

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA



MONITORITZACIÓ I CONTROL DEL
PROCÉS DE PRODUCCIÓ DE
PROTEÏNES HETERÒLOGUES EN
EL LLEVAT METILOTRÒFIC
Pichia pastoris

MEMÒRIA PER OPTAR
AL GRAU DE DOCTOR PER LA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

ORIOI COS BUSQUETS

BELLATERRA, JUNY DE 2005

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 **Oriol Cos Busquets** ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball amb el títol "Monitorització i control del procés de producció de proteïnes heteròlogues en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*" 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 a Bellaterra, 1 de juny 2005.

**DR. FRANCISCO VALERO
BARRANCO**

**DR. JOSÉ LUIS MONTESINOS
SEGUÍ**

ÍNDEX

PRESENTACIÓ	7
RESUM	9
AGRAÏMENTS	15
1. INTRODUCCIÓ	17
1.1. Sistemes d'expressió de proteïnes heteròlogues	19
1.1.1. Llevats com a sistema d'expressió	20
1.2. <i>Pichia pastoris</i>	24
1.2.1. Per què <i>Pichia pastoris</i> ?	24
1.2.2. Promotor de l'AOX1 (P _{AOX1})	25
1.2.3. Vectors d'expressió	26
1.2.4. Soques d'expressió	27
1.2.5. Cultius de producció de proteïnes heteròlogues	30
1.2.6. Proteïnes expressades en <i>Pichia pastoris</i>	31
1.3. Lipases	33
1.3.1. Definició	33
1.3.2. Origen	34
1.3.3. Classificació, estructura i funció	35
1.3.4. Aplicacions industrials i biotecnològiques	36
1.3.5. La lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL)	37
1.4. Modelització de bioprocessos	39
1.4.1. Classificació de models matemàtics	39
1.4.2. Construcció i Validació del model	41
1.5. Principals estratègies de cultiu	42
1.5.1. Operació en discontinu	42
1.5.2. Operació en semicontinu ("Fed-Batch")	43
1.5.3. Operació en continu	43
1.6. Instrumentació i monitorització	45
1.6.1. Sensors	45
1.6.2. Instrumentació suplementària	48
1.6.3. Comunicacions	49
1.7. Control de Bioprocessos	58
1.7.1. Objectius del control	58
1.7.2. Tècniques de control	59
1.7.3. Elements de control	60
1.7.4. Tipus de control	61
2. OBJECTIUS	67
3. MATERIALS I MÈTODES	71
3.1. Instal·lació Experimental	73
3.1.1. Fermentadors	73
3.1.2. Instrumentació complementària	76
3.1.3. Altres equips	80
3.1.4. Material informàtic	80
3.2. Solucions i medis de cultiu	81
3.2.1. Solucions	81
3.2.2. Medis de cultiu	83
3.3. Tècniques Microbiològiques	85
3.3.1. Preparació plaques de Petri (YPD)	85
3.3.2. Determinació de la concentració de biomassa total	85
3.3.3. Determinació de l'activitat lipolítica extracel·lular	86
3.3.4. Determinació de l'activitat lipolítica intracel·lular	86
3.3.5. Determinació de la composició elemental	87
3.4. Mètodes analítics	88
3.4.1. Determinació de la concentració d'amoni	88
3.4.2. Determinació de Nitrogen Total	88
3.4.3. Determinació de la concentració de glicerol	89
3.4.4. Determinació de la concentració de metanol	89

3.5.	Protocols de fermentació	90
3.5.1.	Pre-inòcul	90
3.5.2.	Inòcul.....	90
3.5.3.	Posada en marxa del cultiu	91
3.5.4.	Posada en Marxa del cultiu discontinu	93
3.5.5.	Posada en marxa del cultiusemicontinu	95
3.5.6.	Posada en marxa de l'equip d`anàlisi en línia de Metanol	95
3.6.	Llenguatge de programació utilitzat: Visual Basic.....	97
3.7.	Càlculs	99
3.7.1.	Càlcul de l'OUR, CER i RQ.....	99
3.7.2.	Càlcul de la μ , q_s i q_p	102
3.7.3.	Càlcul de les derivades.....	108
3.7.4.	Càlculs dels valors mitjans.....	110
3.7.5.	Càlcul dels rendiments	111
3.7.6.	Càlcul de les productivitats	112
3.7.7.	Correcció dels paràmetres en funció del volum	112
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	115
4.1.	Estudi de la fermentació.....	117
4.1.1.	Antecedents previs.....	117
4.1.2.	Cultius en discontinu	125
4.1.3.	Cultius en semicontinu	132
4.1.4.	Conclusions.....	148
4.1.5.	Selecció de la soca de treball	149
4.1.6.	Definició d'objectius.....	149
4.2.	Millores a la instal·lació experimental	151
4.2.1.	Anàlisi de gasos	151
4.2.2.	Mesura de la concentració de metanol	154
4.2.3.	Sistema automàtic d'extracció de mostres	170
4.2.4.	Programari de monitorització i control	174
4.3.	Estimació, modelització i control.....	205
4.3.1.	Mesura i Estimació de la biomassa	205
4.3.2.	Control de la concentració de substrat.....	223
4.4.	Experiments finals.....	277
4.4.1.	Experiment 1.....	280
4.4.2.	Experiment 2.....	283
4.4.3.	Experiment 3.....	286
4.4.4.	Experiment 4.....	289
4.4.5.	Comparació i discussió	292
5.	CONCLUSIONS.....	299
6.	BIBLIOGRAFIA	303
6.1.	Bibliografia citada	304
6.2.	Publicacions personals	316
7.	APÈNDIX	317
7.1.	Nomenclatura	319
7.2.	Calibratges.....	321
7.2.1.	Calibratge de la biomassa total	321
7.2.2.	Calibratge de l'activitat lipolítica	322
7.2.3.	Calibratge de la concentració de la proteïna total	323

PRESENTACIÓ

El treball que es presenta a continuació s'ha realitzat als laboratoris del *Departament d'Enginyeria Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB), dins el programa de Doctorat en Biotecnologia.

Aquest forma part del projecte espanyol, assignat al mateix centre, titulat "Optimizació del sistema de producció de proteïnes heteròlogas en *Pichia pastoris*: Aplicación a la producció de lipasas i proteïnes terapéuticas." (CYCYT. PPQ2001-1908). Investigador principal: Dr. Francisco Valero Barranco.

Es parteix d'uns coneixements previs sobre la producció de lipasa del fong *Rhizopus oryzae* expressada en el llevat metilotròfic *Pichia Pastoris* (Serrano, 2002). El desenvolupament i posterior implementació de nombrosa instrumentació ha permès augmentar el coneixement sobre el comportament del creixement d'aquest llevat, tant en cultiu discontinu com semicontinu.

Això ha estat possible gràcies a la interacció d'un ampli espectre de coneixements que van des dels més purament biològics fins als de tipus més pràctic del muntatge. La combinació de les diferents especialitats, dóna una idea del caràcter multidisciplinari que ha de tenir un treball d'aquest tipus.

Avui en dia, sigui quin sigui l'objectiu final de la investigació, és pràcticament inevitable, i més accentuadament en el camp de la Biotecnologia, la combinació entre les diverses i a priori distants branques de la ciència. Aquest treball n'és un clar exemple, on es reuneixen múltiples disciplines al voltant d'un mateix objectiu.

Es creu que una de les principals aportacions d'aquest treball ha estat establir una base sòlida d'eines i tècniques per l'estudi més amb profunditat de la producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*. Durant la realització d'aquesta Tesi, s'han anat veient possibles noves línies d'investigació, que poden ser estudiades en un futur proper.

RESUM

Aquesta memòria continua els estudis per la millora de la producció de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*. Es disposava inicialment de quatre soques d'aquest llevat que es diferenciaven per les característiques fenotípiques (Mut^s i Mut⁺), segons la seva capacitat d'assimilar el metanol i el nombre de còpies del gen hoste integrats al seu ADN.

En una primera tanda d'experiments es va seleccionar quina de les quatre construccions de la soca de *P.pastoris* tenia millors característiques per la seva utilització com a sistema de producció de ROL. Per aquest fi, es van realitzar cultius en discontinu i semicontinu, on a part de tenir en compte la quantitat final de proteïna produïda es va sospesar altres característiques del cultiu com poden ser el temps de cultiu, l'aparició de proteases o la velocitat de consum de nutrients.

A continuació, es van realitzar nombroses millores per aconseguir incrementar la robustesa i reproductibilitat del cultiu. Aquest pas va comportar la instal·lació de més instrumentació per la determinació en temps real dels paràmetres biològics i l'automatització de gran part de les tasques que es realitzaven de forma manual, com pot ser la recollida de mostres. Paral·lelament, es va anar construint un programari capaç de recollir i mostrar tota la informació generada en el cultiu. També es va incloure en aquest la capacitat gestionar gran part de les variables controlades, permetent el control absolut de la fermentació de forma remota.

La producció de la proteïna d'interès (ROL) s'indueix per la utilització del metanol com a única font de carboni. Una de les prioritats d'aquest treball ha estat el control de la concentració d'aquest substrat a l'interior del bioreactor, ja que és tòxic a concentracions superiors als 8 g·l⁻¹. De l'avaluació de diferents possibilitats per al control d'aquesta variable es va optar per emprar un sensor de metanol connectat al corrent gasós de sortida del bioreactor.

S'han desenvolupat un conjunt de controladors per mantenir de forma precisa i robusta la concentració de metanol constant al interior del fermentador. De tots aquests, els millors resultats s'han obtingut d'una algorisme de control predictiu basat en model, que calcula el consum de metanol en línia i s'acaba d'ajustar al valor desitjat amb un controlador PI (Proporcional Integral). Totes aquestes proves es van realitzar en cultius semicontinus de *Pichia Pastoris* amb fenotip Mut^s amb una sola còpia del gen de ROL.

Finalment, es va estudiar l'efecte de la concentració de metanol sobre la producció de ROL obtenint els millors resultats quan es manté la concentració del substrat inductor constant al voltant de 1 g·l⁻¹.

*En teoria,
no existeix la diferència
entre teoria i pràctica;
a la pràctica si que hi és.*

Jan L.A. van de Snepscheut

Als meus pares i a la Mireia,

AGRAÏMENTS

En primer lloc a en Paco i a en José Luis, on a part de destacar la seva contrastada qualitat científica i docent, m'han demostrat la seva vàlua com a persones. Gràcies per la vostra paciència, dedicació i comprensió.

Al Javier Lafuente per ser-hi sempre quan el necessites, per fer-me veure la llum quan he estat immers en la foscor.

A l'omnipresent Juan Baeza, on a part de l'amistat vull agrair-li cadascuna de les innumerables vegades que m'ha ajudat desinteressadament.

A la Gemma, Fernando i Ramon, el millor que m'emporto de la carrera, una amistat incondicional que espero que perduri per sempre més.

Als "lipaseros" de diferents generacions; Dolors, Pau, Alberto, Alícia, Toni, Eva, Aina, David, Anna S., Anna U., Manuel i d'altres que em deixo.

A la resta del departament per la seva calorosa acollida, amistat i suport. A tots, gràcies.

Als alumnes de les diferents titulacions a on he impartit classe, a qui espero haver contribuït humilment a ampliar els seus coneixements.

Als meus pares, un exemple a seguir en tots els aspectes, que m'han ensenyat entre d'altres coses, a tirar endavant en moments complicats i a valorar el que realment és important.

A la meva Mireia, pedra angular en la meua vida, amb qui desitjo seguir construint dia a dia el nostre projecte comú.

Als meus germans, Jeroni, Dolors, Miquel i Judit amb qui ens uneix un lligam més enllà del genètic.

A tota la família; avis, nebots, cunyats, tiets, sogres i cosins, a la que és realment un orgull pertànyer.

A tota la colla del CAU, imprescindibles i insubstituïbles. Que seria de mi sense poder desconnectar el cap de setmana; sigui anant en bici, de marxa o fent una BBQ. Gràcies a tots.

Finalment, als milers de milions de cèl·lules de *Pichia pastoris* que he cultivat i amb les quals he compartit intenses jornades, tant diürnes com nocturnes.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. SISTEMES D'EXPRESSIONI DE PROTEINES HETEROLOGUES

En l'última dècada, ha augmentat de forma exponencial la producció de proteïnes recombinants d'interès terapèutic o industrial. Aquesta metodologia ja s'ha integrat totalment en els processos de producció en totes les empreses biotecnològiques.

Les fases necessàries per a la producció comercial de proteïnes recombinats són:

- ▶ Clonació del gen en un vector d'expressió.
- ▶ Transformació del microorganisme hoste.
- ▶ Procés de selecció dels transformants.
- ▶ Creixement i expressió de la proteïna en bioreactors.
- ▶ Separació i purificació de la proteïna.

El tipus de sistema a utilitzar es selecciona en funció de diferents paràmetres, com el rendiment de la producció de proteïna, les modificacions i el processament transduccional, el plegament i la glicosilació de la proteïna d'interès, la viabilitat econòmica, el posterior procés de purificació, etc...

A la taula 1.1 es descriuen alguns dels avantatges i desavantatges dels principals sistemes d'expressió utilitzats (Rai et al., 2001).

	Avantatges	Desavantatges
Cèl·lules de mamífers	- Producció correcta de proteïnes de mamífers.	- Elevat cost del medi de cultiu. - Sistema de cultiu molt complex. - Creixement molt lent.
Cèl·lules d'insectes	- Rendiments elevats. - Plegament de les proteïnes correctes. - Modificacions postraduccionals.	- Cost elevat dels medis de cultiu. - Creixement lent. - Produeixen proteïnes de mamífers però no glicosilen correctament.
Llevats i fongs	- Rendiments elevats - Modificacions postraduccionals. - Sistemes d'excreció de proteïnes extracel·lular. - Purificació simple. - Nombre de vectors d'expressió en augment. - Medi relativament econòmic.	- Degradació de proteïnes al medi per la presència de proteases. - Creixement més lent que les bacteries.
Bacteris	- Fisiologia simple. - Temps de generació curts. - Medis de cultiu simples i econòmics. - Nombre de vectors d'expressió.	- Rendiments baixos per la poca estabilitat. - Producció de proteïnes tòxiques. - No realitzen modificacions postraduccionals.

Taula 1.1. Avantatges i desavantatges dels principals sistemes d'expressió de proteïnes heteròlogues.

Tot i poder classificar de forma generalista les virtuts i problemes que presenta cadascun dels sistemes d'expressió, la selecció del sistema d'expressió depèn de múltiples factors, que s'han d'estudiar d'una forma més detallada i individual.

No obstant això, la maximització de la producció de proteïnes heteròlogues per ús comercial és encara un art (Rai et al., 2001). Es considera que actualment encara s'està als primers passos del coneixement dels diferents sistemes, ja que molts dels factors dels que es pensa que depèn la producció, s'optimitzen de forma empírica.

1.1.1. LLEVATS COM A SISTEMA D'EXPRESSIONI

El sistema de producció de proteïnes heteròlogues per llevats es considera superior a les bacteries ja que aquestes primeres poden glicosilar, acetilar, plegar i realitzar altres modificacions postraduccionals a les proteïnes eucariotes, accions imprescindibles per aconseguir la seva funcionalitat.

Sens dubte, el llevat més estudiat i utilitzat és *Saccharomyces cerevisiae*, no tant sols antigament per la seva vinculació amb la fermentació del pa i el vi, sinó també va ser el primer llevat utilitzat per la genètica moderna. Una mostra d'aquest fet és que el seu genoma va ser completament seqüenciat l'any 1996.

Van Burt et al. (1986) va realitzar per primera vegada l'expressió d'una vacuna per la Hepatitis B en un llevat (*S. cerevisiae*). Aquest fet va propiciar una augment espectacular de l'ús dels llevats com a sistemes d'expressió. A més, la classificació de molts d'ells com a microorganismes de tipus GRAS (**G**enerally **R**egarded **A**s **S**afe), generalment reconegudes com a segures, ha causat una ràpida expansió d'aquest sistema d'expressió.

