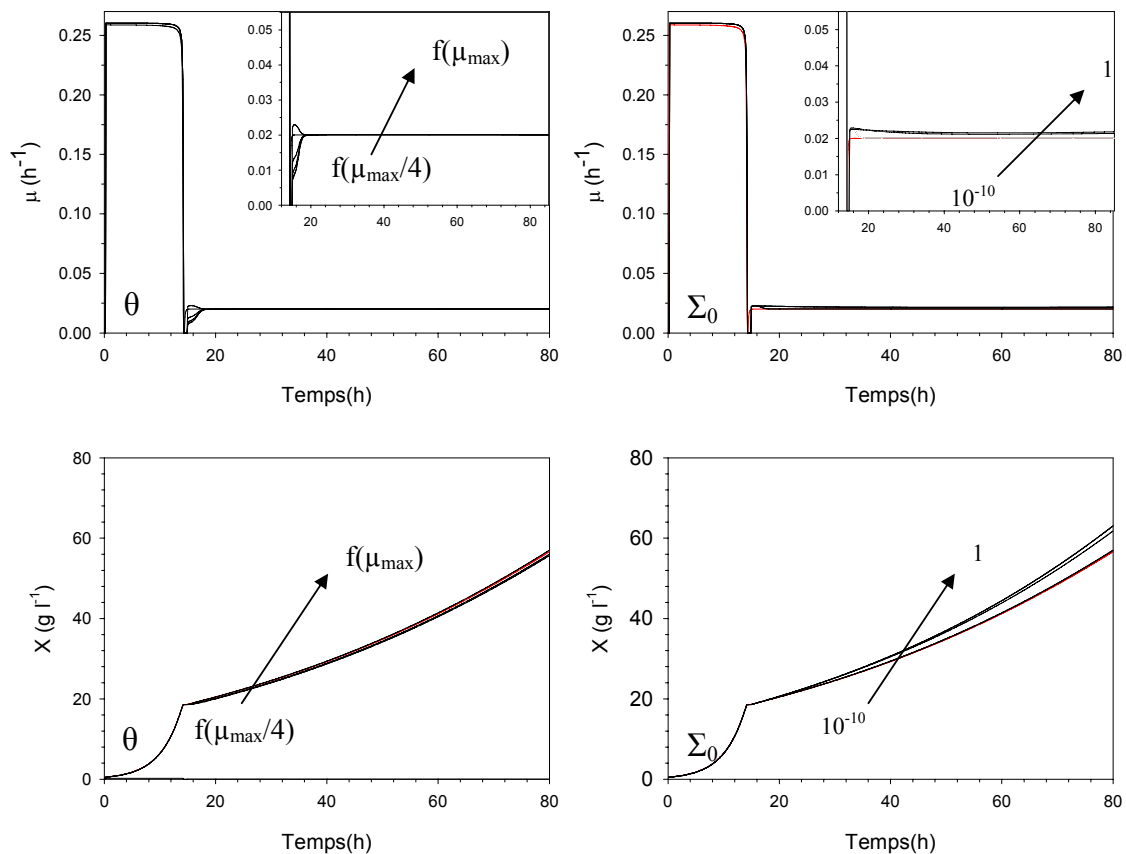


Figura 8.6. Efecte de la variació dels paràmetres i dels valors inicials dels paràmetres implicats en la identificació de la velocitat específica de creixement amb l'estimador IV. (a) variació del valor inicial θ i (b) variació de Σ_0 . Variació de la concentració de biomassa resultant de les variacions de (c) del valor inicial θ i (d) de Σ_0 . (—) simulació del model, (---) estimacions.

Aquesta necessitat de sintonització del factor d'oblit pot ser eliminada si es defineix com una variable que s'adapta recursivament emprant l'algorisme proposat amb l'estimador IV

(equació 8.45). En aquest s'aconsegueix que no es produeixi un efecte de manca d'estímul, que es fa plausible per la reducció de la capacitat d'adaptació amb el temps, de l'estimador per la variació del factor d'oblit.

En aquest estimador es pot apreciar una robustesa força interessant perquè quasi independentment del valor inicial de θ i del valor de Σ_0 la identificació és adequada podent contemplar l'elevada capacitat d'adaptació (fig. 8.6a) de l'estimador, sigui quin sigui el valor inicial de θ i veient com donant un valor prou petit de Σ_0 es pot realitzar una identificació fidedigne de la velocitat específica de creixement.

Cal remarcar que en aquest estimador s'han obtingut els resultats mostrats sense necessitat de reinicialitzar els paràmetres quan es passa de discontinu a semicontinu.

8.2.2. Selecció de l'estimador a aplicar sobre dades experimentals

La utilització de mètodes recursius de mínims quadrats per identificació permeten disminuir la necessitat de tenir un coneixement sobre el sistema, així com aportar altres avantatges com són: minimitzar la potència matemàtica necessària per emprar-los (aquest necessiten poder resoldre sistemes d'equacions lineals mentre que pels observadors no lineals cal resoldre sistemes d'equacions diferencials o discretitzar les variables), permetent augmentar la freqüència d'identificació, gran capacitat d'adaptació als canvis produïts en el procés, disminuir el nombre de paràmetres a sintonitzar, una elevada velocitat de resposta i una gran capacitat d'adaptació (Taula 8.2).

Un cop determinat que la millor opció és aquella que passa pels algorismes lineals, es procedeix a escollir el mètode amb factor d'oblit variable que permet garantir que el sistema no sigui tant dependent de la sintonització dels paràmetres i que manté una excitació que li permet seguir amb garanties tota la dinàmica del procés. En el cas que ens trobem, aquest aspecte és força important per l'addició constant d'agent inductor i la poca variabilitat de la velocitat específica de creixement que pot fer que el sistema no pugui respondre davant d'un canvi sobtat després de moltes hores de cultiu.

Aquest mètode, a més de fer una bona estimació de μ , permet obtenir un valor de la concentració de biomassa acurat.

Taula 8.2. Taula resum de les característiques principals de l'observador estudiats.

Autor	Estimador I (Farza <i>et al.</i>, 2000)	Estimador II (Cazzador i Lubenova 1995)	Estimador III (Estler 1995)	Estimador IV (Golobic <i>et al.</i>, 1999)	Estimador V Ramon <i>et al.</i>,
Característiques	Estimador no lineal amb aproximació exponencial de l'error	Estimador no lineal amb aproximació exponencial de l'error	RLS amb factor d'oblit constant per cultiu discontinu	RLS amb factor d'oblit variable per cultiu discontinu	RLS amb factor d'oblit variable per cultiu semicontinu
Basat en model determinístic	Si	Si	Model caixa negra per determinació de paràmetres sota estructura del model de mesura i balança de matèria	Model caixa negra per determinació de paràmetres sota estructura del model de mesura i balança de matèria	Model caixa negra per determinació de paràmetres sota estructura del model de mesura i balança de matèria
Paràmetres necessaris per la identificació	$Y_{CO_2/X}$, $m_{CO_2/X}$, $\mu_{0discontinu}$, $\mu_{0semicontinu}$, δ_0 , Z_{10} , Z_{20} i Z_{30}	$Y_{CO_2/X}$, $m_{CO_2/X}$, $\mu_{0discontinu}$, $\mu_{0semicontinu}$, δ_0 , w_{10} , w_{20} y w_{30}	$\mu_{0discontinu}$, $\mu_{0semicontinu}$, θ_0 , $\lambda_{discontinu}$, $\lambda_{semicontinu}$, $P_{0discontinu}$, $P_{0semicontinu}$	$\mu_{0discontinu}$, θ_0 , $P_{0discontinu}$, Σ_0	$\mu_{0discontinu}$, θ_0 , $P_{0discontinu}$, Σ_0
Potència de càlcul necessària per la identificació	Alta. Resolució de sistemes d'equacions diferencials	Alta. Resolució de sistemes d'equacions diferencials	Baixa. Resolució de sistemes d'equacions lineals	Baixa. Resolució de sistemes d'equacions lineals	Baixa. Resolució de sistemes d'equacions lineals
Capacitat d'autoadaptació amb sensibilitat variable	Baixa	Baixa	Moderada	Alta	Alta
Deriva produïda per valors erronis	Alta	Alta	Moderada	Baixa	Baixa
Rapidesa de la resposta	Baixa	Baixa	Moderada	Alta	Alta

8.2.3. Utilització d'un algorisme RLS amb factor d'oblit variable per identificar la velocitat específica de creixement

Veient la capacitat d'identificació de l'estimador IV modificat, s'aplica a dades reals per a un cultiu de les mateixes característiques quals les simulacions on s'empra una soca Mut_s^+ creixent amb metanol, emprant una addició exponencial, sota el promotor *AOX*.

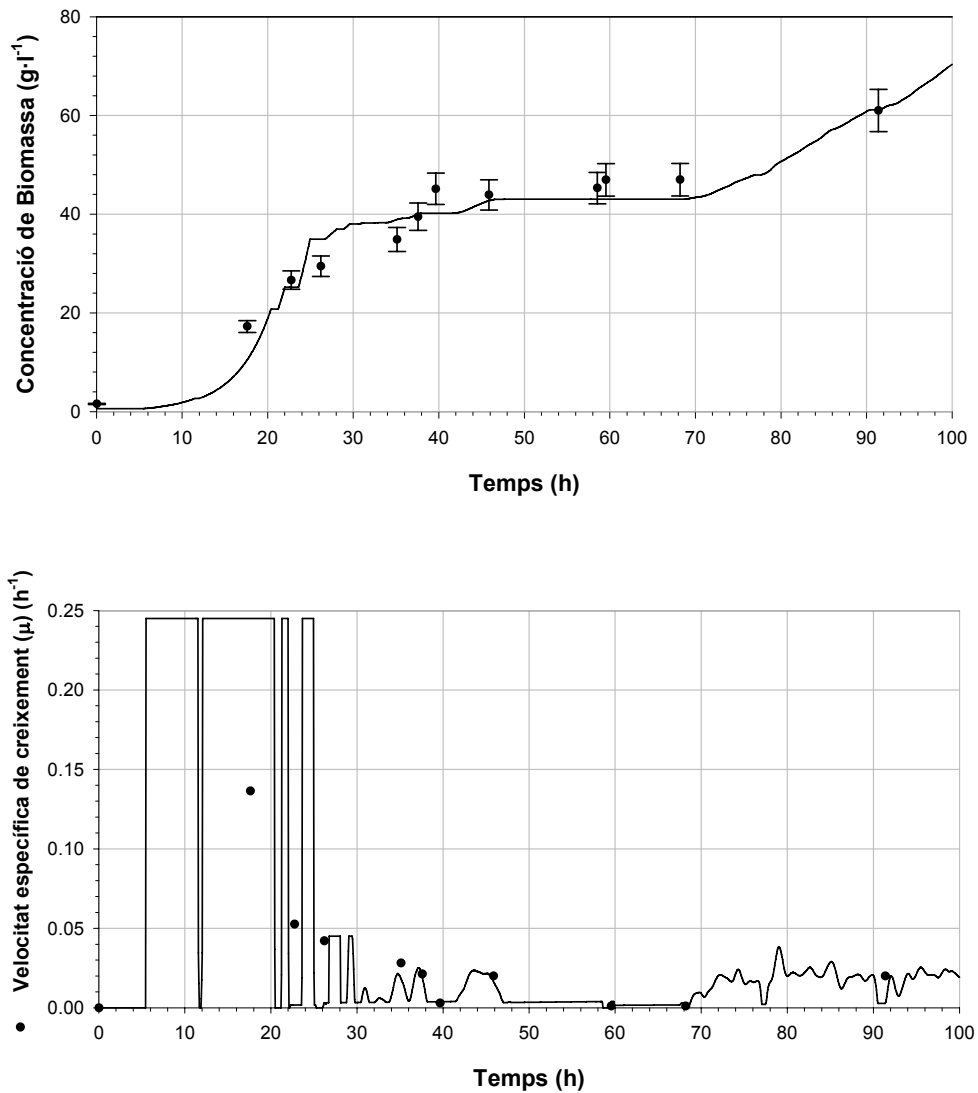


Figura 8.7. Utilització de l'estimador IV modificat per a la identificació de la velocitat específica de creixement en un cultiu amb *P. pastoris*, emprant metanol i amoníac com a fonts de carboni i nitrogen respectivament. (a) Identificació de la velocitat específica de creixement, (b) Estimació de la biomassa resultant.

L'aplicació de l'algorisme de mínims quadrats recursius a dades reals (figura 8.7) permet aconseguir una convergència molt ràpida i permet respondre davant de canvis de substrat, tal i com es produeix a les 20 hores on acaba la fase discontinua. Aquesta capacitat adaptativa es reproduïx quan comença la fase semicontinua, on hi ha una etapa d'aturada del creixement associable a un període de latència del microorganisme fins la seva adaptació al nou substrat i un revifament fruit de la esmentada adaptació.

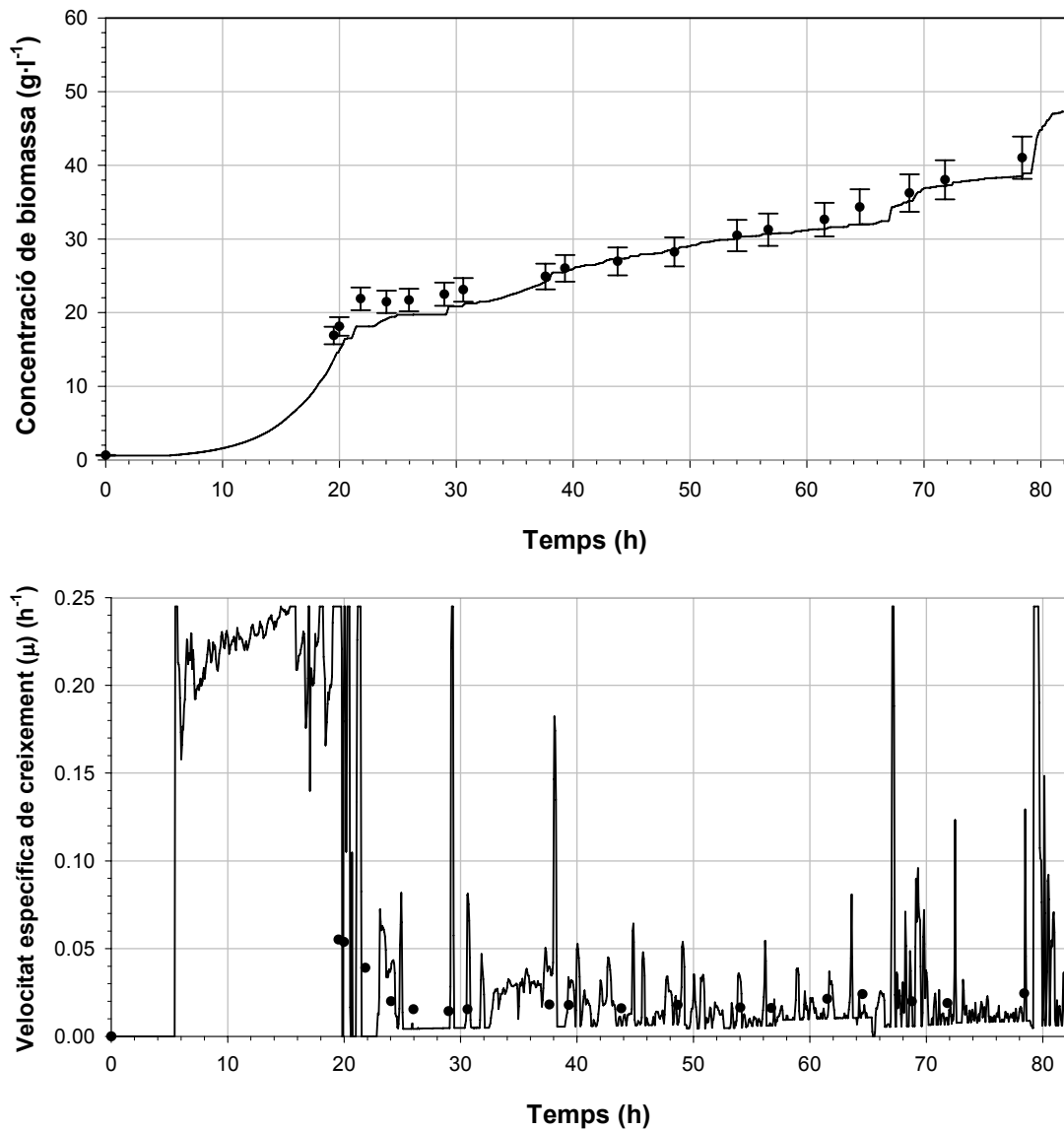


Figura 8.8. Utilització de l'estimador IV per a la identificació de la velocitat específica de creixement en un cultiu amb *P. pastoris*, emprant sorbitol i metilamina com a fonts de carboni i nitrogen respectivament. (a) Identificació de la velocitat específica de creixement, (b) Càlcul de la biomassa resultant.

Per poder garantir la capacitat del mètode proposat, s'ha procedit d'igual manera amb el mateix microorganisme però emprant un altre promotor per induir la producció de la proteïna heteròloga, el promotor *PFLD*. En aquest tipus de cultius es segueix el mateix tipus d'estratègia però en lloc d'emprar metanol i amoníac com a fonts de carboni i nitrogen, respectivament, s'empra sorbitol i metilamina.

Tal i com s'aprecia a la figura 8.8, s'obtenen resultats molt interessants que reproduïen el descrit pel cultiu anterior (figura.8.7). Pot respondre efectivament a canvis de substrat, al final de la fase discontinua, o a la posterior adaptació del microorganisme als nous substrats. A més s'ha detectat la capacitat de l'estimador a respondre davant de problemes operacionals, com per exemple els detectats a les 68 i a les 80h, que han provocat discontinuïtats en el creixement del microorganisme.

8.3. Conclusions

La utilització d'estimadors per a la determinació de la velocitat específica de creixement d'un microorganisme és un element emprat en recerca bàsica i que en un futur s'anirà implementant a la indústria biotecnològica. Comparant els quatre estimadors emprats mitjançant una simulació amb els paràmetres propis d'un cultiu amb *P. pastoris* s'ha decidit que l'estimador més fàcil d'implementar i que a priori és més capaç per poder respondre davant de canvis en el creixement cel·lular, és el mètode recursiu de mínims quadrats (RLS).

