
3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.

3. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.

Com ja s'ha comentat en el capítol anterior, l'objectiu final que es pretén assolir en aquest treball és la millora del cultiu de cèl·lules animals en bioreactor, més concretament per a l'hibridoma KB-26.5, mitjançant l'aplicació d'una sèrie d'estratègies de cultiu que permetin aconseguir concentracions cel·lulars més altes i durades del cultiu més llargues. Una vegada estudiades les diferents estratègies per a la línia cel·lular emprada, definir quina, segons els resultats obtinguts, presenta un millor rendiment. Per tal d'arribar a assolir aquest objectiu és necessari dissenyar uns medis de cultiu i alimentació adequats per a cada estratègia, desenvolupar i implementar tot un conjunt de configuracions experimentals i de mesures en línia de l'estat del cultiu, i en funció de la informació obtinguda, realitzar, de forma automàtica i remota, les accions pertinents i necessàries per controlar l'entorn i l'estat cel·lular, i la demanda nutricional.

L'elaboració d'aquest treball es divideix en dos parts ben diferenciades: un primer bloc en què es desenvolupen i s'implementen les eines tan informàtiques com les mesures de la concentració i activitat cel·lular, i un segon bloc en què amb l'ajut d'aquestes eines i dels diferents sistemes operacionals es realitza i s'optimitza la producció per a cada estratègia de cultiu de cèl·lules animals. El pla de treball que es planteja dins de cadascuna d'aquestes dues parts és el següent:

1) Bloc de desenvolupament i implementació de tècniques:

- Estudi comparatiu de diferents mètodes de mesura, en línia i en temps real, de la concentració cel·lular. Un cop provat el comportament de varis mètodes, seleccionar-ne el més adequat per portar a terme els diferents cultius d'hibridomes. A més a més, complementar la informació sobre la densitat cel·lular del cultiu amb una mesura en línia de l'activitat cel·lular, basada en la mesura de la velocitat del consum d'oxigen, mitjançant el mètode dinàmic del balanç d'oxigen.
- Disseny i construcció d'un software flexible i robust en l'entorn de treball Windows, per poder gestionar els diversos equips, recollir i interpretar les diferents mesures implementades i, amb aquesta informació, emprendre accions de control sobre el procés de cultiu cel·lular.

2) Bloc de caracterització de les diferents estratègies de cultiu cel·lular:

- Estudi de les principals característiques d'un cultiu d'hibridomes en discontinu. Validació de les mesures en línia desenvolupades en el treball. Optimització de l'estratègia amb medis més concentrats. Evolució dels diferents paràmetres del cultiu i anàlisi del comportament cel·lular.
- Optimització i estudi de les principals característiques d'un cultiu d'hibridomes en *fed-batch*. Disseny del medi d'alimentació i aplicació de les diferents configuracions de control. Anàlisi del comportament cel·lular i determinació del factor limitant del creixement cel·lular.
- Posta a punt d'un bioreactor de tanc agitat per tal de realitzar l'estratègia en continu amb perfusió. Sistema d'aeració, sistema de retenció cel·lular, equipament en general i esquema de control de l'entorn cel·lular.
- Estudi i caracterització de cultius en perfusió d'hibridomes. Evolució dels diferents paràmetres del cultiu, establiment de les millors condicions de cultiu i determinació de noves vies de recerca per a la seva optimització. Comparació amb les altres estratègies de cultiu estudiades.

4. DESENVOLUPAMENT I IMPLEMENTACIÓ DE MESURES EN LÍNIA.

4. DESENVOLUPAMENT I IMPLEMENTACIÓ DE MESURES EN LÍNIA.

4.1. LA MESURA EN ELS CULTIUS CEL·LULARS.

La mesura és fonamental en totes les disciplines científiques i tècniques. Normalment, es mostra a fi d'informar sobre l'estat actual de l'objecte investigat i pot ser utilitzada per al control manual o automàtic del procés en curs. El desenvolupament dels processos de fermentació i cultiu cel·lular ha posat de manifest la necessitat de mesurar, el més acuradament possible, els paràmetres bioquímics i fisiològics que determinen el seu comportament. En Biotecnologia, en el desenvolupament d'instrumentació en línia es poden distingir tota una sèrie de variables ja consolidades, normalment de tipus fisicoquímic, com el pH, la temperatura, l'oxigen dissolt, el potencial redox, i una sèrie de variables que, bé a causa de que no són d'un interès general o són intrínsecament complicades, encara no es disposen de sistemes de mesura prou robusts i universalment emprats. Aquest segon tipus de mesures són especialment interessants, ja que han de poder subministrar informació més valuosa sobre l'estat del cultiu, que pugui facilitar el desenvolupament d'estratègies de control. Cal remarcar que una de les causes que sovint fa que algunes d'aquestes mesures no estiguin ben desenvolupades, en el cas dels cultius cel·lulars, és l'escàs marge de variació que es produeix en algunes de les magnituds mesurables, degut als aspectes generals del cultiu ja discutits anteriorment (baixa velocitat de creixement, baixa concentració cel·lular, etc.).

En el decurs dels últims anys s'han proposat varis mètodes per l'estimació en línia d'algunes de les variables més importants dels cultius de cèl·lules animals. Alguns d'aquests inclouen el monitoratge dels substrats com la glucosa (Graf i Schügerl, 1991; Kurokawa i col., 1994, Wang i col., 1995, Ozturk i col., 1997a) i la glutamina (Kurokawa i col., 1994; Campmajó i col., 1994; Wang i col., 1995), o bé subproductes del cultiu com el lactat (Kurokawa i col., 1994; Wang i col., 1995; Ozturk i col., 1997a) i l'amoní (Graf i Schügerl, 1991; Campmajó i col., 1994; Jorgensen i col., 1997), així com la producció d'anticossos monoclonals (Schulze i col., 1994; Reinecke i Scheper, 1997; Ozturk i col., 1997b) mitjançant tècniques cromatogràfiques per HPLC o d'anàlisi FIA. També s'han monitorat variables que aporten informació sobre l'activitat cel·lular i l'estat fisiològic, com ho són entre d'altres, la velocitat de consum d'oxigen (OUR) per l'espectrometria de masses (Behrendt i col., 1994) o pel mètode que realitza mesures d'oxigen dissolt en dos punts (Yoon i Konstantinov, 1994), el potencial redox (Eyer i Heinzle, 1996; Higareda i col., 1997), o la velocitat de flux de calor amb un microcalorímetre *ex situ* (Guan i col., 1998).

4.2. LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ CEL·LULAR.

La mesura i seguiment de la concentració cel·lular en un bioreactor és d'un interès evident i, no obstant, tot i que s'han desenvolupat tota una sèrie de tècniques, encara no es disposa d'un sistema universalment acceptat, i que, sobretot, permeti mesurar tant la concentració com la viabilitat de les cèl·lules. La concentració cel·lular és una mesura de la quantitat disponible de biocatalitzador, essent una variable clau ja que permet determinar, entre d'altres paràmetres, la velocitat de creixement i/o la producció específica de productes i la utilització de substrat, que seran molt útils en el disseny d'estratègies eficients de control. Aquests paràmetres subministren una idea més profunda de l'estat fisiològic de la població cel·lular, i ajuden a detectar transicions fisiològiques fonamentals. Qualsevol intent d'avançar en el control en línia dels bioreactors passa per mesurar en línia la densitat cel·lular. Així, no és estrany que aquest paràmetre es consideri com el més important a monitorar en aquests tipus de processos. En aquells sistemes de cultiu on es requereixi unes condicions d'operació estables (per exemple assegurar un subministrament de nutrients constant dins del bioreactor), la informació en línia sobre la concentració cel·lular es fa necessària per al control del cultiu. Per tant, la disponibilitat d'aquesta variable en temps real permetrà el reemplaçament dels senzills règims d'addició en anell obert per algoritmes més fiables d'anell tancat.

Un estudi dels treballs publicats revela una gran diversitat de mètodes i d'instruments, actualment en ús, per monitorar la concentració cel·lular dels cultius de cèl·lules animals (Konstantinov i col., 1994b). Aquesta diversitat és el resultat de varis factors, incloent-hi les diferències del tipus de bioreactor utilitzat i les característiques de la línia cel·lular. Un resum dels avantatges i desavantatges d'alguns dels treballs publicats enfocats a la determinació en línia de la concentració de cèl·lules animals es recullen a la Taula 4.1. En aquesta taula s'observen dues categories de mètodes de mesura: els directes i els indirectes. Els mètodes directes engloben un conjunt de tècniques que mesuren directament propietats físiques de la cèl·lula i dels seus components, en canvi els mètodes indirectes consisteixen en tècniques que mesuren paràmetres relacionats amb l'activitat cel·lular. Segons el grau d'automatització de la mesura es pot parlar de mesures fora de línia (obtenció de la mesura mitjançant un tractament posterior de la mostra) i en línia (obtenció de la mesura en el mateix moment que té lloc, és a dir, a temps real). A més a més, aquest grup pot ser dividit en tècniques que utilitzen sensors *in situ* (directament instal·lats dins del bioreactor) i en sistemes semicontinus i de flux que tenen sensors *ex situ* (localitzats fora del bioreactor). Les mesures de concentració cel·lular obtingudes fora de línia, per exemple el mètode del recompte cel·lular que es descriu a l'apartat 8.9.1, s'utilitzen com a mètode de referència per poder contrastar amb les diferents tècniques que mesuren concentració cel·lular.

Mètodes Directes			
Mètode	Avantatges	Desavantatges	Referències
Densitometria de ressonància acústica (ARD)	Estabilitat elevada No té problemes d'obturacions	Relativament complicat Requereix un sistema de filtratge Baixa sensibilitat Afectat per l'estat fisiològic cel·lular	Kilburn i col., 1989.
Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)	Pot mesurar a densitats cel·lulars molt altes Respon a la concentració de cèl·lules viables Insensible a canvis fisiològics	Complicat Instrumentació molt cara Sensibilitat baixa	Mancuso i col., 1990.
Mètode electroquímic	Relativament simple Esterilitzable Connexió dins el sistema	Heurístic, sense un coneixement teòric gaire clar Possible dependència de l'estat fisiològic cel·lular	Karube i Sode, 1991.
Conductivitat	Equipament senzill Pot mesurar a densitats cel·lulars molt altes	Sensibilitat baixa Gran error en la mesura Resultats poden dependre de l'estat fisiològic cel·lular	Blute i col., 1988.
Capacitat	Sonda esterilitzable senzilla Respon a la concentració de viables Sensors comercials disponibles Bons resultats amb cultius microbians	Pertorbat per conductivitats del medi altes No treballa bé a densitats cel·lulars baixes Baix rendiment en bioreactors amb cèl·lules animals	Konstantinov i col., 1992; Guan i col., 1998.
Fluorometria	Sonda esterilitzable Bona sensibilitat a baixes concentracions Sensors comercials disponibles Possible correlació amb la concentració de viables	Afectat per múltiples factors Interpretació del senyal difícil Correlació amb la densitat cel·lular poc fiable Sensibilitat baixa a altes densitats cel·lulars Resposta dependent de l'estat fisiològic cel·lular	MacMichael i col., 1987; Siano i Mutharasan, 1991.
Absorbància i/o dispersió	Sonda esterilitzable Disseny robust Bona sensibilitat en un rang ampli Considerable experiència en cultius microbians	Pertorbat per l'embrutiment de la superfície òptica Afectat per l'estat fisiològic cel·lular Interferències per bombolles d'aire	Konstantinov i col., 1992; Wu i col., 1995.
Microscòpia <i>in situ</i>	Conceptualment nova tecnologia, capaç de donar més informació que els altres mètodes	Sistemes comercials encara no disponibles Necessita més recerca i desenvolupament Pot arribar a ser bastant car	Maruhashi i col., 1994; Bittner i col., 1998.
Mètodes Indirectes			
Estimació basada en la velocitat de consum d'oxigen (OUR)	Concepte senzill Relativament fàcil d'implementar	Validesa limitada Suposa que la velocitat específica de consum d'oxigen (SOUR) és constant	Ozturk i col., 1997b
Estimació basada en velocitat d'evolució de CO ₂ (CER)	Concepte senzill	CER és més difícil de estimar Requereix espectròmetre de masses L'estimació suposa grans errors	De Tremblay i col., 1993.
Estimació basada en velocitat de producció d'ATP (APR)	Concepte que ha de ser més acurat que l'estimació basada en la OUR	La suposició que la APR és constant pot no ser vàlida Requereix estimació de la OUR i el LPR	Eyer i Heinzel, 1996; Dorresteyn i col., 1996.

Taula 4.1. Mètodes descrits per monitorar en temps real la concentració de cèl·lules animals.

Els sensors que mesuren la concentració cel·lular en línia i *in situ* han d'acomplir una sèrie de requeriments generals que en limiten el seu desenvolupament. Aquests són (Olsson i Nielsen, 1997):

- **Fiabilitat:** Amb especial èmfasi per l'estabilitat i l'esterilitat en períodes llargs d'operació (de fins a 20 dies) en ambient de planta pilot.
- **Calibratge:** La resposta hauria de ser lineal amb la concentració cel·lular en un extens rang dinàmic, posseir alta resolució a concentracions crítiques, tenir una corba de calibratge senzilla i permetre la possibilitat de calibratge en línia.
- **Interferències:** La mesura no hauria de presentar interferències degudes a sòlids no biològics i a cèl·lules no viables, baixa sensibilitat a canvis en les condicions d'operació (agitació, aeració, concentració d'oxigen dissolt, pH i temperatura), absència d'interferència amb la llum ambient i baixa sensibilitat a canvis en la composició del medi.
- **Disseny:** Amb especial èmfasi a l'esterilització *in situ* i també a la neteja, la capacitat d'inserir el sensor a través d'una connexió estàndard disposant d'una posició en el bioreactor en una zona de bona mescla, un senyal elèctric estable, i tenir un disseny similar per utilitzar-se en diferents aplicacions (bacteris, llevats, fongs i cèl·lules animals).