Dins totes les possibilitats que brinden els llevats, existeixen els que tenen la capacitat de consumir metanol com font de carboni i energia. Les característiques d'aquest reduït grup de llevats els fa especialment interessants per utilitzar-los com a sistema d'expressió de proteïnes.

Llevats metilotròfics

A finals dels anys seixanta es va descobrir l'existència d'alguns llevats metilotròfics (Ogata et al., 1969), és a dir, microorganismes amb la capacitat d'utilitzar el metanol com a única font de carboni. El nombre de llevats que tenen aquesta característica es limita a quatre gèneres molt relacionats entre sí; *Hansenula*, *Pichia*, *Turolopsis* i *Candida* (Tani et al., 1978).

Inicialment l'únic interès d'aquests llevats era per utilitzar-los com a aliment per animals a partir d'excedents de metanol sobrants de la indústria petroquímica, atès el seu baix cost. El seu major contingut en vitamines, lípids, àcids nucleics i aminoàcids aconsellava el seu ús davant altres bacteries també capaces de créixer amb metanol.

Durant aquest període es van realitzar molts avenços amb l'optimització del medi de cultiu, la configuració del bioreactor i les condicions d'operació. Però l'augment del preu dels derivats del petroli cap als '70, va disminuir fortament l'ús i en conseqüència també la investigació al voltant d'aquest tipus de microorganismes.

No és fins a la dècada dels '90 quan torna l'interès per aquests llevats, però amb un objectiu totalment diferent, com a sistema per a l'expressió de proteïnes heteròlogues.

Van ser els investigadors de SIBIA (Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates, Inc.) als EUA que van aïllar els gens i promotors de *Pichia pastoris* útils per a l'expressió de proteïnes forànies. Van estandarditzar tots els passos i compostos necessaris per aconseguir optimitzar la metodologia d'integració d'una proteïna hoste a la soca de *P. pastoris*. Al 1993, Invitrogen Corporation va aconseguir la llicència per explotar comercialment aquest sistema d'expressió (Lin Cereghino, 2000).

A part de l'obtenció de proteïnes heteròlogues, els llevats metilotròfics s'han utilitzat per altres aplicacions derivades de les seves particulars característiques. Una d'elles ha consistit en utilitzar-la com a font per l'obtenció d'aminoàcids com la L-Valina, L-Treonina o L-Lisina (Okumura et al., 1970). També han estat emprats per a la producció d'alguns enzims i metabòlits associats al procés d'assimilació del metanol. Per exemple, en el cas de *Pichia pastoris*, l'enzim de l'alcohol oxidasa que catalitza el primer pas de la reacció de l'oxidació de metanol que pot arribar a significar més del 30 % de la proteïna total soluble quan s'utilitza el metanol com a única font de carboni (Cregg et al., 1987).

Aquest enzim és utilitzat principalment en la detecció dels nivells d'alcohol en "kits" de diagnòstic. També és emprat per la indústria de detergents, on s'inclou en la seva composició ja que un dels productes resultants de les reaccions on intervé és el peròxid d'hidrogen, substància blanquejant (Unilever, 1987). Més recentment, s'ha immobilitzat a l'interior d'un biosensor per a la detecció de la presència de formaldehid (Korpan et al., 2000).

Metabolisme del metanol en els llevats metilotròfics

El tret comú en tots els llevats metilotròfics és la seva capacitat per metabolitzar el metanol com a única font de carboni i energia (Higgins et al., 1998).

A continuació (Figura 1.1) es presenta esquemàticament de forma resumida, les principals reaccions del metabolisme de degradació del metanol en aquests llevats.

L'alcohol oxidasa (AOX) és l'enzim responsable de catalitzar el primer pas de la ruta de degradació del metanol fins a formaldehid obtenint també com a subproducte peròxid d'hidrogen. Aquest últim és un component tòxic per a la cèl·lula i per això s'utilitzen les catalases per degradar-lo. Aquest procés consumeix oxigen, utilitzat com a acceptor final d'electrons. A diferència dels bacteris metilotròfics, aquesta reacció es porta a terme a l'interior dels peroxisomes.

El pes molecular de l'AOX és d'aproximadament 600 kDa (Van Dijken et al., 1976) i com ja s'ha apuntat anteriorment, pot arribar a representar fins a un 30 % del total de proteïna cel·lular, segurament per compensar la baixa afinitat de l'enzim per als substrats (Metanol i oxigen) (Cregg et al., 1989). Aquest fet és molt important, ja que l'expressió de les proteïnes heteròlogues es troben sota el promotor del gen que el codifica per aquest enzim. Per tant, una elevada síntesi d'aquest enzim es tradueix en una gran producció de la proteïna hoste.

De l'oxidació completa del metanol en els llevats metilotròfics se'n poden diferenciar dos tipus de vies metabòliques. La primera correspon a la via dissimilatòria, també coneguda com de generació d'energia. Aquesta és situada

esquemàticament a la part superior de la figura 1.1., i comença amb la sortida del formaldehid de l'interior del peroxisoma. Aquest compost passa per diferents reaccions fins obtenir diòxid de carboni i energia en forma de NADH. És conegut que en llevats metilotròfics, part de l'energia necessària per l'activitat cel·lular s'obté de l'oxidació d'aquest NADH en el citosol.

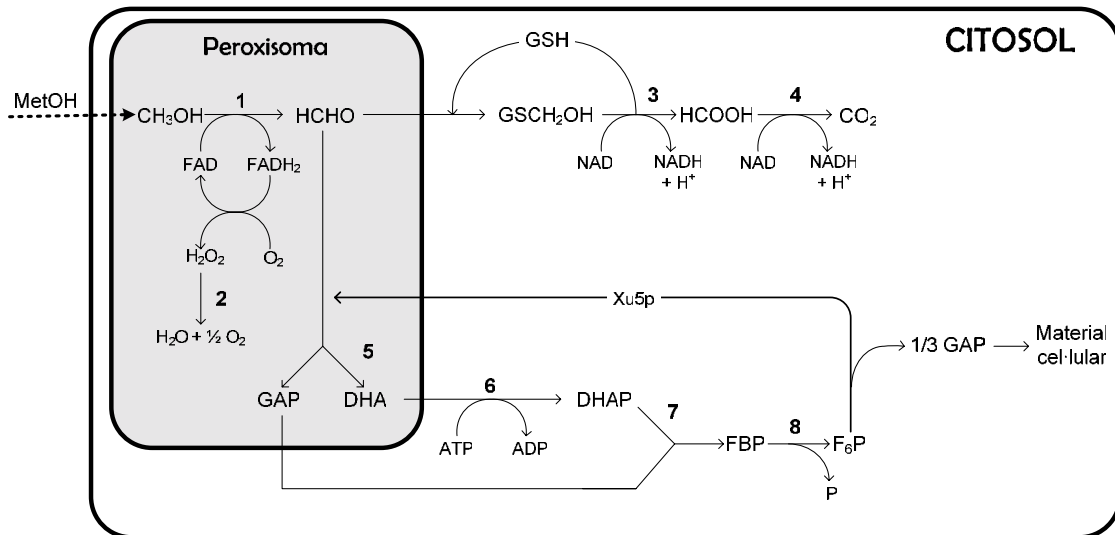


Figura 1.1. Metabolisme del metanol en llevats metilotròfics. Enzims: 1: Alcohol oxidasa (AOX). 2: Catalasa. 3: formaldehid deshidrogenasa (FLD). 4: Format deshidrogenasa (FMD). 5: dihidroxicetona sintasa (DAS). 6: dihidroxicetona quinasa. 7: fructosa-1,6. bifosfat aldolasa. 8: Fructosa-1,6.- bifosfat fosfatasa. Metabolits: CH₃OH: Metanol, HCHO: formaldehid, GSCH₂OH: S-formilglutitona, HCOOH: format, CO₂: diòxid de carboni, GAP: gliceraldehid monofosfat, DHA: dihidroxiacetona, DHAP: dihidroxiacetona fosfat, FBP: fructosa 1,6-bifosfat, F₆P: fructosa 6-fosfat, Xu5P: xilulosa monofosfat.

D'altra banda, hi ha la via que a partir de formaldehid s'arriba a la formació d'enllaços carboni-carboni per la generació de material cel·lular. En aquesta via es realitza bàsicament la condensació de trioses, provinents del formaldehid inicial, en hexoses. El balanç net de la via és la formació d'un mol de trioses (DHA i GAP) per cada tres mols de formaldehid i 3 mols d'ATP (Goodman et al., 1985).

Finalment, comentar l'estreta relació entre la utilització del metanol amb la proliferació dels peroxisomes a l'interior del llevat. Aquest orgànel conté en el seu interior un gran nombre d'enzims metabòlics involucrats directament amb la β-oxidació dels àcids grassos, l'eliminació del peròxid d'hidrogen i l'oxidació del metanol (Subramani, 1998).

Com s'observa a la figura 1.2 els canvis a l'interior del llevat són evidents en funció de la font de carboni emprada. A la imatge esquerra (A) es presenta una micrografia de l'interior d'una cèl·lula de *Pichia pastoris* creixent en glicerol, i com s'aprecia no es detecta l'existència de peroxisomes. En canvi, quan el mateix microorganisme creix en metanol (imatge dreta, B) l'aparició d'aquest orgànel és evident.

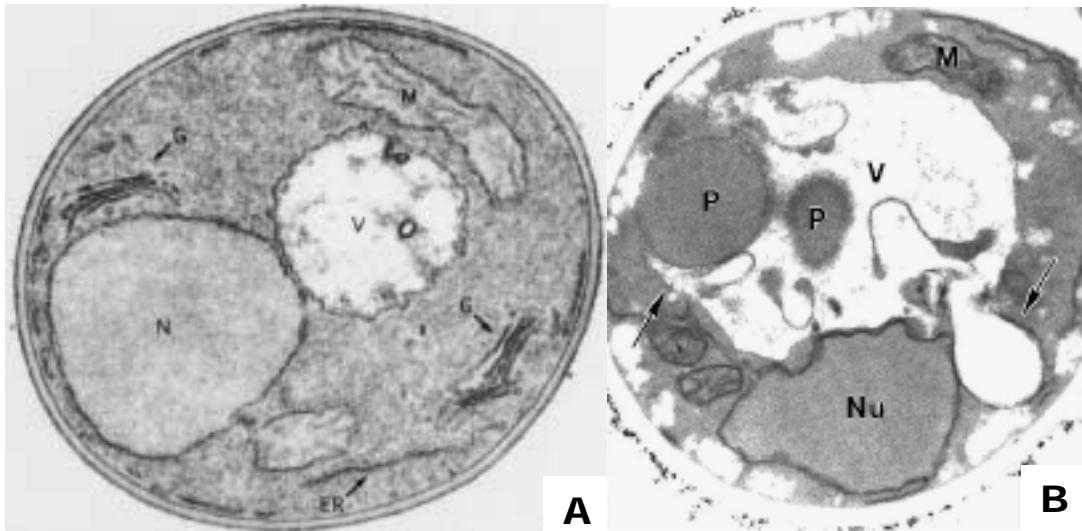


Figura 1.2. Secció d'una cèl·lula de *Pichia pastoris* creixent en glicerol (A) (Rossanese et al., 1999) i amb metanol (B) (Yuan et al., 1999). N o Nu: Nucli, G: Aparell de Golgi, M: mitocòndria, V: vacuola, P:peroxisoma, ER:reticle endoplasmàtic.

Actualment ja s'han identificat els complexos mecanismes i les proteïnes involucrades en l'aparició i desaparició d'aquests orgànuls en funció de la font de carboni consumida (Rossanese et al., 1999).

1.2. PICHIA PASTORIS

P. pastoris és un llevat metilotròfic facultatiu que pertany al grup dels ascomicets, es reproduïx per gemmació, homotàlic i la seva dotació genòmica és de tipus haploide (Lin Cereghino et al., 2000).

La classificació taxonòmica del llevat *Pichia pastoris* (TaxId:4922, Swiss-Prot) és:

Regne: *Fungi*
Phylum: *Ascomycycota*
Subphylum: *Saccharomycotina*
Classe: *Saccharomycetes*
Ordre: *Saccharomycetales*
Família: *Saccharomycetaceae*
Gènere: *Pichia*
Especie: *Pastoris*

Les principals fonts de carboni que pot assimilar *P.pastoris* són la glucosa, metanol, glicerol, etanol, L-ramanosa, trehalosa, D-Manitol i D-glucitol. Com a font de nitrogen principalment assimila l'amoni.

1.2.1. PER QUÈ PICHIA PASTORIS?

Pichia pastoris ha esdevingut un dels sistemes més utilitzats per a l'expressió de proteïnes heteròlogues per diferents factors (Lin et al., 2002), entre ells els més importants són:

- ▶ Com qualsevol llevat, *Pichia pastoris* és un microorganisme unicel·lular de fàcil manipulació i cultiu. La seva similitud amb *S. cerevisiae* fa que totes les tècniques de manipulació genètica desenvolupades per aquest últim siguin fàcilment aplicables a *Pichia pastoris*.
- ▶ No produeix fenòmens de hiperglicosilació de les proteïnes heteròlogues com *S.cerevisiae*, disminuint les respostes immunogèniques de les proteïnes d'organismes superiors.
- ▶ En tractar-se d'un microorganisme eucariota li aporta un gran nombre d'avantatges ja que es capaç de realitzar modificacions postraduccional (plegament, enllaços disulfur, glicosilació, etc...) a les proteïnes expressades.
- ▶ S'aconsegueixen grans nivells d'expressió de proteïnes hostes intra- i extracel·lulars en medi sintètic i barat.
- ▶ L'existència del promotor de l'expressió del gen d'AOX de fàcil manipulació, simple, eficient i fortament regulat per la presència de metanol al medi. Aquesta és sens dubte una de les principals propietats que justifiquen el seu èxit.
- ▶ La gran preferència de *P.pastoris* per un creixement respiratori facilita enormement que s'aconsegueixi arribar a elevades densitats cel·lulars en comparació amb els llevats fermentatius.

- ▶ Aquest sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues té força èxit ja que es caracteritza per ser un mètode ràpid, fàcil i barat (Invitrogen, 2000) comparat amb els sistemes d'expressió d'eucariotes superiors, com la utilització de cèl·lules d'insectes o mamífers.
- ▶ *P.pastoris* no excreta pràcticament proteïnes natives al medi extracel·lular, facilitant d'aquesta forma la recuperació i posterior procés de purificació d'aquelles proteïnes produïdes (quan la seva expressió és extracel·lular).
- ▶ En tractar-se d'un microorganisme haploide significa que qualsevol modificació genètica es manifesta fenotípicament a generacions posteriors.

1.2.2. PROMOTOR DE L'AOX1 (P_{AOX1})

Com s'ha apuntat anteriorment, l'enzim alcohol oxidasa és emprat en la primera reacció d'oxidació del metanol. La seva síntesi està regulada pel promotor P_{AOX1}, fortament reprimat quan *Pichia pastoris* està creixent en la majoria de fonts de carboni (glucosa, glicerol, etc..) i pel contrari, ràpidament induït en presència de metanol com a única font de carboni.

Cal saber però que *P.pastoris* produeix dos enzims d'alcohol oxidasa, conegudes com alcohol oxidasa 1 (AOX1) i alcohol oxidasa 2 (AOX2). Tot i no ser exactament iguals, (similitud entre seqüències codificants del material genètic sobre el 92%), l'alcohol oxidasa generada per cadascun d'ells només es diferencia en un 5 % en composició aminoacídica i un 3 % en quan a activitat específica (Koutz et al., 1989).

L'existència de dos gens que codifiquen pràcticament la mateixa proteïna sembla ser que és d'origen evolutiu. La majoria d'estudis en aquesta sentit apunten que fa més de cent milions d'anys es va produir un fenomen de duplicació genòmica en alguns llevats i una translocació recíproca entre fragments d'ADN que van generar seqüències homòlogues dispersades com parelles de regions duplicades al llarg del genoma (Seoighe et al., 1998). A l'igual que en *P.pastoris* aquest fenomen també es reproduïx en altres llevats com *S. cerevisiae*, particularment amb l'enzim alcohol deshidrogenasa (ADH1 i ADH2) (Cregg et al., 1989).