La utilització d'un model híbrid, basat en el mètode recursiu de mínims quadrats amb factor d'oblit variable, permet identificar correctament de la velocitat específica de creixement i de la concentració de biomassa del llevat *P. pastoris* en cultiu discontinu i semicontinu. Podent desenvolupar, a través d'aquest, un "software sensor" que permeti realitzar una monitorització en línia de la concentració de biomassa al llarg de més de 75 hores de cultiu, incloent etapes on hi ha canvi de substrat i anomalies produïdes per desajusts operacionals.

Capítol 9. Estratègies de cultiu amb addició mixta de substrats

9.1. Introducció

La utilització de substrats mixtes on un és el substrat inductor (metanol), és una proposta que s'ha realitzat puntualment per incrementar la densitat cel·lular, per augmentar la productivitat d'un bioprocés i per reduir el temps d'inducció en cultius de *Pichia pastoris* (Files *et al.*, 2001). Aquesta estratègia permet incrementar l'energia subministrada a les cèl·lules per l'aport addicional d'un substrat (Katakura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000a; Zhang *et al.*, 2003). Si bé s'ha emprat sovint en fermentacions de *P. pastoris* tant en el la soca Mut⁺ (Zhang *et al.*, 2005) com la Mut^s (Xie *et al.*, 2005), en el cas de la darrera, la seva utilització és quasi obligada degut a la seva baixa velocitat específica de creixement, inferior a 0.03 h⁻¹ amb metanol que implica llargs temps de fermentació (>100h).

El glicerol ha estat el cosubstrat més emprat. Les primeres temptatives en cultius en semicontinu realitzades en aquest sentit van ser fetes per Brierley *et al.*, (1990) i Loewen *et al.*, (1997). Posteriorment, s'ha demostrat, en experiments en continu (Thorpe *et al.*, 1999), que si bé el glicerol en excés afavoreix el creixement cel·lular, també és un fort repressor del promotor *PAOX1* (Xie *et al.*, 2005), i en conseqüència un repressor de la producció heteròloga. Per aquest motiu, és de vital importància garantir una velocitat específica mitjana de creixement (μ), a través de la velocitat de dilució, prou llunyana de la màxima (μ_{\max}) per així tenir la certesa de que mai hi ha glicerol residual en el medi de cultiu. Un exemple d'aquesta aplicació, en semicontinu, proposa l'operació a una $\mu < \frac{1}{2} \mu_{\max}$ (d'Anjou i Daugulis 2001), obtenint resultats força interessants pel que fa als nivells de producció assolits.

Com a conseqüència d'aquests experiments s'obre un marc de treball que pretén trobar un cosubstrat que en presència de metanol no provoqui la repressió del promotor *PAOX1*. L'ús d'una font de carboni menys repressora pot implicar millorar les velocitats específiques de producció, millorant la productivitat global del procés i eliminar la necessitat de treballar amb un control tant acurat dels nivells de substrat present en el medi (Thorpe *et al.*, 1999).

Inan i Meagher (2001b) van fer un primer escombrat de possibles cosubstrats, comparant diferents fonts de carboni per comprovar la capacitat de creixement i expressió d'una soca

P. pastoris Mut⁻ amb una construcció *AOXI-lacZ* en flascons agitats. Els resultats d'aquest estudi permeten concloure que la presència de glucosa, glicerol, etanol i acetat fan possible el creixement cel·lular però al mateix temps actuen com a repressors de la producció de la proteïna d'interès, la β – galactosidasa. D'altra banda, el creixement del microorganisme en un medi que contingui alanina, manitol, sorbitol o trehalosa va permetre comprovar que no tant sols feien possible la inducció si no que s'observava millor productivitat que la obtinguda amb la soca Mut⁺ (Inan i Meagher 2001a).

A partir dels estudis referenciats, s'ha començat a utilitzar el sorbitol com a cosubstrat no repressor en cultius amb *P. pastoris*. Alguns dels experiments per fer un escombrat de cosubstrats s'han dut a volums de fermentació superiors entre els quals cal destacar un predecessor del treball aquí descrit: els semicontinus realitzats emprant metanol i sorbitol com a cosubstrats per a la producció de metaloproteïnasses, MMP – 2. En aquest sistema s'observa una disminució del consum de metanol perquè bona part del creixement es realitza emprant el sorbitol com a substrat i el metanol com agent inductor (Sreekrishna *et al.*, 1997).

Thorpe *et al.*, (1999) van comparar la utilització de glicerol i sorbitol com a cosubstrats del metanol emprant una estratègia de producció de tipus semicontinu amb una concentració de metanol entre 1 i 2 g l⁻¹. Tot i que els rendiments biomassa substrat ($Y_{x/s}$) són inferiors emprant sorbitol, es compensa amb una velocitat específica de producció més elevada que implica una producció total semblant amb concentracions cel·lulars més elevades.

Això implica que el sorbitol pot ser addicionat en excés, sense superar la concentració d'inhibició de 35 g l⁻¹ (experiments realitzats pel grup de recerca), sense repressió del promotor *PAOXI* i fent el sistema més robust perquè permet treballar sense tenir que experimentar una possible inhibició per substrat.

Boze *et al.*, (2001) van aplicar una estratègia de substrats mixtes a la producció de rFSH en cultius semicontinus, obtenint valors de rendiments i concentracions de producte per glicerol – metanol de la meitat dels obtinguts amb metanol sol, encara que la biomassa era superior en un 30%. Aquest mateix experiment emprant sorbitol – metanol, amb medi enriquit amb vitamines i amb extracte de llevat, va permetre obtenir una producció quatre vegades la obtinguda amb metanol i la productivitat i la productivitat específica varen ser 4 i 2 vegades més grans, respectivament. A més, es va demostrar que la producció de rFSH és inhibida en presència de glicerol i estimulada per la addició de sorbitol.

En la mateixa línia Xie *et al.*, (2005) van realitzar experiments com els descrits al paràgraf anterior per àcid làctic, àcid acètic, sorbitol i glicerol com a cosubstrats del metanol,

obtenint resultats força interessants per a qualsevol dels substrats en la producció d'angiostatina emprant una soca del tipus Mut^s.

Pel que fa al sistema d'expressió amb el qual s'han realitzat els experiments hi ha una sèrie d'antecedents que cal situar per poder comprendre la importància d'emprar un substrat únic o substrats mixtes en la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Primerament, cal recordar els treballs realitzats per Minning *et al.*, (2001) on es descriu l'efecte negatiu de la producció de ROL en el creixement de *P. pastoris*.

S'ha descrit, emprant el metanol com a única la font de carboni, en experiments realitzats en discontinu (Cos *et al.*, 2005a) que la velocitat màxima de creixement per a una soca Mut^s és 0.06 h⁻¹ que és molt inferior a la obtinguda per la soca salvatge amb les mateixes condicions, que és de 0.14h⁻¹ (Brierley *et al.*, 1990).

Pel que fa al fenotip Mut^s en la seva versió de còpia única, s'han realitzat els mateixos experiments amb un creixement inapreciable del microorganisme i sense detectar producció de la proteïna d'interès.

La operació en semicontinu s'ha realitzat seguint una estratègia que s'inicia amb un discontinu de glicerol a una concentració de 40 g l⁻¹. A l'exhauriment d'aquest hi segueix una etapa de transició on s'addiciona de forma fixa metanol i de forma decreixent glicerol. Finalment, un cop superades les cinc hores que dura la transició, es procedeix a una etapa de inducció on es manté aproximadament constant la concentració de metanol residual en el medi.

Els primers experiments es van realitzar amb una soca Mut^s (Cos *et al.*, 2006a; Cos *et al.*, 2005b) provant concentracions residuals de substrat entre els 0.5 i els 1.75 g l⁻¹. Es va obtenir una velocitat específica de creixement mitjana a l'etapa d'inducció que va des de 0.003 h⁻¹ per a la concentració més baixa, fins a les 0.004h⁻¹ per concentracions superiors. Pel que fa a la producció es va observar un màxim a una concentració de 1 g l⁻¹ de metanol. Cal remarcar en aquest sentit que per concentracions baixes on, segons la bibliografia, s'haurien d'assolir productivitats màximes, la producció s'atura de manera sobtada a les poques hores d'inducció. Aquest fet pot ser associat a una probable manca d'energia que requereix la producció de ROL i la limitada capacitat de la soca Mut^s per metabolitzar el metanol.

Finalment, s'han reproduït els mateixos experiments per a la soca amb una única còpia del fenotip Mut⁺, descrit en aquesta memòria al capítol 7. *Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut⁺, de P. pastoris*, podent observar una situació semblant a la descrita amb el fenotip Mut^s on s'ha realitzat

una bateria d'experiments entre els 0.5 i els 5.5 g l⁻¹ obtenint un màxim per a una concentració de 3 g l⁻¹ que fa pensar en una reproducció de les limitacions descrites amb el primer fenotip presentat.

En tots els experiments realitzats a baixes concentracions de metanol hi ha un fet en comú que s'ha de tenir en compte per poder analitzar en profunditat els resultats obtinguts. Aquest és una aturada en la producció poques hores després de l'inici de la fase d'inducció que pot estar vinculada a les limitacions energètiques descrites amb anterioritat.

A partir d'aquests antecedents es realitzaran uns experiments que han estat pensats per poder comprovar l'efecte de la utilització d'un substrat mixt en el creixement dels diferents fenotips de *Pichia pastoris* per a la producció de ROL, emprant com a referència les fermentacions realitzades emprant com a substrat únic el metanol.

9.2. Presentació i discussió dels resultats

En base als coneixements adquirits treballant amb *P. pastoris*, emprant metanol com a únic substrat i coneixent la problemàtica associada a nivell de producció i de procés, es realitzen experiments emprant sorbitol com a cosubstrat. Aquesta proposta es realitza per estudiar els efectes que produeix el consum combinat de metanol i sorbitol sobre el creixement i producció dels diferents fenotips, sota el promotor PAOX, en la producció de ROL. Aquest estudi es realitza comparant l'ús de sorbitol amb cultius que només empen metanol.

Veient els resultats obtinguts en discontinu, en quant a la explicació de fets associats al creixement del mateix microorganisme i a la producció de ROL, s'han realitzat experiments en semicontinu per poder avaluar l'efecte en condicions d'elevades concentracions de biomassa i producte. Els resultats obtinguts permeten pensar en plantejar-ho com una alternativa avantatjosa per a sistemes biològics on el producte a expressar requereix prou desgast energètic per a la cèl·lula com perquè disminueixi de forma sensible la seva velocitat específica de creixement respecte a la soca salvatge.

Davant de la mancança d'un estudi comparatiu sobre l'efecte de l'ús de substrats mixtes (metanol – sorbitol) en cultius en discontinu per als diferents fenotips en *P. pastoris*, es realitzen tres bateries d'experiments emprant les soques Mut^s (amb una i múltiples còpies del gen de ROL) i Mut⁺ (amb una única còpia). No s'han realitzat experiments amb la soca Mut⁺ multicòpia perquè l'experiència tinguda en treballs anteriors permet anticipar que la dosi gènica en aquest fenotip ha jugat un paper negatiu en la producció de ROL, suposant

un allargament del temps necessari per dur a terme la fermentació sense detectar increments importants en els nivells de producte heteròleg.

9.2.1. Experiments en discontinu

— *Discontinus amb metanol com a substrat*

Per poder realitzar la comparació en discontinu s'ha començat per la realització d'experiments on s'ha pogut fer patent les limitacions de les diferents soques de treball per a la producció de ROL emprant el metanol com a únic substrat. Aquests experiments es realitzen amb una addició inicial de metanol per partir d'una concentració aproximada de 10 g l^{-1} .

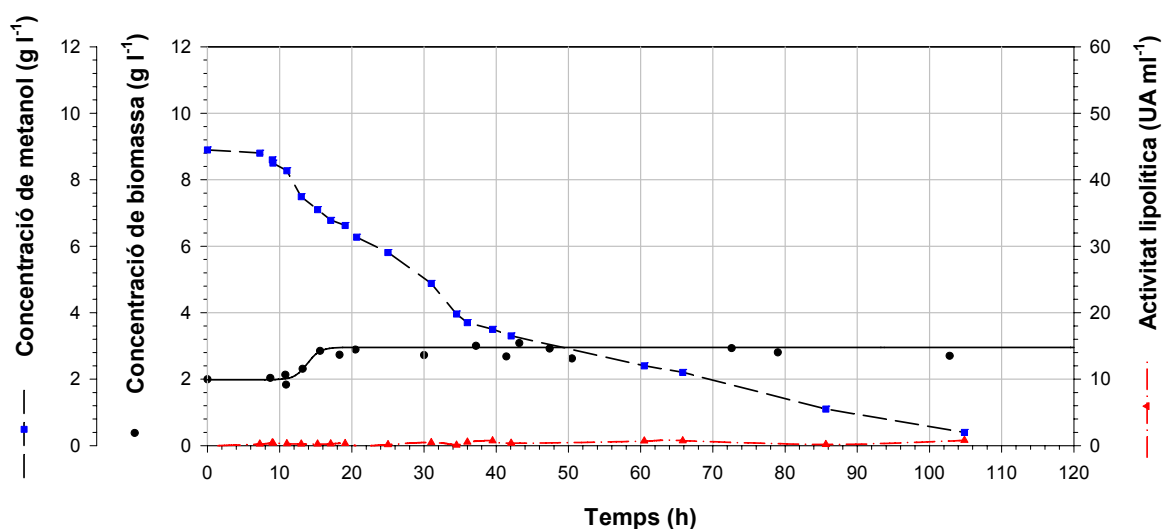


Figura 9.1. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per una fermentació en discontinu de la soca Mut^s de *P. pastoris* emprant com a únic substrat el metanol.

S'ha començat operant amb la soca Mut^s, on s'han pogut apreciar les deficiències que aquestes cèl·lules tenen per la limitada capacitat de metabolitzar metanol (figura 9.1). En l'experiment realitzat s'observa com a l'inici de la fermentació es produeix un lleuger creixement que en poques hores s'atura. D'altra banda, es detecten uns nivells de producció residuals que són equivalents amb els que es detecten davant de qualsevol substrat, és el nivell mínim de producció que pot tenir en un cultiu amb aquest microorganisme. Si s'observa l'evolució de la corba de concentració de substrat es poden

observar dues zones: una primera fins a les 10 hores on sembla que hi ha cert consum de metanol, amb un limitat creixement, i una segona, corresponent a l'aturada de creixement on l'eliminació de metanol es produeix probablement per manteniment del microorganisme i per arrossegament en fase vapor / gas.

La segona part dels experiments s'hauria d'haver realitzat amb la soca Mut^s_m però ha estat descartada per l'experiència prèvia amb la soca Mut^s_s , emprant com a substrat el metanol que fa preveure una problemàtica similar.

Finalment, es realitza el mateix tipus d'experiment amb el fenotip Mut^+_s , obtenint una producció màxima de 6 UA ml^{-1} . (figura 9.2), assolint-se la màxima producció quan el metanol cau per sota dels 2 g l^{-1} (Cos *et al.*, 2005a).

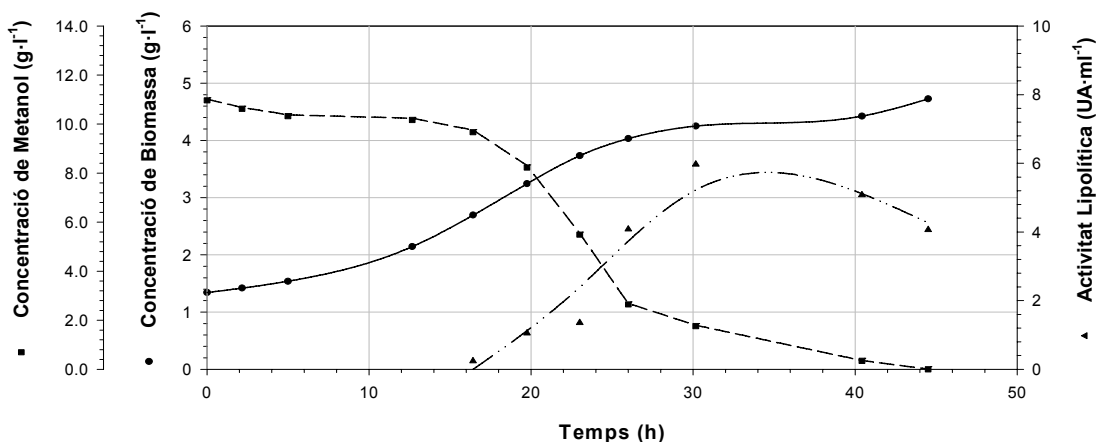


Figura 9.2. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per una fermentació en discontinu de la soca Mut^+ de *P. pastoris* emprant metanol com a substrat únic. (Cos *et al.*, 2005b)

— *Discontinus amb metanol i sorbitol com a substrats mixtes*

Els experiments descrits per al metanol com a únic substrat s'han reproduït per a la combinació metanol – sorbitol a aproximadament 10 g l^{-1} de cadascun.

Si s'analitzen els resultats obtinguts amb la soca Mut^s_s es pot apreciar un consum simultani dels dos substrats (figura 9.3). És interessant remarcar que la presència del sorbitol permet aconseguir el creixement de *P. pastoris* que quasi no s'havia aconseguit amb el metanol com a única font de carboni, assolint una producció màxima de 53 UA ml^{-1} .

Sembla clar que es produeix un efecte que es reproduïx en la resta de fermentacions que s'han realitzat i és que la producció es veu lleugerament desacoblada del creixement, apareixent el producte quan el substrat està a nivells baixos, per sota dels 2 g l⁻¹.

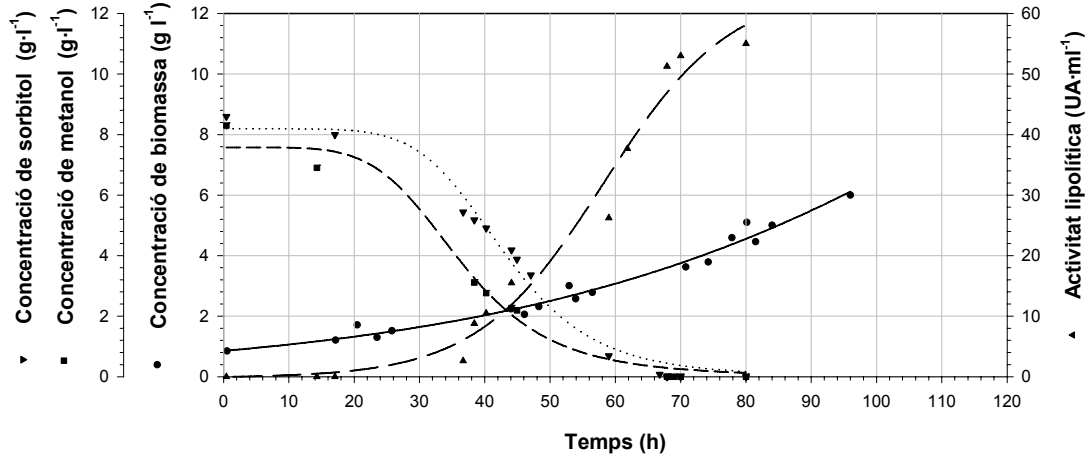


Figura 9.3. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per una fermentació en discontinu de la soca Mut_s de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats .

Seguint la mateixa estratègia, s'ha reproduït l'experiment en discontinu amb els dos substrats per a la soca Mut_m, (figura 9.4).

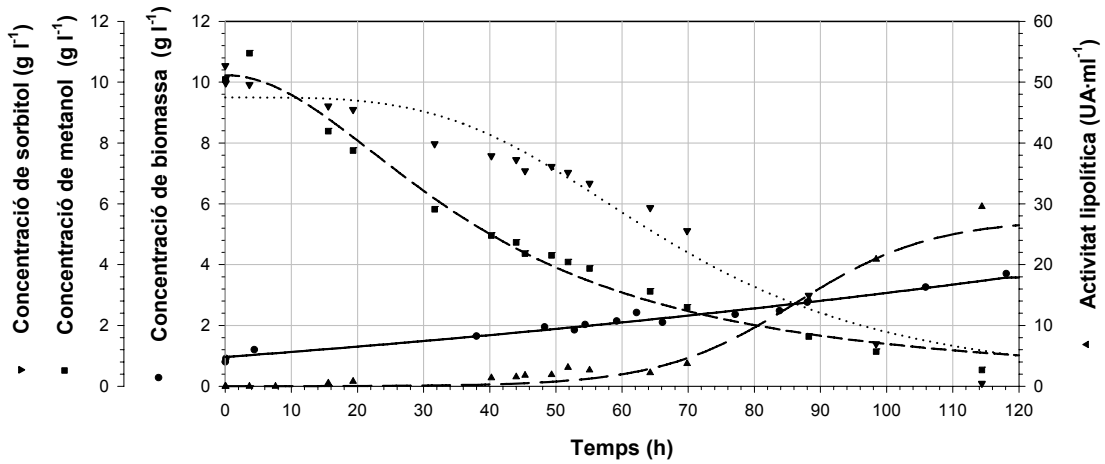


Figura 9.4. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per a una fermentació en discontinu de la soca Mut_m de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats .

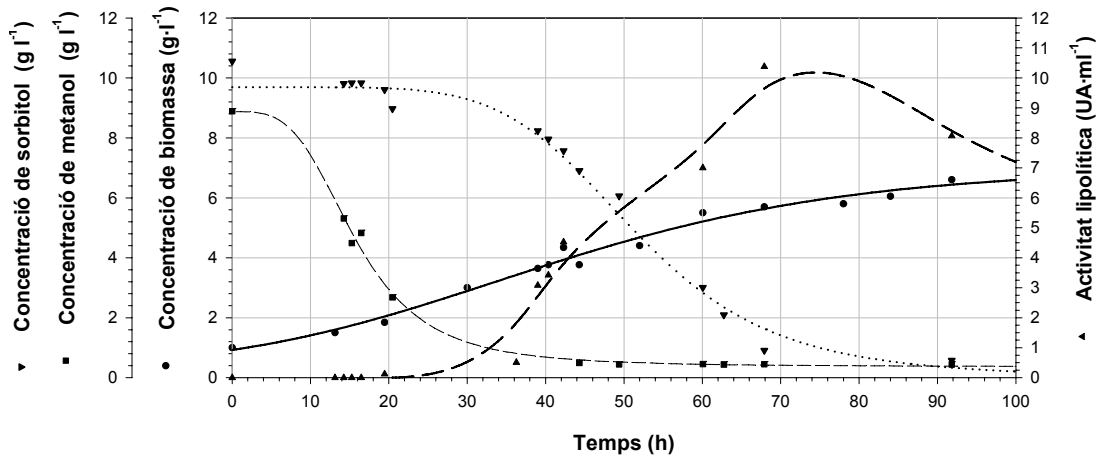


Figura 9.5. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per a una fermentació en discontinu de la soca Mut⁺_s de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats .

Si s'observa la figura en qüestió es pot detectar un consum dels dos substrats de forma quasi simultània, creixement diaúxic, assolint una activitat màxima de 29.5 UA ml⁻¹. En aquest cas es reproduceix el mateix que s'ha observat per a la seva homòloga amb una sola còpia, les limitacions del metanol com a única font de carboni s'han vist superades per la presència del sorbitol com a cosubstrat. De totes maneres, el fet de tenir més d'una còpia provoca una producció més limitada que en el cas de tenir una còpia.

El mateix experiment en discontinu s'ha realitzat amb la soca Mut⁺_s. En la figura 9.5 es pot apreciar com el consum de substrats es realitza de forma seqüencial, a diferència del que passava amb les soques del fenotip Mut^s. En aquest cultiu hi ha un consum quasi únic de metanol que fa disminuir la seva concentració fins a 1 g l⁻¹ durant les primeres 30 hores. A partir d'aquest moment es comença a consumir sorbitol i es fa apreciable la presència de ROL en el medi de fermentació.

Durant les 50 hores següents la concentració de sorbitol va disminuint mentre que l'activitat de la proteïna recombinant es va incrementant. I és a partir d'assolir una concentració de sorbitol de 1 g l⁻¹ quan es detecta una disminució d'activitat, probablement associada a l'acció de proteases en el medi, efecte no detectat en les soques del fenotip Mut^s.

Durant tot aquest procés la concentració de biomassa va augmentant i no s'atura fins el complet exhauriment dels dos substrats, superant els 6 g l⁻¹.

Un cop descrit el comportament de les soques d'estudi amb un substrat o una combinació de substrats es realitza una comparativa en base a les figures dels cultius en discontinu, la taula 9.1 on es recullen algunes de les variables i paràmetres d'interès associats a la producció i evolució de la velocitat específica de producció dels diferents cultius mixtes (figura 9.6).

Taula 9.1. Recull comparatiu dels paràmetres i variables associats a la producció en cultiu discontinu dels fenotips de *P. pastoris* produint ROL sota el control del promotor *PAOX*. Els paràmetres resultants han estat calculats en base a l'activitat lipolítica màxima.

Paràmetres / Variables	Mut^s_s	Mut^s_m	Mut^+_s	Mut^+_s
	Metanol + sorbitol	Metanol + sorbitol	Metanol + sorbitol	Metanol
Velocitat específica de creixement màxima (h^{-1})	0.021	0.014	--	0.06
Activitat Lipolítica màxima (UA ml^{-1})	53	29.5	10.4	6.1
$Y_{P/X}$ (UA gX^{-1})	10600	7284	1825	1413
Productivitat (UA $l^{-1} h^{-1}$)	757	258	153	201
Productivitat específica (UA $gX^{-1} h^{-1}$)	151	64	27	47

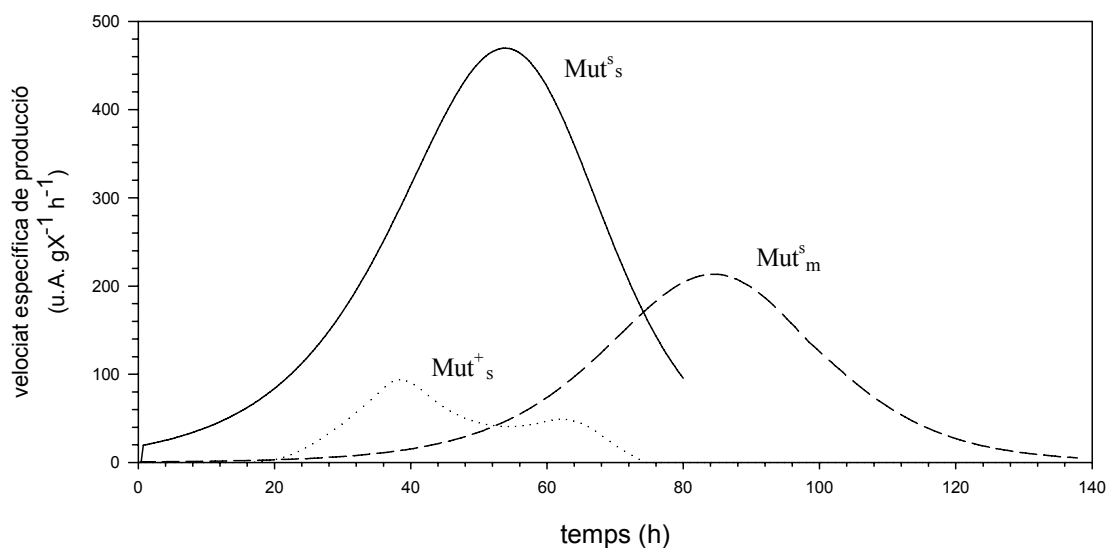


Figura 9.6. Evolució de la velocitat específica de producció per als discontinus realitzats amb les diferents soques de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats .

Si es comparen els nivells de producció que té la soca Mut^+_s creixent amb substrats mixtes i emprant el metanol com a única font de carboni, es pot observar com la producció de la proteïna fins les 30 – 40 hores, quan el metanol està quasi exhaurit, és molt semblant. En aquest interval de temps, els nivells de proteïna secretada d'unes 6 UA ml⁻¹. Però, llavors, la soca que està creixent en presència de sorbitol augmenta els nivells de proteïna en el sobrenedant. Aquest efecte es pot veure amb l'evolució de la velocitat específica de producció de ROL (figura 9.6), on hi ha dos màxims associats a cadascun dels substrats. El primer, com el que té una soca que creix amb metanol com a únic substrat i el segon com a resultat del doble efecte produït per la presència de sorbitol i metanol. Per una banda, és el resultat de la secreció de la proteïna intracel·lular acumulada al final de l'etapa de consum de metanol que es secretada gracies al suplement energètic que aporta el sorbitol i per l'altre, una lleugera producció que s'ha observat amb el microorganisme creixent amb sorbitol com a única font de carboni (~1 UA ml⁻¹).

En aquest cas, tot i tenir uns nivells d'activitat i de $Y_{P/X}$ lleugerament superiors emprant substrats mixtes (Taula 9.1), els nivells de productivitat i productivitat específica són més baixos. A més a més, s'observa que al final del cultiu es produeix una disminució dels nivells d'activitat, probablement associada a la presència de proteases produïdes pel mateix microorganisme.

En definitiva, es pot concloure que la utilització de substrats mixtes en soques de fenotips Mut^+ no millora la producció heteròloga de ROL.

La utilització d'una estratègia amb substrats mixtes és molt més prometedora en el cas del fenotip Mut^s . L'assimilació simultània d'ambdós substrats permet el creixement del microorganisme, que no es produïa amb la presència única de metanol, i uns nivells de producció molt elevats (53 UA ml⁻¹). Això suposa un increment de la producció entre 5 ó 6 vegades superior a l'obtingut amb metanol com a únic substrat, que a nivell de rendiment màssic de biomassa – substrat s'incrementa quasi 7 vegades. De la mateixa manera, els valors de productivitat i productivitat específica són més de tres vegades superiors als obtinguts amb metanol.

Aquest efecte es pot observar a la figura 9.6, quan s'analitza l'evolució de la velocitat específica de producció en front al temps, emprant diferents fenotips per substrats mixtes. El valor màxim s'obté amb el fenotip Mut^s_s (500 UA g biomassa⁻¹ h⁻¹) que supera en 2.5 i 5 vegades als màxims obtinguts amb els fenotips Mut^s_m i Mut^+_s , respectivament.

La co – assimilació del metanol permet que, en el cas de la soca Mut^s es produeixi, no només una elevada velocitat específica de producció si no que a més una producció des de

les primeres hores de cultiu. I tot això, sense detectar un període de latència, com s'observa a la soca Mut^s_m.

L'efecte de l'increment de la dosi gènica, amb el fenotip Mut^s demostra ser una estratègia poc prometedora. Ja que tot i aconseguir el creixement del microorganisme i la producció de ROL, els nivells de màxima activitat lipolítica, de $Y_{P/X}$ i productivitat específica són inferiors als obtinguts amb una única còpia. A més a més, és molt interessant comparar la velocitat específica de creixement d'ambdues soques. En el cas multicòpia és de 0.014 h^{-1} que és clarament inferior a la d'una còpia, 0.021 h^{-1} , comprovant que l'augment de la dosi gènica afecta de manera negativa al creixement del microorganisme i a la producció de ROL, tal com s'ha observat en cultius semicontinus, emprant metanol com a única font de carboni (Cos *et al.*, 2005b).

L'anàlisi dels nivells d'activitat intracel·lular (figura 9.7) permeten detectar un fet molt interessant, s'observa una acumulació del producte a l'interior de la cèl·lula durant les primeres hores de cultiu. Aquest fet sembla lligat a una limitació del procés de secreció i no de síntesi de la proteïna recombinant. Aquest màxim s'assoleix abans de les 20 hores de cultiu i disminueix ràpidament, fins assolir valors molt baixos que són independents del fenotip. Tot i així, els nivells de lipasa extracel·lular de la soca Mut^s són 5 vegades els de la Mut⁺, mentre que els valors de la proteïna intracel·lular només són el doble. Tenint en compte que amb la soca Mut^s el sorbitol s'assimila simultàniament, a diferència de la Mut⁺ en la que el màxim es produeix abans de que comenci a consumir el sorbitol, sembla evident que la co-assimilació de sorbitol afavoreix de forma significativa el procés de secreció de la proteïna heteròloga.

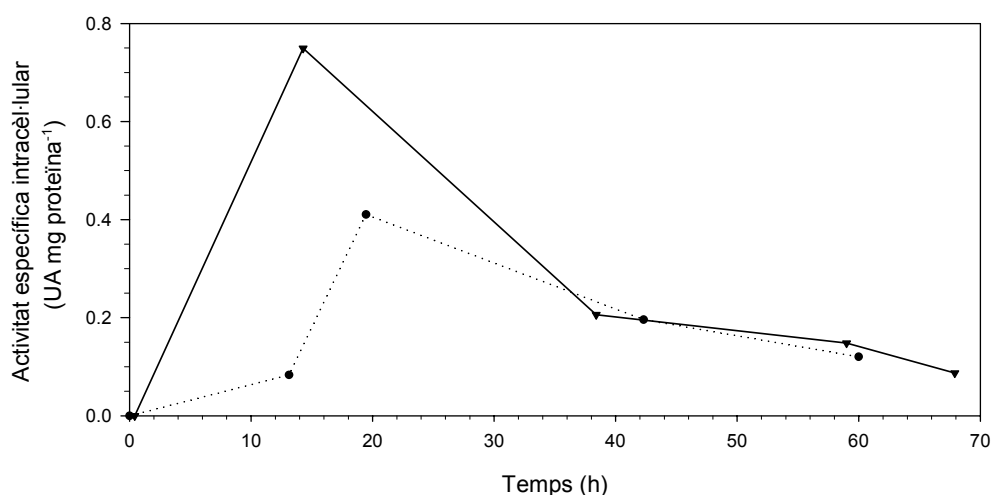


Figura 9.7. Evolució de la concentració de ROL intracel·lular per als discontinus realitzats amb les diferents soques de *P. pastoris* emprant una combinació mixta de substrats.

Un cop vist el comportament de les diferents soques provades amb la prometedora combinació sorbitol – metanol, cal realitzar la selecció d'alguna d'elles amb l'objectiu de portar a un cultiu semicontinu la estratègia amb substrats mixtes.

9.2.2. Selecció de la soca per a cultius en semicontinu

Un cop analitzada la situació i havent realitzat un estudi de la resposta de les diferents soques en un cultiu discontinu, es planteja la necessitat de seleccionar una d'elles per poder centrar la investigació en base a la capacitat productiva. La selecció de la soca s'ha realitzat tenint en compte:

- La resposta obtinguda en cultiu discontinu no deixa lloc a plantejar la utilització de cap soca que no sigui la Mut^s . Aquesta no només ha permès obtenir la millor productivitat sinó que permet tenir un $Y_{P/X}$, una productivitat i una productivitat específica molt per sobre de la resta de candidates.
- A més a més, l'experiència obtinguda amb el fenotip Mut^+ ens indica que l'operació és més fàcil emprant una soca amb una velocitat de consum de metanol més lenta (Mut^s) que no pas emprant una que la tingui més alta (Mut^+). El treball amb aquesta última implica treballar amb un microorganisme amb una velocitat de consum d'oxigen molt elevada que dificulta l'operació del procés per la generació d'escumes, l'arrossegament del metanol present i la necessitat de tenir un controlador de la concentració de metanol que pugui operar amb una dinàmica prou ràpida. Tots aquests aspectes dificulten l'operabilitat del procés i afavoreixen la desestabilització del mateix, i a més, poden provocar una dificultosa reproductibilitat dels experiments.

9.2.3. Estratègia per realitzar els cultius en semicontinu

Per poder portar a terme cultius semicontinus s'ha de definir una estratègia que passa per addicionar les quantitats de metanol i sorbitol a l'interior del fermentador. A partir dels experiments realitzats, es pot estudiar l'efecte de la velocitat específica de creixement i de la concentració de metanol en la productivitat del procés en semicontinu, emprant sorbitol com a cosubstrat. Per poder fer-ho, es realitza un primer experiment en el que es pretén

treballar a la velocitat específica de creixement màxima, en condicions de limitació per substrat, i a una concentració de metanol de 0.5 g l^{-1} .

L'estratègia dissenyada s'inicia amb una fase de cultiu en discontinu de 40 g l^{-1} de glicerol per aconseguir mantenir una concentració de biomassa suficient en la fase d'inducció. Un cop consumit aquest primer substrat, la qual cosa es detectarà per la baixada sobtada de la CER, s'inicia una fase de transició perquè *P. pastoris* s'adapti als substrats emprats a la fase d'inducció. Aquesta fase inclou un cultiu discontinu a una concentració de sorbitol i metanol de 10 i 5 g l^{-1} respectivament. Aquesta transició ha estat pensada per poder minimitzar el temps d'adaptació que pugui tenir el microorganisme a la fase d'inducció, amb la finalitat de disminuir el temps de cultiu i millorar la productivitat.

En el moment en que s'exhaureixen els dos substrats, detectat a través de la CER, es continua realitzant una estratègia d'addició que persegueix mantenir els nivells de metanol i sorbitol esmentats al paràgraf anterior.