No obstant, tot i la disponibilitat d'un gran nombre de tècniques experimentals per mesurar la concentració cel·lular, no hi ha un mètode que sigui aplicable de forma generalitzada per monitorar la concentració de cèl·lules en línia en qualsevol entorn de procés i que compleixi amb tots els requeriments acabats d'assenyalar. Generalment, són preferibles els sensors especialitzats basats en el monitoratge directe als d'estimació indirecta. Aquests últims mètodes depenen d'un nombre de suposicions que no sempre s'acompleixen, però també s'ha de considerar que poden ser útils quan no existeixen alternatives. La combinació d'utilitzar mètodes directes i indirectes pot incrementar la informació que s'obté sobre les cèl·lules, per exemple, permeten obtenir mesures de concentració i d'activitat cel·lular. La Taula 4.1 mostra com tots els mètodes de monitoratge tenen associats alguna limitació. Per tant, en cada aplicació cal fer una tasca prèvia de selecció per tal d'identificar l'instrument o tècnica més adient.

Entre les diferents possibilitats que es desprenen de l'estudi realitzat sobre diferents tècniques de mesura de la concentració cel·lular, en el present treball es va optar per estudiar dues alternatives diferents, i aplicar-les a la mesura de cèl·lules d'hibridoma. La primera de les alternatives és l'aplicació de mesures d'espectroscòpia d'impedància. Aquesta tècnica té

l'avantatge que permet mesurar directament cèl·lules viables, que en principi són l'objectiu principal de la mesura, donat que són les cèl·lules que estan actives i, per tant, produeixen la proteïna d'interès. En canvi, té l'inconvenient de ser una tècnica poc desenvolupada. La col·laboració existent entre el grup de recerca en què s'ha efectuat aquest treball i el grup de recerca del Departament d'Enginyeria Electrònica de la Universitat Politècnica de Catalunya ha permès explorar la possibilitat d'aplicació d'aquesta tècnica de mesura directa de la concentració de cèl·lules viables. La segona alternativa que s'ha provat en aquest treball és la utilització d'una mesura òptica, basada en la dispersió de la llum. En aquest cas es tracta d'un sistema més desenvolupat, disponible comercialment, que per altra banda només permet la mesura de les cèl·lules totals. Per tant, a mesura que el cultiu vagi perdent viabilitat, aquesta mesura serà menys representativa de la concentració de cèl·lules actives al reactor.

Idealment seria molt interessant poder aplicar les dues mesures, ja que d'aquesta manera es podria tenir informació en línia de la concentració de cèl·lules totals i viables i, per tant, es podria saber l'evolució de la viabilitat del cultiu, paràmetre de gran interès. Per aquesta raó es considera necessari l'estudi de les dues tècniques seleccionades, assenyalant també que, com es veurà en un apartat posterior, aquestes mesures encara poden ser complementades amb alguna mesura de l'activitat de les cèl·lules, per tal d'obtenir una informació el més exhaustiva possible sobre l'evolució del cultiu.

4.3. ESPECTROSCÒPIA D'IMPEDÀNCIA.

L'anàlisi dielèctric de suspensions cel·lulars és una tècnica atractiva a fi d'estimar la concentració cel·lular ja que és un sistema de monitoratge automatitzat en temps real i aplicable a medis complexos (Kell i col., 1990). Les propietats elèctriques de les suspensions cel·lulars en el rang de la radiofreqüència són una funció directa i monòtona del radi i la fracció de volum de les partícules que constitueixen la fase en suspensió (Harris i col., 1987). Els mètodes basats en les mesures elèctriques utilitzen la dependència de les variables macroscòpiques d'un material com la conductància (G) i la capacitat (C) o les propietats elèctriques intrínseques com la conductivitat (σ) i la permitivitat (ϵ), amb la fracció de volum cel·lular (P) a un o dos punts de freqüència. Alguns dels resultats publicats obtinguts amb diferents tipus de cèl·lules han demostrat una relació estreta entre les propietats dielèctriques de suspensions cel·lulars, com la capacitat i la concentració de biomassa (Mishima i col., 1991a; Markx i col., 1991; Fehrenbach i col., 1992; Davey i col., 1992; Matanguihan i col., 1994). Aquest mètode dona un senyal que és lineal fins a alts nivells de concentració cel·lular (Harris i Kell, 1983) i subministra informació sistemàtica sobre l'estat de les cèl·lules en cultius de llevats (Asami i Yonezawa, 1995). Altres autors (Mishima i col., 1991b; Austin i col., 1994) han demostrat una relació entre la capacitat i els canvis en la fase de creixement

estacionària i la viabilitat cel·lular, no ha estat possible, però, fer una descripció completament quantitativa d'aquest fenomen. Malgrat els canvis en les propietats dielèctriques de les cèl·lules, s'ha evidenciat la potencialitat de l'ús de la espectroscòpia dielèctrica com una eina per detectar canvis en l'estat fisiològic de les cèl·lules (Matanguihan i col., 1994).

La dependència de la ϵ amb la fracció de volum cel·lular, o biovolum, (P), (essent P el quocient entre el volum encerclat per les membranes cel·lulars i el volum total de la suspensió cel·lular), és descrita pel model de Maxwell (Foster i Schwan, 1989). A la pràctica, les mesures de permitivitat dielèctrica es determinen a partir de la C , a través d'un factor geomètric anomenat constant de cel·la. No obstant, ni la ϵ ni la C es poden mesurar directament. Aquests són determinats a partir de càlculs posteriors de mesures de voltatge i corrent, assumint un model elèctric per a la suspensió que menysprea la conducció iònica a través del medi. Aquest mecanisme de conducció esdevé una interferència en les mesures pràctiques. En aquest treball, l'aproximació que es fa a aquest tipus de mesures es basa en utilitzar la mesura directa de les propietats passives d'una regió de la suspensió cel·lular, incloent tots els mecanismes de conducció. Després d'això, es defineix un estimador relatiu (*ratimetric*) per a la concentració de biomassa que evita les imprecisions en la determinació de la constant de cel·la. La linealitat de l'estimador sota certes condicions es dedueix a partir de models ben establerts de la suspensió, i es valida mitjançant resultats experimentals.

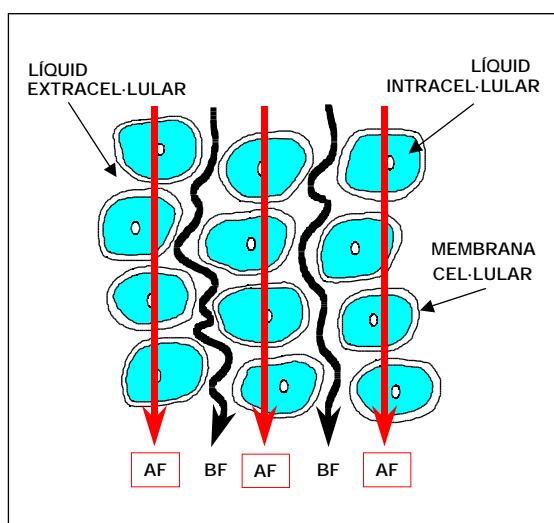


Figura 4.1. Flux de corrent a través dels medis intra i extracel·lular d'una suspensió cel·lular, a diferents freqüències del camp elèctric aplicat.

La mesura més directa que es pot calcular a partir de mesures de voltatge (V) i d'intensitat (I) és la impedància elèctrica (Z), essent aquesta la relació entre V i I . A baixes freqüències (BF) la impedància d'una suspensió cel·lular és màxima, ja que les membranes cel·lulars aïllen l'espai intracel·lular, degut a la polarització de la membrana cel·lular,

disminuint així el volum conductor (Figura 4.1). A altes freqüències (AF), el corrent de desplaçament a través de les membranes esdevé molt més alt, aleshores les membranes no aïllen l'espai intracel·lular, degut a la baixa polarització, i la impedància de la suspensió baixa fins al seu valor mínim.

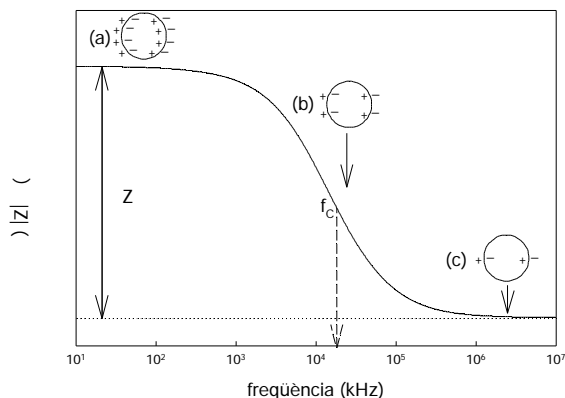


Figura 4.2. Variació de la impedància amb la freqüència en una suspensió cel·lular.

A la Figura 4.2 es mostra la polarització típica a través d'una cèl·lula quan s'augmenta la freqüència. A la freqüència (a) de la Figura 4.2, la freqüència de camp és baixa i molts ions tenen temps d'assolir les membranes citoplasmàtiques i polaritzar-les abans que el camp canviï de direcció i mogui els ions en la direcció oposada. Així, la impedància de la suspensió cel·lular és alta. A freqüències altes (b) hi ha menys ions que tinguin temps d'assolir la membrana, per tant l'abast de la polarització de la membrana és menor i la impedància de la suspensió és també més baixa. A freqüències molt altes (c) molts pocs ions tenen temps de desplaçar-se i polaritzar les membranes abans que el camp canviï de direcció, per tant la polarització de membrana és molt petita. En aquestes freqüències la contribució de les cèl·lules a la impedància de la suspensió és molt petita i realment es mesura la impedància de fons del medi (principalment deguda a la conducció iònica de les sals dissoltes). Aquesta caiguda de la impedància en forma d'esglaó, típica dels cultius cel·lulars, coneguda també com la relaxació d'impedància, quan es produeix en el rang de freqüències de 100 kHz fins a 100 MHz, s'anomena dispersió, i aquesta relaxació es deu, principalment, a la pèrdua de polarització de la membrana per l'increment de la freqüència. Aquest comportament pot ser caracteritzat amb tres paràmetres: els valors d'impedància a baixa freqüència (R_0) i alta freqüència (R_∞), i la freqüència central de relaxació (f_c) (Figura 4.2). La freqüència central de relaxació f_c està relacionada amb la mida de la cèl·lula; les cèl·lules més petites tenen la f_c més alta. Els valors d'impedància a freqüències molt més baixes o molt més altes que f_c es relacionen amb la conductivitat de l'entorn intra i extracel·lular, i la proporció entre els volums intra i extracel·lular. Aquest comportament es pot modelar (Eq. 4.1) adaptant el model de Cole-Cole per a la permitivitat complexa dels materials dielèctrics al de la impedància

elèctrica de les suspensions cel·lulars (Cole i Cole, 1941). El paràmetre α descriu la dispersió de les mides i formes de la cèl·lula, essent zero per a cèl·lules esfèriques d'igual mida.

$$Z(f) = R + \frac{R_0 - R}{1 + j \frac{f}{f_c}}^{1-\alpha} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

El comportament de la impedància elèctrica amb la freqüència i la fracció de volum cel·lular es pot deduir utilitzant l'àmpliament acceptat model de Maxwell per a suspensions cel·lulars i considerant la dependència dels paràmetres del model de Cole-Cole amb la fracció de volum cel·lular (Foster i Schwan, 1989). La seva representació gràfica per valors de paràmetres usuals es mostra a la Figura 4.3. Es pot observar com concentracions de biomassa altes donen relaxacions més profundes. Aparentment, una simple mesura realitzada a baixa freqüència pot subministrar una bona estimació del biovolum. No obstant, aquest valor està fortament influenciat als canvis de conductivitat deguts a les variacions de temperatura o de concentracions d'ions. Degut a això, els estimadors basats en les variacions relatives de la impedància resultaran molt més robusts, i de fet hi ha molt interès en el seu desenvolupament.

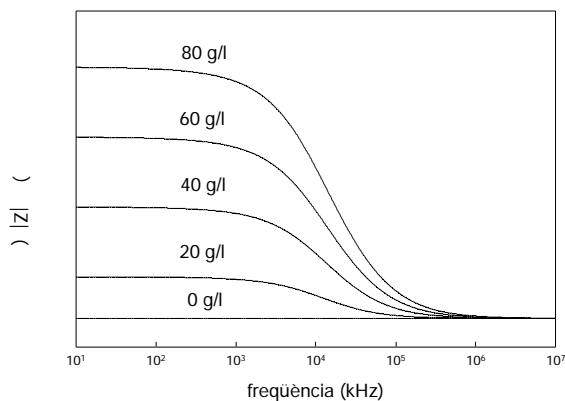


Figura 4.3. Efecte de l'augment de concentració de biomassa (g/l) d'una suspensió cel·lular en la dispersió.

L'estimador de la densitat de biomassa que s'aplica en aquest treball i al qual s'anomena E_2 , es defineix com la variació relativa entre la magnitud dels valors d'impedància a baixa freqüència $Z(BF)$ i a alta freqüència $Z(AF)$, respecte al valor de $Z(BF)$ (Eq. 4.2).

$$E_2 = 100 \left(1 - \frac{|Z(AF)|}{|Z(BF)|} \right) \quad (\text{Eq. 4.2})$$

on

E_2 : estimador de biomassa, en %.

$|Z(BF)|$: magnitud de la impedància a la freqüència $f \ll f_c$, en Ω .

$|Z(AF)|$: magnitud de la impedància a la freqüència $f \gg f_c$, en Ω .

L'estimador de biomassa, E_2 , és una funció de la mida cel·lular (r_c), de la capacitat específica de la membrana (C_m), de la fracció de volum total ocupada per les cèl·lules (P) i les conductivitats intra i extracel·lular (σ_i i σ_e). Suposant $P < 0.2$ i que les conductivitats intra i extracel·lular són similars, es pot demostrar que E_2 varia linealment amb P i que no depèn dels altres paràmetres (Bragós, 1997). A la pràctica, tant la r_c , la C_m i la σ_i són constants per a un determinat microorganisme, però la σ_e pot presentar variacions. En aquest cas, el E_2 mostra un canvi de sensibilitat, predita pel model, i que si és necessari es pot corregir amb una mesura addicional de la conductivitat del medi.