En referència als gens AOX1 i AOX2 de *P.pastoris* cal saber que ambdós semblen estar regulats de forma similar. No obstant això, els nivells de transcripció de cadascun d'ells és clarament diferent. Del total d'alcohol oxidasa generada pel llevat, el 90 % prové del gen d'AOX1 i només el 10 % restant està codificat pel gen d'AOX2 (Cregg et al., 1989).

Aquesta elevada transcripció del gen AOX1 és un dels principals motius pel qual s'utilitza el promotor d'aquest gen per a l'expressió de proteïnes heteròlogues en *P.pastoris*.

La regulació de la transcripció del gen AOX1 està sotmesa a dos tipus de mecanismes, per una banda la coneguda i característica inducció específica per metanol i la repressió/derepressió per catabòlit. No obstant això, és només per la inducció pel metanol que hi ha nivells de transcripció d'enzim significatius. L'exhauriment de fonts de carboni repressores com la glucosa o glicerol, per tant la conseqüent derepressió per catabòlit, no és suficient per produir quantitats significatives del gen AOX1 (Harder et al., 1987, Tschopp et al., 1987). Cal

assenyalar que aquest fet no es compleix de la mateixa manera a la resta de llevats metilotròfics, com per exemple per a l'enzim metanol oxidasa i format deshidrogenasa de *H. polymorfa* i *C. boidinii* (Mayer et al., 1999).

La gran majoria de vectors d'expressió dissenyats per a *P.pastoris* contenen el promotor P_{AOX1} i per tant sotmesos a la inducció per metanol. Com es veurà posteriorment, el disseny del cultiu vindrà molt condicionat per les característiques de regulació d'aquest promotor.

1.2.3. VECTORS D'EXPRESSIÓ

Tots els vectors utilitzats per a l'expressió de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris* estan formats per:

- ▶ Un promotor de la transcripció.
- ▶ Una o més ubicacions de restricció (on clonar el gen de la proteïna desitjada).
- ▶ Una seqüència terminal 3' de la mateixa *P.pastoris* per assegurar la correcta transcripció del gen.
- ▶ Un marcador de selecció per a *P. pastoris*.
- ▶ Seqüència de replicació i selecció d'*E. coli*.

La majoria d'aquests plasmidis es recombinen amb les zones homòlogues del genoma de la cèl·lula assegurant la seva major estabilitat, és a dir, que s'integren al ADN. Per tant, a l'interior dels vectors s'inclouen zones homòlogues del genoma de *P.pastoris* per dirigir a un punt específic la clonació. Les zones homòlogues més utilitzades en aquest llevat són una part del gen d'AOX1 o del gen HIS4 (histinol deshidrogenasa). L'ús d'aquest últim està limitat a les soques de *Pichia pastoris* auxotròfiques de l'aminoàcid d'histidina. Alguns vectors, a més d'incloure el gen HIS4 contenen un segon marcador cel·lular, el gen de la kanamicina o ampilicina, ambdós provinents d'*E.coli* que ofereixen resistència a la droga G418 (Higgins et al., 1998). No obstant això, la utilització d'aquest tipus de vectors incrementa la dificultat de la clonació i posterior transformació, ja que la inclusió de HIS4 conjuntament amb la resistència a l'antibiòtic augmenta considerablement el pes molecular del vector.

Com a alternativa a aquest conjunt de vectors, existeixen un altre grup on s'utilitza la zona homòloga 3' del gen AOX1 amb un marcador de menors dimensions com és el gen SH BLE (*Streptoalloteichus hindustanus*). Aquest últim permet la resistència a l'antibiòtic bleomicina Zeocina eficaç en la majoria de llevats i altres eucariotes (Gatignol et al., 1988). La principal virtut d'aquest tipus de vectors, respecte als quals utilitzen HIS4, és la substancial reducció de la seva mida, millorant també la seva manipulació durant la fase de clonació.

L'elecció del vector també vindrà condicionada pel tipus de proteïna que es desitja obtenir. En el cas que la proteïna sigui citosílica i no glicosilada es pot escollir expressar la proteïna de forma intracel·lular. Pel contrari, si la proteïna es glicosila i es desitja obtenir-la extracel·lularment hi ha vectors que inclouen el senyal específic d'excreció de *P.pastoris* o el senyal del factor "alpha" de *S.cerevisiae*, que realitza la mateixa funció.

Actualment la llista de vectors disponibles per *P.pastoris* és força extensa ja que contínuament s'estudia amb nous marcadors i es té més coneixement sobre l'aïllament de gens. Malgrat això, comercialment el nombre de vectors és més reduït, tot i que ja ocupen àmpliament el ventall de possibilitats requerides pels investigadors (Lin Cereghino et al., 2000).

1.2.4. SOQUES D'EXPRESSIONIÓ

Totes les soques de *Pichia pastoris* utilitzades per a l'expressió de proteïnes heteròlogues provenen de la soca NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL). Aquesta soca té una mutació en el gen histinol deshidrogenasa (HIS4), pel qual el seu creixement en medis mínims o sintètics requereix el suplement d'histidina. La seva auxotròfia per histidina s'indica amb el símbol His⁻, que pel contrari, en el cas que el mateix microorganisme sigui capaç de sintetitzar aquest aminoàcid s'indica com His⁺.

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, els vectors més comuns per a la inclusió del gen de la proteïna desitjada a l'interior del microorganisme són dirigits mitjançant la inclusió de zones homòlogues del gen HIS4 o d'AOX1 de *P.pastoris*. Si s'utilitza un vector amb HIS4, es poden seleccionar les soques correctament transformades per a la reversió de la seva auxotròfia per histidina, és a dir, que queden com a His⁺.

La utilització del vector d'expressió, emprant la regió 3' del gen que codifica l'AOX1 com a zona homòloga, pot comportar en alguns casos la deleció del gen d'alcohol oxidasa.

En el cas que hi hagi una deleció del gen d'AOX1 (Figura 1.3) es canvia per complet el comportament de la soca de *P.pastoris* quan s'utilitza metanol com a única font de carboni, ja que es disminueix en un 90 % la quantitat d'AOX a l'interior de la cèl·lula. Només està operativa l'aportació de l'AOX2 fent que la metabolització del metanol per part de la nova soca sigui molt més lenta. Les soques amb aquesta característica són conegudes amb l'acrònim de Mut^s (**M**ethanol **u**tilitization **s**low).

Si pel contrari, la inserció del vector a l'interior del genoma no implica la interrupció del gen AOX1 (Figura 1.4), ambdós enzims d'alcohol oxidasa (AOX1 i AOX2) estan operatius, llavors la soca s'anomena Mut⁺ (**M**ethanol **u**tilitization **p**lus).

El comportament de les dues soques és exactament idèntic quan s'utilitza una font repressora de l'expressió de l'AOX com la glucosa o el glicerol. Ara bé, si s'empra el metanol com a única font de carboni, les diferències entre les dues soques Mut^s i Mut⁺ són clarament apreciables, ja que varia substancialment la quantitat d'AOX sintetitzada. Segons el tipus de fenotip utilitzat varia significativament la capacitat de metabolització d'aquest substrat i en conseqüència, la velocitat de creixement.

Comercialment es poden trobar soques d'ambdós fenotips, inclús alguna soca de tipus Mut⁻, que es caracteritza per la supressió dels dos gens d'AOX (AOX1 i AOX2). Aquesta última no és capaç de metabolitzar el metanol però necessita la seva presència per l'expressió de la proteïna d'interès ja que igualment s'utilitza el promotor de l'AOX desactivada. (Cregg et al, 1998).

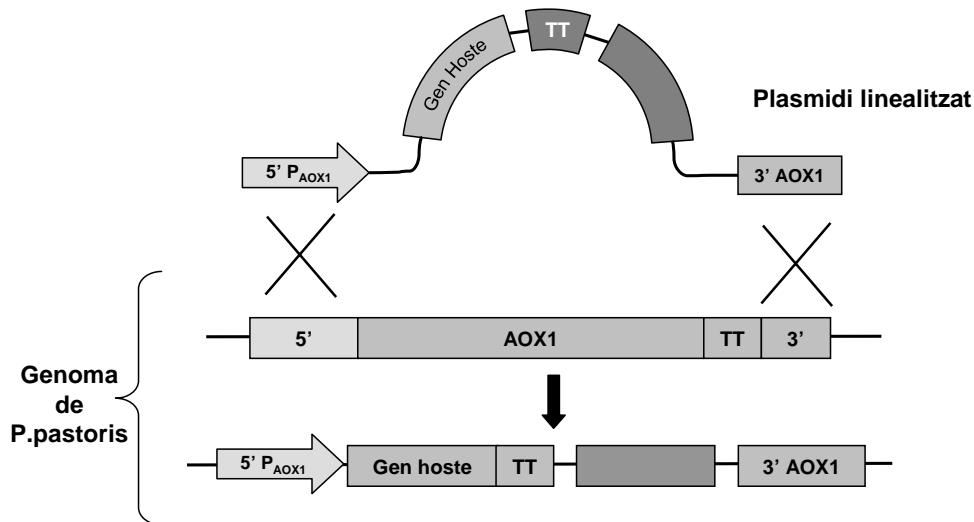


Figura 1.3. Recombinació doble entre els extrems homòleg del plasmidi i el genoma de *P.pastoris* que suposa la inserció del gen hoste mitjançant la pèrdua del gen AOX cel·lular. El fenotip resultant d'aquesta operació és de tipus *Mut^s*.

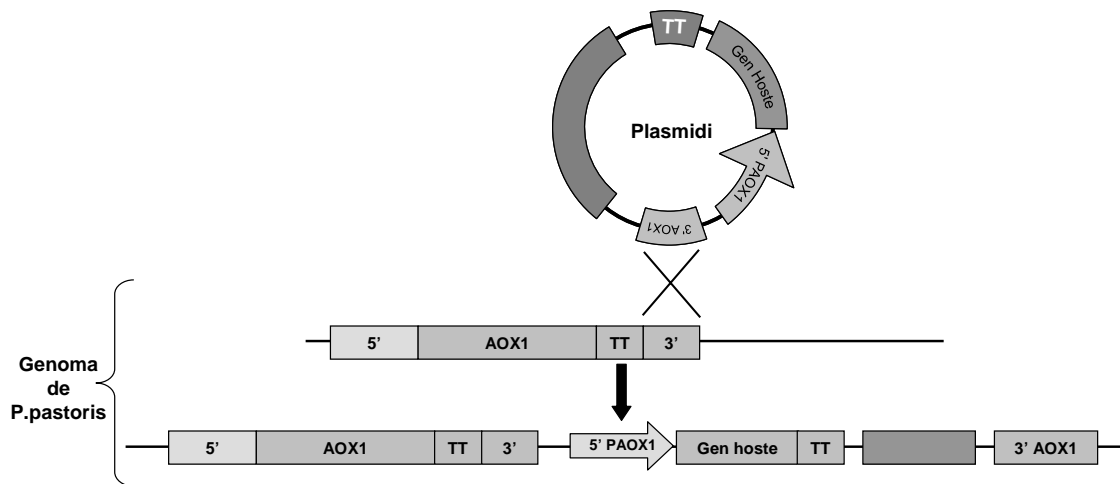


Figura 1.4. Integració del plasmidi al genoma de *Pichia pastoris* per l'intercanvi de la zona homòloga 3', deixant inalterada la seqüència de transcripció de l'AOX1. El fenotip resultant és de tipus *Mut⁺*.

Es possible incloure múltiples còpies del gen hoste al genoma de *Pichia pastoris* augmentant teòricament, la quantitat de proteïna produïda cada vegada que es realitzi una transcripció. El mecanisme per obtenir una soca d'aquest tipus es basa en una repetició de la inserció del plasmidi en la zona homòloga 3' annex al gen de l'AOX (Figura 1.5). Aquesta modificació es pot realitzar igualment pels dos fenotips possibles (*Mut⁺* i *Mut^s*).

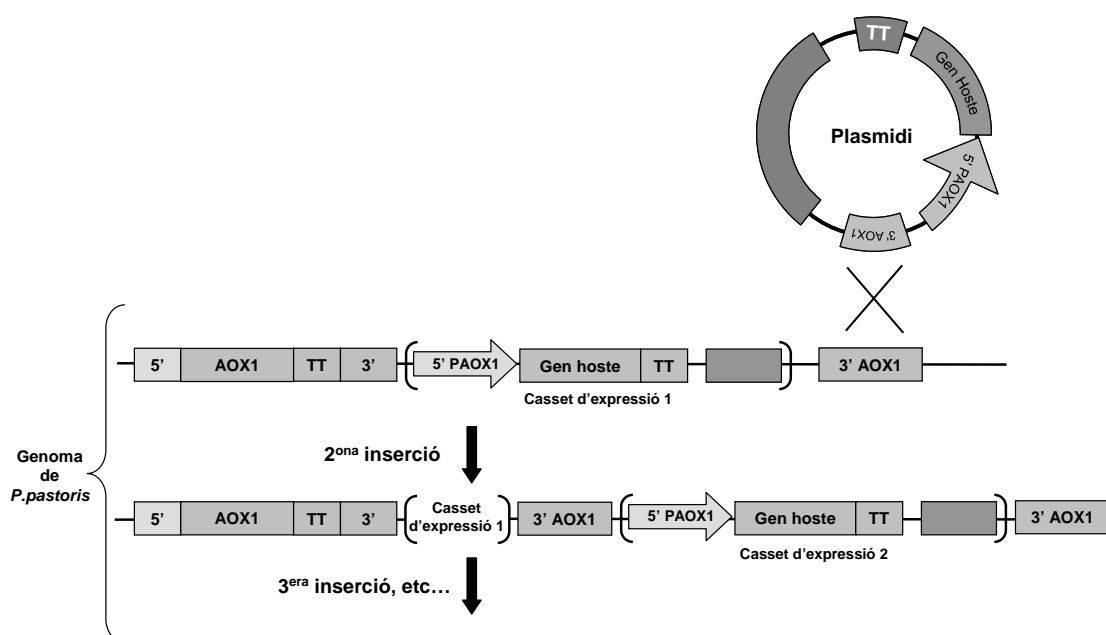


Figura 1.5. Construcció de la soca multicòpia mitjançant les repetides insercions del plasmidi a la zona homòloga 3' del genoma de *P.pastoris*. Exemple per una soca de tipus *Mut*⁺.

A continuació es presenten algunes de les soques de *P.pastoris* de les que es disposa comercialment (Taula 1.2) (Higgins et al., 1998).

Identificació de la soca de <i>P.pastoris</i>	Genotip	Fenotip
GS115	HIS4	<i>Mut</i> ⁺ <i>His</i> ⁻
KM71	<i>aox1Δ::SARG4 his4 arg4</i>	<i>Mut</i> ^s <i>His</i> ⁻
X-33	Wt (GS115 revertida)	<i>Mut</i> ⁺ <i>His</i> ⁺
MC100-3	<i>aox1Δ::SARG4 aox2Δ::phis4 his4 arg4</i>	<i>Mut</i> ⁻ <i>His</i> ⁻

Taula 1.2. Alguns exemples de les soques comercials de *P.pastoris*.

També es poden trobar al mercat algunes d'aquestes soques deficientes en expressió de proteases. Com es veurà en apartats posteriors, la lisi de la biomassa en cultius d'elevada densitat cel·lular allibera al medi nombroses proteases vacuolars que degraden les proteïnes del medi, entre elles la proteïna d'interès. Malgrat això, tot i la deleció de dues o tres de les proteases més abundants, i donada la quantitat de diferents tipus de proteases existents, és difícil aconseguir una soca totalment defectiva en degradació proteolítica. Comercialment però, ja es disposa d'aquest tipus de soques de fenotip *Mut*⁺ *His*⁻ proteasa⁻, conegudes amb el nom de SMD 1163, SMD 1165 i SMD 1168.