Davant de la no existència d'un sensor específic de sorbitol, s'ha emprat una estratègia d'addició pre – programada amb l'objectiu de controlar, en llaç obert, la velocitat específica de creixement del microorganisme durant la fase d'inducció.

Si es considera que hi ha un pseudo – estat estacionari per cada instant de temps, a partir del balanç de substrat a la fase semicontinua, es pot obtenir la relació entre la velocitat específica de creixement, el cabal de substrat addicionat i la biomassa en cada instant (equació 9.1).

$$\mu(t) = \frac{Y_{X/S} u(t) S_0}{V(t) X(t)} \quad (\text{eq. 9.1})$$

Si a més s'integra el balanç de biomassa en la fase d'inducció s'obté la equació 9.2.

$$X(t)V(t) = X(t_0)V(t_0) \exp[\mu(t - t_0)] \quad (\text{eq. 9.2})$$

I combinant i reordenant les equacions 9.1 i 9.2, s'obté el cabal ($u(t)$) que cal addicionar per poder mantenir la velocitat específica de creixement constant (equació 9.3).

$$u(t) = \frac{\mu(t)[X(t_0)V(t_0)]}{Y_{X/S} S_0} \exp[\mu(t - t_0)] \quad (\text{eq. 9.3})$$

Aquest cabal depèn del volum inicial ($V(t_0)$), de la concentració de biomassa inicial ($X(t_0)$) i de $Y_{X/S}$ que es considera constant al llarg de la fermentació i que es determina a partir dels experiments realitzats en discontinu.

Si no s'acomplís la hipòtesi plantejada potser que calgués modificar els cabals d'addició de sorbitol. Per això cal fer un seguiment de la concentració d'aquest compost en el medi de cultiu mitjançant HPLC. Amb aquesta dada i mitjançant el balanç de sorbitol es pot quantificar el consum de sorbitol en cada un dels intervals de temps i reajustar el cabal consumit en cada moment.

Per poder complir el requeriment de treballar a una concentració de metanol de 0.5g l^{-1} , s'empra el llaç de control tancat descrit al *Capítol 7. Efecte de la concentració de metanol en la producció de ROL en cultius semicontinus amb la soca Mut^+_s de *Pichia pastoris**, que permet garantir els nivells desitjats.

9.2.4. Experiments en semicontinu

La selecció de les condicions en que es realitzen els experiments han estat plantejades per poder superar les limitacions observades en experiments previs. Aquestes limitacions s'han detectat en experiments on la soca en qüestió creix amb una concentració de metanol residual en el medi de cultiu de 0.5g l^{-1} . A aquestes concentracions, el microorganisme assoleix una producció d'aproximadament 125UA ml^{-1} en el principi de la fase d'inducció (figura 9.8) – fins a les 30 hores – a partir de llavors ja no hi ha un increment apreciable dels nivells d'activitat.

Per tant, es detecta una limitació en la capacitat de producció o d'inducció del microorganisme a aquestes concentracions. A més a més, s'ha pogut veure com el pendent de la velocitat específica de producció (figura 9.9) és més elevat treballant a una concentració de 0.5g l^{-1} que treballant a concentracions superiors, on no s'atura la producció amb metanol (Cos *et al.*, 2006a).

Per tant, un experiment que pot resultar molt interessant és el que englobi les avantatges de la utilització de substrats mixtes, amb les condicions que permeten aconseguir la màxima activitat per gram de biomassa amb metanol.

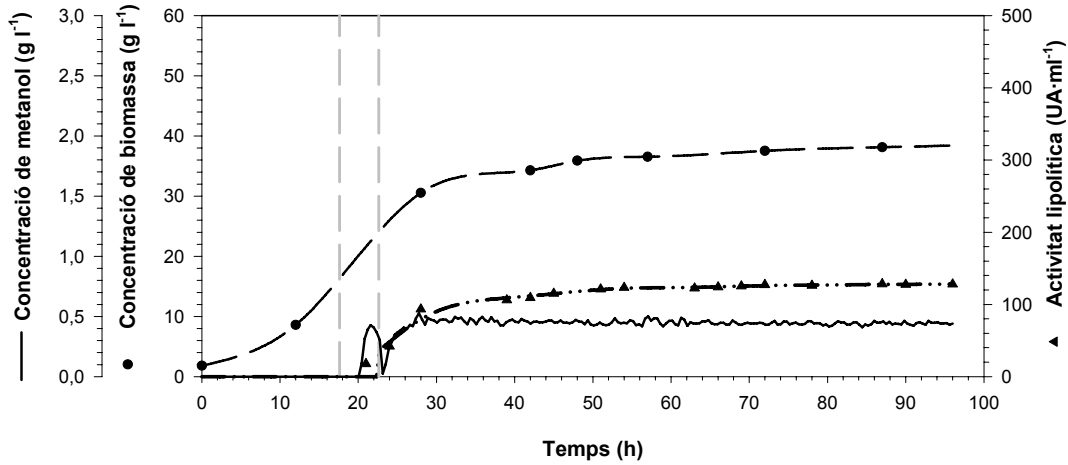


Figura 9.8. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per una fermentació en semicontinu de la soca Mut^s de *P. pastoris* emprant metanol com a únic substrat amb una consigna de 0.5 g l⁻¹ (Cos *et al.*, 2006a).

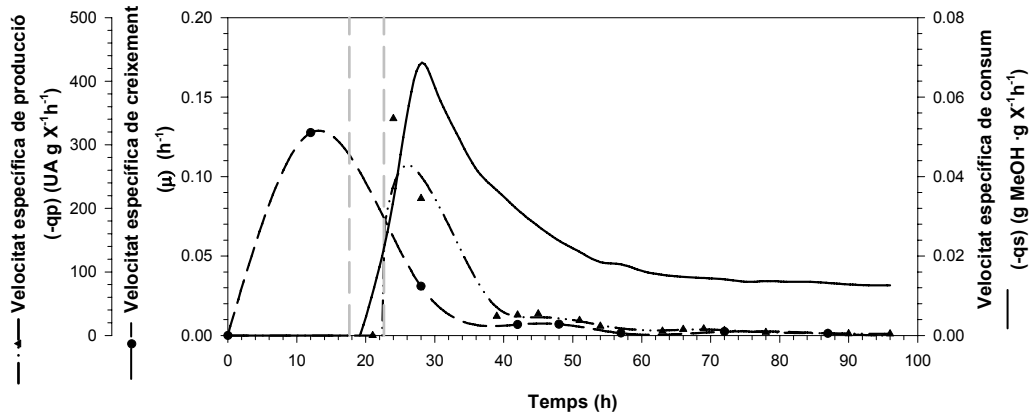


Figura 9.9. Evolució de la velocitat específica de creixement i de la velocitat específica de producció de ROL per una fermentació en semicontinu de la soca Mut^s de *P. pastoris* emprant metanol com a únic substrat amb una consigna de 0.5 g l⁻¹ (Cos *et al.*, 2006a).

L'experiment realitzat, amb una combinació de metanol i sorbitol per garantir 0.5 g l⁻¹ del primer i la velocitat específica de creixement màxima amb el segon, es presenta a les figures 9.10 i 9.11, on es veu l'evolució de la biomassa, substrats, activitat lipolítica, la velocitat específica de creixement i de producció.

Durant la fermentació no hi ha hagut una acumulació de sorbitol, a excepció de l'inici de la fase d'inducció permetent assegurar que l'experiment s'ha realitzat en condicions de substrat limitant, d'acord a una estratègia d'addició exponencial de sorbitol preprogramada. D'altra banda l'ús de substrats mixtes permet incrementar el rendiment biomassa substrat 2.1 vegades i la velocitat específica de creixement 4 vegades, a més a

més d'incrementar de manera significativa la productivitat i la productivitat específica (Taula 9.2). Quan l'estratègia escollida és mixta s'assoleixen resultats on l'activitat lipolítica és 2.8 vegades superior a la que emprava un únic substrat. A més a més, és fàcil apreciar que en la estratègia amb substrats mixtes no s'aprecia una aturada del creixement del llevat i de la producció, mentre que quan es treballa amb un únic substrat, aquest efecte es detecta a les 20 hores d'inducció sigui quina sigui la concentració de metanol emprada.

Una altra qüestió a tenir en compte i que té una especial rellevància és que la velocitat específica de producció, després d'assolir un màxim a l'inici de la fase d'inducció, no disminueix sobtadament fins a zero, tal com passava amb el metanol com a únic substrat. Aquesta velocitat específica cau per mantenir-se en un valor entorn a les 125 UA $gX^{-1} h^{-1}$ entre les 50 i 70 hores.

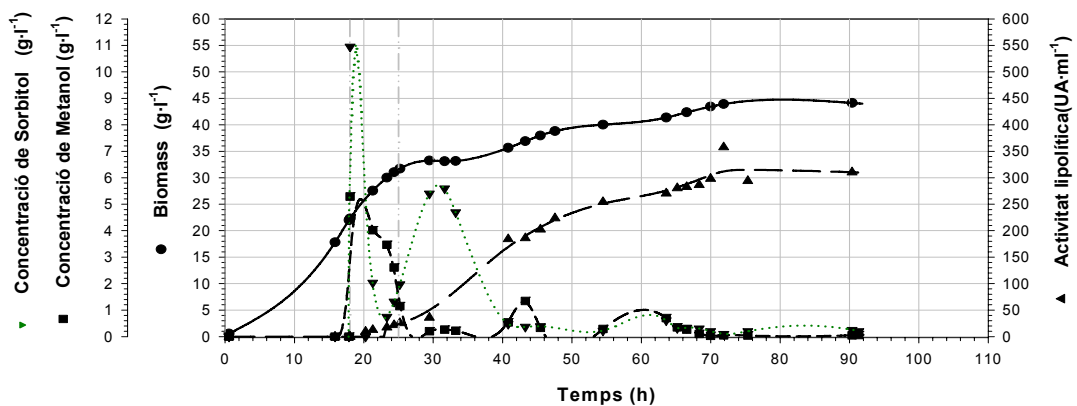


Figura 9.10. Evolució de la concentració de biomassa, metanol i de l'activitat lipolítica per a una fermentació en semicontinu de la soca *Mut^s* de *P. pastoris* emprant sorbitol i metanol en condicions de substrat limitants.

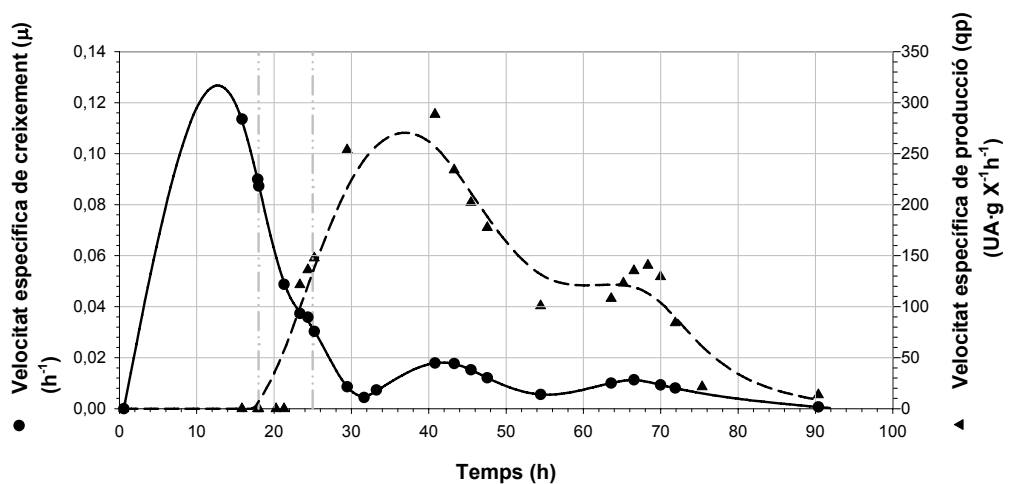


Figura 9.11. Evolució de la velocitat específica de creixement i de la velocitat específica de producció de ROL per a una fermentació en semicontinu de la soca *Mut^s* de *P. pastoris* emprant sorbitol i metanol en condicions de substrat limitants.

Taula 9.2. Comparació de la velocitat específica de creixement màxima i mitjana (μ) i de la velocitat específica de producció (q_p) en un procés semicontinu a una consigna de concentració de metanol de 0.5 g l^{-1} amb i sense sorbitol. (Les velocitats específiques de creixement mitjanes s'han estimats respecte al temps)

Paràmetres	MeOH 0.5 g l^{-1}	MeOH 0.5 g l^{-1} + sorbitol
Activitat lipolítica màxima ($\text{UA} \cdot \text{mL}^{-1}$)	137	380
$Y_{P/X}$ ($\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{X}$)	3917	8260
Productivitat ($\text{UA} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	1996	4285
Productivitat específica ($\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{X} \cdot \text{h}^{-1}$)	57	99
μ_{mitjana}^* (h^{-1})	0.003	0.012
$q_{p,\text{max}}^*$ ($\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{X} \cdot \text{h}^{-1}$)	340	350
$q_{p,\text{mitjana}}^*$ ($\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{X} \cdot \text{h}^{-1}$)	58	165

Una aproximació a nivell de transcripció es pot realitzar en calcular el pendent de la velocitat específica de producció abans d'assolir el màxim, sempre i quan no hi hagi acumulació de ROL intracel·lular. Quan el metanol és emprat com a única font de carboni amb una concentració de consigna de 0.5 g l^{-1} s'obté $106 \text{ UA gX}^{-1} \text{ h}^{-2}$. Aquest pendent quan es realitza amb sorbitol com a cosubstrat és de $40 \text{ UA gX}^{-1} \text{ h}^{-2}$. Tot i que el sorbitol en condicions limitants disminueix el grau de transcripció és 2 vegades més gran que quan s'empra metanol com a única font de carboni amb una consigna de 1 g l^{-1} , el que confirma que tot i ser repressor si disminueix el $Y_{P/X}$. En aquestes condicions és on s'aconsegueix la màxima producció i productivitat de ROL per aquesta soca (Cos *et al.*, 2006a).

9.2.5. Proposta de futur

Per poder estudiar en profunditat l'efecte de la utilització combinada de sorbitol i metanol en cultius semicontinus caldrà realitzar un disseny d'experiments que permeti establir la certesa de les següents hipòtesis:

- El paràmetre clau que determina la productivitat específica de ROL és la concentració residual de metanol en el medi de cultiu. Per això caldrà mantenir la velocitat

específica de creixement en el seu valor màxim i anar variant les concentracions del substrat inductor.

- El paràmetre clau que determina la productivitat específica de ROL és la velocitat específica de creixement. Per això caldrà fixar una concentració de metanol inferior a 2 g l^{-1} , i anar variant la velocitat específica de creixement en diferents cultius (variant el perfil d'addició de sorbitol).

El resultat d'aquesta bateria d'experiments, tenint com a funció objectiu la productivitat específica de ROL i com a variables la concentració de metanol residual i la velocitat específica de creixement, permetrà obtenir les condicions òptimes per a la producció de la proteïna d'interès.

9.3. Conclusions

El perfil d'assimilació de sorbitol de *P. pastoris* en cultius discontinus amb sorbitol i metanol com a cosubstrats presenta un diferent comportament depenent del fenotip amb el que es treballi (Mut^+ o Mut^s).

Quan la capacitat d'assimilació del metanol està restringida (fenotip Mut^s), els dos substrats es consumeixen de forma simultània, permetent una velocitat específica de creixement més elevada i uns nivells de producció molt superiors a qualsevol de les soques dels dos fenotips descrits creixent en metanol com a única font de carboni, aconseguint nivells de proteïna heteròloga sensiblement superiors als aconseguits amb el creixement amb metanol com a única font de carboni.. Aquest efecte no es detecta en el fenotip Mut^+ on els dos substrats es consumeixen de forma seqüencial.

Cal remarcar, de cara a establir les condicions operatives per a la operació en discontinu que en tots els casos estudiats s'assoleix un màxim en la productivitat quan la concentració de metanol residual es troba per sota dels 2 g l^{-1} .

Pel que fa a la addició combinada de sorbitol en cultius discontinus de soques Mut^s multicòpia permeten tenir creixement i producció, que no s'havia aconseguit emprant metanol com a únic substrat. No obstant això, l'efecte de l'increment de la dosi gènica és negatiu perquè produeix un descens significatiu de la velocitat específica de creixement i dels nivells de producció.

A més a més, cal tenir en compte l'avantatge operativa que suposa l'operació amb una soca Mut^s , respecte a l'operació amb una del fenotip Mut^+ , que creixent a una velocitat

específica moderada no té els requeriments d'oxigen que implica l'operació amb la segona per millorar el creixement microbià.

L'estratègia aplicada a un cultiu discontinu amb la soca Mut_s i una consigna de concentració de metanol de 0.5 g l⁻¹ permet incrementar la producció de la proteïna heteròloga en aquest fenotip. Aquesta millora s'aconsegueix gràcies a salvar les limitacions associades a la dràstica caiguda de la velocitat específica de producció a les poques hores de l'inici de la fase d'inducció, a l'increment de la velocitat específica de creixement i de l'important augment de la productivitat i de la productivitat específica.

Aquesta és una estratègia amb grans possibilitats de cara a un futur i que pot ampliar l'espectre de productes produïts amb *P. pastoris*. Actualment, alguns productes són expressats en cultius de baixa densitat cel·lular però presenten problemes alhora de portar-los a una escala més gran i és llavors on es pot plantejar la estratègia presentada com a solució per poder produir-los.

Capítol 10. Sistema automàtic per a l'anàlisi de compostos nitrogenats

10.1. Introducció

Les limitacions associades a l'ús del promotor *AOX1*, per l'existència de patents que llicencien la seva explotació, ha portat a la investigació de nous promotors que permeten aprofitar els beneficis derivats de la producció recombinant amb *P. pastoris*. Un d'aquests promotors ha estat la formaldehid deshidrogenasa (*PFLDI*) que han estat clonats i caracteritzats recentment (Shen *et al.*, 1998; Resina *et al.*, 2004). El gen *FLDI* codifica un enzim que juga un paper important en el catabolisme del metanol com a font de carboni, així com en el metabolisme de les amines metilades com a font de nitrogen. Dins de la via d'assimilació del metanol (Harder i Veenhuis 1989), el primer pas d'oxidació té lloc al peroxisoma, on la alcohol oxidasa genera formaldehid i peròxid d'hidrogen a partir del metanol. El peròxid d'hidrogen és degradat per una catalasa i una fracció del formaldehid és assimilada per la via biosintètica de la xylulosa monofostat. L'altre fracció de formaldehid deixa el peroxisoma i és oxidada al citosol a diòxid de carboni via format per la formaldehid deshidrogenasa i per la format deshidrogenasa.