La validesa del mètode de mesura d'impedàncies en suspensions cel·lulars s'ha comprovat en un sistema de mesura estàtic, anomenat així perquè les diferents suspensions cel·lulars utilitzades per validar el mètode es troben en condicions de no proliferació i perquè les mesures es realitzen fora de línia. Per realitzar la validació del mètode s'ha utilitzat la cubeta estàtica que es descriu al capítol de *Materials i Mètodes*. Primer de tot, se selecciona el rang de freqüències en què s'aplica l'estimador E_2 . En segon lloc, es realitza un estudi preliminar del seu comportament front a canvis en variables com la temperatura, la conductivitat i el nivell de líquid a la cubeta. Una vegada caracteritzada la cubeta s'efectuen les mesures d'impedància per a les diferents suspensions cel·lulars.

4.3.1. Elecció del rang de freqüències.

L'analitzador d'impedàncies comercial HP4192A (descriu a l'apartat 8.10.1.1) pot treballar en el rang de freqüències que va des de 5 Hz fins a 13 MHz (l'error s'incrementa notablement per sobre de 10 MHz). Per tant, degut a aquestes limitacions s'ha escollit com a baixa freqüència 10 kHz i com a alta 10 MHz, obtenint-se el següent estimador de biomassa, E_2 (Eq. 4.3):

$$E_2 = 100 \left(1 - \frac{|Z(10MHz)|}{|Z(10kHz)|} \right) \quad (\text{Eq. 4.3})$$

El valor de l'estimador E_2 (%) es pot relacionar amb altres mètodes de determinació de la concentració cel·lular, com el pes sec i/o el recompte cel·lular.

4.3.2. Estudis preliminars.

Per tal de definir les condicions de mesura a la cubeta estàtica, es va determinar la influència de variacions de temperatura, conductivitat i alçada de nivell de líquid arribant-se als següents resultats:

- Un augment de la temperatura (T) de la solució salina provoca una disminució del valor de la impedància. Aquest fet és a causa de que quan en una solució la T augmenta els ions tenen més mobilitat, facilitant el pas del corrent i, per tant, disminuint el valor de la impedància. Per tant, la variació de la temperatura influeix de manera molt notable a la mesura de forma que és necessari mantenir-la constant. En les mesures es treballarà a 26 °C permetent una variació de ± 0.1 °C.
- Un augment de la conductivitat en el medi produeix una disminució del mòdul de la impedància degut a l'increment d'ions. Aleshores, les variacions en la conductivitat del medi també afecten molt la mesura. Per tal de mantenir la conductivitat del medi en què s'efectuen les mesures, es prepararà un volum suficient de medi (NaCl 0.9%) per portar a terme totes les dilucions corresponents a un mateix experiment.
- Cal mantenir el nivell de líquid per sobre de 40 mm, ja que treballar per sota d'aquest nivell pot afectar a la mesura degut a la densitat de les línies de corrent elèctric, que són grans en les proximitats als elèctrodes. En les mesures successives es treballarà a 45 mm d'alçada de nivell de líquid (equivalent a 40 ml de solució).

Tots aquests aspectes es tenen en compte en els experiments que es descriuen tot seguit, per tal d'assegurar que els resultats obtinguts són deguts als factors estudiats, i no a variacions de la T, la conductivitat o l'alçada de nivell de líquid.

4.3.3. Validació del mètode de mesura.

Per validar aquest mètode de mesura s'han utilitzat suspensions cel·lulars de diverses línies cel·lulars, dos llevats, *Candida rugosa* i *Saccharomyces cerevisiae*, dos bacteris, *Escherichia coli* i *Rhodobacter capsulata*, a més de les cèl·lules d'hibridoma. S'ha fet d'aquesta manera per tal de poder obtenir una millor caracterització d'aquesta nova tècnica, i veure quina influència podien presentar la naturalesa i grandària de les cèl·lules en les mesures obtingudes. El rang de concentracions cel·lulars utilitzat per a cada soca pot considerar-se com els valors típics assolibles en un cultiu normal en bioreactor. Els experiments s'han realitzat en condicions estàtiques on la fisiologia de la cèl·lula (r_c , C_m , μ) i les condicions de l'ambient (temperatura i alçada de nivell de líquid) i del medi (μ_a) han estat

uniformes. Si la r_c , la C_m , la ρ_i i la ρ_a són constants, l'estimador E_2 és funció de la fracció del volum total ocupada per les cèl·lules, P , i per tant és una mesura de la seva concentració. A la Figura 4.4 es mostra la dependència del mòdul de la impedància amb la freqüència en el rang de 10 kHz fins a 10 MHz per al llevat *S.cerevisiae* i a diferents concentracions de cèl·lules. Les diferents corbes de relaxació estan en el rang de la dispersió i mostren una clara dependència amb la concentració cel·lular. Les relaxacions no són completes ja que el valor d'alta freqüència (10 MHz) en què s'han realitzat les mesures està al voltant de les respectives freqüències centrals f_c . Concretament en els llevats la f_c és inferior a 10 MHz i en els bacteris el valor de la f_c és superior. Aquesta limitació és deguda a l'equip de mesura.

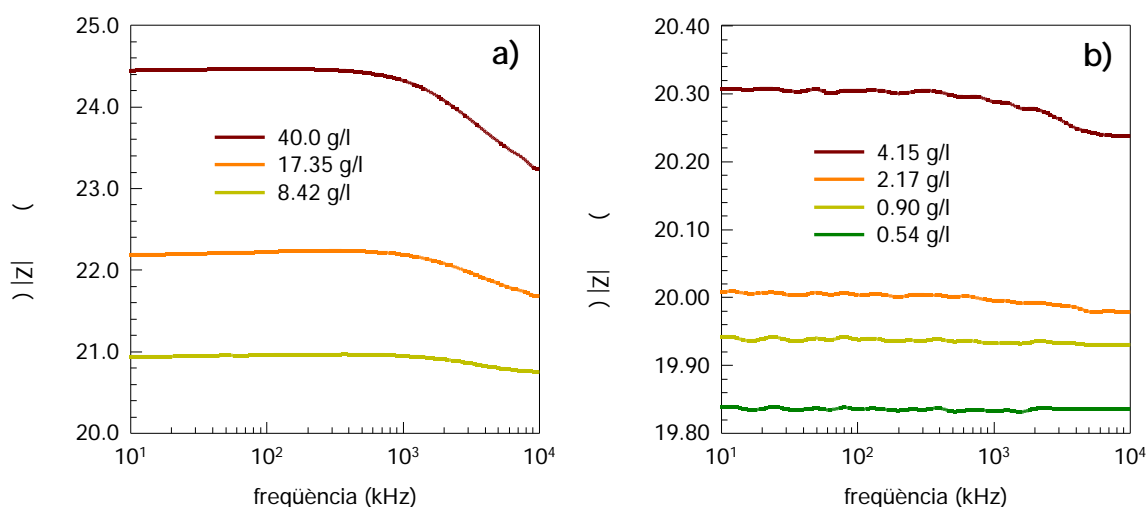


Figura 4.4. Valor del mòdul de la impedància en el rang de la radiofreqüència per a diferents concentracions de *S.cerevisiae* : a) des de 40.0 g/l fins a 8.42 g/l. b) des de 4.15 g/l fins a 0.54 g/l.

A partir dels valors del mòdul de la impedància a 10 kHz i 10 MHz s'ha procedit al càlcul de l'estimador E_2 per a cada suspensió cel·lular. A la Figura 4.5 es mostren els valors obtinguts i s'observa una linealitat excel·lent (coeficients de correlació a la Taula 4.2) entre E_2 (%) i la concentració cel·lular (g/l) pels diferents tipus de cèl·lules utilitzades.

Microorganisme	Diàmetre (μm)	Mínim de detecció (g/l)	$Q_{X,E_2} \cdot 10^2$ ($\% \cdot \text{l} \cdot \text{g}^{-1}$)	Coefficient de Regressió
<i>R.capsulata</i>	0.5 - 1.2	1.8	6	0.995
<i>E.coli</i>	1.5 - 2.7 ^a	1.5	7	0.998
<i>S.cerevisiae</i>	3.5 - 4.5	0.6	13	0.997
<i>C.rugosa</i>	5.0 - 6.0	0.3	25	0.999

Taula 4.2. Resum de les dades obtingudes per a les diferents línies cel·lulars. (^a) Diàmetre de l'esfera equivalent d'igual volum a la forma cilíndrica d'*E.coli*.

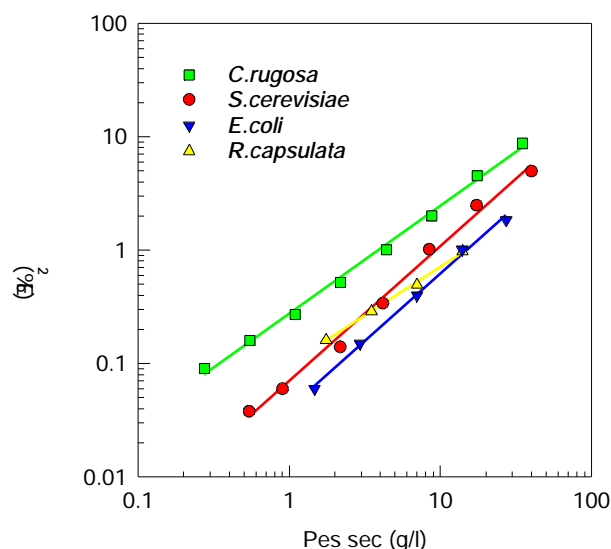


Figura 4.5. Correlació en escala logarítmica entre l'estimador de biomassa, E_2 , i la concentració de biomassa per pes sec de diferents línies cel·lulars.

També s'ha obtingut una correlació quantitativa entre l'estimador de biomassa i la concentració cel·lular. El pendent de la recta que relaciona E_2 amb la concentració de cèl·lules s'ha definit com l'estimador cel·lular específic (Q_{X,E_2}). A la Taula 4.2 es presenta el valor d'aquest coeficient, Q_{X,E_2} , per a cada microorganisme. En els llevats aquest coeficient és superior que en els bacteris. Es pot observar un increment del Q_{X,E_2} des de *R.capsulata* fins a *C.rugosa*. Aquesta tendència indica que el valor del Q_{X,E_2} depèn de l'organisme a mesurar i, intuïtivament, es podria correlacionar directament amb l'increment de la mida cel·lular des de *R.capsulata* fins a *C.rugosa*. També es poden trobar a la Taula 4.2 els valors de concentració de biomassa mínims que es poden detectar amb el mètode d'impedància en les condicions del medi per a cada microorganisme.

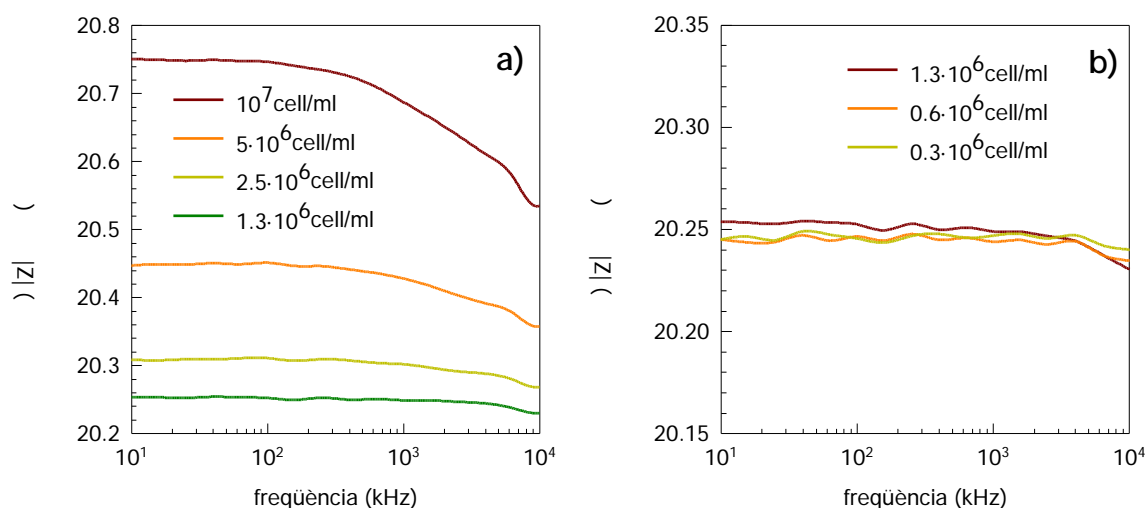


Figura 4.6. Valor del mòdul de la impedància en el rang de la radiofreqüència per a diferents concentracions d'hibridoma KB-26.5: a) des de 10^7 cèl·lules/ml fins a $1.3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. b) des de $1.3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml fins a $0.3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml.

A la Figura 4.6 es mostra la dependència del mòdul de la impedància amb la freqüència en el rang de 10 kHz fins a 10 MHz per a les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5 i a diferents concentracions cel·lulars. Les diferents corbes de relaxació mostren dependència amb la concentració cel·lular fins que les últimes corbes se sobreposen (Figura 4.6b) donant així el mètode un mínim de detecció al voltant de $1.3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml (l'equivalent en pes sec, 0.5 g/l). Amb l'avaluació quantitativa de les diferents relaxacions a partir dels valors del mòdul de la impedància a 10 kHz i 10 MHz s'han obtingut els valors de l'estimador E_2 per a la suspensió cel·lular d'hibridomes.

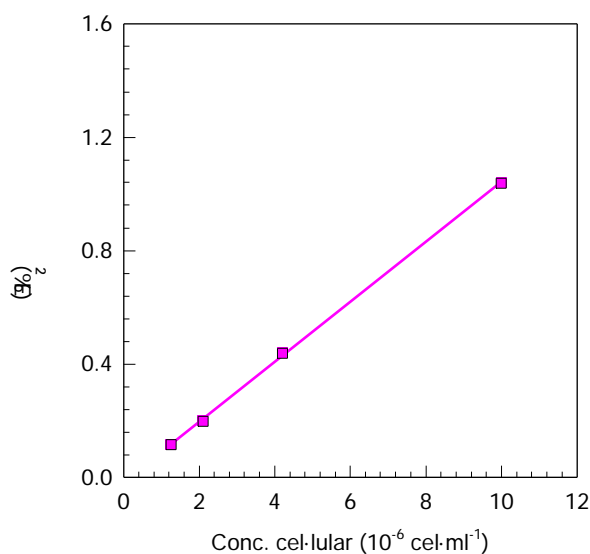


Figura 4.7. Correlació entre l'estimador de biomassa, E_2 , i la concentració cel·lular per recompte cel·lular de l'hibridoma KB-26.5. La línia contínua representa els valors de la regressió.