L'expressió de proteïnes heteròlogues sota el control del promotor del gen d'alcohol oxidasa, el *P*_{AOX1}, pot venir afectada per multitud de factors. Algunes d'elles són intrínseques del sistema d'expressió, com per exemple el tipus de fenotip seleccionat (*Mut*⁺, *Mut*^s o *Mut*⁻), la localització de la inserció dins el genoma cel·lular, el nombre de còpies del gen extern o si l'expressió és intra o extracel·lular. També són importants la quantitat i el tipus de modificacions post-traduccionals i l'estabilitat del seu mRNA (Gellisen G. 2000).

Per altra banda, els paràmetres físics com la temperatura, l'agitació o l'aeració també tenen un efecte directe sobre el nivell d'expressió, així com la composició del medi, el pH, o la força iònica del mateix.

És també significatiu, per aconseguir uns bons nivells de producció de la proteïna d'interès, el tipus d'estratègia de cultiu seleccionada i en quin moment s'ha de començar la inducció de l'expressió de la proteïna.

No ha estat demostrat, ni es creu possible trobar una combinació d'aquestes variables que sigui òptima per qualsevol proteïna heteròloga sota el control de P_{AOX1} en *P.pastoris*. Com s'ha pogut observar després de revisar nombrosa bibliografia, sembla ser que la naturalesa de proteïna heteròloga és la que determina amb més força quines són les condicions òptimes de producció. Trobar aquestes condicions es realitza, encara a l'actualitat, de forma empírica. No obstant això, si que és cert que es coneixen una sèrie de generalitats que poden centrar o orientar el rang dins el qual poden variar les diferents variables.

1.2.5. CULTIUS DE PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES HETERÒLOGUES

Es comú trobar en la majoria d'estudis de l'expressió de proteïnes heteròlogues en *P.pastoris* sota el control transcripcional de P_{AOX1} , la utilització de l'estratègia de cultiu en semicontinu ("fed-batch"). En pràcticament tots ells, es comença en un primera etapa en discontinu amb una font de carboni repressora de l'expressió de proteïna (habitualment glicerol o glucosa) amb l'únic objectiu de generar una gran quantitat de biomassa de forma ràpida. En aquesta etapa el comportament de les soques de diferent fenotip (Mut^+ , Mut^s i Mut^-) és exactament idèntic.

Seguidament s'indueix la producció de proteïna amb l'addició de metanol al medi. La presència de metanol com a única font de carboni i energia implica l'activació del P_{AOX1} per aconseguir elevats nivells d'expressió de la proteïna alcohol oxidasa (per l'assimilació de metanol), i del gen heteròleg desitjat clonat sota el mateix promotor. És en aquest apartat on es troben les principals diferències entre els diferents estudis que demostren que segons el tipus de metodologia seleccionada es poden obtenir resultats molt diferents.

El volum i la freqüència d'addició del metanol determinarà en molts casos l'aparició i acumulació de metabòlits secundaris tòxics (com el format o formaldehid). El mateix metanol, també té un efecte tòxic sobre *P.pastoris* a partir de concentracions superiors als $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, per tant, s'ha d'evitar la seva acumulació al medi.

Evidentment el tipus d'addició vindrà fortament condicionat per la capacitat d'assimilació de metanol de la soca de *P.pastoris* seleccionada, és a dir, pel seu fenotip Mut . Així doncs, la velocitat de consum de metanol per una soca Mut^+ i Mut^s és lògicament força diferent i en conseqüència el tipus d'addició també variarà.

Com es veurà més extensament a l'apartat de resultats i discussió, existeixen algunes tècniques per aconseguir mantenir la concentració del substrat inductor dins un rang raonable. Malgrat això, es presenten en moltes d'elles limitacions que provoquen el mal funcionament del cultiu en termes de producció. És en aquesta direcció que s'orienta una part important d'aquest treball, ja que s'intenta construir un sistema de control prou robust per tal de mantenir el més constant possible la concentració del substrat inductor, el metanol.

1.2.6. PROTEÏNES EXPRESSADES EN *PICHIA PASTORIS*.

Com apunta Lin Cereghino (2000), ja són més de 400 tipus de proteïnes heteròlogues expressades amb èxit en *P.pastoris*. A més, a part de l'elevat nombre, aquest llistat de proteïnes són de naturalesa molt diversa, des de les d'origen bacterià, les pròpies de llevats, plantes, d'animals invertebrats i vertebrats, i entre elles algunes d'origen humà.

Aquesta llista està creixent dia a dia de forma exponencial, ja que la utilització del llevat *P.pastoris* com a sistema d'expressió de proteïnes ha esdevingut un sistema de referència en el món acadèmic, de la investigació i industrial, gràcies als seus avantatges.

La quantitat produïda en cada cas depèn de nombroses variables, començant pel tipus de proteïna expressada i podent oscil·lar des dels pocs micrograms fins als varis grams per litre de cultiu.

A la taula 1.3 es presenten alguns exemples de les proteïnes expressades en *P.pastoris*.

Proteïna	Tipus d'expressió I-Intracel·lular E-Extracel·lular	Quantitat produïda	Referència
BACTERIS			
Fragment C de la toxina del tètanos de <i>Clostridium tetani</i>	I	12 g·l ⁻¹	Clare et al., 1991
Antigen SAG1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	E	12 mg·l ⁻¹	Biemans et al., 1998
Àcid fosfatasa d' <i>Escherichia coli</i>	E	28.9 U/mg	Rodriguez et al., 1999
Alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	E	2.5 g·l ⁻¹	Montesino et al., 1998
Pertactina de <i>Bordetella pertussis</i>	I	3 g·l ⁻¹	Romanos et al., 1991
FONGS I LLEVATS			
Lipasa 1 de <i>Candida rugosa</i>	E	150 U·ml ⁻¹	Brocca et al., 1998
Lipasa de <i>Kurtzmanomyces sp.</i>	E	46 U·ml ⁻¹	Kakugawa et al., 2002
Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	E	200 U·ml ⁻¹	Mining et al., 1998
Invertasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	E	2.5 g·l ⁻¹	Tschopp et al., 1987
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	E	1.6 g·l ⁻¹	Boyle et al., 1998
PLANTES			
Invertasa de <i>Ipomoea batatas</i>	E	4 g·l ⁻¹	Huang et al., 2003
Nitrat reductasa d'espinaç	I	420 mg·l ⁻¹	Mertens et al., 2000
Hidroxinitrili liasa d' <i>Hevea brasiliensis</i>	I	22 g·l ⁻¹	Hasslacher et al., 1997
INVERTEBRATS			
Proteïna olfactiva de l'abella	E	0.2 g·l ⁻¹	Danty et al., 1999
Alpha- bungarotoxina de <i>Snake venom</i>	E	2 mg·l ⁻¹	Levandoski et al., 2000
Proteïna de la seda	I	663 mg·l ⁻¹	Fahnestock et al.,

d'aranya			1997
VERTEBRATS (NO HUMANS)			
β - caseína bovina	I	1 g·l ⁻¹	Choi et al., 1996
Albúmina de gat	E	3.3 mg·l ⁻¹	Ree et al., 1999
Pepsinogen de porc	E	30 mg·l ⁻¹	Yoshimasu et al., 2002
α -tropomyosin de gallina	I	20 mg·l ⁻¹	Hilario et al., 2001
Proteïna anticongelant II del peix ratlla	E	36 mg·l ⁻¹	D'Anjou et al., 2001
VERTEBRATS (HUMANS)			
Col·lagen tipus I	I	0.5 g·l ⁻¹	Mokelainen et al., 2001
Lipasa pancreàtica	E	75 mg·l ⁻¹	Yang et al., 1998
Insulina	E	1.5 g·l ⁻¹	Wang et al., 2001
Lisozima	E	300 mg·l ⁻¹	Oka et al., 1999
Factor de necrosis tumoral	I	10 g·l ⁻¹	Sreekrishna et al., 1989
VIRUS			
Virus de d'immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1)	E	20 mg·l ⁻¹	Scorer et al., 1993
Antigen de superfície de la hepatitis B	I	400 mg·l ⁻¹	Baer et al., 2003

Taula 1.3. Alguns exemples de proteïnes expressades en P.pastoris classificades segons l'origen de la proteïna.

1.3. LIPASES

1.3.1. DEFINICIÓ

Les Lipases (E.C. 3.1.1.3), també anomenades triacilglicerol èster hidrolases, catalitzen la hidròlisi dels triglicèrids (Figura 1.6) a la interfase entre el substrat insoluble i aigua. A part dels substrats naturals com esters i triglicèrids insolubles, les lipases catalitzen la síntesi i la hidròlisi enantio i regioselectiva d'un ampli ventall d'esters naturals o sintètics (Bornscheuer, 1995; Santaniello et al., 1993).

A la natura les lipases tenen un rol molt important, catalitzant el primer pas del metabolisme dels greixos i olis, que no podrien ser consumits sense ser prèviament hidrolitzats.

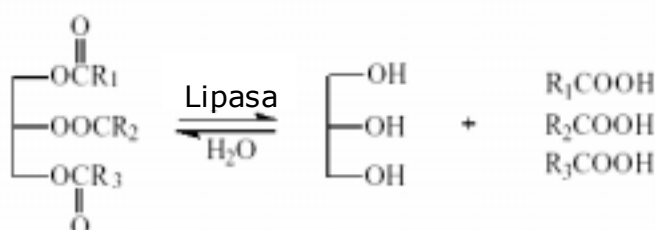


Figura 1.6. Hidròlisi d'un triglicèrid catalitzada per la lipasa.

En l'última dècada, les lipases han aixecat grans expectatives en altres reaccions com són la resolució de mesclures racèmiques de compostos quirals (Skupin et al., 1997), la interesterificació o intercanvi del grup acil entre triglicèrids i un àcid gras o un èster d'un àcid gras (Jaeger et al., 1994) i la síntesi de productes enantiomèricament purs (Gil et al., 1997).

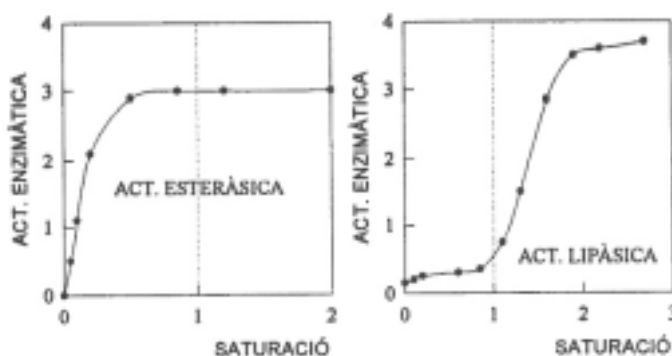


Figura 1.7. Velocitats de reacció en funció de la concentració de substrat.

La diferència entre les lipases i la resta d'enzims que també poden hidrolitzar esters és la necessitat d'una interfase orgànico-aquosa per realitzar la seva funció catalítica. Les esterases, per exemple, no hidrolitzen esters insolubles, o ho fan molt lentament. L'activitat esteràsica és funció de la concentració de substrat, tal com descriu la cinètica de Michaelis-Menten, arribant a la velocitat màxima de reacció molt abans que el medi es trobi saturat de substrat, de manera que la formació d'una emulsió substrat-aigua no afecta a la velocitat de reacció. En canvi, les lipases quasi no presenten activitat en condicions de saturació, i és quan

s'excideix a concentracions superiors a la solubilitat de substrat i té lloc la formació d'una emulsió, que es produeix un augment brusc en l'activitat enzimàtica (Figura 1.7). Aquest fenomen es coneix com activació interfacial.

Aquesta reacció no es pot descriure mitjançant una cinètica tipus Michaelis-Menten, ja que el procés d'hidròlisi té diverses etapes (Verger, 1990). En primer lloc, la lipasa s'adsorbeix sobre la fase orgànica, seguit de la formació del complex enzim-substrat, i finalment s'alliberen els productes a la fase aquosa i es produeix la regeneració de l'enzim.

1.3.2. ORIGEN

Les lipases poden ser produïdes per animals, plantes o microorganismes (Antonian 1988; Khachatourians and Hui 1995). Les primeres lipases utilitzades eren extreïdes del pàncrees dels mamífers (generalment del porc). Però els productors més interessants a nivell industrial són els microorganismes com els llevats i els bacteris. Els principals productors de lipasa comercial són *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas sp.*, i sobretot *Rhizopus sp.*, *Candida rugosa* i *Candida antarctica*.

A la taula 1.4 es presenta les principals fonts emprades per a l'obtenció de lipases, classificades segons la seva naturalesa.

FONT	NOM
Mamífers	Lipasa pancreàtica humana Lipasa pancreàtica de cavall Lipasa pancreàtica de porc
Fongs	<i>Rhizomucor meihe</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Humicola lanuginosa</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Geotrichum candidum</i>
Bacteris	<i>Chromobacterium viscosum</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Bacillus thermocatenulatus</i> <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Taula 1.4. Principals fonts naturals per a l'obtenció de lipases.

Un gran nombre d'empreses que comercialitzen enzims a nivell industrial, estan dedicant molts esforços per aconseguir microorganismes superproductors d'aquestes proteïnes i, que al mateix temps, siguin classificats com "inofensius" (GRAS). En el cas de la lipasa, *Novo Nordisk* ha desenvolupat processos de producció d'aquest enzim a escala industrial, utilitzant *Aspergillus niger* com a microorganisme hoste i utilitzant els gens de *Rhizomucor miehei* i de *Humicola lanuginosa* (Boel, 1990).

1.3.3. CLASSIFICACIÓ, ESTRUCTURA I FUNCIÓ

Tradicionalment les lipases es classifiquen d'acord amb la seva especificitat cap el substrat. Es poden agrupar en dos grans grups (McRae, 1983).

Lipases no específiques: Hidrolitzen el triglicèrid per obtenir els àcids grassos en qualsevol de les tres posicions possibles del glicerol, apareixent com a productes intermediaris els (1,2),(2,3)(1,3)-diglicèrids i els monoglicèrids. Alguns exemples de microorganismes que produeixen aquest tipus de lipases són: *Candida rugosa*, *Candida curvata*, *Geotrichum candidum*, *Staphylococcus aureus* i *Penicillium cyclopium*.

Lipases específiques: Aquest tipus de lipases es poden diferenciar en dos grans grups d'acord amb la seva diferent especificitat.

Especificitat posicional: Aquest grup únicament hidrolitza les posicions n-1,3 dels triglicèrids, amb productes intermediaris com els (1,2)(2,3)-diglicèrids i el 2-monoglicèrid. La velocitat d'hidròlisi dels triglicèrids és, generalment, més ràpida que la dels di i monoglicèrids, que s'acumulen al llarg de la reacció. La causa és que els (1,2)(2,3)-diglicèrids i el 2-monoglicèrids són químicament inestables. Alguns microorganismes productors d'aquest tipus de lipases són: *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus sp.*, *Pseudomonas fluorescens* i *Humicola lanuginosa*.

Especificitat cap els àcids grassos: Catalitza l'alliberament d'un determinat àcid gras dels triglicèrids. Exemples d'aquest tipus, podrien ser les lipases de *Penicillium cyclopium*, que són més actives en triglicèrids de cadena curta.