A més de la funció que té en el metabolisme del metanol, la *FLD* està vinculada a l'assimilació de C_1 – amines, com la metilamina. L'oxidació de la metilamina té lloc al peroxisoma per la metilamina oxidasa, generant formaldehid, peròxid d'hidrogen i ions amoni. Aquest formaldehid pot ser oxidat a diòxid d'hidrogen o passar a generar biomassa per la ruta de metabolisme del metanol.

Aquest possible ús de la metilamina com a font de nitrogen en els cultius amb *P. pastoris* planteja la necessitat de fer un seguiment de la concentració d'aquest compost en un cultiu microbià (Resina *et al.*, 2005) i per això s'ha treballat en posar a punt un mètode i un equip que en permeti fer el seguiment de la concentració de la font de carboni i de nitrogen present en el brou de cultiu per poder marcar una estratègia que garanteixi la reproductibilitat dels resultats obtinguts i la optimització del procés de producció.

L'amoniac i les amines de cadena curta (metilamina - MMA, dimetilamina - DMA i trimetilamina - TMA) són compostos que es caracteritzen per unes propietats molt concretes que els fa relativament fàcils d'analitzar, per la seva volatilitat i el seu elevat pKa (figura 10.1).

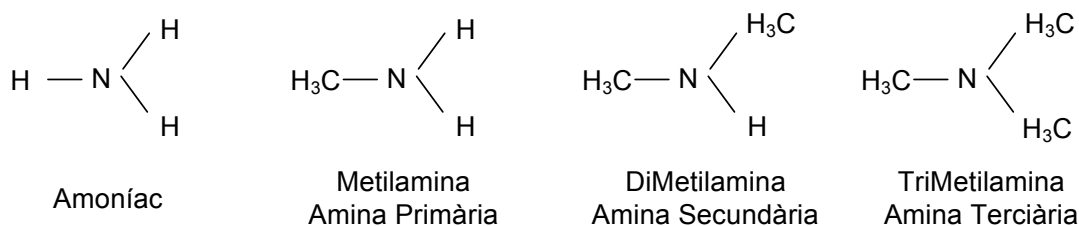


Figura 10.1. Representació de les espècies analitzades, l'amoníac, la metilamina, la dimetilamina i la trimetilamina.

En base a aquestes característiques es desenvoluparà un sistema per poder monitoritzar la concentració d'aquests compostos en un bioprocés.

La utilització de sistemes automàtics de mesura ha estat extensament descrit en molts processos biològics. Els sistemes desenvolupats, en molts casos han estat el resultat d'automatitzar processos clàssics (Gabriel *et al.*, 1998), d'altres han estat el resultat de la utilització de noves tècniques per poder augmentar l'especificitat dels sensors en qüestió i finalment n'hi ha hagut d'altres que han aparegut pel desenvolupament de noves tecnologies (Alegret *et al.*, 1990). En el cas que ens ocupa s'han desenvolupat dos sensors de característiques semblants als primers i als últims per poder avaluar la sensibilitat i robustesa dels mateixos: un basat en un elèctrode selectiu d'amoníac i l'altre en un sensor electroquímic d'amoníac en fase gas.

Per tant, l'objectiu d'aquest capítol és descriure el desenvolupament d'un sensor per la monitorització de la concentració d'amines primàries, secundàries i terciàries emprades com a font de carboni i nitrogen en bioprocessos i la seva posterior aplicació en fermentacions amb la soca pPICZFLDaROL derivada de la soca X-33 de *P. pastoris* (Resina *et al.*, 2004).

Per fer-ho, es selecciona un sensor que és sensible a compostos amínics volàtils, els quals són interferents del compost pel que han estat desenvolupat, l'amoníac.

El desenvolupament d'aquest muntatge es realitza passant per diferents etapes com són: la validació dels sensor escollit, del sistema d'automatització, del sistema integrat i finalment l'aplicació amb una fermentació on es comprova l'efectivitat del mateix amb mostres obtingudes en línia.

10.1.1. Sistema basat en un elèctrode selectiu d'amoníac.

La determinació de la concentració de compostos nitrogenats s'ha realitzat emprant un ampli ventall de metodologies en funció de la naturalesa dels compostos en qüestió. S'han desenvolupat sistemes específics per a la determinació de compostos nitrogenats d'origen inorgànic però que no són els que ens ocupen. Pel que fa als compostos orgànics nitrogenats es va desenvolupar el mètode Kjeldahl (Mckenzie 1994) que és el mètode de referència per a la determinació de nitrogen en la seva forma trinegativa. Aquest implica la digestió de les mostres amb un catalitzador específic que inclou sovint Cu i Se per facilitar el trencament de les molècules orgàniques i l'alliberament del nitrogen que inclouen en forma d'amoni.

En el cas que ens ocupa no ens cal patir per la utilització de mètodes de digestió previs perquè les espècies d'interès no requereixen una digestió prèvia i es poden analitzar mitjançant la utilització de qualsevol dels dos mètodes quantitius proposats.

La quantificació de la concentració de l'amoni inclòs a la solució digerida es pot realitzar de diverses maneres que estan ben descrites a Standard Methods for the examination of water and wastewater (1995) que serà la guia emprada per l'anàlisi proposat. El mètode emprat està descrit sota el nom de "4500-NH₃ D. Mètode de l'elèctrode selectiu d'amoníac" que s'empra per poder determinar la concentració d'amoníac i de les amines orgàniques ja descrites.

El sensor emprat, ORION 95-12 Ammonia electrode (Thermoelectron Corporation, Beverly, USA) ha estat desenvolupat per permetre una ràpida, simple, econòmica i acurada mesura de l'amoníac dissolt en una solució aquosa (figura 10.2). Aquest elèctrode és sensible a l'amoníac en fase gas i pot ser emprat també per a la mesura de l'ió amoni o a compostos orgànics nitrogenats després de la seva digestió i alliberament de nitrogen en forma amoniacal. Tal com s'ha descrit a l'apartat 4. *Materials i mètodes*, aquest sensor està format per un elèctrode intern de pH que permet mesurar la concentració d'ions hidroxil que és proporcional a la concentració d'amoníac present en solució.

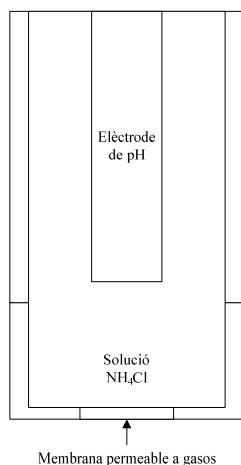
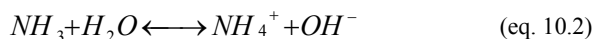
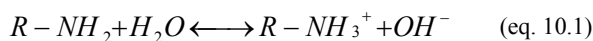


Figura 10.2. Esquema qualitatiu de l'elèctrode selectiu d'amoniac ORION 95-12.

Segons indicacions del subministrador, aquest sensor permet tenir una mesura robusta de l'amoniac present en una solució aquosa per la nul·la interferència que tenen els ions, els cations i qualsevol espècie dissolta per l'elevada especificitat de la membrana aquesta és permeable al pas de gasos en solució, i que només es pot veure afectada per la presència d'amines. Aquesta afirmació es pot fer extensible a la metilamina, dimetilamina i la trimetilamina, sempre i quan no hi hagi amoniac ni més d'aquestes dues espècies alhora.

Per poder validar el funcionament del sensor, tot i ser un mètode de referència, s'utilitza un mètode cromatogràfic descrit al *Capítol 4. Materials i mètodes*.

Aquest mètode es basa en el desplaçament en l'equilibri produït per la presència d'ions hidroxil en un medi fortament basificat que produeix una transformació dels ions amoni a amoniac (a partir es fa referència a la parella amoni – amoniac però es extrapolable a les seves amines homologues).



Les espècies presents a la reacció mantenen un equilibri que es regeix per l'equació:

$$\frac{[NH_4^+][OH^-]}{[NH_3]} = K_1 \quad (\text{eq. 10.3})$$

Aquest fet permet tenir una elevada presència de compostos en la seva forma gasosa en el medi (figura 10.3) i així augmentar la sensibilitat de l'elèctrode en qüestió per la permeabilitat de la membrana hidrofòbica dels compostos nitrogenats.

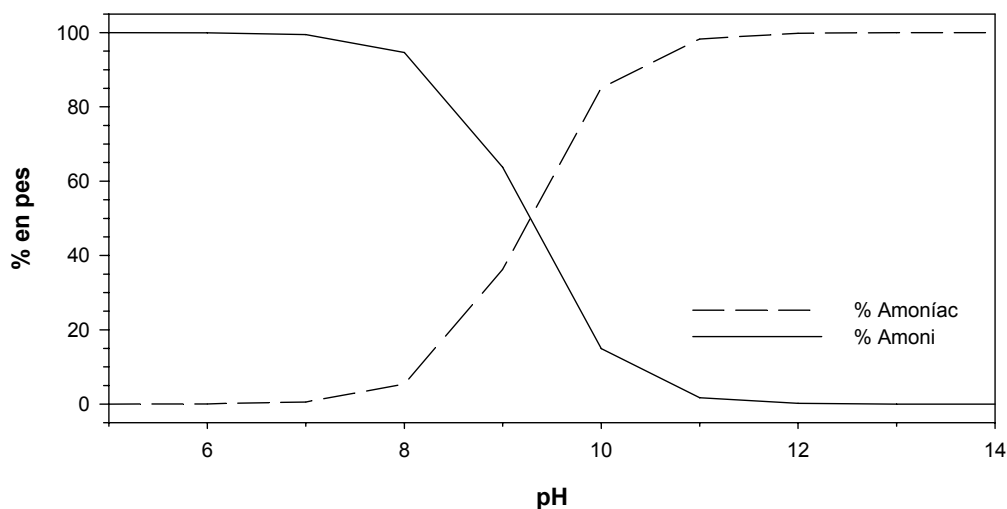


Figura 10.3. Relació de percentatges en pes d'amoniàc i d'amoni en funció del pH de la solució (<http://cobweb.ecn.purdue.edu/~piwc/w3-research/free-ammonia/nh3.html>)

Un cop travessada la membrana la concentració d'ions amoni es prou elevada (*Capítol 4. Materials i mètodes*) per poder considerar que és fixa i per tant poder considerar:

$$[OH^-] = K_2 [NH_3] \quad (\text{eq. 10.4})$$

Llavors la sensibilitat de l'elèctrode intern a la concentració d'ions hidroxil (proporcional a la concentració d'amoniàc en solució)

La realització d'un calibrat amb patrons permet associar aquesta concentració d'amoniàc a la que inicialment hi ha de cada una de les espècies. Les equacions 10.5 i 10.6 mostren el tipus de relació existent entre la mesura de l'elèctrode i la concentració de compost, logarítmica. Per tant cal fer un calibrat semi – logarítmic per poder establir la concentració de compost nitrogenat en base a les mesures preses.

$$E_{OH} = E_{OH_0} - S_{OH} \cdot \log([OH^-]) \quad (\text{eq. 10.5})$$

permet obtenir una mesura de la concentració de d'amoniàc en solució.

$$E_{NH_3} = E_{NH_3 0} - S_{NH_3} \cdot \log([NH_3]) \quad (\text{eq. 10.6})$$

10.2. Presentació i discussió dels resultats

S'ha desenvolupat un sistema de mesura de compostos nitrogenats en línia. Aquesta mesura es realitza emprant un elèctrode selectiu d'amoníac. Aquest tipus de sensor ha de poder donar una mesura fiable de les espècies d'interès, sense ser interferit per les espècies presents en els medis de fermentació emprats per realitzar els experiments. Per fer-ho cal filtrar la mostra en línia però no ha estat possible provar-ho. De totes maneres s'han realitzat els anàlisis amb una centrifugació prèvia de les mostres i posterior filtració per eliminar la biomassa present. El sistema desenvolupat és un sistema d'anàlisi per injecció on s'agafa mostra que entra en contacte amb un corrent de base que fa pujar el pH fins a 11 i llavors es desplaça l'equilibri líquid – gas i el sensor és capaç de mesurar la concentració de la espècie nitrogenada.

Pel desenvolupament del sistema de mesura de compostos nitrogenats es desenvolupen les següents etapes:

- Calibratge per poder comprovar la capacitat del sensor per mesurar les espècies nitrogenades.
- Muntatge i desenvolupament del sistema automàtic de mesura d'espècies nitrogenades.
- Realització de calibratges per mostres amb el medi de fermentació emprat en experiments reals. Anàlisi del temps de resposta, estabilitat i rang de mesura.
- Realització del seguiment de la concentració de metilamina d'un cultiu semicontinu d'una soca *FLD* de *P. pastoris*.

Tot i que en aquesta memòria no es presenten els resultats, s'han fet proves amb un sensor electroquímic TGS-826 Ammonia sensor (Figaro USA Inc) que permet fer el seguiment de les espècies nitrogenades contingudes en els gasos de sortida del cultiu. Aquest tipus de sensor és molt interessant perquè permet treballar sense haver d'incloure l'etapa d'eliminació de la biomassa present en el corrent de sortida. Però malauradament, la manca de sensibilitat d'aquest sensor davant la metilamina i la dimetilamina han obligat a descartar-lo.

10.2.1. Capacitat del sensor per mesurar les espècies nitrogenades.

Primerament s'han realitzat experiments per veure la resposta del sensor davant de les espècies presents en patrons de totes les espècies d'interès. Els experiments realitzats han permès veure la linealitat de les mesures en un ampli rang per totes les espècies provades (figura 10.4)

Per poder realitzar una mesura de referència que permeti establir la concentració real de la espècie nitrogenada s'ha emprat un mètode desenvolupat pel servei d'anàlisi de la Universitat Autònoma de Barcelona que permet mesurar la concentració de la metilamina, la dimetilamina i la trimetilamina.

Els primers experiments han estat amb amoníac (figura 10.4a) i metilamina (figura 10.4b), que a priori seran les més interessants de realitzar, emprant com a diluent aigua. Les mesures s'han realitzat seguin el mètode proposat, apartat 4 *Materials i mètodes*, és a dir, emprant el sensor directament sobre la mostra sense emprar cap sistema de flux.

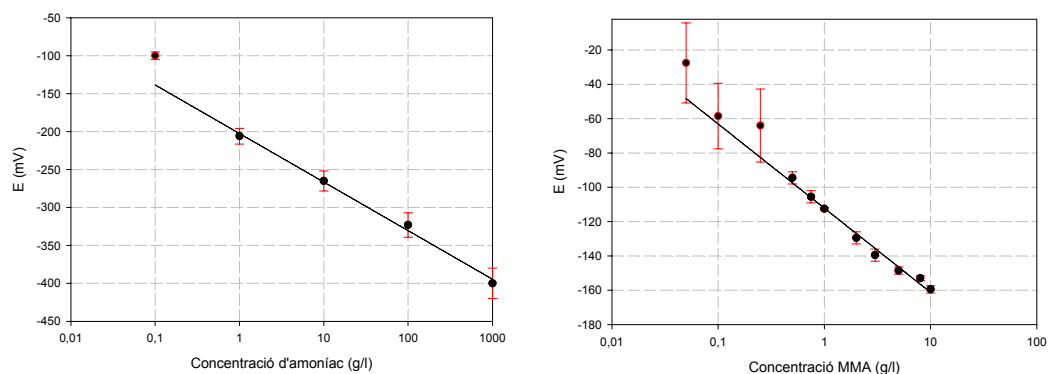


Figura 10.4. Calibratge del sensor ORION 95-12 per (a) amoníac i (b) MMA emprant com a solvent l'aigua .

S'ha realitzat el calibratge per a totes les espècies entre els 0.1 i els 10 g l⁻¹, podent detectar un rang de mesura prou ampli que permet emprar el sensor per a l'aplicació plantejada sense tenir que diluir cap de les mostres. Aquest fet implica treballar amb volums de mostra més grans però que permet eliminar un dels processos que poden conferir error al sistema, la dilució.

10.2.2. Muntatge i desenvolupament del sistema automàtic de mesura d'espècies nitrogenades.

Un cop comprovada la capacitat del sensor per a la mesura de mostres en el rang requerit pel procés indicat, es procedeix a dissenyar un sistema automàtic de mesura de la concentració d'amoniac i de compostos amínics.

Per fer-ho s'han realitzat una sèrie de proves per veure l'efectivitat de diferents sistemes de mescla (de tipus tanc agitat, de flux de pistó i de contacte directe), determinar la relació de cabals necessaris per assolir un pH de 11 (1.6 ml min^{-1} de mostra per 0.05 ml min^{-1} de NaOH 5M) i provat la millor inclinació per evitar l'acumulació de bombolles d'aire a la cel·la de mesura. Paral·lelament s'implementa un procediment per l'automatització emprant un mòdul lògic programable que permet accionar tots els elements que componen el sistema.

Finalment es procedeix a desenvolupar un sistema d'adquisició de dades i de desenvolupar un llaç de control per poder mantenir la concentració de la font de nitrogen en qüestió a l'interior del tanc de reacció.