A la Figura 4.7 s'observa una bona linealitat ($r = 0.999$) entre E_2 (%) i la concentració cel·lular (10^6 cèl·lules/ml) per a la cèl·lula utilitzada. El valor del pendent és de 0.105 $\% \cdot \text{ml} \cdot 10^{-6}$ cèl·lules, si se l'hi aplica el valor que relaciona el nombre de cèl·lules totals amb la mesura de pes sec (0.36 $\text{mg}/10^6$ cèl·lules) es pot convertir aquest pendent a les mateixes unitats del Q_{X,E_2} , prenent un valor de 0.30 en $\% \cdot \text{l} \cdot \text{g}^{-1}$. Si aquest valor es representa front el seu diàmetre cel·lular mitjà, juntament amb els valors de la Taula 4.2 s'obté la gràfica de la Figura 4.8. En aquesta figura es presenta la relació entre el Q_{X,E_2} i el diàmetre cel·lular mitjà, que com es pot veure és de tipus no lineal. De la figura, bàsicament es pot interpretar que el mètode de mesura és més sensible quan la mida de les cèl·lules és més gran, i per tant hi ha més volum intracel·lular. D'altra banda, si es compara els mínims de detecció de la Taula 4.2 i l'obtingut en la suspensió d'hibridomes, es pot dir que a més diàmetre cel·lular el mínim de detecció de la concentració cel·lular serà inferior. En qualsevol cas, no es pot pensar en plantejar una expressió que relacioni únicament el Q_{X,E_2} i el diàmetre cel·lular, ja que les capacitats específiques de membrana, les conductivitats intracel·lulars, la forma i la distribució cel·lular

de mides no són iguals pels diferents tipus de cèl·lules, i aquests factors (i no solament la mida) intervenen en la resposta de les cèl·lules al corrent elèctric.

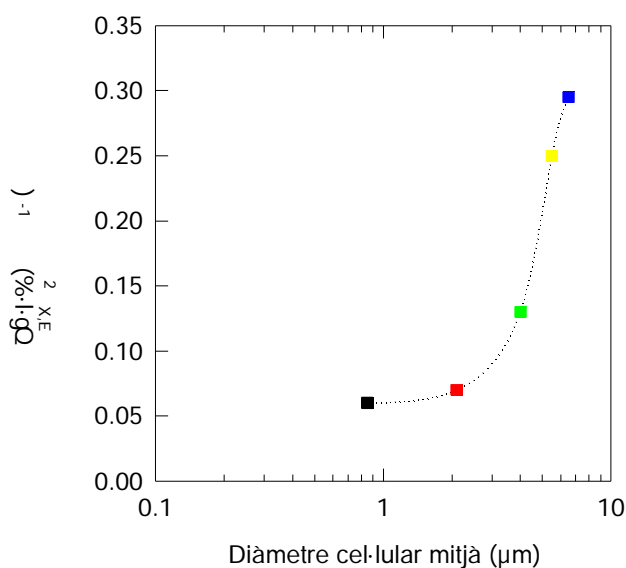


Figura 4.8. Representació del valor de l'estimador cel·lular específic, Q_{X,E_2} , vers el diàmetre cel·lular mitjà de l'hibridoma KB-26.5 (blau), *C. rugosa* (groc), *S. cerevisiae* (verd), *E. coli* (vermell) i *R. capsulata* (negre).

Com a resum d'aquest apartat es pot dir que els resultats obtinguts indiquen que es pot obtenir, a partir de mesures d'impedància elèctrica, un excel·lent i robust estimador de la concentració cel·lular essent lineal fins a densitats cel·lulars molt altes. D'altra banda, els llevats i les cèl·lules animals proporcionen una resposta al mètode (Q_{X,E_2}) superior a la dels bacteris, degut a la seva major grandària, així com concentracions mínimes de pes sec detectables inferiors a les dels bacteris.

4.4. MÈTODES ÒPTICS.

Les tècniques òptiques per monitorar la concentració cel·lular són, potser, les més emprades en aquests moments. Entre els seus avantatges es poden citar: resposta ràpida, bona sensibilitat, fàcil manteniment, simplicitat i principis físics senzills. Les sondes desenvolupades poden estar basades en la fluorimetria, l'absorbància i/o la dispersió de la llum, i els sistemes de tractament d'imatges en temps real (microscòpia *in situ*). Tot i els seus avantatges, els sensors òptics també presenten inconvenients. Un problema general és l'embrutament de les superfícies òptiques, com a resultat de l'adheriment de proteïnes o cèl·lules. Aquest fet pot ser crític en cultius de llarga durada. A més a més, la majoria dels sensors òptics no distingeixen entre cèl·lules viables i no-viables. La seva resposta està afectada per l'estat fisiològic del cultiu cel·lular, mida i morfologia de la cèl·lula, i per la

terbolesa global del brou del cultiu, el qual depèn de la concentració de residus (*cell debris*), provocats pel trencament cel·lular, dels agregats i altres partícules no-cel·lulars.

La densitat òptica (DO) és sovint considerada com un mètode de referència per les mesures fora de línia de la concentració cel·lular. La DO es correlaciona de forma lineal amb la concentració de cèl·lules, és ràpida i fàcil de realitzar, fent la mesura de la DO molt atractiva. Les correlacions lineals entre DO i la concentració cel·lular han portat al desenvolupament d'alguns sensors *in situ* per mesurar la DO. A la Taula 4.3 es fa un recull d'alguns dels sensors disponibles comercialment. Mentre que els sensors òptics basats en l'absorbància i/o dispersió de la llum havien estat molt emprats en el monitoratge de cultius microbians, en els cultius de cèl·lules animals no s'havien aplicat amb massa intensitat. Això probablement es deu a la seva inadequada sensibilitat. La majoria dels instruments comercials havien estat dissenyats per mesurar densitats cel·lulars microbianes, sovint fins a 50 g/l de pes sec. A baixes concentracions cel·lulars, la seva resolució no era apropiada. En els últims anys s'han incorporat al mercat un bon nombre de sondes d'alta sensibilitat que són capaces d'operar amb cultius de cèl·lules animals.

Sensor	Angle ^a	Longitud d'ona (nm)	Font de llum	Fabricant
Aquasant AS82-AF44 CS/R	180°	940	Font de llum infraroja	Aquasant-Messtechnik AG (Bubendorf, Suïssa)
ASR Laser Turbidimeter	0°, 90° i 135°	780	Làmpada de Tungstè	ASR co. (Tokio, Japó)
Cell-growth Probe	0°	750-980	Làmpada propera a l'infraroig	Wedgewood Technology Inc. (Carls, CA, USA)
MAX TM	180°	820-850	Diode làser	Cerex corporation (Gaithersburg, MD, USA)
Mettler FSC 402	180°	880	Diode emissor de llum	Ingold Electronics Inc. (Suïssa)
Monitek FS1/FT1	0°	800-1100	Font incandescent	Monitek Technologies (Hayward, CA, USA)
^a L'angle especifica l'angle de mesura comparat amb la font de llum, és a dir, un angle de 0° representa la mesura de llum transmesa i 180° representa la situació on la llum retroreflectida és mesurada.				

Taula 4.3. Recull de les diferents sondes òptiques de densitat cel·lular *in situ* comercials (Olsson i Nielsen, 1997).

La terbolesa d'una suspensió cel·lular està afectada per variables com la concentració de cèl·lules, les partícules sòlides (com els residus cel·lulars) i les bombolles d'aire (en el cas d'aeració del medi). Sota condicions normals, la concentració cel·lular és el factor més

significant. Quan s'irradien amb una font externa de llum, cadascuna d'aquestes partícules absorbeixen o reflecteixen la llum (Figura 4.9). L'absorbància de la llum, en què es basen la majoria de sensors òptics, es quantifica per la ben coneguda llei de Lambert-Beer. La dispersió de la llum és un altre fenomen que també depèn de la concentració cel·lular. La Figura 4.9 mostra partícules que dispersen la llum des d'angles que van del 0° (dispersió endavant o transmissió) fins als 180° (dispersió enrera o retroreflectida). S'han construït alguns sensors basats només en la dispersió de la llum, com la sonda d'Aquasant AS82-AF44 CS/R (Aquasant-Messtechnik AG, Bubendorf, Suïssa). En altres instruments, absorbància i dispersió es monitoren en paral·lel. La relació dels corresponents senyals ajuda a millorar la sensibilitat de la sonda i la seva linealitat.

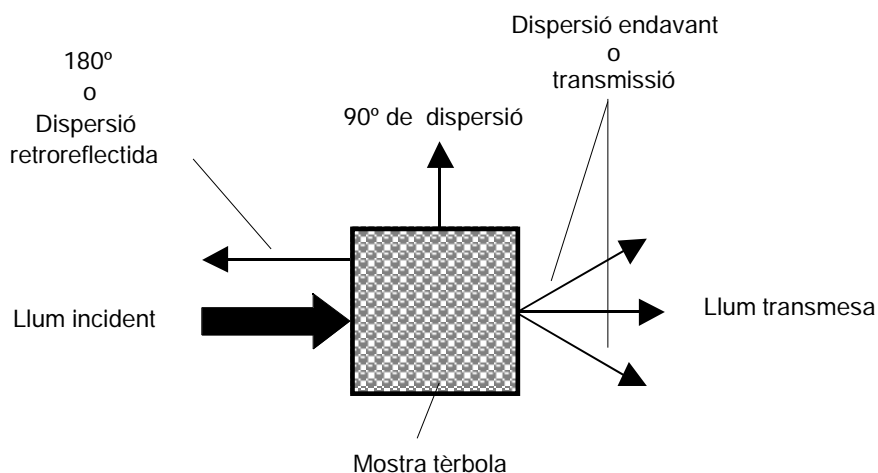


Figura 4.9. Absorció i dispersió de la llum mitjançant partícules irradiades per una font de llum externa. Els sensors òptics per monitorar la concentració cel·lular utilitzen mesures de llum a varis angles respecte a la llum incident.

Pel propòsit de mesurar la densitat cel·lular de cultius amb cèl·lules d'hibridoma s'ha seleccionat una sonda que mesuri la dispersió retroreflectada de la llum, ja que aquest tipus de sensors òptics proporcionen un alt nivell de sensibilitat (Olsson i Nielsen, 1997). La selecció entre els diferents sensors que es recullen a la Taula 4.3 també ha estat basada en un estudi en què es comparava la seva capacitat de mesura i comportament pel cas de cèl·lules animals (Wu i col., 1995). D'entre tots els sensors estudiats en el mencionat treball el que més s'ajusta als requeriments dels cultius d'hibridomes és la sonda d'Aquasant AF44 CS/R. Algunes de les característiques que la presenten com una de les més convenientes són:

- Alt nivell de sensibilitat a altes i a baixes concentracions cel·lulars (1×10^6 cèl·lules/ml – 20×10^6 cèl·lules/ml), encara que per sota de 1×10^6 cèl·lules/ml no s'ha comprovat la seva linealitat.
- Linealitat de la resposta.

- Requereix una llargada d'inserció curta, així no interfereix amb l'operació del reactor, però en canvi necessita un espai obert en front de la sonda de com a mínim 3 cm.
- Disseny robust comparat amb les altres sondes òptiques.

La descripció de l'equip d'instrumentació Aquasant es detalla a l'apartat 8.2.3 (sonda) i 8.2.4 (transmissor) del capítol de *Materials i Mètodes*. A la Figura 4.10 es mostra gràficament el principi de mesura del sensor. Aquest consisteix en un transmissor de raigs infrarojos (AS82) consignat a 940 nm, que emet, en un cable de fibra òptica per al senyal emès, dos feixos de raigs infrarojos (1). La sonda introdueix la radiació en el medi (2) pels dos costats al mateix temps. Un receptor òptic d'alta resolució (3) envia la radiació infraroja reflectida cap enrera, a través del cable de fibra òptica per al senyal rebut (4) a la unitat de mesura que l'avalua.

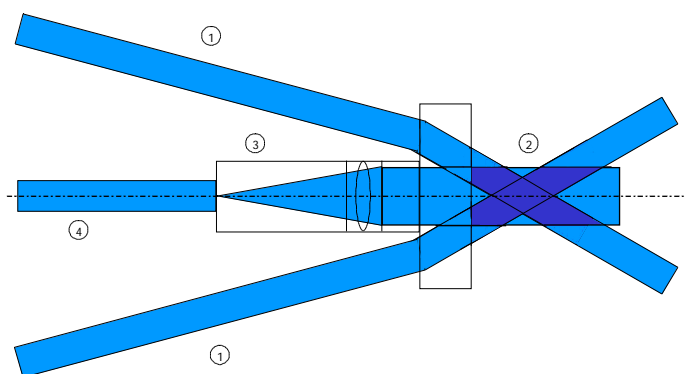


Figura 4.10. Esquema del funcionament de la mesura òptica en la sonda Aquasant AS82-AF44 CS/R.

4.4.1. Calibratge extern de la sonda.

Amb suspensions cel·lulars de concentració coneguda es genera la corba de calibratge de la cèl·lula d'hibridoma KB-26.5. La corba de calibratge es realitza en un recipient especial per al calibratge, tancat a la llum externa, amb un volum de mostra de 100 ml i suspensions en el rang de concentracions típiques d'un cultiu en discontinu. A la Figura 4.11 es mostra la resposta del sensor que es representa en funció de la densitat cel·lular. La relació entre les lectures del sensor i la concentració de cèl·lules és, amb suficient precisió ($r = 0.9998$), una recta lineal per al rang de concentracions provat. També s'observa que el mètode de mesura està capacitat per detectar concentracions inferiors a 0.2×10^6 cèl·lules/ml amb un pendent de 24300 cèl·lules/(ml·%), per a un valor del guany del transmissor AS82 igual a 30. Encara que el rang de la corba de calibratge cobreix les concentracions esperades en un experiment en discontinu, no hi ha cap problema per monitorar concentracions en un rang més ampli, mitjançant la correcció del guany de l'aparell. La sensibilitat mostrada per la sonda permetria

el seguiment de la concentració cel·lular, en el cas dels híbridomes emprats en aquest treball, des del moment inicial del cultiu, després de la inoculació.