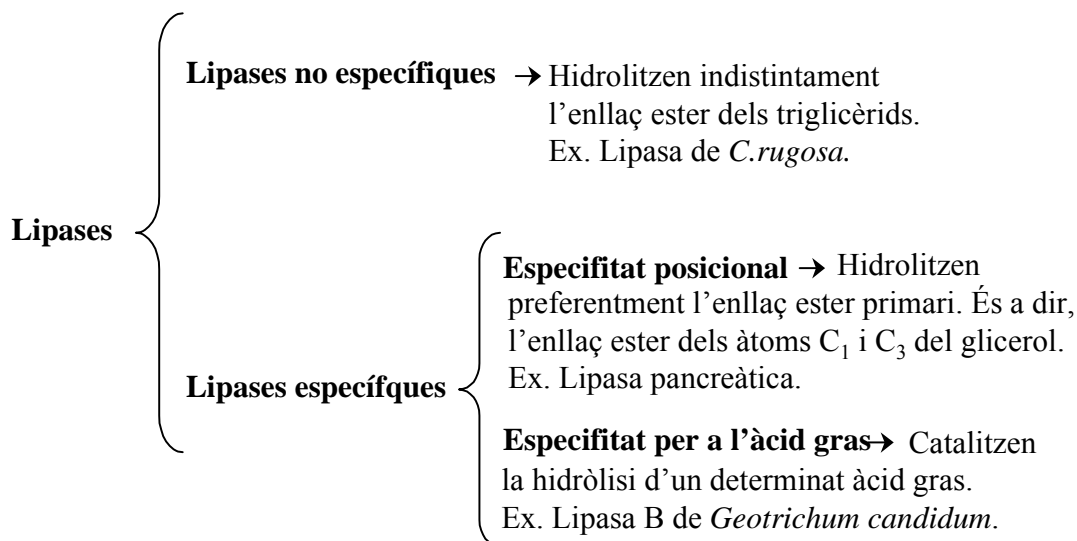


Figura 1.8. Classificació dels diferents tipus de lipases d'acord amb la seva especificitat.

En l'estructura tridimensional de les lipases per difracció de raigs X, s'observen significatives semblances en topologia i conformació a la família de les α/β hidrolases, que inclouen les esterases i altres enzims lipolítics.

Les lipases d'origen microbià varien pel que fa al nombre d'aminoàcids. El seu centre catalític consisteix en un residu aminoacídic de Serina recobert per un fragment polipeptídic α -helicoidal que actua com a tapa protectora, de tal forma

que el domini catalític esdevé inaccessible. El contacte amb una interfase orgànico-aquosa origina el desplaçament de la protecció peptídica i els residus del centre actiu, de caràcter hidrofòbic, queden exposats, la qual cosa intensifica l'afinitat de l'enzim pel substrat al mateix temps que estabilitza l'estat de transició durant la catalisi (Grochulski, 1994). Aquest fenomen es coneix com activació interfacial, i és necessària per a la seva funció catalítica.

1.3.4. APLICACIONS INDUSTRIALS I BIOTECNOLÒGIQUES

Tot i l'elevat nombre d'aplicacions que tenen les lipases, encara ara només s'apliquen en processos molt determinats, a causa del seu elevat preu. Durant els últims anys però, utilitzant tècniques d'enginyeria genètica s'ha aconseguit disposar de microorganismes hostes que permeten una superproducció de l'enzim desitjat, abaratint els costos i facilitant que moltes empreses utilitzin aquesta proteïna per millorar alguna part del seu procés de producció. Les principals reaccions amb lipases són:

Reaccions d'hidròlisi

- ▶ Hidròlisi d'olis vegetals a la indústria oleoquímica.
- ▶ Producció d'aromes i savoritzants per a la indústria alimentària.
- ▶ S'inclouen dins els detergents per eliminar les taques de grasses.
- ▶ Resolució de mescles quirals.

Reaccions de síntesi

- ▶ Síntesi de triglicèrids.
- ▶ Síntesi de precursors dels pèptids.
- ▶ Producció d'esteroides per a la indústria farmacèutica.
- ▶ Resolució de mescles racèmiques d'alcohols per a la indústria farmacèutica.
- ▶ Síntesi d'alcohols terpènics com a savoritzants.
- ▶ Síntesi d'esters glucídics per a la indústria cosmètica.

Reaccions d'interesterificació

- ▶ Variació de la composició d'àcids grassos en mescles de triglicèrids.
- ▶ Eliminació d'àcids grassos responsables de causar la inestabilitat en el gust de certs olis i mantegues.
- ▶ Reaccions de transesterificació.
- ▶ Preparació de compostos enantiomèricament purs.
- ▶ Transesterificacions enantioselectives dobles.

Una de les indústries que utilitza les lipases és l'alimentària. Dins aquest sector, l'indústria làctica utilitza aquest enzim per hidrolitzar el greix de la llet, aconseguint, per exemple, millorar el gust del formatge o accelerar el procés de maduració dels mateixos. Els àcids grassos alliberats per la reacció enzimàtica són els responsables de les característiques organolèptiques de molts productes làctics (Abdou, 2003). També s'utilitzen les lipases per l'elaboració d'embotits crus assaonats (Ansorena et al., 2000).

A la indústria oleoquímica, cada cop més, s'apliquen processos enzimàtics per a la hidròlisi, gliceròlisi i alcoholòlisi d'olis i greixos. Les condicions agressives del procés tradicional (temperatura 250 °C i pressió 60 bars) provoquen la inestabilitat dels productes obtinguts, un gran consum energètic i la formació de productes secundaris no desitjats. La utilització de processos enzimàtics millora significativament el rendiments gràcies a l'especificitat d'aquesta cap el substrat, i

la minimització de productes indesitjables. Aquest motiu, junt amb el constant abaratiment del seu preu, farà possible, en un futur no gaire llunyà, la progressiva substitució del processos convencionals pels de tipus enzimàtic.

Un altre ús de les lipases és la seva aplicació com a component funcional de mescles en les formulacions de detergents emprats per l'eliminació de taques de grassa a baixes temperatures de rentat, reduint el consum de surfactants per raons mediambientals (Pandey et al., 1999). La utilització de lipases termostables ha ampliat notablement les seves aplicacions en aquest camp, permetent utilitzar-les en la majoria de condicions de rentat.

En molts d'altres sectors s'utilitzen les lipases, com ara: en anàlisi clínica per realitzar surfactants, per a l'obtenció de productes òpticament actius, etc... Es podria assegurar que el consum de lipases augmentarà espectacularment gràcies al seu constant abaratiment i a la millora de competitivitat respecte els processos convencionals.

Un dels principals productors mundials de lipases és l'empresa *Novo Nordisk*, que disposa de nombroses línies de productes que es diferencien segons la seva aplicació final, segons l'especificitat de l'enzim.

Nom Comercial	Aplicació a l'indústria
Lipopan®	panificadora
Lipozyme®	greixos i olis
Novozym® 27007	d'alimentació
Palatase™	làctica
Clear-Lens™ LIPO	cosmètica
GreaseX	pel·letera
Lipolase™	detergents
LipoPrime®	detergents
NovoCor™ AD	pel·letera
Novozym® 735	tèxtil
Novozym® 871	d'alimentació

Taula 1.5. Productes de lipasa distribuïts per Novo Nordisk.

Es descriuen a la bibliografia nombroses noves aplicacions de les lipases, sobretot en reaccions enantioselectives en solvents molt determinats amb l'obtenció de productes d'alt valor afegit (Chang et al., 2003). També s'ha avançat molt en la millora dels rendiments en la immobilització de la lipasa sobre superfícies sòlides (Hwang et al., 2004), poden.

1.3.5. LA LIPASA DE RHIZOPUS ORYZAE (ROL)

El fong *Rhizopus oryzae*, es troba en el seu estadi natural en el fruit de la palma. D'aquest fong se n'ha aïllat una lipasa extracel·lular coneguda amb el nom de ROL (**R**hizopus **O**ryzae **L**ipase) (Hiol et al., 2000).

El pes molecular de la lipasa nativa de *Rhizopus oryzae* és al voltant dels 32kDa, conté tres ponts disulfur i quatre llocs de N-glicosilació (Ben Salah, 1994). L'enzim pur és estable en un rang de pH entre 4.5 i 7, a 30°C.

L'expressió d'aquesta proteïna heteròloga es va realitzar per primera vegada en cèl·lules *E.coli* per Beer et al. (1996), però va resultar que la purificació de la lipasa era excessivament costosa. En aquest treball es va comprovar que la ROL

tenia certa activitat com a fosfolipasa, pel que la seva expressió resultava ser tòxica per al creixement del microorganisme. Treballs posteriors han expressat la ROL en el fong *S. cerevisiae*, obtenint nivells de producció molt més baixos (Takahashi et al., 1998).

Minning et al., (1998) van realitzar per primera vegada l'expressió de ROL madura en el llevat *Pichia pastoris*, obtenint uns nivells de producció satisfactoris (uns 60 mg de proteïna activa per litre de cultiu). La ROL obtinguda d'aquesta font té un pes molecular de 30 kDa amb un pH òptim d'activitat de 8.1 a 30 °C i un punt isoelèctric ≥ 9.3 .

De les seves aplicacions a l'indústria en destaca principalment la utilització per a la síntesi dels metil esters continguts en l'oli de soja per utilitzar-lo posteriorment com a biodiesel (Kaieda et al., 1999). La seva regioespecificitat per alguns substrats fa de la ROL un enzim eficient per aquest tipus d'aplicacions.

1.4. MODELITZACIÓ DE BIOPROCESSOS

Els models matemàtics tenen un important paper en la síntesi i desenvolupament d'un sistema. La representació matemàtica del procés pot servir per millorar-lo i constitueix una eina imprescindible per la sintonia i disseny de controladors. Una de les seves principals utilitats és la simulació del procés, estalviant d'aquesta forma temps i esforç de desenvolupament de sistemes de control.

1.4.1. CLASSIFICACIÓ DE MODELS MATEMÀTICS

Existeixen molts tipus de classificacions de models matemàtics, no obstant les més emprades en processos biotecnològics són les basades segons el nivell de descripció. Fredrickson (1970) va proposar una classificació que encara avui en dia segueix sent utilitzada, diferenciant els models entre estructurats i no estructurats, segregats i no segregats.

A continuació es realitza una breu descripció de cadascun d'ells (Bailey, 1998):

Models no estructurats: Es caracteritzen per la seva senzillesa, ja que es considera la biomassa com una caixa negra i sense tenir en compte cap tipus de reacció intracel·lular. Es descriu el creixement basat en un sol substrat limitant, considerant en el model el consum d'aquest substrat, el creixement de la biomassa i en alguns casos, la formació de productes.

El sistema és definit a partir de l'evolució de les variables macroscòpiques. Aquest tipus de models funcionen correctament en casos relativament simples.

Són models molt útils per realitzar una anàlisi preliminar del sistema, però sovint no són extrapolables quan es canvien les condicions.

L'exemple més conegut de model no estructurat és l'equació de Monod (1942), on s'estableix una relació senzilla entre la velocitat de creixement i la concentració de substrat. Amb una simple equació s'aproxima la relació extremadament complexa entre aquestes dues variables.

Model estructurat: El nivell de complexitat d'aquest tipus de model és elevat ja que s'intenta descriure matemàticament de forma detallada tot el que passa a l'interior de la cèl·lula. El nombre de paràmetres, tant microscòpics com macroscòpics, i la relacions entre ells pot arribar a ser extremadament gran.

El models estructurats d'un sistema biològic són normalment desenvolupats per a propòsits molt específics, com per a la comprensió del la regulació intracel·lular, el control en la transcripció, la reproducció, etc..

El principal problema d'aquest tipus de model és que la determinació experimental de tots els paràmetres, la qual cosa és un tasca extremadament complexa. A més disposar de la mesura d'algunes de les variables que intervenen al model pot ser una tasca molt difícil, i sense garantir que aquest esforç sigui recompensat per l'obtenció d'un model prou correcte.

Model distribuït: Es tracten tots el microorganismes com si adquirissin totes les mateixes propietats, mitjana de la població real.

Model segregat: Aquests models tenen en compte que el cultiu conté cèl·lules en diferents estadis de creixement, diferenciant-los pel seu volum/massa o per l'edat. Segons la classificació que es realitzi, el model s'agruparà per diferents poblacions, fet que augmentarà la complexitat del model.

Una altra classificació molt utilitzada en el món de la modelització és segons el grau de detall en que es descriu el procés. En el cas que el model sigui una descripció exacte del procés rep el nom de model **determinístic**, on tots els paràmetres són coneguts amb precisió i el model pot ser utilitzat per estimar la resposta futura del sistema. És clar que molts dels processos biològics no poden ser descrits amb aquest tipus de model ja que la seva dinàmica conté un cert component d'incertesa. Així doncs, si el model incorpora un cert soroll o incertesa, en part per la falta de coneixement del procés, el model rep el nom **d'estocàstic**.

Altres classificacions realitzades en l'última dècada (Lübbert et al., 1994) (Lübbert et al., 2001) diferencien els models segons el tipus de relació que es pot establir entre les dades recollides durant l'experimentació. A continuació es descriuen a grans trets cadascun d'aquest tipus de models ordenats de menor a major complexitat.

Model caixa negra: són models que formalment descriuen les característiques del procés sense cap base teòrica. Els models construïts a partir de regressions són un clar exemple. L'ús de xarxes neuronals en bioprocessos és una de les noves aplicacions d'aquest tipus de modelització.

Models basats en regles: Utilitzant el coneixement del procés extret de l'experiència es poden formular models aproximats de comportament seguint regles del tipus; si...(condició) ...llavors....(conseqüència). Les regles són processades normalment per sistemes experts o fuzzy.

Models físics: Com indica el seu nom, són models matemàtics basats únicament amb els mecanismes físics del procés. No obstant, la descripció detallada dels fenòmens físics en un procés biològic és pràcticament impossible de realitzar per la seva elevada complexitat, normalment es combina aquest tipus de modelització amb model de caixa negra.

Models híbrids: Combina tots els avantatges d'utilitzar les dades experimentals del procés i el coneixement del procés per millorar l'actuació del model. Simplement, es pot definir aquest tipus de models com la combinació entre els anteriors tipus.

També es poden classificar els models segons el àmbit on es centra la modelització, per exemple pot ser de tipus estequiomètric, cinètic, fisiològic o metabòlic (Schürgel, 2001). És fàcil adonar-se de la multitud de sistemes de classificació existents i que entre elles no són incompatibles, un mateix model pot pertànyer a més d'una classe, per exemple, un model matemàtic pot ser estocàstic, no estructurat i distribuït. Així doncs, poden realitzar-se diferents tipus de models del mateix procés sense poder afirmar, en molts casos, quin és el millor.

En la majoria de casos, els processos biològics són sistemes no lineals ja que les diferents relacions entre les variables d'estat depenen de múltiples factors, generalment complexes. A la pràctica, molts d'ells s'aproximen a models lineals, fent que la dinàmica del sistema sigui molt més fàcil d'analitzar, encara que no descriu amb total veracitat el procés.

1.4.2. CONSTRUCCIÓ I VALIDACIÓ DEL MODEL

Quan s'intenta modelitzar un procés microbiològic d'aquestes característiques s'aconsella basar-se en el principi de la simplicitat. Amb freqüència es comet l'error de crear un model complex, incloent diferents propostes descrites a la literatura, indiferentment de la seva rellevància en el conjunt del procés. És comú incloure al model descripcions i relacions entre paràmetres que poden ser simplificats i aproximats per la poca contribució final en l'evolució del mateix.

En el procés de construcció d'un model matemàtic per processos de fermentació es pot diferenciar en els següents passos:

- ▶ **Anàlisi del sistema:** L'anàlisi qualitatiu de l'estructura del sistema consisteix en el coneixement previ de les relacions entre les diferents variables d'estat (concentració de biomassa, substrat, producte, etc...).
- ▶ **Formulació del model:** Descripció matemàtica de les variacions, relacions i restriccions de les variables d'estat. Tota la informació es pot classificar en tres grans apartats, els balanços (de matèria, energia i moviment), les equacions cinètiques (representen la velocitat en que esdevenen els canvis) i les restriccions (imposades pel sistema o per l'usuari).
- ▶ **Identificació i determinació dels paràmetres (Calibratge):** A partir dels valors experimentals del procés real es troben els valors numèrics de les constants i paràmetres del model. Hi ha múltiples formes de trobar aquests valors, encara que en molts casos és realitza aquest càlcul mitjançant l'estadística convencional (regressió), tenint com objectiu la minimització de l'error entre els valors reals i l'estimació del model. També és comú la utilització de mètodes d'optimització no lineal com el mètode Simplex (o Nealder-Mead) basats amb la utilització de la derivada per buscar el punt on es minimitza la diferència entre els valor experimentals i el model. En principi, els paràmetres només seràn vàlids per les condicions de calibratge, fora d'aquestes no seràn vàlides.
- ▶ **Validació del model:** Finalment, després de l'obtenció d'un conjunt de paràmetres del model, es procedeix a comprovar si aquest és vàlid per un nou grup de dades experimentals. Cal saber que un model mai serà vàlid per tot el rang de treball de les variables. No obstant això, pot arribar a ser-ho per un determinat espai on s'ubiquen les condicions d'operació del sistema estudiat.