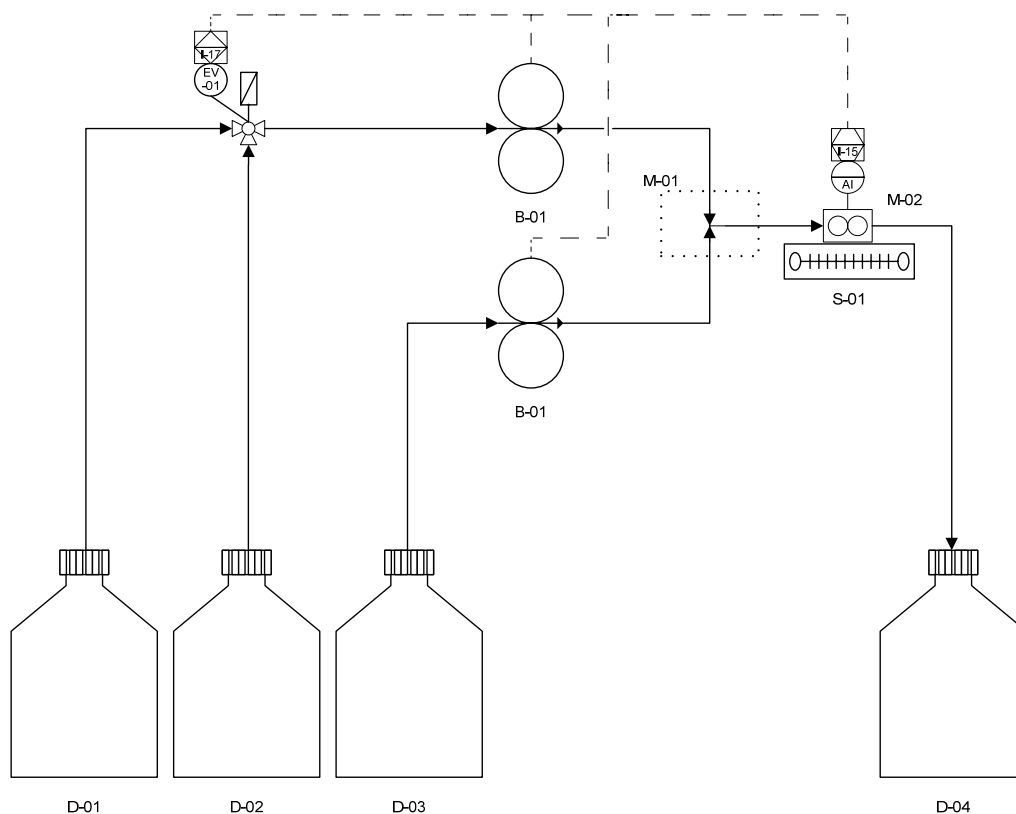


Figura 10.5. Diagrama de procés de sistema automàtic de mesura de compostos nitrogenats..

El muntatge experimental emprat per dur a terme els experiments ha estat desenvolupat pensant en minimitzar la complexitat del mateix per garantir un màxim de robustesa (figura 10.5).

Els equips relacionats amb aquestes instal·lacions es troben descrits en el següent llistat d'equips i d'instruments.

Taula 10.2. Llistat d'equips i instruments emprats per la realització del muntatge del sistema d'anàlisi en línia.

Ítem	Descripció	Contingut	Material
D – 01	Dipòsit de procés	Mostra	Pyrex
D – 02	Dipòsit de procés	Solució de NH ₄ Cl	Pyrex
D – 03	Dipòsit de procés	NaOH 5N	Pyrex
D – 04	Dipòsit de procés	Waste	Pyrex
B – 01	Bomba Peristàltica	Mostra / NaOH 5N	--
M – 01	Cel·la mescla T	Mostra / NaOH 5N	EPDF
M – 02	Cel·la sensor	Mostra / NaOH 5N	PVC
S – 01	Agitador magnètic	--	--
EV – 01	Vàlvula de 3 vies	Mostra / NaOH 5N	AISI 316L
AI – 01	Sensor d'amoniac	Mostra / NaOH 5N	EPDF
AT -01	Transmissor de pH	--	--

Tots els components de la llista són elements estàndard excepte en el cas de la cel·la on s'ubica el sensor que ha estat dissenyada i realitzada a mida per poder garantir la estanquitat i el contacte amb el fluid de procés (figura 10.6) .

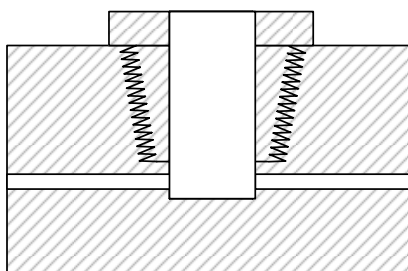


Figura 10.6. Esquema de la cel·la de reacció emprada per a la mesura de compostos nitrogenats.

Tal com es pot apreciar a la figura 10.6, la cel·la ha estat dissenyada per minimitzar els volums morts possibles, amb un únic circuit possible i amb una rosca en forma cònica perquè el sensor quedi perfectament apretat i amb un espai mínim per a la circulació del corrent a analitzar.

El sistema funciona alimentat per uns dipòsits d'estoc de NH_4Cl (2%), de NaOH (5M) mostra. El sistema pot funcionar en dos modes: el primer consisteix en quan no s'està analitzant la mostra i es manté el circuit ple d'una solució de NH_4Cl (2%), que permet mantenir una concentració residual mínima en el circuit per poder detectar possibles derives que tingui el sensor i evitar que s'assequi la membrana del sensor. Aquest corrent de clorur amònic entra en contacte amb un corrent de sosa en una T de connexió, la relació de cabals d'aquests dos corrents està pensada per mantenir un pH de 11. Un cop realitzada la mescla, a la sortida de la T, el corrent entra en la cel·la de mesura, on el sensor d'amoniac fa una mesura. Aquest es un senyal elèctric i que queda recollit a l'ordinador mitjançant una comunicació entre ports sèrie.

El segon mode és el de mesura, en aquest cas, el fluid que circula és la mostra a mesurar. La selecció del corrent de mostra o del corrent de NH_4Cl es selecciona mitjançant una vàlvula de tres vies que rep el senyal d'un mòdul lògic programable com el descrit al *Capítol 5.1 Sistema d'extracció de mostres*. La resta del circuit de la mostra és exactament igual que el descrit per a la solució amònica.

10.2.3. Realització de calibratges per a mostres amb el medi de fermentació emprat en experiments reals. Anàlisi del temps de resposta, estabilitat i mesura.

Per poder comprovar la capacitat de mesura del sistema s'han realitzat experiments que permeten establir tots els paràmetres claus que en determinen el seu funcionament.

Aquests experiments s'han realitzat emprant aigua i el medi de fermentació amb que es treballarà amb i sense la seva font de carboni principal, el sorbitol. Per evitar reproduir els experiments diverses vegades i no aportar una informació qualitativament interessant, es procedeix a mostrar aquells experiments realitzats en les condicions d'operació final.

Davant de les expectatives proporcionades pels experiments amb el mètode estandarditzat, es procedeix a realitzar una sèrie de calibratges més exhaustius per poder establir paràmetres més concrets referits a la dinàmica del sensor.

La següent sèrie de figures (figura 10.7). donen una idea aproximada de la capacitat del sensor davant de totes les espècies nitrogenades. Els experiments s'han realitzat per duplicat per poder garantir la seva reproductibilitat.

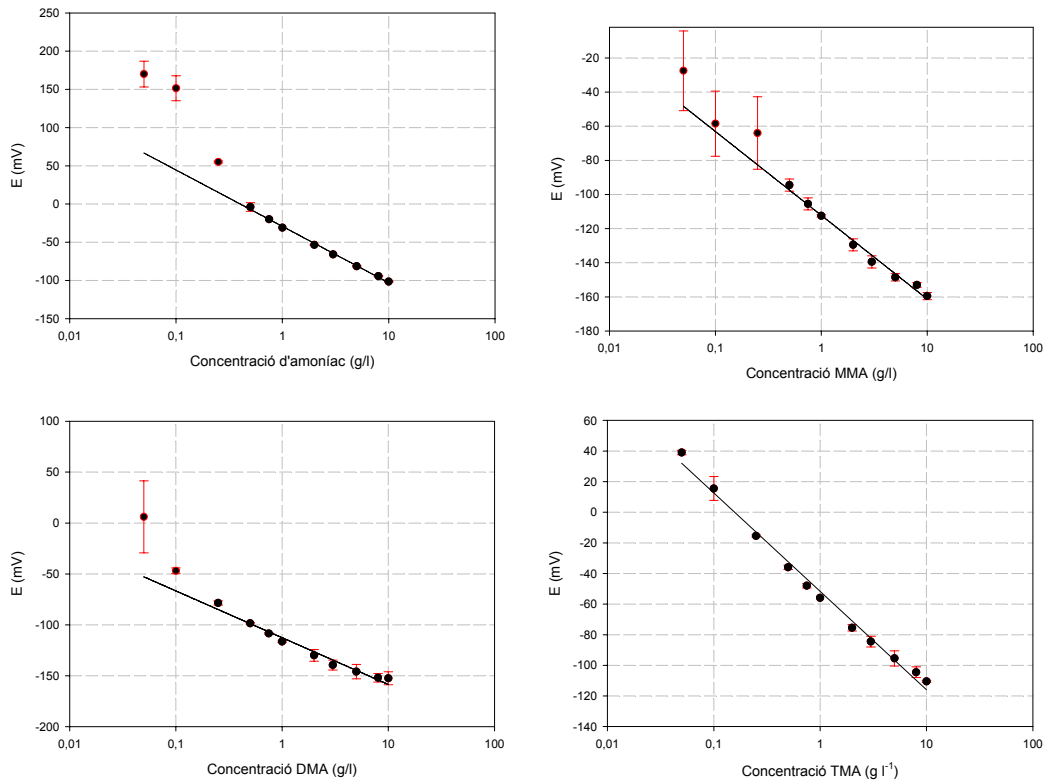


Figura 10.7. Calibratge del sensor ORION 95-12 per amoníac i MMA, DMA i TMA emprant com a medi el que s'utilitza en el bioprocés .

Tal i com es pot apreciar, les mesures realitzades en el medi de fermentació permeten tenir mesures en un rang més gran que en la majoria dels casos va des dels 0.1 fins als 10 g l⁻¹. Si s'observa amb profunditat els resultats obtinguts es pot comprovar com el punt on es deixa de tenir linealitat és aquell en el que comença a haver dispersió. Aquesta dispersió es clarament apreciable a les figures 10.8, 10.9, 10.10 i 10.11, on realitzant dues mesures contínues de la mateixa mostra es detecta com no es reproduïx el mateix cicle de valors.

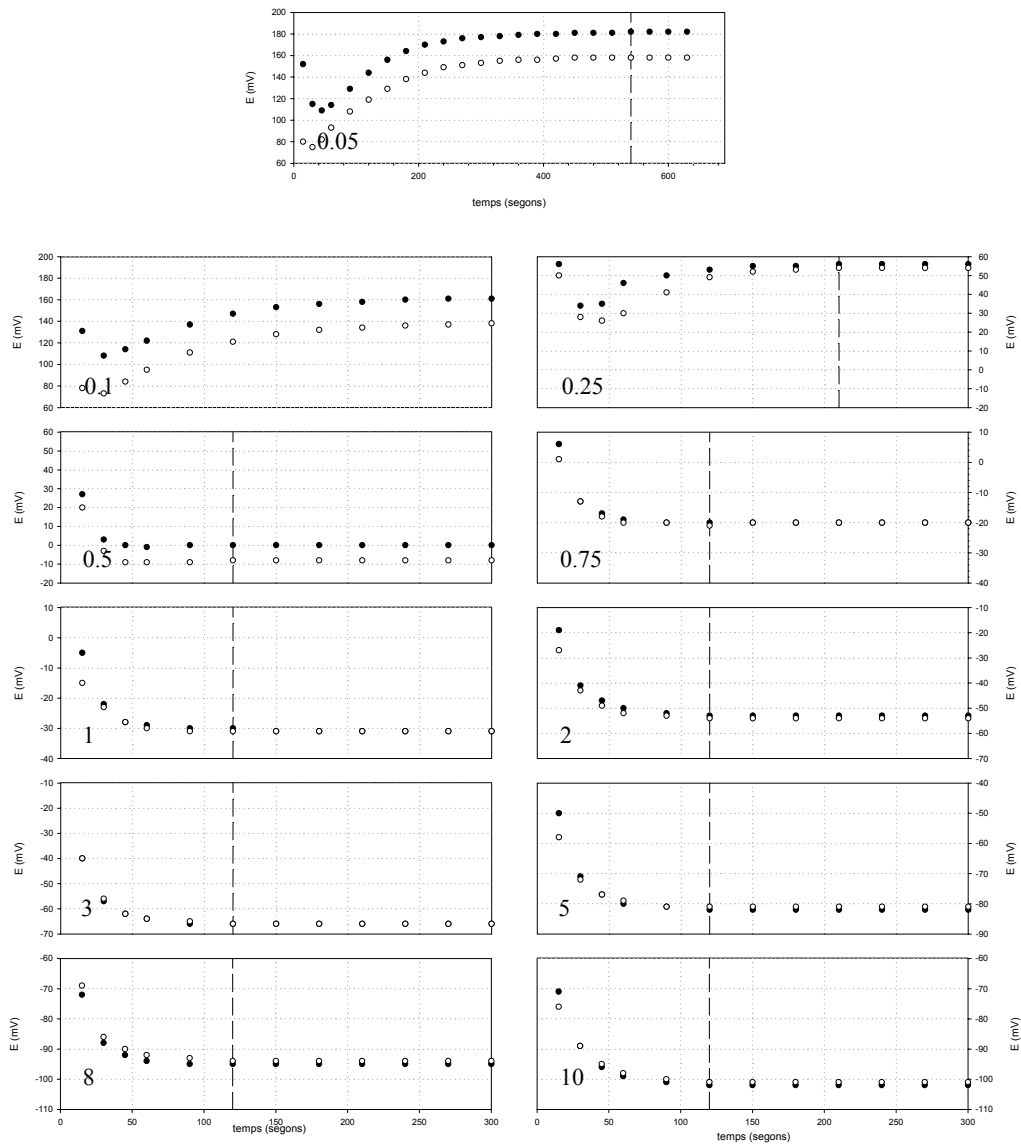


Figura 10.8. Resposta del sensor ORION 95-12 davant de les diferents concentracions d'amoniac proposades (0.05, 0.1, 0.25 , 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 10 g l⁻¹).

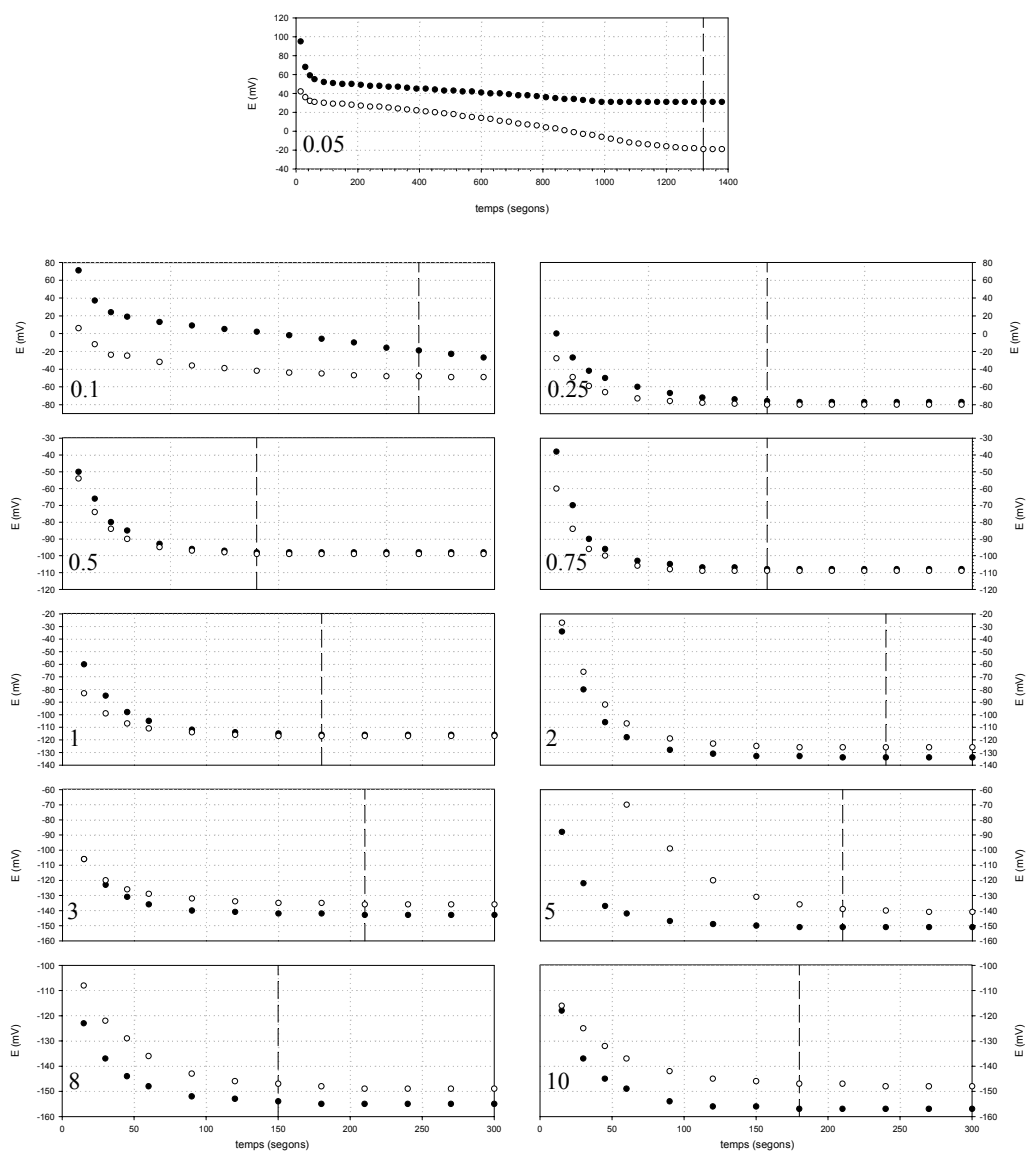


Figura 10.9. Resposta del sensor ORION 95-12 davant de les diferents concentracions de metilamina proposades (0.05, 0.1, 0.25 , 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 10 g l⁻¹).