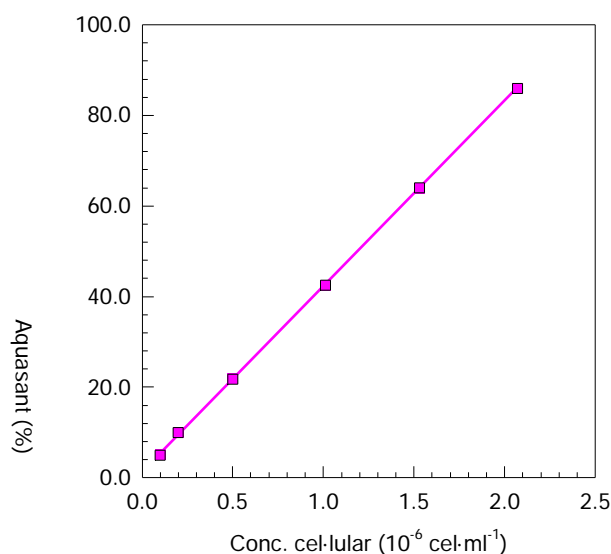


Figura 4.11. Corba de calibratge externa per a una suspensió d'híbridomes KB-26.5.

Tot i que els valors obtinguts en l'espectroscòpia d'impedància per a la cèl·lula d'híbridoma KB-26.5 presenten una bona linealitat, els resultats no són totalment satisfactoris ja que no permeten mesurar en tot el rang en què es mouen els valors de densitat cel·lular en els cultius en discontinu amb aquesta cèl·lula ($0.1-2.0 \times 10^6$ cèl·lules/ml). Per tant, a baixes concentracions cel·lulars la resolució del mètode es considera pobre (valor mínim de detecció massa elevat, 1.3×10^6 cèl·lules/ml) com per poder definir estratègies d'addició basant-se únicament amb aquesta mesura. De totes formes, en el moment en què es dissenyin sistemes i estratègies de cultiu que permetin assolir densitats cel·lulars molt més elevades, la inclusió d'aquest mètode de mesura al sistema de cultiu serà molt avantatjosa per obtenir informació, en línia i en temps real, sobre l'estat de la població cel·lular en el bioreactor. Fins que no arribi aquest moment, el mètode es descarta com a vàlid per la mesura en línia en el desenvolupament d'aquest treball. En canvi, a la sonda òptica, la precisió de l'estimació és millor i, per tant, molt més sensible que l'aconseguida en el mètode d'espectroscòpia d'impedància. A més, a baixes concentracions cel·lulars la resolució del mètode es considera molt més bona. A més a més, el sensor turbidimètric és simple, esterilitzable, de fàcil manteniment i fiable en el rang d'alta viabilitat del cultiu, tenint un cost econòmic assequible. Concloent, la sonda d'Aquasant permet mesurar en un ampli rang de concentracions, des de l'inòcul fins al final del cultiu, proporcionant una resposta lineal i més sensible, i es disposa d'aquest sensor comercialment. Per tant, se selecciona aquest sensor per mesurar la concentració cel·lular en els experiments en bioreactors.

4.4.2. Comportament de la sonda Aquasant en el seguiment de cultius en bioreactor.

Per tal d'analitzar de forma més completa el comportament de la sonda Aquasant, i donats els bons resultats obtinguts anteriorment, es va plantejar la seva utilització i calibratge en el mateix reactor on es realitzen els cultius d'hibridoma en aquest treball. La disposició del sensor Aquasant dins el bioreactor Biostat MCD provoca alguns problemes inicials en l'objectiu de mesurar en línia la concentració cel·lular. Cal dir que, donades les característiques d'aquest fermentador, les sondes només es poden muntar en posició vertical, inserides per les connexions de la tapa d'acer inoxidable. Quan s'aireja el cultiu a través de la membrana tubular de silicona es produeixen microbombolles, algunes de les quals van a parar a la superfície de la sonda on s'acumulen, formant una pel·lícula de gas, estacionària, just sota el sensor, i impedit la lectura correcta de la terbolesa del medi. El lloc on es col·loca el sensor dins d'aquest bioreactor no es pot millorar. Per tant, es va dissenyar un circuit de rentat de la superfície òptica del sensor, que permetia realitzar les lectures turbidimètriques en continu. Aquest dispositiu elimina l'acumulació de bombolles d'aire a la superfície del sensor Aquasant solucionant, com es veurà posteriorment, en gran part el problema del soroll en la lectura, deixant-lo operatiu en les condicions normals de cultiu. La definició del sistema físic de neteja es descriu a l'apartat 8.8.1.1 dels *Materials i Mètodes*, així com el procediment operacional del rentat. A la Figura 4.12 es mostren varis detalls del circuit de rentat. En síntesi, el sistema desenvolupat permet injectar un pols de medi just a la part de sota de la sonda, alliberant-la de l'acumulació de gas, i permetent un temps de mesura prou llarg, sense interferències pel gas. Aquesta operació es realitza sempre que es vol realitzar una mesura, de forma automàtica.

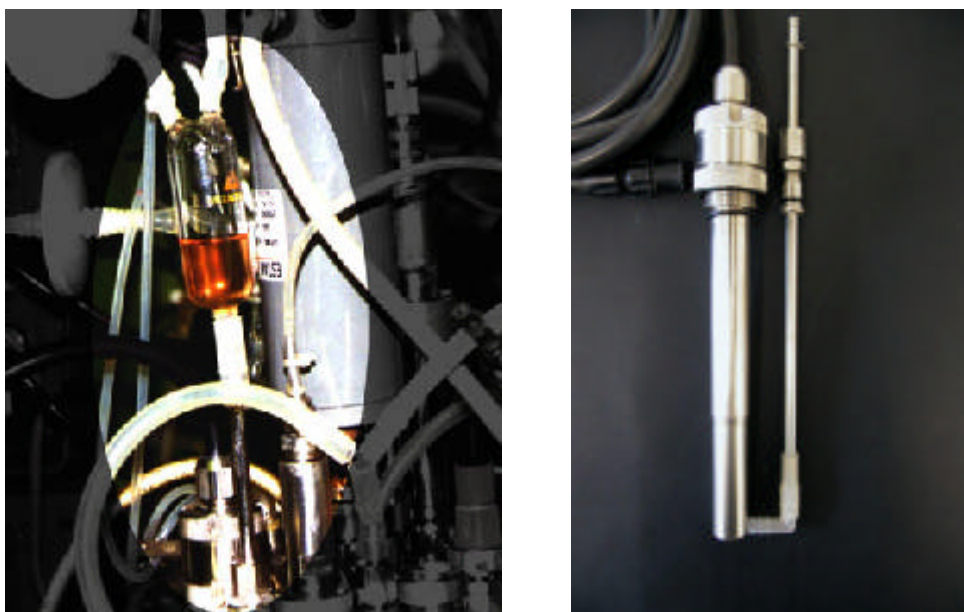


Figura 4.12. Circuit de neteja del sensor turbidimètric. A la dreta, detall de l'operació de rentat en un cultiu d'hibridomes en discontinu. A l'esquerra disposició de la cànula en la superfície del sensor.

Un cop solucionats els problemes derivats de l'acumulació de bombolles d'aire es procedeix a estudiar la resposta del sensor en un cultiu en discontinu. A la Figura 4.13 es presenten els resultats obtinguts amb el sensor en un primer cultiu en discontinu d'hibridomes, el qual s'ha fet créixer en un medi DMEM amb 23.8 mM de glucosa i 3.2 mM de glutamina. La resposta del sensor es compara amb mesures fora de línia, com el recompte cel·lular de cèl·lules viables i totals. Després d'una fase de latència al voltant de 18 h, les cèl·lules comencen a créixer exponencialment, i la concentració de cèl·lules totals arriba a 2.3×10^6 cèl·lules/ml en aproximadament 72 h. Les lectures del sensor correlacionen bé amb el creixement cel·lular, seguint el perfil de la concentració de les cèl·lules viables durant el període d'alta viabilitat. No obstant, la qualitat del senyal presenta certes oscil·lacions tot i la inclusió del circuit d'eliminació de bombolles. La raó de la persistència d'aquest soroll es deu a la necessitat de consignar la resposta del sensor en el màxim guany (30), obtenint així una gran sensibilitat, que segueix la concentració cel·lular des de l'inici del cultiu.

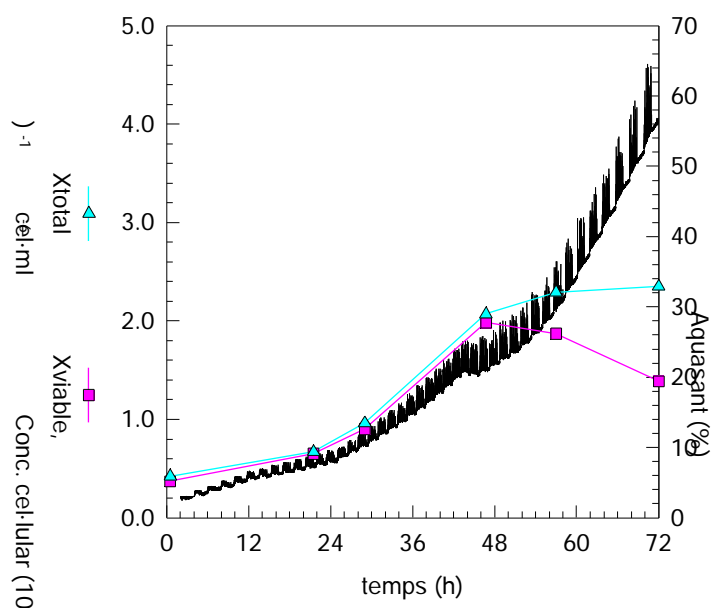


Figura 4.13. Monitoratge d'un creixement de cèl·lules d'hibridoma en discontinu amb el sensor turbidimètric d'Aquasant.

D'altra banda, com que la resposta del cultiu és bastant lenta (temps de duplicació entre 18 i 26 hores) les lectures necessàries per realitzar una acció de control no cal que siguin efectuades a cada instant. Aquesta característica del procés de cultiu permet la realització d'un filtratge del senyal adquirit en un determinat espai de temps, per exemple en una hora, i assignar al punt resultant de fer la mitjana dels últims valors de la matriu filtrada, una estimació de la concentració cel·lular mitjançant la recta de calibratge (aquest filtratge es realitza al mateix temps que el processament de les dades del consum d'oxigen adquirides per

estimar el valor de OUR; aquest últim mètode de mesura es descriu a l'apartat 4.5). El canvi en aquest procediment de mesura de la concentració de biomassa permet obtenir un senyal molt més estable, com es pot veure a les dades presentades a la Figura 4.14, corresponent a un cultiu en *fed-batch*. Com es pot observar el senyal del sensor coincideix exactament amb els recomptes cel·lulars a la zona d'alta viabilitat. Amb l'ús del mètode de filtratge descrit anteriorment, la qualitat de la mesura es millora remarcablement. El nivell de soroll és molt baix, i per tant és possible el càlcul acurat d'algunes variables que són difícils d'estimar en línia, com la velocitat específica de creixement, μ .

Com es pot observar a les figures 4.13 i 4.14 la resposta del sensor és correcta sempre i quan es mesuri en la fase de creixement cel·lular exponencial, i no es faci ni en la fase de mort ni en la de latència del cultiu. En aquestes fases apareixen factors que distorsionen el senyal com el trencament del material cel·lular (residus cel·lulars) i/o l'augment de la mida cel·lular, provocant així un increment molt important de la resposta; encara que l'augment que es produeix a l'inici és insignificant comparat amb el del final del cultiu. Aquestes observacions coincideixen amb les efectuades per altres autors treballant amb aquest mateix sensor (Behrendt i col., 1994). Aleshores, mentre que la viabilitat del cultiu és alta i no s'acumulen cèl·lules mortes, la lectura de l'Aquasant és fiable i representativa del cultiu.

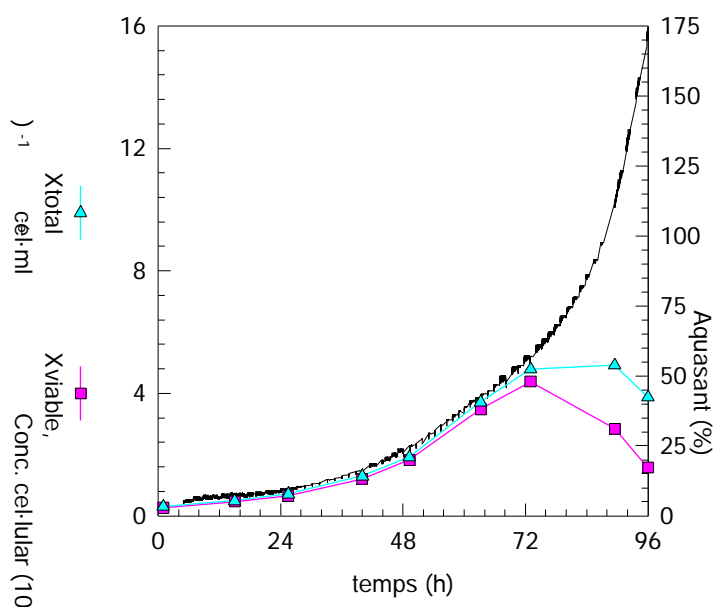


Figura 4.14. Monitoratge d'un creixement de cèl·lules d'hibridoma en *fed-batch* amb el sensor turbidimètric d'Aquasant.