1.5. PRINCIPALS ESTRATÈGIES DE CULTIU

El terme "fermentació" prové del verb llatí *fervere*, que vol dir bullir, descrivint l'aparença de l'acció del llevat amb l'extracte de malta. Les bombolles generades per la producció de diòxid de carboni causat pel catabolisme anaeròbic dels sucres produeix aquest efecte semblant a l'ebullició d'un líquid.

Malgrat això, el terme fermentació ha anat adquirint diferents significats segons el camp d'estudi. Actualment, el terme és utilitzant per descriure un ampli ventall de processos que de forma genèrica només descriuen la producció d'un producte utilitzant el cultiu d'un microorganisme.

Les tècniques més emprades per realitzar cultius cel·lulars realitzats a escala laboratori o industrial són el cultiu en discontinu, en semicontinu ("fed-batch") o en continu.

1.5.1. OPERACIÓ EN DISCONTINU

El cultiu en discontinu es caracteritza per l'addició de tots els nutrients necessaris al principi del cultiu i la posterior recollida de productes un cop finalitzat el mateix. Els únics components que són alimentats contínuament al bioreactor són l'oxigen i la solució bàsica per mantenir el pH.

Durant el procés, el microorganisme segueix diferents fases de creixement:

- ▶ **Fase de latència:** Aquesta etapa descriu el temps necessari per l'adaptació del microorganisme al nou medi. A l'indústria, s'intenta reduir al màxim la seva durada mitjançant l'optimització de l'inòcul (p.ex. creixement de l'inòcul amb la mateixa font de carboni utilitzada en el cultiu).
- ▶ **Fase de creixement exponencial:** La velocitat de creixement, μ augmenta progressivament fins establir-se al seu valor màxim (μ_{\max}). Durant aquesta fase tots els nutrients es troben en excés.
- ▶ **Fase de desacceleració:** el progressiu exhauriment d'algun dels nutrients o la producció d'algun producte tòxic fa que la velocitat de creixement disminueixi paulatinament fins arribar a aturar-se.
- ▶ **Fase estacionària:** Esdevé quan la velocitat de creixement passa a ser nul·la però les cèl·lules encara mantenen alguna activitat metabòlica.

El principal avantatge d'aquesta tècnica de cultiu és la seva senzillesa; la instrumentació i inversió per realitzar un cultiu en discontinu és mínima.

Pel que fa als desavantatges, l'elevada pèrdua de temps per realitzar un cicle complet format pel temps de càrrega, de creixement o producció, i posteriorment, el de neteja és potser la més notòria. La llarga durada d'aquests temps morts (càrrega, descàrrega i neteja) respecte a la de l'etapa de creixement del microorganisme, provoca una important disminució de la productivitat. D'altra banda, l'operació en discontinu no és adequada per al cultiu de microorganismes amb problemes d'inhibició per substrat o per producte, ja que per obtenir un mínim creixement del microorganisme cal afegir inicialment concentracions considerables de substrat.

1.5.2. OPERACIÓ EN SEMICONTINU (“FED-BATCH”)

La baixa productivitat obtinguda en treballar amb un procés discontinu, es millora significativament amb la utilització de sistemes en semicontinu (o intermitent). Aquest tipus de procés combina bona part dels avantatges del procés en discontinu amb la millora afegida de poder actuar sobre el procés amb l'addició de substrat limitant o altres compostos per millorar la producció.

L'operació en semicontinu va ser utilitzada per primera vegada a principis de segle en la producció del llevat *Saccharomyces cerevisiae* a partir de malta per solucionar els problemes d'inhibició per substrat. Cap als anys 40 la seva aplicació es va estendre en la producció de butanol, acetona, glicerol i àcids orgànics.

Actualment l'operació en semicontinu està àmpliament estesa en la producció de llevats (Sauer et al, 2000), enzims, antibiòtics, aminoàcids i proteïnes recombinats (Shiloach, 2005).

El procés en “fed-batch” és bàsicament un cultiu en discontinu en el qual s'hi afegeixen contínuament determinats nutrients, com per exemple; el substrat limitant o additius com a precursors dels productes. Durant tot el procés no s'extreu cap corrent del bioreactor, exceptuant el volum extret per a mostres per poder controlar l'evolució del cultiu. Per tant, és evident que el cultiu té un període límit de durada, sigui pel progressiu increment de volum o per l'arribada a nivells de biomassa elevats.

Aquest tipus d'operació resulta avantatjosa en sistemes amb substrats inhibidors del creixement, ja que aquest es va addicionant al mateix temps que el microorganisme el va consumint, aconseguint així que sempre es treballi en concentracions per sota la d'inhibició. Depenent de l'estratègia utilitzada per a l'addició de substrat es pot controlar el sistema per aconseguir la màxima producció d'algun metabòlit secundari o un altre producte que interressi.

L'operació en “fed-batch” permet augmentar la biomassa de l'ordre de deu vegades respecte l'operació en discontinu i es disminueix el risc de contaminació i mutació en comparació amb un sistema continu.

Els desavantatges són de tipus operacional, ja que aquests necessiten un muntatge més complex que l'operació en discontinu, a causa de que sovint s'ha d'aplicar una estratègia de control “feedback” (o de retroalimentació) per addicionar el substrat.

Existeixen a la bibliografia nombrosos modes de realitzar l'addició, des de fixar un cabal constant, incrementar-lo esglaonadament, exponencialment, etc... No obstant això, la forma més aconsellable és addicionar el substrat o nutrient en funció de la mesura de la seva concentració en línia mitjançant la utilització d'un llaç de control tancat. Segons l'estratègia seleccionada i en el cas que aquesta mantingui el valor de la velocitat de creixement pràcticament constant, es considera que el cultiu està en estat quasi estacionari, comparable a l'estat estacionari aconseguit en el cultiu en continu.

1.5.3. OPERACIÓ EN CONTINU

El cultiu en continu consisteix en aportar contínuament un corrent d'aliment fresc al mateix temps que s'elimina un corrent de medi residual que conté biomassa, substrat i productes. S'aconsegueix així que, tant la quantitat de microorganisme, com les concentracions dels diferents nutrients es mantinguin

teòricament constants. És una forma de fixar les condicions de creixement, treballant durant un temps idealment indefinit dins les condicions desitjades. És a dir, s'arriba a un funcionament en estat estacionari.

A l'igual que el procés en semicontinu, el cultiu en continu parteix d'una operació en discontinu per tenir una mínima quantitat de biomassa com a base per poder començar el nou mode d'operació. L'estat estacionari s'assoleix normalment després de 4 o 5 temps de residència del reactor. A partir del moment que s'arrenca l'entrada i sortida contínua de cabal. En tot moment el volum del reactor resta constant, ja que els cabal d'entrada i sortida són els mateixos.

Els desavantatges d'aquest tipus d'operació són l'augment de la complexitat respecte els altres modes d'operació, el risc de contaminació i la mutació espontània causada per la llarga durada que pot tenir el procés.

Tot i això, aquest tipus d'estratègia de cultiu és molt utilitzada en el món de la investigació ja que en treballar en estat estacionari les condicions es mantenen constants al llarg del temps. Per exemple, treballar en continu és molt útil per obtenir, observar i estudiar quins són els efectes dels diferents paràmetres físics i químics sobre el creixement del microorganisme.

L'estratègia d'operació per sistemes de cultiu en continu més estesa és el quimiòstat. Aquesta consisteix en confeccionar un aliment que contingui en excés tots els nutrients menys un, que controlarà la velocitat específica de creixement del microorganisme. Per tant, quan s'hagi arribat a l'estat estacionari la velocitat específica de creixement i la biomassa romandran constants. És tracta d'un sistema en llaç obert on es fixa el cabal d'entrada i de sortida constants.

Per altra banda es pot treballar en auxostat, cultiu en continu en llaç tancat on es controla per retroalimentació alguna de les variables d'estat del sistema (concentració de biomassa o de substrat). Dins aquesta categoria de cultius es pot classificar segons la variable mesurada, per exemple el turbidostat, el nutriostat o el pH-auxostat, la variable a controlar és la turbidesa del medi, la concentració d'algun component o el pH del cultiu respectivament. Com es pot apreciar, es poden utilitzar mesures indirectes de propietats físiques del medi com és el cas del pH, ja que es pot establir una correlació amb la concentració de biomassa (Vicente et al., 1998).

Si s'utilitza la tècnica de l'auxostat es pot aconseguir treballar a una velocitat específica propera a la màxima de creixement (μ_{\max}) del microorganisme. L'únic problema d'aquest tipus d'operació es que cal disposar d'una mesura en línia directe o indirecte de la variable a controlar, cosa que no és sempre possible o viable.

1.6. INSTRUMENTACIÓ I MONITORITZACIÓ

Tant el creixement d'un microorganisme com la seva producció d'enzim depenen directament de les condicions ambientals que l'envolten. Per tant, la mesura i control d'aquestes condicions determinaran l'evolució del cultiu. La implementació d'un bon sistema de mesura en línia té com objectius principals l'augment de la productivitat i un coneixement més exhaustiu del comportament del procés biotecnològic. La instrumentació utilitzada en aquest tipus de processos és similar a l'emprada en processos químics convencionals, però amb una sèrie de característiques específiques.

1.6.1. SENSORS

Els sensors són aquells aparells que ens permeten conèixer el valor de les diferents variables existents en un procés. A l'hora de seleccionar un sensor per monitoritzar alguna de les variables del procés cal tenir en compte especialment les següents característiques:

Precisió i Exactitud: En funció de l'ús que es vulgui del sensor, aquests dos termes poden ser més o menys rellevants. Per exemple, si es vol controlar la temperatura amb una precisió de ± 0.1 °C, cal que el sensor sigui significativament més precís que aquest valor si es volen evitar desviacions importants.

Precisió a llarg temps: Tots els sensors experimenten un deteriorament temporal, és important doncs, conèixer a quina velocitat la mesura s'allunya del valor real. En alguns casos, un procés de recalibratge és suficient per solucionar aquesta desviació. En qualsevol cas, abans d'adquirir un sensor cal conèixer quin és el seu temps de vida amb un funcionament correcte.

Fiabilitat: És important disposar d'un sensor fiable i més en una indústria com la biotecnològica on els productes tenen un alt valor afegit. La pèrdua d'un lot de producte final per problemes en un sensor pot significar un important cost econòmic. És essencial adquirir sensors fiables i com a mesura preventiva realitzar manteniments rutinaris per comprovar-ne el bon funcionament.

Viabilitat: Lògicament el sensor ha de ser capaç de treballar correctament en tot el rang de condicions del procés. Per exemple, en molts dels bioprocessos cal emprar sensors que siguin esterilitzables per temperatura.

Cost econòmic: Actualment es possible trobar un gran nombre de sensors sofisticats relacionats amb el món de la fermentació. Malauradament, el seu import en molts d'aquests casos és força alt i només s'aconsella utilitzar-los quan la seva implementació es tradueix amb un increment de la producció suficient per garantir la seva amortització.

Velocitat de resposta: La dinàmica de cada sensor és un paràmetre vital a conèixer, ja que per assegurar el bon funcionament. Si s'utilitza aquest en un llaç de control tancat només es pot garantir quan el temps de resposta del sensor és inferior a la dinàmica de canvi del procés.

Localització del sensor: La posició on anirà ubicat el sensor depèn del disseny del bioreactor. Cal assegurar una bona lectura de la mesura durant tot el cultiu, siguin quines siguin les operacions. A més si el valor de la propietat no és

constant en l'interior del reactor, cal estudiar la seva col·locació ja que serà l'únic punt de referència que es tindrà durant el cultiu.

Una primera classificació dels diferents tipus de sensors existents pot ser de com i on es realitza la mesura, podent ser discontinu i en línia.

Discontinuu (en anglès "Off-line"): Implica la presa de mostra, el posterior tractament i anàlisi de forma manual. S'utilitzen mètodes químics i microbiològics tradicionals, presentant generalment elevats temps de resposta (hores/dies) i per tant, inaplicables per poder prendre decisions de control en temps real sobre el procés. Ex. Mesura de la concentració de biomassa per pes sec.

En línia (en anglès "On-line"): El sensor forma part de l'equipament de fermentació i la mesura es realitza de forma automàtica sense la intervenció humana. El concepte de sensor en línia engloba un gran nombre d'aparells que es poden classificar en tres sub-categories:

- ▶ Sensors situats directament a l'interior del reactor (Ex: pH, oxigen dissolt, etc..).
- ▶ Sensors que mesuren contínuament mostres extretes de l'interior del reactor. Ex. Sistema FIA o anàlisi de la composició del gas de sortida.
- ▶ Sensors que no entren en contacte amb el fluid. Ex. Tacòmetre de l'agitador.

Una altra classificació dels diferents tipus de sensors es segons la variable a mesurar, i en aquest sentit es poden diferenciar dos grans grups: els sensors físics i els sensors químics.

SENSORS FÍSICS

Els principals paràmetres físics mesurats en un bioprocés i que es poden monitoritzar són:

Temperatura: Els aparells més utilitzats per mesurar aquesta variable són les resistències de platí, per la seva fiabilitat en un extens rang de temperatures i robustesa (poden resistir temperatures i pressions elevades). També són àmpliament emprats altres sensors com els termopars o termistors. En canvi, els termòmetres de mercuri s'utilitzen únicament com a comprovació de la mesura.

Pressió: La mesura d'aquesta variable és molt útil, tant en el moment de l'esterilització com durant l'etapa de creixement, per tal de mantenir una pressió a caps del fermentador superior a l'ambiental, evitant d'aquesta manera possibles contaminacions. També és important la seva influència en la solubilitat dels gasos en dissolució o altres components volàtils. La seva mesura és de gran ajuda per detectar problemes de colmatació dels filtres, tant d'entrada com de sortida del reactor durant el procés. Els sensors més utilitzats són els transductors de pressió.

Agitació: Generalment la velocitat d'agitació es calibra fora de les condicions de treball. Per aquest fi s'utilitzen, en el cas de reactors de petites dimensions, sensors òptics o magnètics, i tacòmetres quan es treballa en equips més grans. La mesura és vital per tal de mantenir una correcta velocitat d'agitació, ja que una variació d'aquesta pot variar considerablement les condicions reològiques del cultiu. La mesura de la potència d'agitació resulta més complicada, ja que sempre es produeixen pèrdues d'energia per fricció entre el motor i l'eix d'agitació.

Nivell: La mesura del nivell en sistemes de fermentació es realitza generalment mitjançant una sonda que detecta variacions de capacítancia o conductivitat al entrar en contacte amb el medi líquid. Sondes d'aquest tipus també es poden utilitzar per la detecció de la formació d'escumes, fenomen molt freqüent en sistemes on l'aportació externa de gasos (aire o O₂) és important.

Cabal: Dels diferents tipus de mesuradors de cabal que existeixen el més simple i utilitzat és el rotàmetre, que proporciona una lectura visual, o bé, ajustat amb un transductor pot donar una mesura elèctrica. Ara bé, aquest tipus de sensor no dona una mesura massa precisa. Quan es necessita la mesura del cabal per realitzar balanços de matèria és més apropiat utilitzar mesuradors tèrmics de cabal màssic, ja que poden donar una precisió de fins el 1% de l'escala emprada.

Per mesurar cabals líquids es poden utilitzar cabalímetres electromagnètics, encara que aquests a causa del seu elevat cost són poc emprats a escala laboratori. Quan es treballa amb cabals petits, generalment, no cal utilitzar aquest tipus de sensor, perquè sistemes d'impulsió com bombes de diafragma, bombes de desplaçament positiu o microburetes automàtiques garantitzen la precisió d'aquesta variable. Els mètodes de pesada del fermentador o dipòsit d'alimentació o sortida també poden ser una solució per conèixer en cada moment el cabal d'entrada o de sortida de líquid en el reactor.