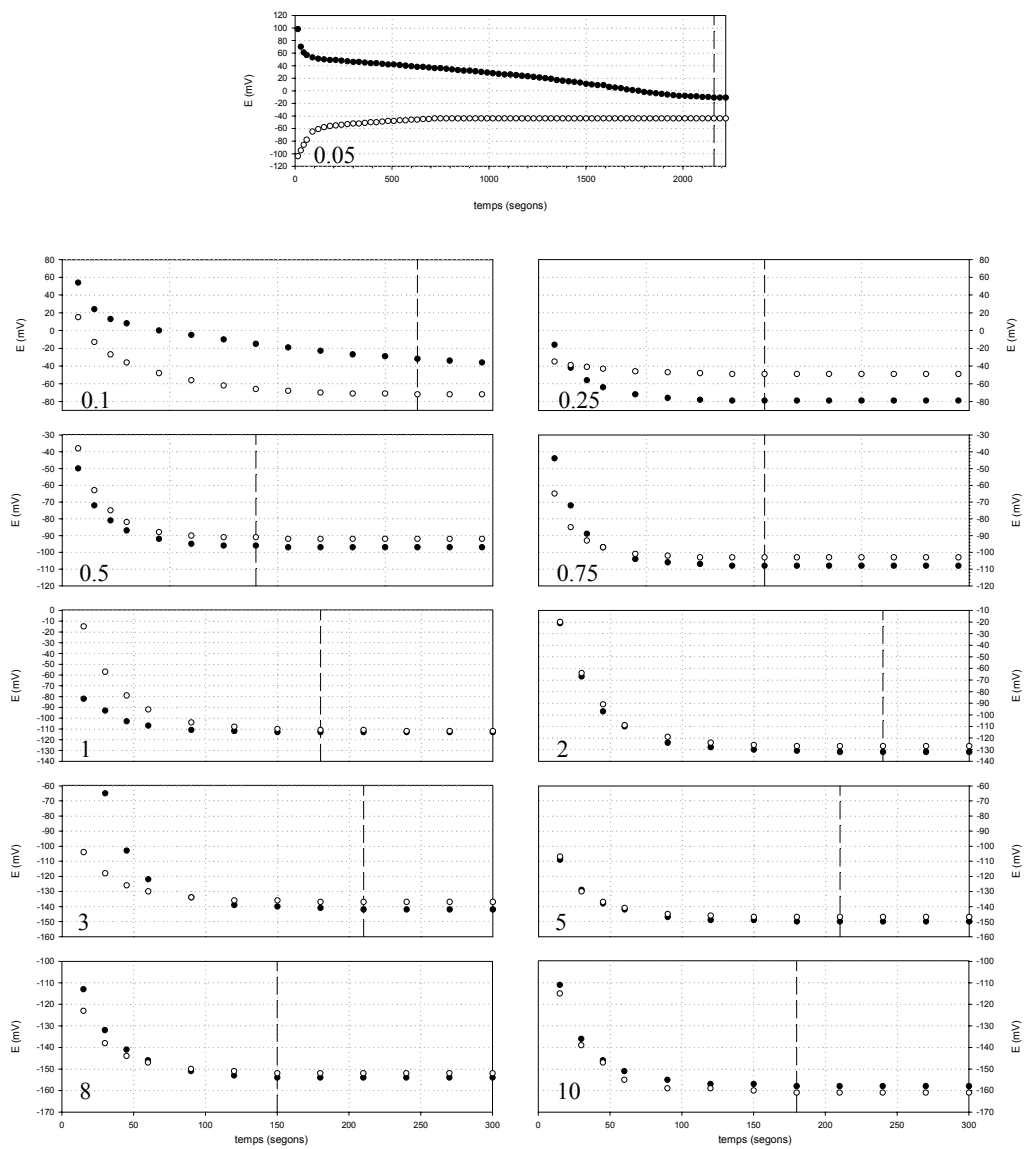


Figura 10.10. Resposta del sensor ORION 95-12 davant de les diferents concentracions de dimetilamina proposades (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 10 g l⁻¹).

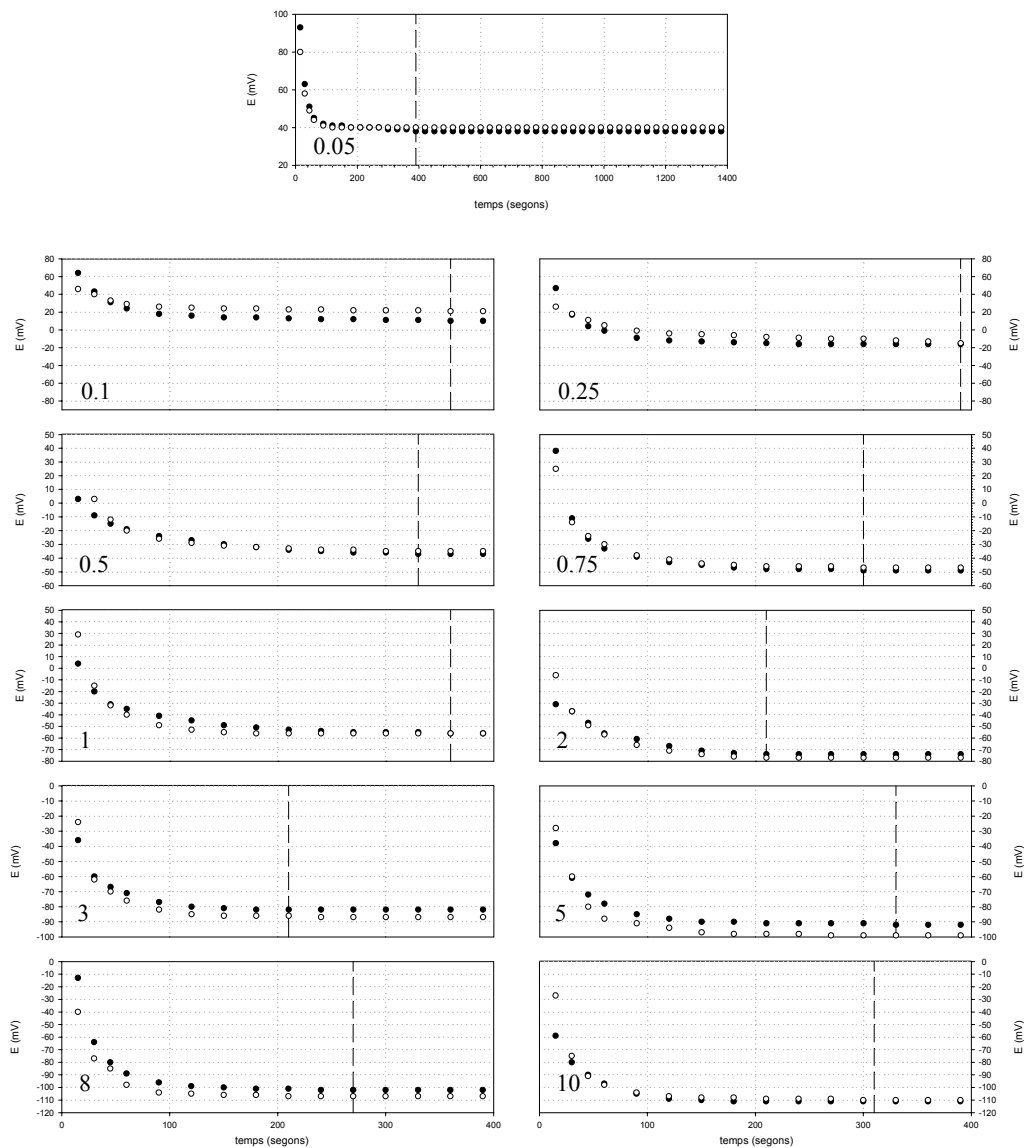


Figura 10.11. Resposta del sensor ORION 95-12 davant de les diferents concentracions de trimetilamina proposades (0.05, 0.1, 0.25 , 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 10 g l⁻¹).

De tots aquests gràfics es pot extreure la següent informació per poder tenir un recull de les condicions i temps necessaris per realitzar una mesura.

Taula 10.3. Taula recull dels paràmetres més rellevants de la mesura del sensor ORION 95-12 per als calibratges realitzats.

Paràmetre	Amoníac	MMA	DMA	TMA
Límit inferior del rang lineal (g l ⁻¹)	0.5	0.5	0.25	0.05
Límit superior del rang lineal (g l ⁻¹)	10	10	10	10
Temps mínim estabilitat de la mesura (s)	120	120	150	120
Temps màxim estabilitat de la mesura(s)	120	120	240	390
Desviació estàndard màx. (mV)	0.7	3.5	7.1	7.7

Si s'observa la taula proposada es pot discernir una linealitat a partir de concentracions relativament baixes però suficient per al tipus de procés proposat.

Aquest mateix exercici s'ha reproduït per a totes les espècies per un rang de mesura igual que el emprat pels calibratges de les figures 10.8, 10.9, 10.10, 10.11 però aquest cas incloent una concentració de sorbitol que permeti discernir si aquest afecta de forma determinant a les característiques del medi i en conseqüència dificulta la mesura de les espècies d'interès. El resultat obtingut és equivalent a l'obtingut als calibratges amb medi sense font de carboni i acull un rang suficientment gran per l'aplicació en cultius semicontinus.

10.2.4. Experiments de validació i caracterització de funcionament del sensor

En base als resultats obtinguts i a les mesures realitzades es planteja el seguiment de la concentració d'alguna de les espècies nitrogenades al llarg d'un cultiu.

Per això es decideix realitzar el seguiment de la concentració de metilamina en un cultiu semicontinu d'una soca *FLD* de *P. pastoris*.

Aquest cultiu es realitza en una primera fase en discontinu on el microorganisme es fa créixer, emprant com a font de carboni glicerol (40 g l⁻¹). Un cop exhaurit el glicerol es procedeix a realitzar una fase transitòria on es fa un discontinu de sorbitol (10 g l⁻¹) metilamina (2 g l⁻¹). Un cop exhaurit el sorbitol es realitza una addició exponencial,

descrita a l'apartat 5.4. *Determinació de la velocitat específica de creixement mitjançant un estimador adaptatiu*, que addiciona de forma estequiomètrica la quantitat de sorbitol i metilamina necessària per mantenir una determinada velocitat específica de creixement.

Tal i com s'aprecia als resultats obtinguts (figura 10.12), el sensor emprat permet fer un seguiment de la concentració de metilamina dins del medi de cultiu i si s'observa com l'evolució de les concentracions de metilamina i sorbitol evolucionen de forma paral·lela.

Aquest mateix exercici s'ha realitzat amb el mètode analític per HPLC descrit a l'apartat 4. Materials i mètodes, comprovant que les variacions obtingudes són inferiors a $0,2 \text{ g l}^{-1}$. Desviació que es assumible pel tipus d'experiment i dinàmica de procés amb la que s'està treballant.

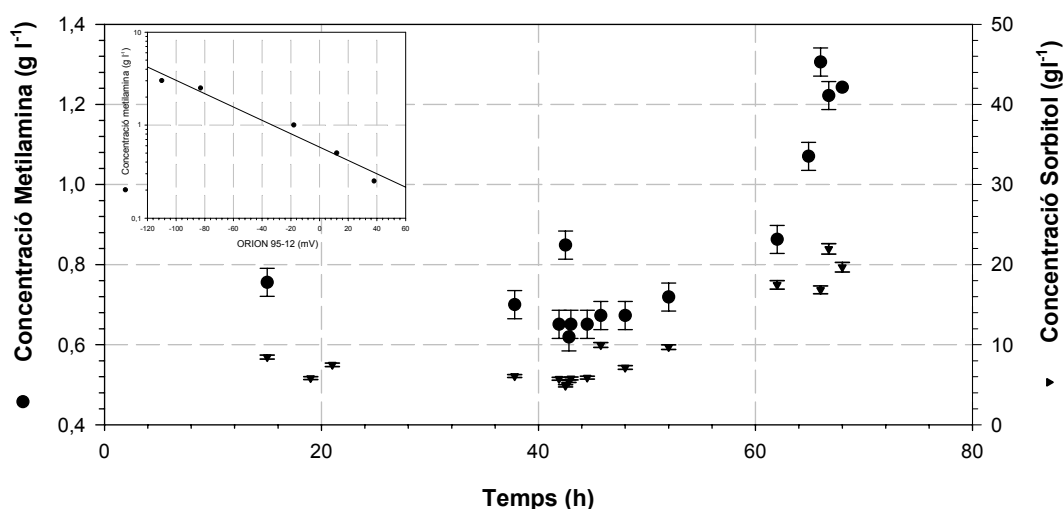


Figura 10.12. Mesura de les concentracions de metilamina i sorbitol d'un cultiu semicontinu amb el promotor *PFLDI* de *P. pastoris*.

10.3. Conclusions

Aquesta part del treball ha permès estudiar amb d'altres soques de *P. pastoris* que permeten operar sota el promotor *PFLDI* i que entren com a font de carboni i de nitrogen, el sorbitol i la metilamina.

Per aquest motiu s'ha desenvolupat un sistema automàtic d'anàlisi de metilamina, dimetilamina i trimetilamina, aprofitant que actuen com a interferents dels elèctrodes d'amoníac. Per això s'ha realitzat una sèrie d'experiments que permeten corroborar la capacitat de mesura del sistema desenvolupat. S'han vist capacitats de mesura del sensor

fins a concentracions prou baixes per al tipus de procés amb què s'opera, temps de resposta prou curts per a la dinàmica del microorganisme.

Finalment, s'ha pogut establir la capacitat del sensor operant amb mostres reals provinents d'una fermentació i s'ha pogut seguir satisfactòriament el consum de metilamina en un cultiu semicontinu.

Tenint en compte la dificultat d'obtenir una mesura en línia de sorbitol, el seguiment dels nivells d'aquest substrat a través de la mesura en línia de metilamina, es presenta com una aproximació que s'està desenvolupant dins del grup d'investigació.

Capítol 11. Conclusions generals

El treball descrit en aquesta memòria permet establir unes conclusions de caràcter general que es recullen a continuació:

- S’han desenvolupat, amb èxit, una sèrie d’eines per a la monitorització dels bioprocessos que respon a les necessitats determinades per la iniciativa PAT de la FDA. Aquests instruments s’han implementat a processos de producció de proteïnes recombinants sota els promotors *PFLDI* i *PAOXI* de *P. pastoris*. En la mateixa línia s’ha realitzat un estudi que permet millorar la mesura de metanol per poder fer un seguiment de la concentració d’aquest compost en cultius amb el promotor *PAOXI*. Tot això, determinant les possibles interferències produïdes per addició d’amoniac i proposant canviar de base durant el cultiu o implementar un sensor submergit que no sigui tant sensible a canvis de pressió, cabal d’aire i de compostos volàtils.
- Un cop s’ha establert una estratègia per poder obtenir una mesura fiable de la concentració de metanol, s’ha procedit a implementar un llaç de control amb un algorisme basat en el consum de metanol per poder mantenir constant la concentració d’aquest substrat al llarg del cultiu amb la soca Mut^+_s de *P. pastoris*. Amb aquesta proposta s’ha vist que es pot mantenir constant la concentració de metanol, tot i la dinàmica no – lineal d’aquest tipus de cultius. A més s’ha determinat que una concentració entorn a 2 g l^{-1} és l’òptim per garantir una màxima productivitat del procés.
- En base a aquests experiments s’han observat dos fets que són interessants i que han donat continuïtat al treball experimental: la producció s’atura quan es treballa a concentracions de metanol de 0.5 g l^{-1} , detectant al mateix temps un pendent inicial de la velocitat específica de producció per sobre de les vinculades a concentracions més elevades, fet que fa pensar en millors resultats si es deslliga el creixement de la producció. Per això s’ha proposat una estratègia de utilització de substrats mixtes que permet obtenir productivitats més estables i elevades, amb un mínim requeriment d’aire que facilita l’operatòria i el control del procés per soques Mut^s .
- S’ha desenvolupat un sistema de monitorització de la velocitat específica de creixement per poder fer-ne el seguiment mitjançant l’aplicació d’un estimador lineal

que permet seguir en línia la variable en qüestió per cultius amb *P. pastoris*, amb l'objectiu d'arribar a controlar aquesta variable en propers experiments.

- S'ha desenvolupat i posat a punt un sensor capaç de realitzar el seguiment de la concentració de metilamina per un cultiu semicontinu. Aquest sistema de mesura pot ser l'eina per poder implementar un llaç de control que permeti garantir la concentració dels substrats per cultius sota el promotor *PFLDI*.

Capítol 12. Bibliografia

Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19th[1]. 1995. American Public Health Association.

Pichia fermentation process guidelines. Invitrogen . 2000.

Guidance for Industry: PAR – A Framework for Innovation Pharmaceutical development, Manufacturing and Quality Assurance. 2004. Center of Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration.

Alegret, S., Alonso, J., Bartroli, J., Delvalle, M., Jaffrezicrenault, N. i Duvaulttherrera, Y. (1990). Flow-Through Ph-Isfet As Detector in the Determination of Ammonia. *Analytica Chimica Acta*, 231, 53-58.

Ästrom, K. i Wittenmark, B. (1990). *Computer Controlled Systems: Theory and Design*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Bailey, J. E. i Olis, D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: Mc Graw-Hill.

Beer, H. D., McCarthy, J. E. G., Bornscheuer, U. T. i Schmid, R. D. (1998). Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *biochimica et biophysica acta-gene structure and expression*, 1399, 173-180.

Beer, H. D., Wohlfahrt, G., Schmid, R. D. i McCarthy, J. E. G. (1996). The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochemical Journal*, 319, 351-359.

Bensalah, A., Fendri, K. i Gargoury, Y. (1994). The Enzyme of *Rhizopus-Oryzae* - Production, Purification and Biochemical Characteristics. *Revue Francaise des Corps Gras*, 41, 133-137.

Bonarius, H. P. J., Degooijer, C. D., Tramper, J. i Schmid, G. (1995). Determination of the Respiration Quotient in Mammalian-Cell Culture in Bicarbonate Buffered Media. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 524-535.

Borzani, W. (2003). Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnology Letters*, 25, 1953-1956.

Borzani, W. i Perego, L. (1976). Mash Volume Decrease During Ethanol Fermentation of Blackstrap Molasses. *Journal of Fermentation Technology*, 54, 902-906.

Boze, H., Laborde, C., Chemardin, P., Fabien, R., Venturin, C., Combarnous, Y. i Moulin, G. (2001). High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 36, 907-913.

Brierley, R. A., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A. i Siegel, R. S. (1990). Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 589, 350-362.

Carrier, J. F. i Stephanopoulos, G. (1998). Wavelet-based modulation in control-relevant process identification. *Aiche Journal*, 44, 341-360.

Cazzador, L. i Lubenova, V. (1995). Nonlinear estimation of specific growth rate for aerobic fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 47, 626-632.

Cereghino, J. L. i Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Review*, 24, 45-66.

Chae, H. J., Delisa, M. P., Cha, H. J., Weigand, W. A., Rao, G. i Bentley, W. E. (2000). Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 275-285.

Chen, Y., Krol, J., Cino, J., Freedman, D., White, C. i Komives, E. (1996). Continuous production of thrombomodulin from a *Pichia pastoris* fermentation. *Journal of chemical Tecnology and Biotechnology*, 67, 143-148.

Chiruvolu, V., Eskridge, K. M., Cregg, J. M. i Meagher, M. M. (1998). Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris*. *Applied Biochemical Biotechnology*, 75, 163-173.

Chung, J. D. (2000). Design of metabolic feed controllers: Application to high-density fermentations of *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 298-307.

Cos, O. Memòria de Tesi Doctoral. Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. 2005. Universitat Autònoma de Barcelona.

Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2006a). A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.

Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2006b). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5, 1-20.

Cos, O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2005a). Heterologous protein production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 26, 86-94.

Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M. i Valero, F. (2005b). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *Journal of Biotechnology*, 116, 321-335.