Les corbes de calibratge realitzades a partir de les dades obtingudes en els experiments en discontinu i *fed-batch* de les figures 4.13 i 4.14 es presenten a la Figura 4.15. Ambdues

corbes presenten molt bona linealitat ($r > 0.999$), tant per a cèl·lules viables com per a cèl·lules totals en el rang d'alta viabilitat dels cultius, així com sensibilitats molt similars (al voltant de 87500 cèl·lules/(ml·%)). Tot i disposar de la corba de calibratge realitzada en el recipient de calibratge, aquesta no s'utilitza per predir la densitat cel·lular dins el bioreactor. La raó és que la corba de calibratge externa s'ha realitzat en unes condicions favorables de no interferència de la llum ambiental, mentre que quan la sonda està immersa dins del bioreactor (vidre transparent) es troba pertorbada per la llum de l'entorn i/o per les bombolles d'aire del sistema d'aeració. Encara que el transmissor s'encarrega de compensar aquests efectes, la corba de calibratge resultant és 2-3 vegades menys sensible que l'obtinguda en el recipient de calibratge (24300 cèl·lules/(ml·%) de pendent en el recipient de calibratge vers els aproximadament 87500 cèl·lules/(ml·%) de mitjana al bioreactor). Per aquesta raó, la corba de calibratge del cultiu s'efectua quan el cultiu ja està iniciat dins del bioreactor. Tot i que d'un cultiu a un altre es manté el pendent que relaciona les cèl·lules viables amb la resposta del sensor, és preferible refer la corba per determinar l'ordenada a l'origen. El càlcul del valor d'aquesta última corregirà els possibles canvis de resposta que pugui haver inicialment en el nombre de cèl·lules mortes i material cel·lular residual entre diferents cultius. Per poder estimar la concentració a l'inici del cultiu, com a primera aproximació s'utilitza una corba d'un cultiu anterior, i quan s'han extret les primeres dues mostres del cultiu en funcionament, aquesta es canvia per la corba recalibrada per al cultiu en curs.

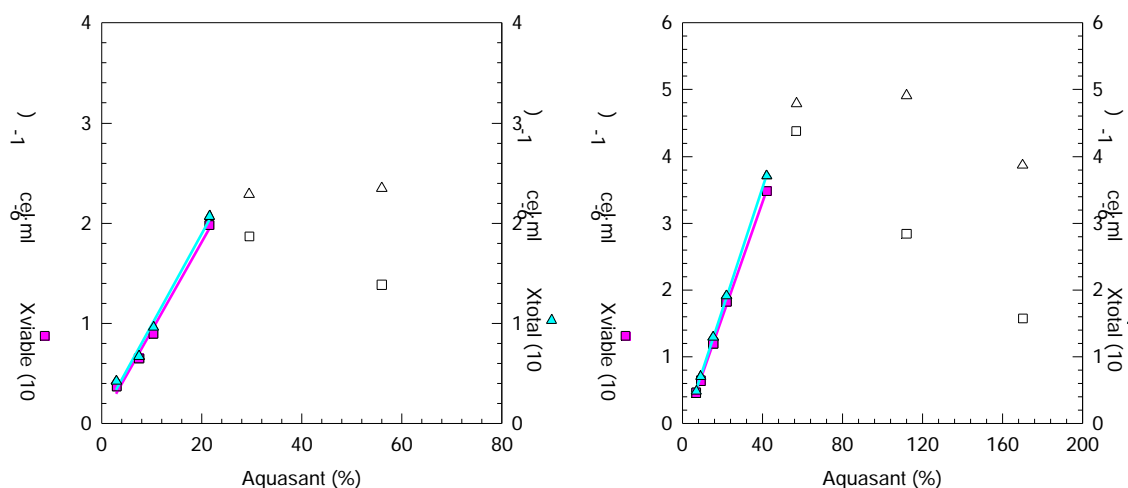


Figura 4.15. Corbes de calibratge en bioreactor per a cultius d'hibridomes KB-26.5 en l'operació en discontinuu (la de l'esquerra) i *fed-batch* (la de la dreta). Els punts sense color corresponen a dades del cultiu que no compleixen la regressió lineal.

Com a resum d'aquest apartat es pot dir que la qualitat del senyal és suficientment bona, com per permetre càlculs en línia de la μ de les cèl·lules d'hibridoma. El sensor turbidimètric proporciona una bona estimació de la concentració cel·lular fins al final del

període de creixement ràpid com s'ha comprovat al utilitzar-lo directament en el bioreactor, en cultius en discontinu i *fed-batch* de l'hibridoma KB-26.5. En la fase de descens, la viabilitat cel·lular del cultiu disminueix significativament i les mesures obtingudes són propenses a grans errors, possiblement deguts a la lisi i a canvis en la distribució de la mida cel·lular que afecta a les propietats d'absorció de la llum del cultiu. Aquesta és la raó per la qual s'examina la possibilitat d'emprar un mètode per avaluar l'activitat cel·lular de les cèl·lules d'hibridoma en línia com a complement del sensor de densitat òptica. Per tant, en el següent apartat es descriu la implementació d'un mètode de mesura sensible a l'estat fisiològic del cultiu d'hibridomes: la velocitat de consum d'oxigen dissolt, anomenat OUR (*Oxygen Uptake Rate*).

4.5. BALANÇ MÀSSIC D'OXIGEN.

Com s'ha comentat anteriorment, el monitoratge del cultiu cel·lular que es planteja en aquest procés considera, a més d'una mesura de la concentració cel·lular, finalment definida en base a la densitat òptica segons l'apartat anterior, obtenir també una mesura en línia que sigui indicativa de l'activitat de les cèl·lules. D'aquesta forma, la combinació d'ambdues mesures pot donar informació molt útil sobre l'evolució del cultiu. En aquest sentit, un dels indicadors més adients per seguir canvis en el comportament metabòlic és la determinació de la velocitat de consum d'oxigen (OUR). A banda del seu ús directe, la OUR sovint es combina amb altres variables per generar mesures útils amb un sòlid sentit fisiològic. Entre aquestes, les més habituals són la velocitat específica del consum d'oxigen (SOUR o q_{O_2}), el quocient respiratori (RQ), la relació entre la velocitat de consum de glucosa i la OUR, i d'altres. Individualment o en combinació, aquestes quantitats proporcionen un coneixement més profund sobre diferents aspectes del metabolisme cel·lular. Si es monitoren en temps real es poden utilitzar per al disseny d'estratègies molt més avançades del control de bioprocessos.

Malgrat la importància de la OUR, però, la seva utilització rutinària en operacions de bioprocessos està limitada per les dificultats trobades en el seu monitoratge en línia (Konstantinov i col., 1994b). Encara que s'han desenvolupat un bon nombre de mètodes, tots ells tenen desavantatges que impedeixen l'aplicació de la OUR com una variable del bioprocés estàndard, tal com ho són l'oxigen dissolt o el pH. En general, els mètodes per monitorar la OUR es poden dividir en dos grups: mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase gas, i els mètodes basats en la mesura de la concentració d'oxigen en la fase líquida. Les seves característiques es descriuen a continuació.

Mesures en la fase gas.

Aquestes mesures es basen en el monitoratge de la diferència entre les concentracions dels corrents de gas d'entrada i sortida del bioreactor, els quals es realitzen contínuament, en temps real mitjançant:

- Analitzadors de gasos. Aquests aparells (típicament basats en el principi paramagnètic), són relativament simples, fiables i no gaire cars. Desafortunadament, la seva sensibilitat sovint és insuficient per monitorar els consums relativament petits associats als cultius de cèl·lules animals. Aquesta és la raó per la que s'han aplicat exclusivament en cultius microbians, on les velocitats metabòliques són un o dos ordres de magnitud més grans comparat amb les de les cèl·lules animals. Recents avanços en cultius en perfusió d'alta densitat minimitzen, fins a cert punt, aquestes diferències. En aquest sentit ja s'ha fet alguna aplicació en aquest tipus de cultius amb resultats satisfactoris (Lovrecz i Gray, 1994). De totes formes, l'aplicació de l'anàlisi en línia del gas exhaurit en cultius de cèl·lules animals és molt més difícil degut al baix valor que pren la OUR, el gran temps de retenció del gas en l'espai de caps del bioreactor, i a l'ús del tampó bicarbonat en el medi de cultiu.
- Espectròmetres de masses. Aquests equips són instruments sofisticats i molt cars, proporcionant una gran sensibilitat en la mesura. Encara que s'han publicat alguns resultats positius en l'estimació de la OUR mitjançant el balanç en la fase gas amb espectrometria de masses (De Tremblay i col., 1993; Behrendt i col., 1994; Eyer i col., 1995; Dorresteyjn i col., 1996), el seu ús és encara limitat. Mentre que la seva sensibilitat és alta, encara pot ser insuficient a baixes densitats cel·lulars quan la diferència entre la concentració d'oxigen en els corrents de gas d'entrada i de sortida és molt petita. També poden sorgir problemes addicionals en els bioreactors oxigenats amb dispositius de difusió (Yoon i Konstantinov, 1994).

Mesures en la fase líquida.

Històricament, aquests mètodes es varen desenvolupar abans que els analitzadors de gasos i els espectròmetres de masses. La tècnica principal, coneguda com mètode dinàmic, existeix en diverses versions i només requereix sensors d'oxigen polarogràfics estàndards, fent d'ella una tècnica assequible i barata. El concepte essencial del mètode consisteix en aturar el subministrament d'oxigen al reactor per un temps limitat, i la OUR es calcula a partir del descens dinàmic del pO_2 causat per la respiració cel·lular. Després que l'estimació s'ha completat, es reprèn el subministrament d'oxigen. El procediment pot realitzar-se directament en el bioreactor o en un petit recipient extern connectat al reactor. Una segona alternativa es

basa en realitzar un balanç d'oxigen en la fase líquida assumint que el coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen (k_{La}) i la constant de la llei de Henry (H) són constants al llarg del cultiu (Zhou i Hu, 1994). La OUR es calcula del perfil d'oxigen dissolt (pO_2) a través del balanç d'oxigen en la fase líquida, mentre que la composició de l'oxigen en la fase gas es manté constant. En el treball publicat per Yoon i Konstantinov (1994) per a una línia cel·lular de mieloma, es planteja una tècnica alternativa per al monitoratge de la OUR en línia. En aquest cas la OUR es calcula a partir de la diferència de les lectures de dues sondes d'oxigen dissolt, una col·locada en un circuit de recirculació extern del medi de cultiu i l'altra inserida dins del bioreactor.

Entre les diferents possibilitats, en aquest treball s'ha escollit el mètode dinàmic, a la vista dels avantatges que ofereix i dels antecedents bibliogràfics en què ha estat aplicat amb èxit. No obstant, al realitzar la seva aplicació cal tenir en compte una sèrie de factors i limitacions, per tal d'arribar a obtenir una mesura fiable:

- No proporciona un senyal continu. El procediment ha de ser iniciat periòdicament a intervals de temps regulars. Aquest fet implica realitzar una certa distorsió en el nivell d'oxigen dissolt al medi, quan es fan les mesures, però la dinàmica relativament lenta del creixement d'hibridomes fa que aquesta distorsió no sigui crítica, ja que les mesures es poden realitzar en intervals de temps prou espaiats.
- Suposa una seqüència d'accions que cal automatitzar. Encara que el principi és simple, l'estimació de la OUR del perfil d'oxigen dissolt no és sempre immediata.
- Cal tenir en compte les constants de temps del sensor de pO_2 , ja que poden causar grans errors a concentracions cel·lulars elevades.
- Crea trastorns en l'operació. Això pot no ser acceptable en alguns casos.
- Requereix l'estimació acurada del k_{La} . En la majoria de casos s'assumeix k_{La} constant. Tot i que això és bàsicament una aproximació, ja que estrictament el valor del k_{La} pot variar al llarg del cultiu per diferents factors.

Tenint en compte tots aquests condicionaments i les característiques del sistema de cultiu emprat, en els apartats que segueixen es fa una descripció de com s'han anat adreçant per arribar a disposar d'una mesura de OUR fiable, basada en el mètode dinàmic.

4.5.1. Caracterització del sistema d'aeració.

Les diferències trobades en els valors del coeficient volumètric de transferència de matèria per l'oxigen (k_{La}) entre els cultius de cèl·lules animals i fermentacions microbianes es deuen principalment a les velocitats d'agitació més baixes i als reduïts cabals d'aeració emprats en les suspensions amb cèl·lules animals (Lavery i Nienow, 1987). Aquest règim de

mescla i d'aeració reduïts són requerits degut a la susceptibilitat de les cèl·lules animals a l'estrès mecànic i a l'efecte del bombolleig directe (Dodge i Hu, 1986; Lavery i Nienow, 1987; Murhammer i Goochee, 1990). No obstant, aquests valors baixos de $k_L a$ no són normalment limitants, donat que la demanda d'oxigen dels cultius de cèl·lules animals és baixa. En aquest treball s'han utilitzat dos sistemes d'aeració diferents en funció de les necessitats del tipus de cultiu: la membrana tubular de silicona i el microdifusor d'acer sinteritzat (ambdós descrits a l'apartat 8.2.1 de *Materials i Mètodes*). La utilització d'aquest últim es discuteix en el capítol 6 de la memòria i ve lligada a la major necessitat d'aeració que es requereix en l'operació en perfusió, a més altes densitats cel·lulars. De forma general, s'ha usat sempre la membrana tubular de silicona com a sistema d'aeració. Per saber com es comporta aquest sistema d'aeració en el bioreactor Biostat MCD i si el subministrament d'oxigen serà suficient per mantenir els cultius que s'efectuïn, és necessari calcular el $k_L a$.

Hi ha un gran nombre de mètodes per mesurar el $k_L a$, però el més utilitzat és el mètode d'eliminació de gasos. La determinació experimental del $k_L a$ en aquest treball es realitza indirectament mitjançant la tècnica d'eliminació de gasos i posterior reaeració (Van't Riet, 1979). Aquesta tècnica consisteix a reduir la concentració d'oxigen mitjançant un corrent de nitrogen gas fins a eliminar completament l'oxigen del medi. Seguidament s'introdueix un corrent d'aire al bioreactor a través del sistema d'aeració a caracteritzar i en les condicions de treball del cultiu (1000 ml/min de cabal i $_ \text{bar}$ de pressió), mesurant-se l'evolució de l'oxigen dissolt en el medi del seu interior, el qual conté un medi base DMEM amb 25 mM de glucosa, 4 mM de glutamina i 2% de FCS. Si es considera que la dinàmica del sistema d'aeració és més lenta que la dinàmica del sensor, el valor del $k_L a$ es pot calcular senzillament mitjançant la següent equació formulada per Van't Riet (1979):

$$k_L a = 1/t_{0.63} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

on $t_{0.63}$ és el temps necessari per arribar al 63% de saturació d'aire començant des del 0% d'oxigen dissolt. Aquesta aproximació per calcular el $k_L a$ del sistema d'aeració també s'ha utilitzat en altres treballs de cultiu cel·lular (Zhang i col., 1993).