SENSORS QUÍMICS

Actualment es disposa d'una ampla varietat d'equips comercials per realitzar la mesura contínua de diversos paràmetres químics, com el pH, l'oxigen dissolt en el medi (pO₂), i el potencial redox. Aquests sensors també han de permetre la seva esterilització per temperatura ja que estan en contacte directe amb el medi.

pH: L'elèctrode de pH és una de les sondes més utilitzades en bioprocessos. El sensor de pH més estès és un elèctrode combinat, format per un elèctrode de referència i un elèctrode amb una membrana de vidre a través del qual es genera un potencial elèctric, funció del pH del medi.

El calibratge s'ha de realitzar abans de l'esterilització i el seu temps de vida és limitat en funció del nombre d'esterilitzacions que se li realitzen i de la composició del medi de fermentació. Actualment, es distribueixen elèctrodes més resistents on l'electròlit es troba en un gel perfectament aïllat del medi, impedingint la mescla de l'electròlit amb el cultiu.

pO₂: Els dos tipus de sondes més comunes són les amperomètriques i les polarogràfiques o galvàniques. Aquestes sondes mesuren el tant per cent de saturació d'oxigen en el medi, per una pressió parcial en la fase gas determinada. Paràmetres físics com l'agitació, la temperatura i la pressió, són variables que afecten directament a la concentració d'oxigen dissolt.

Potencial redox: Aquest tipus de sensor s'utilitza majoritàriament en condicions anaeròbiques per mesurar concentracions molt baixes d'oxigen dissolt (de l'ordre de 1 ppm). La mesura es pot realitzar col·locant un elèctrode de platí (també pot ser de rodi o d'or) juntament amb un elèctrode de referència.

Tots els sensors descrits anteriorment són comercials i molts d'aquests formen part de l'equip estàndard de fermentació. La característica principal de tota aquesta instrumentació és que ha de permetre la mesura de la variable en línia a temps real. Amb la utilització de totes aquestes es disposa de molta informació de les condicions ambientals del medi de cultiu, però també caldria un altre tipus de sensors que fer possible conèixer en línia l'estat del microorganisme.

1.6.2. INSTRUMENTACIÓ SUPLEMENTÀRIA

Anàlisi de gasos

La mesura en línia de la concentració de CO₂ i O₂ dels gasos de sortida del reactor proporciona una valuosa informació sobre l'activitat respiratòria de la cèl·lula. En molts casos s'utilitza el valor d'aquesta variable per controlar el creixement del microorganisme.

Els analitzadors més utilitzats per conèixer el consum d'oxigen i la producció de diòxid de carboni són els paramagnètics i l'infraroig, respectivament. La seva robustesa, fiabilitat i baix manteniment, juntament amb el seu cost raonable, fa que aquests tipus d'analitzadors s'utilitzin preferentment davant dels altres tipus com els que es descriuen a continuació. Un altre aparell que permet mesurar la concentració d'oxigen és la cel·la electroquímica, donant una bona mesura a baix cost però amb la necessitat d'un elevat manteniment.

Si el que es necessita és molta precisió, el millor analitzador que es pot utilitzar és basat en l'espectrometria de masses, que pot analitzar tots els components volàtils (amb un pes molecular baix) a més de l'O₂ i CO₂ que surten pel corrent gasós (Heinzle, 1987), permet mesurar-los en quantitats molt petites (ppm). Aquest tipus d'analitzador s'està utilitzant molt a la indústria per la seva fiabilitat i precisió. L'inconvenient de l'espectrometria de masses és el seu elevat cost (5 vegades superior a la resta d'analitzadors), a part de la necessitat d'un major manteniment.

Biosensors

Aquesta és la denominació que reben els sensors que permeten mesurar variables molt específiques utilitzant algun component biològic en la seva instrumentació (enzims, microorganismes), donant una valuosa informació sobre l'estat del microorganisme.

Generalment, aquests tipus de sensors es basen en la utilització d'enzims, normalment immobilitzats, com a elements detectors (aprofitant les seves qualitats d'especificitat cap al producte) seguit d'un transductor, que passarà el senyal enzimàtic a una variació generalment elèctrica. La presència i quantitat del producte a analitzar en contacte amb l'enzim desencadenarà una reacció de catàlisi mesurable en forma d'una variació de pH, de temperatura o aparició de luminescència.

La creació de nous biosensors per mesurar compostos determinants per conèixer l'evolució del creixement és un camp en plena expansió dins la Química Analítica. Per exemple, ja s'han creat sensors que poden mesurar de forma automàtica compostos com glucosa (Céspedes et al., 1995)(Milardovic et al., 1997), urea (Baohong et al., 1997), etanol (Cai et al., 1997) o per pesticides (Mazzei et al., 1996).

Tot i semblar que aquests sensors permetran tenir un complet control sobre el sistema, a l'hora d'utilitzar-los es topa amb problemes com la robustesa i fiabilitat. A l'emprar enzims com a elements sensors es tenen problemes com la seva estabilitat i reproductibilitat, i només es pot operar dins les condicions en que és activa, per tant, en cap cas, aquest tipus de sensor es podrà esterilitzar.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

El principal avantatge de la cromatografia HPLC és que es poden analitzar entre 5 i 10 components al mateix temps. La mostra ha de ser desgasificada i desproteïnitzada, i si és possible, s'ha de tenir saturació d'Heli per evitar la formació de bombolles que puguin provocar el col·lapse de la columna. La separació dels diferents components que formen la mostra es pot produir per diversos fenòmens com ara l'adsorció, permeació de gel, cromatografia d'afinitat, etc.... És àmpliament utilitzat en biotecnologia per conèixer concentracions de compostos existents en el medi com etanol, alguns sucres, lactat, glicerol, aminoàcids, etc.

L'automatització en línia d'aquest equip en processos biotecnològics és poc emprada, en part causada per la complexitat que comporta el muntatge de l'equip en línia.

Tècnica FIA (Flow Injection Analysis)

Una altra alternativa per disposar de mesures de variables en línia dels processos fermentatius és utilitzar la tècnica FIA (Flow injection analysis). Aquesta tècnica es basa en l'automatització de metodologies de detecció i quantificació de compostos químics que normalment es fan "off-line".

La tècnica FIA és una metodologia iniciada al 1975 per Ruzicka i Hanssen (Ruzicka, 1981), i des d'aleshores s'ha usat per resoldre un ampli ventall de problemes analítics. La seva versatilitat, el baix cost, la bona reproductibilitat de mesura i el reduït temps d'anàlisi, ha facilitat la ràpida extensió d'aquesta tècnica, una de les més utilitzades, tant a la indústria com a nivell d'investigació (Schurgerl, 1996). Aquesta tècnica és cada dia més emprada en biotecnologia, aplicable a la mesura dels compostos més diversos (Keay, 1997), com per exemple en l'anàlisi d'alguns components de l'aigua residual (Andrew, 1994).

1.6.3. COMUNICACIONS

Un cop instal·lats tots els sensors necessaris o possibles en l'entorn del reactor per tal de conèixer les condicions ambientals del cultiu, cal interpretar i centralitzar 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. Aquesta acció és coneguda amb el nom de monitorització.

Normalment, s'utilitza per a tal fi un ordinador, que permet entre d'altres funcions, la comunicació amb tots els sensors. El sensor envia un senyal, normalment de tipus elèctric o pneumàtic (aquest últim actualment en desús) proporcional al valor de la variable que mesura.

Per a la transmissió de dades entre dos equips de control es poden emprar diferents tipus, classificables en dos grans grups: la transmissió analògica i la digital. La diferència bàsica entre aquests dos tipus de transmissió resta en la forma de transmetre el senyal. Si és analògic, indica que el senyal és totalment continu, pel contrari, el digital envia dades de forma discontinua.

Transmissió analògica

La necessitat de comunicar dos elements de control a llarga distància de forma fiable, va originar l'aparició dels transductors i transmissors. El transductor és un dispositiu, normalment adjunt al sensor, que genera un senyal equivalent a la mesura per l'element sensor permetent que aquest pugui ser transmès. L'element

transmissor, tal com indica el seu nom, és el que transmet a través seu el senyal del transductor fins l'aparell receptor. En el cas que la transmissió sigui elèctrica, serà un cable, i si la transmissió és de tipus pneumàtica, aquest serà un tub.

La transmissió analògica de tipus pneumàtica treballa en un rang entre 0.2 i 1 bar. La utilització de pressions relativament baixes i aire comprimit com a gas fa que el cost d'aquest tipus d'instal·lacions sigui relativament barat. És per aquesta raó que és encara emprat en plantes químiques on el risc d'incendi és elevat o en ambients on l'electrònica pot fallar (per calor, fred o molta humitat). S'utilitza 0.2 bar de pressió absoluta per indicar el menor valor de la variable mesurada, perquè seria molt difícil buidar totalment la línia de transmissió, per aconseguir que la pressió fos exactament zero.

Si la transmissió de dades és elèctrica es treballa, normalment, amb intensitat (entre 4-20 mA). En el cas que s'utilitzi el voltatge, aquest pot donar problemes en llargues distàncies per la resistència del cable. Treballant amb un rang baix d'intensitat s'aconsegueix abaratir el cost de la instal·lació, ja que no es requereixen cables d'un gruix massa elevat i encara és fàcilment mesurable per l'aparell receptor. A l'igual que el senyal pneumàtic, és difícil aconseguir el zero exacte, però a més en aquest cas es necessitaria una font d'alimentació externa.

Transmissió digital

La comunicació digital es basa en la transmissió de bits a través d'un cable, permetent la comunicació lògica entre dos equips. El bit (BINary digiT) només pot tenir dos valors, 0 o 1, i cada un d'aquests valors ve determinat per un voltatge. Com només pot tenir dos possibles valors, aquest s'agrupa en unitats més grans que proporcionen un esquema lògic més gran. Un byte està format per una sèrie de 8 bits, i que permeten realitzar 256 (2^8) combinacions diferents d'uns i zeros. Per tant, un byte pot adquirir un valor entre 0 i 255 segons el valor de cadascun del bits que el formen.

La transmissió de dades en paral·lel consisteix en enviar simultàniament la informació d'un byte a través de 8 cables (més un de referència). Cada cable envia un bit d'informació (valors possibles 0 o 1), permetent que l'aparell receptor rebí vuit bits que formen el byte. Aquest tipus de comunicació és molt ràpida, però dona molts errors per les diferències de resistència, capacitat i inductància que poden existir durant el trajecte que recorre el senyal. Un altre desavantatge és l'elevat cost dels cables quan es volen transmetre dades a llarga distància. Per tant, la transmissió de dades en paral·lel és únicament utilitzada a l'interior de l'ordinador o en un entorn pròxim (impressores, sistemes d'emmagatzematge o registre externs), on es necessiten altes velocitats de transferència entre aparells pròxims.

Una altra forma de transmetre les dades que resulta menys cara (s'utilitzen menys cables) i més segura a llargues distàncies és la coneguda com la comunicació o transmissió en sèrie. L'alternativa a enviar les dades simultàniament una després d'una altra per la mateixa línia. A l'extrem receptor s'inverteix el procés construint el byte original. Aquest tipus de transmissió redueix la complexitat i part del cost del sistema, però s'obté una menor eficàcia, ja que es triga vuit vegades més a enviar la mateixa informació, ja que els bits van un darrera l'altre, en comptes d'enviar-se simultàniament.

S'han d'afegir una sèrie de bits complementaris als de les dades per tal d'assegurar una bona comunicació. Aquests s'han estandarditzat per tots els equips digitals. Els bits complementaris són els següents:

- ▶ Bit d'inici: Indica l'inici del paquet de dades.
- ▶ Bits de dades : Poden ser 7 (128 combinacions) o 8 (256 combinacions).
- ▶ Bit de paritat: Aquest bit serveix per comprovar si les dades han estat ben rebudes. Existeixen les següents variants:
 - Paritat parell: Si la suma dels bits de dades és parell, el valor del bit és 1, en el cas que siguin imparells és 0.
 - Paritat imparell: El bit és 1 si la suma de bits de dades és imparell i 0 si és parell.
- ▶ Sense paritat: No s'utilitza el bit de paritat.
- ▶ Bit de parada: Indiquen la fi del paquet. Poden ser un o dos bits.

Com pot observar-se, és necessari enviar un mínim de 10 bits per cada byte de dades. Això provocarà la disminució de la velocitat de transmissió, però compensat per l'augment de la seguretat en l'enviament.

Per a la comunicació de dades en sèrie s'han establert diferents protocols que especifiquen les característiques tècniques de la connexió. A continuació s'especifiquen els més usuals:

RS-232-C

L'any 1969 l'Associació d'Indústries Electròniques (EIA), juntament amb els laboratoris Bell i els fabricants d'equips de comunicacions, van formar aquest protocol; el RS-232-C. El propòsit inicial va ser la connexió entre un equip terminal de dades (DTE, Data Terminal Equipment) i un equip de comunicació de dades (DCE, Data Communications Equipment) utilitzant l'intercanvi de dades binàries en sèrie. En aquest acord es va establir el protocol que establia com havien de ser físicament les connexions, el voltatge i altres detalls, com la nomenclatura a utilitzar.

Actualment, aquest tipus de connexió és el més utilitzat per connectar equips auxiliars als ordinadors, encara que presenti inconvenients d'origen en comunicar un mòdem i un ordinador.

El RS-232-C està format per tres cables, el de transmissió, el de recepció i el de referència. Així doncs, es permet establir la comunicació en les dues direccions, els equips connectats poden rebre i enviar dades. El cable de transmissió (TxD), tal com indica el seu nom, permet la sortida de dades cap un altre dispositiu. El de recepció és el d'entrada de dades provinents d'altres equips (RxD). Finalment, el tercer cable s'utilitza com a referència per determinar la polaritat i el voltatge dels altres dos cables.

Els voltatges utilitzats per a la comunicació són diferents en el cas que es tracti d'entrada o sortida de l'aparell. Aquesta diferència entre les definicions de voltatges permissibles és utilitzada com a marge de seguretat. La llargada del cable de comunicació, juntament a la proximitat que pot tenir aquest amb altres equips elèctrics (motors, transformadors, etc..) provoca una disminució del senyal, que pot ser, fins i tot, d'algun volt. Com a solució al problema s'ha estandarditzat que el rang de voltatge que defineix els valors lògics sigui una mica més ampli per al senyal rebut, és a dir, per a la d'entrada de dades a l'aparell receptor. Les definicions lògiques per a l'entrada són les següents:

- ▶ Definició 1 lògic: Entre -3 i -15 V.
- ▶ Definició de zero lògic: Entre 3 i 15 V.

- **Zona de transició:** Entre -3 i 3V. Aquesta no aporta cap tipus d'informació, serveix per separar les zones que defineixen els valors lògics, evitant qualsevol confusió.

Per a la sortida aquestes definicions varien lleugerament, sent l'única diferència l'amplitud de cada zona. La zona de transició és major, entre 5 i -5V, conseqüentment s'estrenyen les altres dues zones, sent per a la definició del 1 lògic el rang entre -5 i -15V i per la definició del 0 lògic el mateix interval però de signe contrari.

Un dels grans inconvenients per a la comunicació en sèrie, respecte a la de tipus paral·lel, és la limitació de la velocitat de transmissió. Quan s'intenta treballar a velocitats altes, les dades són susceptibles a pèrdues importants de voltatge causades per la capacitat, la resistència i la inductància del cable, provocant errors significatius en la comunicació.

Aquestes pèrdues són conegudes com efectes d'alta freqüència i augmenten amb la longitud. Per exemple, utilitzant una velocitat de 19200 bits/s per a la comunicació entre dos equips RS-232, la distància màxima entre ells pot ser com a màxim 15 metres. Si es desitja emprar longituds de cable més elevades, només cal que es rebaixi la velocitat de transmissió.