- Cregg, J. M. (2004, April 1). Heterologous proteins expressed in *Pichia Pastoris*. Accessible via <http://faculty.kgi.edu/cregg>
- Cregg, J. M., Lin Cereghino, J., Shi, J. i Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16, 23-52.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S. i Raschke, W. V. (1993). Recent advances in the Expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio-Technology*, 11, 905-910.
- Crowley, J., McCarthy, B., Nunn, N. S., Harvey, L. M. i McNeil, B. (2000). Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnology Letters*, 22, 1907-1912.
- Curvers, S., Brixius, P., Klauser, T., Thömmes, J., Weuster-Botz, D., Takors, R. i Wandrey, C. (2001). Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnology progress*, 17, 495-502.
- d'Anjou, M. C. i Daugulis, A. J. (2000). Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters*, 22, 141-146.
- d'Anjou, M. C. i Daugulis, A. J. (2001). A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 1-11.
- Daly, R. i Hearn, T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18, 119-138.
- Di Lorenzo, M., Hidalgo, A., Haas, M. i Bornscheuer, U. T. (2005). Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8974-8977.
- Dochain, D. i Bastin, G. (1990). Adaptive-Control of Fedbatch Bioreactors. *Chemical Engineering Communications*, 87, 67-85.
- Estler, M. U. (1995). Recursive on-line estimation of the specific growth rate from off-gas analysis for the adaptive control of fed-batch processes. *Bioprocess Engineering*, 12, 205-207.
- Faber, K. N., Harder, W., Ab, G. i Veenhuis, M. (1995). Review: Methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *yeast*, 11, 1331-1344.
- Farza, M., Hammouri, H., Othman, S. i Busawon, K. (1997). Nonlinear observers for parameter estimation in bioprocesses. *Chemical Engineering Science*, 52, 4251-4267.
- Farza, M., Nadri, M. i Hammouri, H. (2000). Nonlinear observation of specific growth rate in aerobic fermentation processes. *Bioprocess Engineering*, 23, 359-366.
- Files, D., Ogawa, M., Scaman, C. H. i Baldwin, S. A. (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 29, 335-340.

- Gabriel, D., Baeza, J., Valero, F. i Lafuente, J. (1998). A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria. *Analytica Chimica Acta*, 359, 173-183.
- Ganguly J. i Vogel G. (2006). Process Analytical Technology (PAT) and Scalable Automation for Bioprocess Control and Monitoring - A Case Study. *Pharmaceutical Engineering*.
- Golobic, I., Gjerkes, H. i Malensek, J. (1999). On-line estimation of the specific growth rate in the bacitracin fermentation process. *Aiche Journal*, 45, 2550-2556.
- Gorgens, J. F., Pianas, J., van Zyl, W. H., Knoetze, J. H. i Hahn-Hagerdal, B. (2004). Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium. *yeast*, 21, 1205-1217.
- Guarna, M. M., Lesnicki, G. J., Tam, B. M., Robinson, J., Radziminski, C. Z., Hasenwinkle, D., Boraston, A., Jervis, E., MacGillivray, R. T. A., Turner, R. F. B. i Kilburn, D. G. (1997). On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 279-286.
- Harder, W. i Veenhuis, M. (1989). Metabolism of one carbon compounds. In: *Rose AH, Harrison JS, editors. The yeasts. Vol 3 London: Academic press.*, 3, 289-316.
- Hellwig, S., Emde, F., Raven, N. P. G., Henke, M., van der Logt, P. i Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 344-352.
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. i Mattanovich, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 367-375.
- Hutchinson, M. F. (1986). A Fast Procedure for Calculating Minimum Cross-Validation Cubic Smoothing Splines. *Acm Transactions on Mathematical Software*, 12, 150-153.
- Inan, M. i Meagher, M. (2001a). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 585-589.
- Inan, M. i Meagher, M. M. (2001b). The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 337-341.
- Invitrogen Corporation CA USA . A Manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia Pastoris*. K1710-01. Version F. 2006.
- Isermann, R., Lachmann, K. i Matko, D. (1992). *Adaptive control systems*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A. K., Martinelle, M. i Enfors, S. O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102, 45-53.

- Jimenez, E. R., Sanchez, K., Roca, H. i Delgado, J. M. (1997). Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotechnology Techniques*, 11, 461-466.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E. i Fukuda, H. (1999). Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 627-631.
- Känsäkoski, M., Kurkinen, M., von Weymarn, N., Niemelä, P., Neubauer, P., Juuso, E., Eerikäinen, T., Turunen, S., Aho, S. i Suhonen, P. Process analytical technology (PAT) needs and applications in the bioprocess industry. A Review. 2006. VTT.
- Katakura, Y., Zhang, W. H., Zhuang, G. Q., Omasa, T., Kishimoto, M., Goto, W. i Suga, K. I. (1998). Effect of methanol concentration on the production of human beta(2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 482-487.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K. i Ohmura, T. (2000a). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 55-61.
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M. i Tomomitsu, K. (2000b). High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 280-288.
- Li, Z. J., Xiong, F., Lin, Q. S., d'Anjou, M., Daugulis, A. J., Yang, D. S. C. i Hew, C. L. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 21, 438-445.
- Lim, H.-K., Choi, S.-J., Kim, K.-Y. i Jung, K.-H. (2003). Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Applied Microbial Biotechnology*, 62, 342-348.
- Lin Cereghino, J. i Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Review*, 24, 45-66.
- Loewen, M. C., Liu, X., Davies, P. L. i Daugulis, A. J. (1997). Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein fermentation by *Pichia pastoris*. *Applied Microbial Biotechnology*, 48, 480-486.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. i Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *yeast*, 22, 249-270.
- Marx, H., Sauer, M., Resina, D., Vai, M., Porro, D., Valero, F., Ferrer, P. i Mattanovich, D. (2006). Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. *Fems Microbiology Letters*, 264, 40-47.

Mckenzie, H. A. (1994). The Kjeldahl Determination of Nitrogen - Retrospect and Prospect. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 13, 138-144.

Menendez, J., Valdes, I. i Cabrera, N. (2003). The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *yeast*, 20, 1097-1108.

Minning, S., Schmidt-Dannert, C. i Schmid, R. D. (1998). Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology*, 66, 147-156.

Minning, S., Serrano, A., Ferrer, P., Solà, C., Schmid, R. D. i Valero, F. (2001). Optimization of the high-level production of *Rizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 86, 59-70.

Mochizuki, S., Hamato, N., Hirose M, Miyano K, Ohtani W, Kameyama S, Kuwae S, Tokuyama T i Ohi H (2001). Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 23, 55-65.

Montesinos, J. L., Lafuente, J., Gordillo, M. A., Valero, F., Sola, C., Charbonnier, S. i Cheruy, A. (1995). Structured Modeling and State Estimation in A Fermentation Process - Lipase Production by *Candida-Rugosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 573-584.

Oliveira, R., Clemente, J. J., Cunha, A. E. i Carrondo, M. J. T. (2005). Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation. *Journal of Biotechnology*, 116, 35-50.

Oliveira, R., Ferreira, E. C., Oliveira, F. i deAzevedo, S. F. (1996). A study on the convergence of observer-based kinetics estimators in stirred tank bioreactors. *Journal of Process Control*, 6, 367-371.

Park, S. i Ramirez, W. F. (1990). Optimal Regulatory Control of Bioreactor Nutrient Concentration Incorporating System-Identification. *Chemical Engineering Science*, 45, 3467-3481.

Perrier, M., de Azevedo, F. S., Ferreira, E. C. i Dochain, D. (2000). Tuning of observer-based estimators: theory and application to the on-line estimation of kinetic parameters. *Control Engineering Practice*, 8, 377-388.

Ramon, R., Feliu, J. X., Cos, O., Montesinos, J. L., Berthet, F. X. i Valero, F. (2004). Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 26, 1447-1452.

Resina, D., Cos, O., Ferrer, P. i Valero, F. (2005). Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated *FLD1* promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 91, 760-767.

Resina, D., Serrano, A., Valero, F. i Ferrer, P. (2004). Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *Journal of Biotechnology*, 109, 103-113.

- Roux, G., Dahhou, B. i Queinnec, I. (1996). Modelling and estimation aspects of adaptive predictive control in a fermentation process. *Control Engineering Practice*, 4, 55-66.
- Royce, P. N. (1992). Effect of Changes in the Ph and Carbon-Dioxide Evolution Rate on the Measured Respiratory Quotient of Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1129-1138.
- San, K. Y. i Stephanopoulos, G. (1984). Studies on Online Bioreactor Identification .2. Numerical and Experimental Results. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1189-1197.
- Shen, S. G., Sulter, G., Jeffries, T. W. i Cregg, J. M. (1998). A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 216, 93-102.
- Sinha, J., Plantz, B. A., Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V. L., Liu, C.-P. i Meagher, M. M. (2003). Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnology Progress*, 19, 794-802.
- Snoep, J. L., Yomano, L. P., Westerhoff, H. V. i Ingram, L. O. (1995). Protein Burden in *Zymomonas-Mobilis* - Negative Flux and Growth-Control Due to Overproduction of Glycolytic-Enzymes. *Microbiology-Uk*, 141, 2329-2337.
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J.-T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A. i Birkenberger, L. A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 190, 55-62.
- Stephanopoulos, G. i San, K. Y. (1984). Studies on Online Bioreactor Identification .1. Theory. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1176-1188.
- Stratton, J., Chiruvolu, V. i Meagher, M. M. (1998). High cell-density fermentation. In: Higgins DR, Cregg JM, editors. *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press., 103, 107-120.
- Surribas, A., Cos, O., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2003). On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnology Letters*, 25, 1795-1800.
- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H. D., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D. i Tanaka, A. (1998). Extracellular production of active Rhizopus oryzae lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 164-168.
- Thorpe, E. D., d'Anjou, M. C. i Daugulis, A. J. (1999). Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 21, 669-672.
- Trinh, L. B., Phue, J. N. i Shiloah, J. (2003). Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 438-444.

Wagner, L. W., Matheson, N. H., Heisey, R. F. i Schneider, K. (1997). Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques*, 11, 791-795.

Wang, H. Y. (1979). Volume Changes During Aerobic Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 525-532.

Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V. i Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186, 37-44.

Wegner, E. H. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. Phillips Petroleum Company. 316164[US patent 4414329]. 1983. Bartlesville/ Oklahoma.

Xie, J. L., Zhou, Q. W., Pen, D., Gan, R. B. i Qin, Y. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 36, 210-216.

Yang, J., Zhou, X.-S. i Zhang, Y.-X. (2004). Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology Letters*, 26, 1013-1017.

Zhang, W., Inan, M. i Meagher, M. M. (2000a). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 275-287.

Zhang, W. H., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A. i Meagher, M. M. (2000b). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, Serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 1-8.

Zhang, W. H., Liu, C.-P., Inan, M. i Meagher, M. M. (2004). Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 330-334.

Zhang, W. H., Potter, K. J., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., Smith, L. A. i Meagher, M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 210-215.

Zhang, W. H., Sinha, J., Smith, L. A., Inan, M. i Meagher, M. M. (2005). Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. *Biotechnology Progress*, 21, 386-393.

Zhang, W. H., Smith, L. A., Plantz, B. A., Schlegel, V. L. i Meagher, M. M. (2002). Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. *Biotechnology Progress*, 18, 1392-1399.

Zhou, X.-S. i Zhang, Y.-X. (2002). Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. *Biotechnology Letters*, 24, 1449-1453.

Capítol 13. Apèndix

13.1. Nomenclatura

Taula 13.1. Nomenclatura

Abreviatures	Definició	Unitats
c	Valor de la variable manipulada.	
CTR	Velocitat de transferència de diòxid de carboni de la fase líquida cap a la fase gasosa - CO ₂ Transfer rate	mol l ⁻¹ h ⁻¹
CER	Velocitat de producció de CO ₂ – Carbon dioxide evolution rate	mol l ⁻¹ h ⁻¹
D	Velocitat de dilució	h ⁻¹
E	Potencial equació de Nerst	V
F	Cabal alimentació	l h ⁻¹
F _{ent}	Cabal d'aire d'entrada	l min ⁻¹
i	Identificador de valor a l'interior del cultiu	
k _{La}	Coefficient global de transferència d'oxigen referit a la fase líquida.	
k	Factor de conversió	
K _S	Constant de saturació de Michaelis - Menten	
K	Matriu de suport	
Kp	Guany del controlador proporcional.	
M	Concentració de metanol	g l ⁻¹
M ₀	Concentració de metanol a l'aliment	g l ⁻¹
max	Identificador de valor màxim	
m _{O/X}	Coefficient de manteniment	mol g ⁻¹ h ⁻¹
m _{CO2/X}	Coefficient de manteniment	mol g ⁻¹ h ⁻¹
O ₂	Concentració d'oxigen a la fase líquida	mol l ⁻¹
O ₂ ^{sat}	Concentració de saturació d'oxigen dissolt	mol l ⁻¹
OTR	Velocitat de transferència d'oxigen de la fase gasosa cap a la fase líquida. - Oxigen Transfer Rate	mol l ⁻¹ h ⁻¹
OUR	Velocitat de consum d'oxigen (“Oxygen uptake rate”)	mol l ⁻¹ h ⁻¹
P	Matriu de covariança	
P	Concentració de producte	UA·ml ⁻¹
Q	Matriu de suport	
q _p	Velocitat específica de producció	UA·g ⁻¹ ·h ⁻¹
q _s	Velocitat específica de consum de substrat	g g ⁻¹ ·h ⁻¹
r _M	Velocitat de consum de metanol	g l ⁻¹ ·h ⁻¹
r _p	Velocitat de producció de producte	UA l ⁻¹ ·h ⁻¹
RQ	Quocient respiratori.	
r _S	Velocitat de consum de substrat	g l ⁻¹ h ⁻¹
r _X	Velocitat de producció de biomassa	g l ⁻¹ h ⁻¹
s	Pendent equació de Nerst	
S	Concentració de substrat	g l ⁻¹
S ₀	Concentració de substrat a l'aliment	g l ⁻¹
t	Temps	h
u	Cabal addició de substrat	l h ⁻¹
V _R	Volum reactor	l
V	Volum de cultiu	l

Abreviatures	Definició	Unitats
V	Voltatge	V
w	Variable auxiliars estimador II	
X	Concentració de biomassa	g l ⁻¹
X _{ent.CO2}	Fracció molar de CO ₂ del corrent d'aire d'entrada.	
X _{sort.CO2}	Fracció molar de CO ₂ del corrent de gas de sortida.	
X _{sort.O2}	Fracció molar d'O ₂ del corrent de gas de sortida.	
X _{ent.O2}	Fracció molar d'O ₂ del corrent d'aire d'entrada.	
Y _{CO2/X}	Rendiment CO ₂ biomassa	mol g ⁻¹
Y _{X/O}	Rendiment biomassa - oxigen	g mol ⁻¹
Y _{X/P}	Rendiment biomassa - producte	g UA ⁻¹
Y _{X/S}	Rendiment biomassa - substrat	g g ⁻¹
y	vector de variables de sortida	
z	Variable auxiliars estimador I	
τ _I	Paràmetre de l'efecte integral.	
τ _D	Paràmetre de l'efecte derivatiu.	
δ	Paràmetre sintonització estimadors I i II – guany estimador	
ε	funció que descriu la dinàmica de funció acotada	
λ	Factor d'oblit	
Σ ₀	Paràmetre sintonització estimador IV	
θ	Vector de paràmetres identificats	
ψ	Vector de dades	
μ	Velocitat específica de creixement	h ⁻¹
^	Identificador de variable estimada	
·	Identificador de terme derivat respecte al temps	
0	Identificador de valor inicial	

13.2. Simbologia emprada en el diagrames de procés

La simbologia emprada en els instruments dels diagrames de procés està basada en l'estandard de la Instrumentation Society of America (ISA) on es descriuen els diferents nivells de descripció d'un instrument:

Taula 13.2 Quadre nomenclatura ISA

	PRIMER CARÀCTER		CARACTERS SUCCESIU		
	Paràmetre mesurat	Modificació	Funció passiva	Funció de sortida	Modificació
A	Anàlisi		Alarma		
B	Flama		Disponible	Disponible	Disponible
C	Conduct. elèctrica			Control	
D	Densitat	Diferencial			
E	Tensió (EMF)				
F	Cabal	Relació			
G	Dimensió		Vidre		
H	Manual				Valor alt
I	Intens. elèctrica		Indicador		
J	Potència				
K	Temps				
L	Nivell		Làmpara		Valor baix
M	Humitat				
N	Disponible		Disponible	Disponible	Disponible
O	Disponible		Orifici		
P	Pressió				
Q	Quantitat	Totalització			
R	Radiactivitat		Registref		
S	Velocitat	Seguretat		Interruptor	
T	Temperatura			Transmissor	
U	Multivariable		Multifunció	Multifunció	Multifunció
V	Viscositat			Vàlvula	
W	Pes		Vaina		
X	Variis		Variis	Variis	Variis
Y	Disponible			Relé/Convertidor	
Z	Posició			Final de Carrera	

13.3. Esquemes elèctrics del sistema de presa de mostra

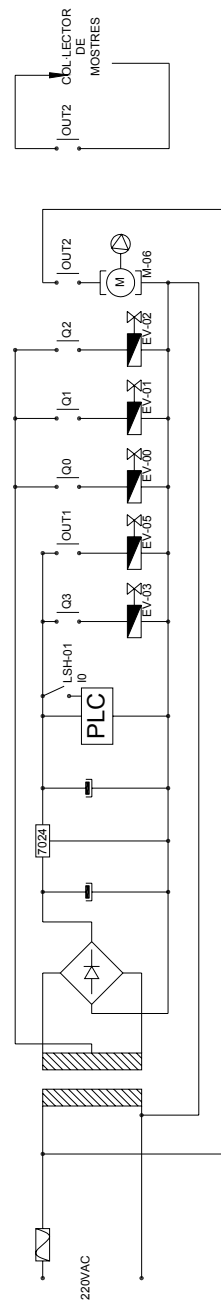


Figura 13.1. Esquema elèctric del sistema de presa de mostra.

13.4. Publicacions vinculades a aquest treball

- Ramon, R., Feliu, J. X., Cos, O., Montesinos, J. L., Berthet, F. X. i Valero, F. (2004). Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 26, 1447-1452.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2006a). A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 145-154.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J. L. i Valero, F. (2006b). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5, 1-20.
- Ramon, R., Ferrer, P. i Valero F. (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression in *Pichia pastoris* of a *Rhizopus oryzae* lipase *Journal of Biotechnology* (Acceptat)