Per tant, per poder aplicar l'equació 4.4 en la determinació del $k_L a$, primer de tot s'ha de conèixer el valor del temps de resposta del sensor d'oxigen, t_p , definint-se aquest com el temps que triga l'elèctrode d'oxigen en assolir el 63.2% del valor final, quan se sotmet a un esglaió de concentració que va des del 0% fins al 100% de saturació d'aire. La resposta de la sonda d'oxigen es determina mesurant l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt en desplaçar ràpidament l'elèctrode d'un recipient, saturat de nitrogen gas, a un altre recipient que es troba saturat d'aire al 100%, mitjançant el bombolleig de nitrogen i d'aire respectivament, i sota les mateixes condicions per les que es vol mesurar el $k_L a$. La majoria de

les sondes d'oxigen dissolt comercials es poden aproximar a sistemes de primer ordre i en general s'utilitza τ_p per caracteritzar-les. Es recomana que $\tau_p < 1/k_L a$ per obtenir mesures acurades del $k_L a$, és a dir, per garantir que la dinàmica de la sonda és prou més ràpida que la dinàmica del sistema de transferència d'oxigen. Els valor experimental de la resposta normalitzada de la sonda d'oxigen (Γ) es presenten a la Figura 4.16,

$$\Gamma(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{ss} - I_0} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

on I correspon a les lectures de la sonda, i on I_0 i I_{ss} corresponen al valor inicial i de saturació, respectivament.

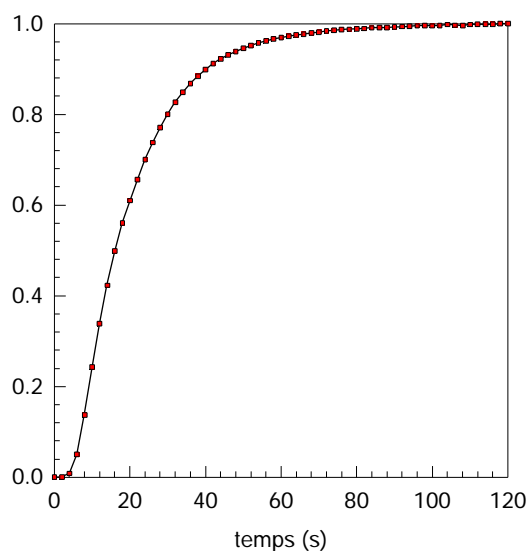


Figura 4.16. Resposta normalitzada de la sonda d'oxigen emprada per a la determinació del $k_L a$ i la mesura d'oxigen al reactor.

El temps de resposta de l'elèctrode ($\tau_p = 14.5 \pm 0.3$ s) s'ha determinat considerant que la sonda té una dinàmica de primer ordre, a partir de l'ajust lineal de l'expressió següent:

$$\ln(1 - \Gamma(t)) = -\frac{1}{\tau_p} t \quad (\text{Eq. 4.6})$$

on t és el temps per a cada valor normalitzat d'oxigen dissolt. Per altra banda, a la Figura 4.17 es pot veure l'evolució de la concentració d'oxigen al bioreactor Biostat MCD, quan després d'eliminar l'oxigen amb nitrogen gas, s'alimenta un cabal d'aire de 1000 ml/min amb 0.5 bars de pressió a la sortida de la línia, a través de la membrana de silicona, representativa de les

condicions normals del reactor. Es pot comprovar que la dinàmica del sistema és molt més lenta que la de la sonda, per tant l'equació 4.4 es podrà emprar per determinar el valor del $k_{L,a}$. El valor obtingut, fent la mitjana del resultat de tres determinacions, és de $2.674 \pm 0.074 \text{ h}^{-1}$. A la Taula 4.4 es mostren alguns dels valors de $k_{L,a}$ publicats per bioreactors de cultiu cel·lular. Es pot observar com els sistemes d'aeració que combinen l'oxigenació per l'espai de caps del reactor i la membrana de silicona alhora presenten $k_{L,a}$ superiors. Pel sistema d'aeració de membrana de silicona s'observa que el valor de $k_{L,a}$ calculat pel bioreactor Biostat MCD s'ajusta als valors bibliogràfics mostrats.

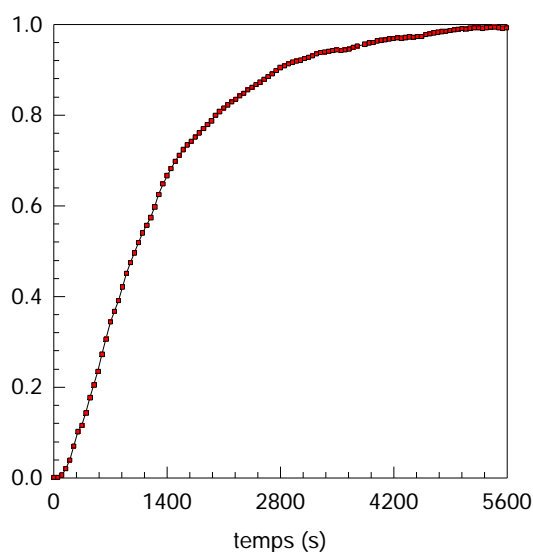


Figura 4.17. Dinàmica del sistema d'aeració amb la membrana tubular de silicona.

Volum del reactor/ Volum de treball (ml)	Velocitat d'agitació (rpm)	Sistema d'aeració	$k_{L,a}$ (h^{-1})	Referència Bibliogràfica
1000/500	50	HS+B	4.29	Kyung i col., 1994
750/500	60	HS+B	4.58	Zhou i col., 1995
1000/500	60	HS	0.93	Kussow i col., 1995
6000/3000	50	HS	0.79	Dorresteijn i col., 1996
750/1000	60	HS	1.13	Zhou i Hu, 1994
NE/1000	100	B	~2.7	Emery i col., 1995

Taula 4.4. Recull de valors bibliogràfics del coeficient volumètric de transferència d'oxigen en bioreactors de cultiu cel·lular. HS = aeració per l'espai de caps del reactor, B = aeració per membrana de silicona, NE = no especificat.

4.5.2. Mesura de la OUR mitjançant el mètode dinàmic.

La OUR es mesura en intervals de temps que van des de les dues hores a l'inici del cultiu, passant a la freqüència d'una hora en la fase de creixement. En cultius d'alta densitat cel·lular pot arribar a requerir velocitats més altes de mostratge donada l'evolució més ràpida del cultiu. Per tal de realitzar aquesta mesura de forma automàtica, s'ha desenvolupat el corresponent codi de programació, basat en el procediment esquematitzat de la Figura 4.18, i que es descriu amb detall a l'apartat 5.5.7.10. Bàsicament, el procés té els següents passos:

1. S'interromp el subministrament de gasos (aire/N₂/CO₂) al sistema de membrana tubular de silicona.
2. S'introdueix un corrent de N₂ per l'espai de caps del bioreactor per esgotar l'oxigen en la fase gas.
3. Es registren les lectures d'oxigen dissolt des del nivell controlat de pO₂, al voltant del 60% en tots els cultius, fins que el valor de pO₂ baixa al 30% de la saturació. La disminució de l'oxigen dissolt en aquest període es deu al consum d'oxigen per les cèl·lules i a la transferència d'oxigen pel nitrogen gas.
4. Es tanca l'entrada de nitrogen gas una vegada s'ha assolit el 30% de la saturació d'aire.
5. Es restableix el subministrament de gasos al sistema de membrana tubular de silicona.
6. Es calcula la demanda d'oxigen mitjançant el perfil de pO₂, entre el 50-30%, vers el temps i el balanç d'oxigen al reactor, donat per l'equació:

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = k_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) - OUR \quad (\text{Eq. 4.7})$$

Com que el nitrogen és introduït al capçal del bioreactor per esgotar l'oxigen a la fase gas, d'acord amb la llei de Henry, la concentració d'oxigen dissolt en equilibri en la fase gas, $C_{O_2}^*$, es redueix a zero en l'equació anterior, i l'equació esdevé:

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = k_L'' a (0 - C_{O_2}(t)) - OUR \quad (\text{Eq. 4.8})$$

on $k_L'' a (0 - C_{O_2}(t))$ representa el terme de desorció d'oxigen del medi de cultiu, i així $k_L'' a$ és defineix com el coeficient de desorció, que per a més comoditat s'anomena K_{des} . L'equació 4.8 es pot integrar, obtenint-se:

$$OUR = \frac{C_{O_2}(t_0) - C_{O_2}(t_f)}{t_f - t_0} + \frac{\int_{t_0}^{t_f} (-K_{des} C_{O_2}(t)) dt}{t_f - t_0} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

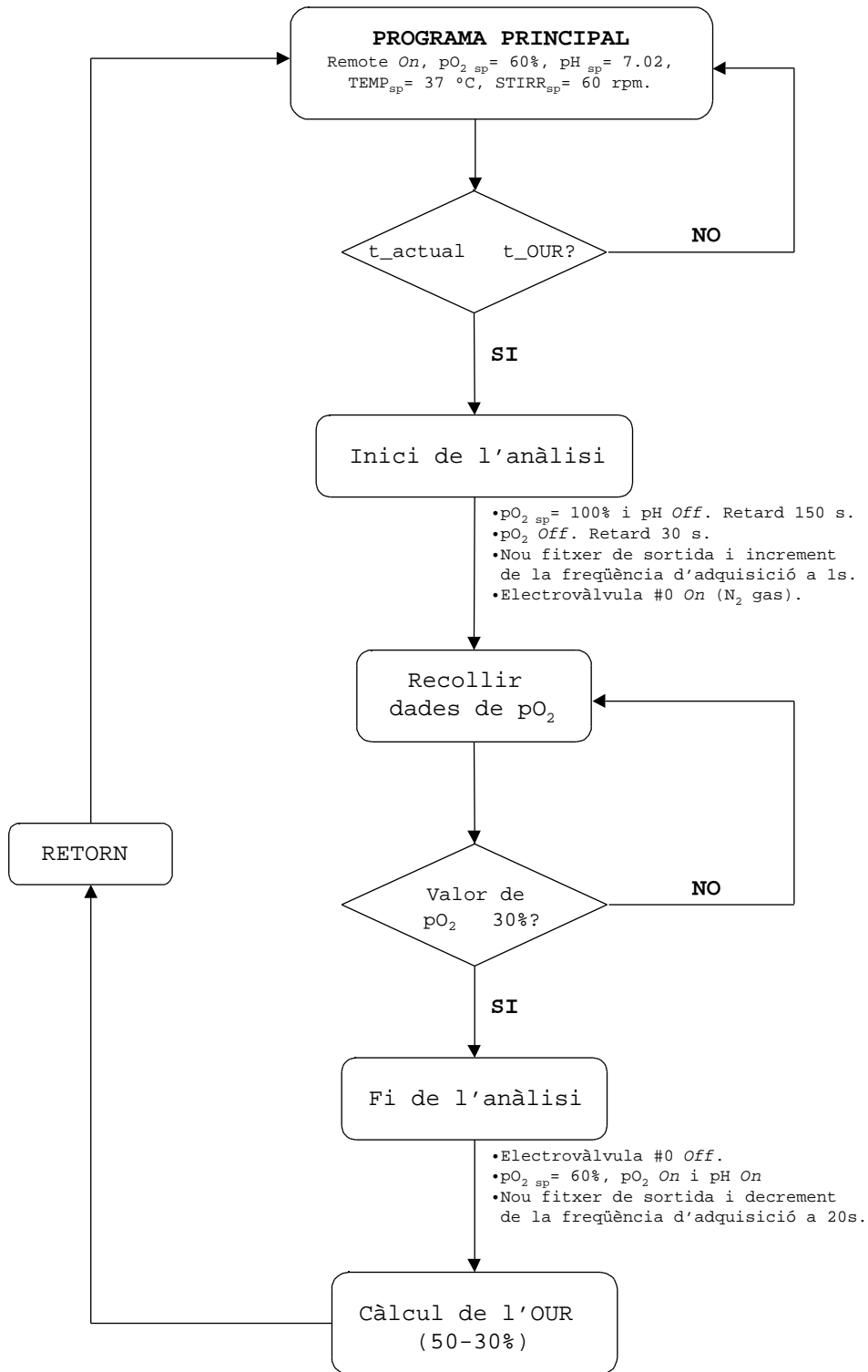


Figura 4.18. Diagrama de flux de la seqüència de passos per a l'anàlisi de la demanda d'oxigen.

on $C_{O_2}(t_0)$ és la concentració inicial (50%) i $C_{O_2}(t_f)$ és la concentració final (30%); t_f i t_0 són els temps de registre inicial i final de l'oxigen dissolt al 30% i al 50% respectivament. La variable $C_{O_2}(t)$ representa la concentració d'oxigen dissolt en qualsevol temps t . Per medis de cultiu de cèl·lules animals a 37 °C i saturats amb aire, la constant de Henry per l'oxigen en el medi (o solubilitat de l'oxigen, S_{O_2}) ha estat calculada per alguns autors (Miller i col., 1988; Ramirez i Mutharasan, 1990; Higareda i col., 1997), considerant-se normalment constant i igual a 0.194 mmol/l. Dorresteijn i col. (1996) varen demostrar que per als medis de cultius de cèl·lules animals es podia assumir amb seguretat que la solubilitat de l'oxigen era constant i no variava al llarg del cultiu. Per solucionar l'equació 4.9 és necessari conèixer el valor de K_{des} . Per això s'utilitza el bioreactor Biostat MCD sense cèl·lules, i en aquestes condicions (OUR = 0.00), l'equació 4.8 queda reduïda a:

$$\frac{dC_{O_2}(t)}{dt} = -K_{des}C_{O_2}(t) \quad (\text{Eq. 4.10})$$

Es pot avaluar el valor de K_{des} linealitzant aquesta equació amb les dades dels valors logarítmics del perfil de pO_2 , entre el 50-30%, vers el temps. A la Figura 4.19 es mostra el perfil de l'oxigen dissolt en un experiment de desorció sense cèl·lules. Per a la determinació de la constant de desorció i la OUR, s'han programat funcions, definides en el programari de control del procés, que es descriu en el capítol següent de la memòria. Com a mètode d'integració numèric s'ha utilitzat el mètode del trapezi. Aquest mètode ha donat una alta resolució degut a l'elevat nombre de punts que es registren en l'interval de càlcul per a cada caiguda de l'oxigen dissolt (entre 150 i 2500 punts).

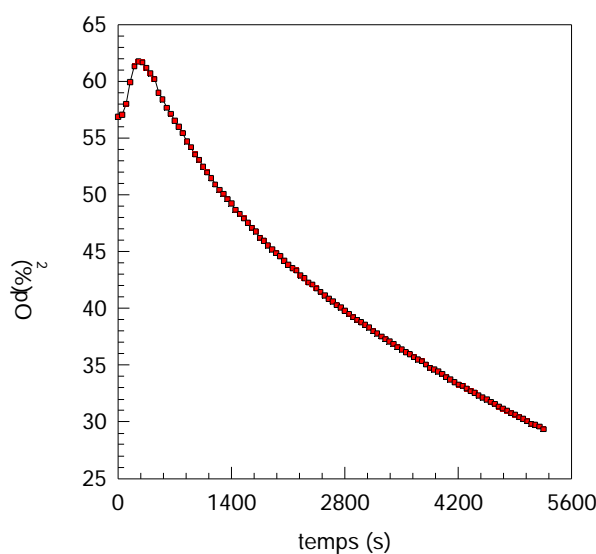


Figura 4.19. Perfil de desorció de l'oxigen dissolt del Biostat MCD en medi DMEM.

4.5.3. Precisió de la mesura de OUR.

Una estimació acurada del K_{des} millora la precisió de la mesura de OUR (Jiao i col., 1997). En els experiments que s'han realitzat al llarg del treball s'ha calculat el valor de K_{des} per a cada cultiu. En cadascun d'aquests cultius abans d'inocular el bioreactor s'efectuen entre 5 i 10 mesures del coeficient de desorció per poder així donar un valor mitjà, el qual s'aplica al càlcul de la demanda d'oxigen. Els valors obtinguts a l'inici del cultiu varien segons cada experiment, però tots ells s'han mantingut entre els valors de 0.396 h^{-1} i 0.482 h^{-1} amb una desviació estàndard mitjana de 0.014 h^{-1} . Per comprovar si el valor de K_{des} ha canviat durant el cultiu, s'afegeix en el bioreactor al final del cultiu 1.0 g d'azida sòdica (NaN_3) a fi d'eliminar el consum d'oxigen de les cèl·lules i, aleshores, es torna a calcular el K_{des} . Després de l'acabament del cultiu, no s'ha trobat en cap experiment canvis significatius en el seu valor, solent incrementar-se entre el 5% i el 10%. Per tant, K_{des} pot considerar-se com una constant, simplificant així l'equació 4.9 descrita anteriorment.

Temps (h)	OUR (mmol/(l·h))	OURn (mmol/(l·h))	Error (%)
4	0.026	0.062	57.8
14	0.036	0.072	49.9
24	0.066	0.102	35.2
49	0.131	0.166	21.3
54	0.161	0.196	18.0
59	0.191	0.226	15.7
64	0.224	0.259	13.6
69	0.273	0.308	11.5
74	0.314	0.349	10.2
79	0.372	0.408	8.8
84	0.434	0.470	7.6
89	0.486	0.522	6.9
94	0.543	0.579	6.2
99	0.598	0.634	5.6
104	0.715	0.751	4.8
109	0.827	0.863	4.2
114	0.938	0.975	3.7

Taula 4.5. Efecte de la desorció de l'oxigen sobre l'estimació de la OUR. Els valors s'han obtingut d'un cultiu en perfusió. Els valors de OURn es calculen menyspreant el terme de desorció de l'equació 4.9.

Com es mostra a l'equació 4.9, una disminució en l'oxigen dissolt mitjançant el mètode dinàmic no es deu només al consum d'oxigen per les cèl·lules, sinó que també es deu a la desorció de l'oxigen del medi de cultiu. En contra del que s'observa a les fermentacions microbianes, per a l'estimació de la OUR en cultius de cèl·lules animals, i sobretot en la fase

inicial del cultiu, la velocitat del consum d'oxigen és quasi del mateix ordre de magnitud que la velocitat de desorció, i per tant aquesta última no pot ser menyspreada. A la Taula 4.5 es donen els resultats comparatius d'un experiment de cultiu en què la mesura de la OUR s'ha efectuat tenint en compte la desorció (OUR), i sense tenir-la en compte (OURn). Com es pot observar, les diferències són notables, sobretot al principi del cultiu, fent-se més petites a mesura que augmenta la concentració de cèl·lules amb el creixement.

4.5.3. Monitoratge de la OUR en línia.

Finalment, per demostrar l'ús pràctic de la mesura de OUR s'ha realitzat un cultiu en discontinu per a les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5. Amb un nivell d'oxigen dissolt del 60% s'aconsegueixen densitats cel·lulars al voltant de 2×10^6 cèl·lules/ml, en condicions fisiològiques òptimes. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la Figura 4.20. En aquest cultiu s'observen clarament les tres fases típiques del creixement en discontinu per a les cèl·lules animals: latència, exponencial i mort. El monitoratge dels cultius amb el mètode dinàmic de determinació de la OUR permet seguir aquestes tres fases. La OUR augmenta a ritme constant des de la inoculació del bioreactor fins al final de la fase exponencial, mostrant molt bona correlació amb la densitat cel·lular. Abans d'assolir el màxim de concentració de cèl·lules viables (al voltant de les 47 hores de cultiu), la OUR mostra un sobtat i ràpid descens a partir de les 43 hores. Per tant, la OUR assoleix el seu valor màxim 4 hores més aviat que la concentració de viables. Aquest fet s'interpreta de forma molt positiva, donat que permet disposar d'una mesura en línia indicativa de l'activitat fisiològica de les cèl·lules, que d'una manera molt més directa que el recompte de viabilitat al microscopi, que s'efectua manualment fora de línia, pot permetre detectar els canvis en el comportament de la cèl·lula en el moment en què es produeixen i, per tant, facilitar accions de control per corregir la situació. En l'experiment concret realitzat aquí, la mort cel·lular es produeix per l'esgotament de la glutamina al medi. Durant la fase de mort la OUR continua decreixent a velocitats lleugerament més baixes fins a nivells per sota dels observats en la inoculació, mentre que la caiguda de la concentració de cèl·lules viables és més gradual.

En aquest cultiu, les mesures en línia de OUR es realitzen cada hora. Com s'ha comentat anteriorment al final del cultiu s'efectua la comprovació per si ha variat el coeficient de desorció. No s'observen canvis significatius en els valors de K_{des} (0.460 h^{-1} a l'inici per 0.507 h^{-1} al final), fent vàlida així la suposició que es manté constant. En aquest experiment els valors de OUR han oscil·lat entre $0.02\text{-}0.03 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ en la fase de latència fins a un màxim de $0.23 \text{ mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ al final de la fase exponencial.

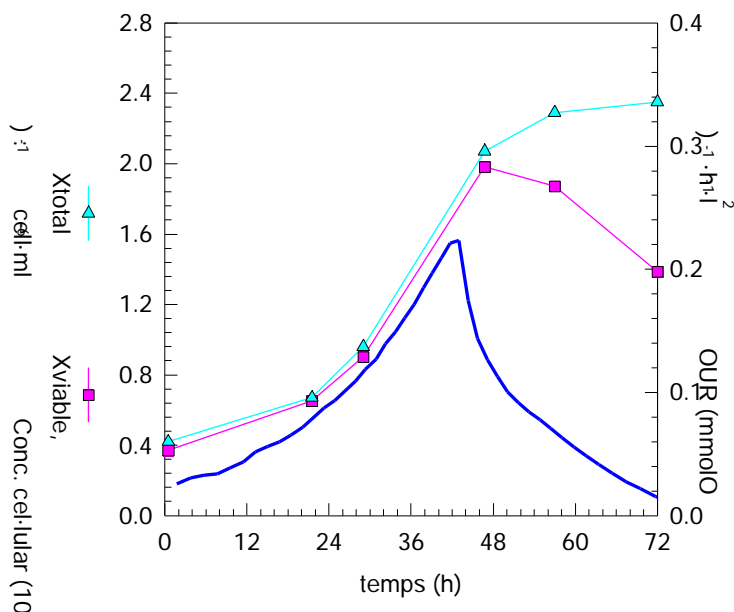


Figura 4.20. Perfil típic de la mesura en línia de la OUR i de la densitat cel·lular de viables durant un cultiu en discontinu en bioreactor.

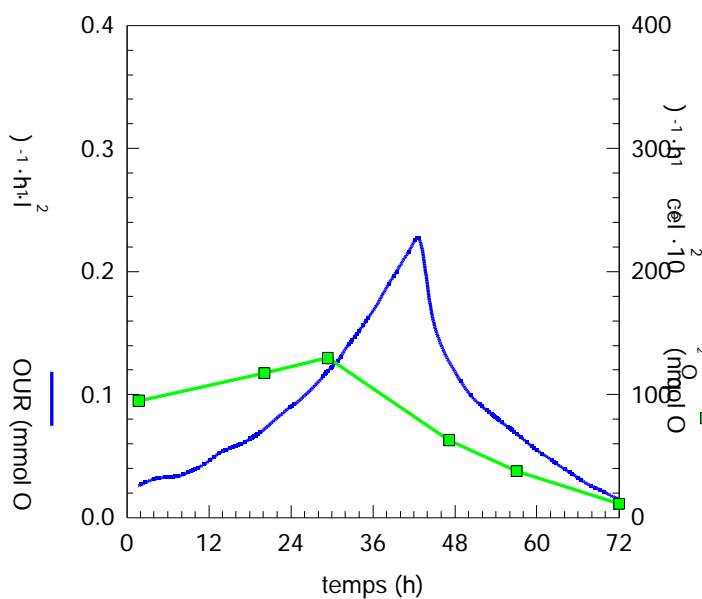


Figura 4.21. Perfil de la mesura en línia de la OUR i de q_{O_2} durant un cultiu en discontinu en bioreactor.

Una variable interessant per obtenir informació complementària sobre l'estat del cultiu, és la velocitat específica del consum d'oxigen (q_{O_2} o SOUR). En aquest cas aquesta variable es calcula a partir de la relació entre les dades de concentració de cèl·lules viables, mesurades fora de línia, i els seus valors corresponents de OUR. Malauradament, és un paràmetre que no es pot calcular en línia, només quan es manté constant, ja que quan la mesura del sensor d'Aquasant es comença a desviar, ja no es pot calcular de forma fiable.

Com es pot observar a la Figura 4.21, la q_{O_2} resta relativament constant des de l'inici de la fase exponencial fins a unes hores abans del màxim valor de OUR. Durant la fase de creixement exponencial el valor de la q_{O_2} és $120 \text{ nmolO}_2/(\text{10}^6 \text{ cèl·lules·h})$. Aquest resultat és comparable als aconseguits en altres treballs. Singh (1996) amb el mètode dinàmic va trobar una q_{O_2} molt similar a la d'aquest cultiu, de valor $150 \text{ nmolO}_2/(\text{10}^6 \text{ cèl·lules·h})$, mentre que altres autors (Eyer i col., 1995; Dorresteijn i col., 1996) mostraren que per a la majoria de línies cel·lulars animals, la q_{O_2} es troba en el rang comprès entre 50 i $520 \text{ nmolO}_2/(\text{10}^6 \text{ cèl·lules·h})$.

Els resultats obtinguts utilitzant les mesures de OUR subministren un major aprofundiment en el coneixement del comportament de les cèl·lules. La mesura de OUR es pot utilitzar com un veritable senyal de la resposta del sistema, especialment en l'última part del cultiu, ja que s'observa un distint comportament entre la concentració de cèl·lules viables i l'activitat cel·lular, indicant que l'activitat cel·lular respon molt més ràpidament als canvis de l'entorn o de les condicions cel·lulars que el que pugui fer-se a través del recompte cel·lular al microscopi. Aquesta capacitat per detectar canvis en el comportament de la cèl·lula, en una finestra molt propera al seu inici, és molt important en el cas del cultiu de cèl·lules animals, ja que si no es poden aplicar accions immediates de correcció de la causa que provoca el canvi, les cèl·lules del cultiu poden entrar ràpidament en el procés irreversible de mort cel·lular programada, i fer inútils altres accions de control que es puguin efectuar més tard. A més a més, utilitzant el valor de la velocitat específica del consum d'oxigen juntament amb les mesures de OUR es pot realitzar l'estimació de la concentració de viables en línia, sempre i quan sigui vàlid suposar la q_{O_2} constant al llarg del cultiu. Normalment, aquesta suposició és correcta en la fase de creixement exponencial dels cultius en discontinu.

Finalment, es pot concloure que s'ha implementat un sistema d'estimació en línia, utilitzant-se per al monitoratge de la demanda d'oxigen de les cèl·lules d'hibridoma KB-26.5 creixent en bioreactor, demostrant ser un excel·lent mètode per detectar canvis fisiològics durant els cultius cel·lulars, i podent-se utilitzar els seus valors per a l'ajust automàtic de les condicions del cultiu. A més, la combinació d'aquesta eina amb la mesura en línia de la concentració cel·lular per turbidimetria ha de permetre millors resultats en l'objectiu de conèixer, en línia i en temps real, allò que succeeix en el cultiu, i així poder emprendre les accions de control necessàries.

Una vegada definida i provada la instrumentació per seguir el comportament cel·lular de l'hibridoma KB-26.5, així com tots els sensors necessaris per tal de conèixer les condicions ambientals del cultiu, cal recollir i interpretar les mesures per poder actuar sobre el procés. La informació recollida ha d'enviar-se a un sistema de gestió que permeti recopilar totes les dades. També cal poder gestionar remotament aquells equips que permeten realitzar els

diferents tipus d'accions sobre el cultiu cel·lular (bombes d'alimentació, subministrament de gasos, canvis de consignes, etc.). Normalment, s'utilitza per a tal fi un ordinador que permet, entre d'altres funcions, la comunicació amb tots els sensors, equips i/o aparells, i un programari de control i gestió del procés. En el capítol següent es descriu detalladament el programari desenvolupat en aquest treball per assolir els requeriments anteriorment especificats.