Per aconseguir una perfecte comunicació entre els diferents equips, el model oficial RS-232-C estableix una sèrie de connexions per conèixer l'estat del sistema per si la comunicació entre ells és viable. Aquest tipus de control entre equips és conegut com acoblament ("handshaking") i es defineix com el mode en què es regula i controla el flux de dades a través de la connexió.

Hi ha dos tipus d'acoblament; per maquinari ("hardware"), on es regula el flux de transmissió de dades electrònicament, mitjançant l'addició de més cables per conèixer l'estat de l'altre aparell. I per programari ("software"), on juntament amb les dades s'envien bits d'inici i fi de transmissió, i una sèrie de bits de revisió, que donen informació del paquet enviat, com per exemple, el nombre de bits totals, o una suma dels valors dels bits enviats.

Pin Connector DB9	Pin Connector DB25	Nom	Funció
3	2	TXD	Transmissió de dades (sortida)
2	3	RXD	Recepció de dades (entrada)
7	4	RTS	Petició d'enviament (sortida)
8	5	CTS	Preparat per enviar (entrada)
6	6	DSR	Dispositiu de dades preparat (entrada)
5	7	Comú	Comú (referència)
1	8	DCD	Detecció de portadora de dades (entrada)
4	20	DTR	Terminal de dades preparada (sortida)
9	22	RI	Indicador de crida (entrada)

Taula 1.6. Disposició dels pins en un connector tipus mitjançant RS-232-C.

Per tal d'estandarditzar les connexions tipus RS-232-C es donen una sèrie de noms als diferents tipus de senyals, siguin de dades o d'acoblament, i també l'assignació a les diferents patilles (pins) utilitzades en les connectors de 25 i 9 patilles. La taula 1.6 mostra la nomenclatura utilitzada universalment per aquest tipus de protocol.

Es pot observar que són necessaris un total de 9 cables per realitzar la connexió:

- ▶ 1 per enviar dades (TXD)
- ▶ 1 per rebre dades (RXD)
- ▶ 1 comú per a tots els circuits (Terra)
- ▶ 4 per poder enviar senyals d'acoblament (CTS, DSR, DCD, RI).
- ▶ 2 per poder rebre senyals d'acoblament (RTS, DTR).

Alguns dels senyals (DCD, RI) són utilitzats per conèixer l'estat d'un mòdem, però no són emprats per les altres aplicacions.

Per exemple, si es volen connectar dos ordinadors (dispositius DTE) en sèrie mitjançant dos connectors de 25 pins, les connexions que s'haurien de realitzar són les descrites a la figura 1.9, on la direcció de les fletxes indica la direcció del flux d'informació.

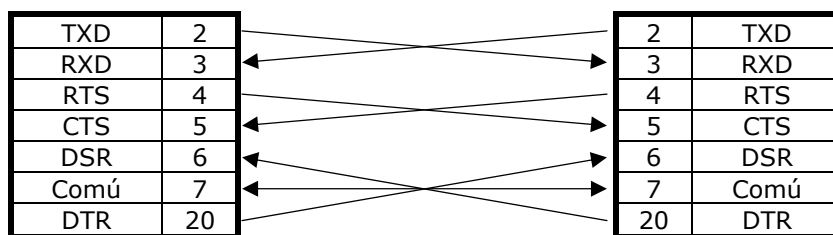


Figura 1.9. Connexió estàndard entre dos equips RS-232-C.

Si no es desitgen utilitzar els senyals d'acoblament de tipus físic (per hardware), es pot fer una modificació que no alteri el funcionament, encara que alguns programes puguin necessitar-les. Tot i que el protocol RS-232-C original està pensat per comunicar únicament dos equips, si es suprimeixen els senyals d'acoblament, es permet connectar amb el mateix cable varis equips en sèrie. En aquest cas, s'haurà d'utilitzar algun tipus d'acoblament per programari que indiqui quin és el destinatari de la informació, mantenint al marge la resta d'aparells.

A la figura 1.10 es mostra la nova disposició de les connexions per eliminar els senyals d'acoblament físic entre els equips.

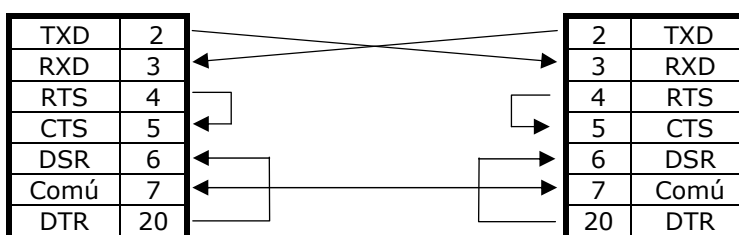


Figura 1.10. Connexió RS-232-C entre dos equips sense utilitzar els senyals d'acoblament.

La majoria d'equips que utilitzen RS-232-C es poden comunicar físicament de la forma explicada anteriorment, però en alguns casos existeixen aparells que utilitzen petites variacions que no permeten una correcta connexió. En aquests casos és necessari un estudi de les característiques dels dos dispositius per trobar una solució.

RS-422-A

El protocol de comunicació RS-422-A sorgeix com a alternativa al RS-232-C per solucionar algunes de les mancances que aquest ofereix, com la limitació de llargada i velocitat de la transmissió de dades.

Al 1975 l' EIA va desenvolupar el RS-422-A per millorar la transmissió de dades. Aquesta millora s'aconsegueix utilitzant circuits balancejats, és a dir, que no s'empra un únic cable per a la transmissió canviant la polaritat respecte el cable comú, sinó que s'utilitzen dos cables per a cada senyal. Les condicions de 0 i 1 lògic són determinades per canvis en la polaritat entre els dos cables, és a dir, per referència d'un amb l'altre.

Aquest canvi permet una important millora de les prestacions; utilitzant un cable apantallat és possible transmetre informació a distàncies de 1200 metres i amb velocitats properes a 1 megabit/s (1MBps). L'inconvenient d'aquest tipus de comunicació és que s'han de duplicar la quantitat de cables per connexió. Però, a l'igual que el sistema RS-232-C, es poden suprimir els senyals d'acoblament connectant la sortida d'aquesta a l'entrada del mateix dispositiu. És en aquest sentit que moltes empreses comercials ja optaven directament per la simplificació dels senyals d'acoblament en els seus equips. Aquesta tendència a la simplificació, junt a la limitació que aquest protocol només permet la comunicació entre dos equips, va originar la revisió i posterior aparició d'un nou protocol que millorava les possibilitats, el RS-485.

RS-485

L'estàndard RS-485 és l'únic que permet la comunicació de diversos equips amb un únic cable. La seva robustesa, juntament amb les altes velocitats de transmissió i la capacitat de comunicar-se amb equips a llargues distàncies, ha fet del RS-485 el tipus de connexió més utilitzat a la indústria.

L'EIA va confeccionar aquest estàndard al 1983, i des de llavors ha estat sotmès a nombroses actualitzacions que han convertit el RS-485 en la connexió en sèrie per transmissió de dades digitals més segura i fiable.

Aquest model complementa el RS-422, mantenint els seus avantatges com la velocitat de transmissió (1 megabit/s) i longituds pròximes als 1200 metres, i a més permet la comunicació de fins 32 equips amb un mateix cable. També cal assenyalar que amb el nou estàndard s'han eliminat els cables d'acoblament, simplificant de forma significativa la connexió i abaratint els costos de cablejat.

Dins l'estàndard RS-485 existeixen diferents variants, una de les quals és coneguda com 4D-RS-485. En aquest cas, es mantenen per separat la línia de recepció i la d'enviament de dades. A la taula 1.7 es mostren els senyals necessaris per establir aquest tipus de comunicació.

Nom	Funció
TXD (+)	Transmissió de dades (sortida +)
TXD (-)	Transmissió de dades (sortida -)
RXD (+)	Recepció de dades (entrada +)
RXD (-)	Recepció de dades (entrada -)
TERRA	Referència

Taula 1.7. Senyals utilitzades en la connexió 4D-RS-485.

Així doncs, s'aconsegueix, amb tant sols cinc cables, una connexió segura, fiable i que respecte a anteriors estàndards, permet la connexió de més de dos equips amb el mateix cable. A la figura 1.11 s'indica la disposició dels diferents cables utilitzada en la comunicació 4D-RS-485.

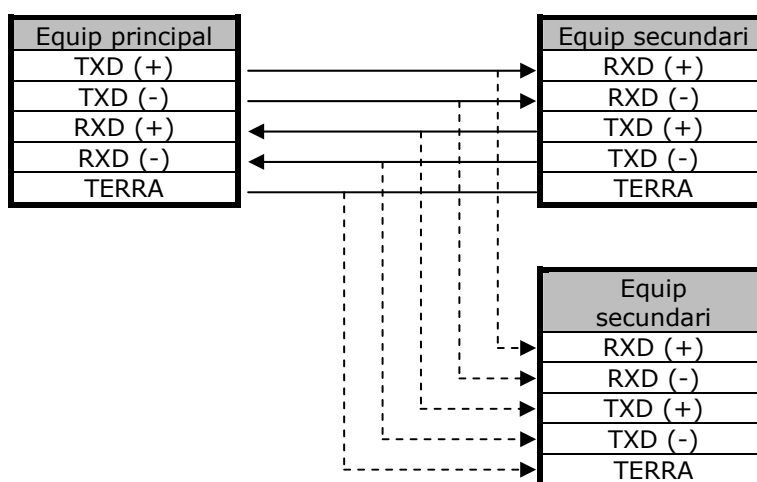


Figura 1.11. Connexió entre equips 4D-RS-485.

El següent pas en simplificació és l'estàndard 2D-RS-485. D'aquesta manera, s'elimina una de les línies de transmissió de dades, és a dir, s'utilitza una sola línia de comunicació bidireccional. Les característiques de l'estàndard es mantenen (longitud i velocitats de transmissió), l'única diferència amb el 4D-RS-485 és que aquest ha d'incorporar un dispositiu de control que permeti commutar els senyals d'enviament i recepció, per evitar que s'emetin simultàniament.

Els senyals necessaris que defineixen l'estàndard 2D-RS-485 es mostren a la taula 1.8.

Nom	Funció
TXD / RXD (+)	Transmissió de dades (sortida +)
TXD / RXD (-)	Transmissió de dades (sortida -)
TERRA	Terra

Taula 1.8. Senyals emprats en la connexió 2D-RS-485.

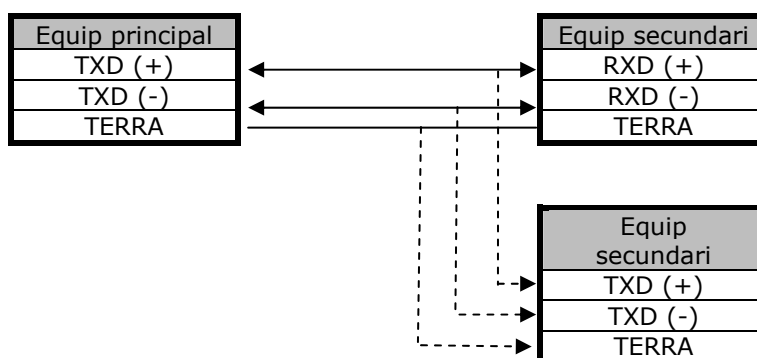


Figura 1.12. Connexió entre equips 2D-RS-485.

A la figura 1.12 es mostra l'esquema d'interconnexió entre diferents equips, on com pot observar-se es redueix el nombre de cables però s'augmenta la complexitat de la connexió a causa de la bidireccionalitat que ha de suportar l'única línia de transmissió.

En totes les variants de l'estàndard RS-485 el cable de referència (terra) és opcional, només és necessari quan puguin existir interferències.

Cal assenyalar que els estàndards 4D-RS-485 i 2D-RS-485 en permetre la comunicació amb la mateixa línia de més des de 30 equips, s'ha de controlar el flux d'informació per evitar que més d'un equip transmeti informació al mateix temps. Per controlar aquest fet, l'equip principal ("master") es responsabilitza d'administrar el flux de dades. Els equips secundaris ("slaves") resten en espera per rebre una petició de dades de l'equip principal. Així doncs, només envien dades quan aquestes són requerides des de l'equip administrador.

Conversió RS-232-C / RS-485

Les millores de l'estàndard de connexió RS-485 respecte el RS-232-C són evidents, però l'elevat cost de la implementació del primer origina que l'estàndard més antic encara sigui àmpliament utilitzat. Per exemple, la majoria d'ordinadors fabricats actualment segueixen utilitzant el RS-232-C i pel contrari, el RS-485 s'empra generalment en la fabricació d'instrumentació industrial. És per tant, habitual trobar-se amb el problema de la conversió entre dos estàndards de comunicació digital en sèrie quan s'utilitza un ordinador com equip principal.

Al laboratori aquest problema és fàcilment solucionat mitjançant una placa de comunicació d'estàndard RS-485 configurable com a port de comunicació en sèrie dins el PC. Aquesta solució no és aplicable a nivell industrial, ja que aquests elements són poc resistents a interferències o sobrecàrregues provocades per la proximitat d'elements elèctrics. En ambients industrials s'empra un convertidor optoïllat (aïllat de corrents externes mitjançant un sistema intern de díodes), que transforma un senyal generat en RS-232-C a RS-485, aïllant totalment les línies de qualsevol interferència externa.

Protocol TCP/IP

Si la comunicació es vol realitzar entre dos ordinadors, la forma més ràpida i segura de fer-ho es mitjançant una red ethernet. Aquesta consisteix en la interconnexió en sèrie de múltiples estacions on es permeti la comunicació entre tots ells. Els protocols TCP i IP són els més emprats per la gestió de la informació en una red.

El protocol TPC (Transfer Control Protocol) estableix el format de les dades, el tipus de confirmació que les estacions intercanvien i els procediments que utilitzen les màquines per assegurar-se que les dades han estat rebudes correctament.

El protocol IP (Internet Protocol) té tres funcions principals:

- ▶ Definició del datagrama (unitat bàsica de la transferència de dades).
- ▶ Efectuar l'encaminament dels datagrames entre els dos nodes.
- ▶ Incloure les regles necessàries per indicar les estacions el mode de processar els paquets, com i quan generar missatges d'error i les condicions per descartar paquets.

El datagrama es defineix com el conjunt de dades on s'inclou de forma ordenada la informació sobre el tipus de servei, la prioritat de la transmissió, la direcció d'origen, la de destí i per últim les dades a transmetre.

La combinació dels dos protocol rep el nom de TCP/IP i assegura una connexió ràpida i fiable entre dos equips, sense límit de distància física entre ells. Actualment tots els sistemes operatius avançats (MacOs, Windows, Linux) ja incorporen totes aquestes funcions totalment invisibles per l'usuari final.

1.7. CONTROL DE BIOPROCESSOS

Els sistemes que treballen amb microorganismes estan restringit a fer-ho en unes condicions específiques per obtenir les transformacions desitjades. El control d'aquests processos és complex, tant per la desconeixença del funcionament fisiològic del microorganisme, com per l'elevada quantitat de variables necessàries que cal conèixer durant l'evolució del bioprocés.

Aquests tipus d'operació poden veure's afectats per diferents pertorbacions, com ara variacions de temperatura, pH o concentracions inadequades de compostos que alterin el creixement, provocant una desviació important en el comportament del microorganisme. És per tant necessari algun tipus de control sobre el procés per garantir que totes les possibles variables estiguin dins el rang desitjat.

Cal assenyalar el retràs significatiu en l'aplicació de sistemes de control avançats als processos biotecnològics respecte a altres processos industrials. Tot i que aquests també són aplicables als bioprocessos, cal estudiar prèviament el sistema amb profunditat abans de la seva implementació, ja que es tracta d'un entorn molt més complex que l'existent als processos industrials químics convencionals. La principal dificultat per aplicar un sistema de control avançat és la limitació que hi ha per obtenir mesures en línia de les variables claus pel control.

Altres problemes com la complexitat d'aquest procés per les nombroses reaccions bioquímiques que hi tenen lloc o els fenòmens de transport existents, justifiquen l'escassa aplicació de sistemes de control avançats. Alguns exemples, de la utilització de sistemes de control per aconseguir l'objectiu desitjat poden ser; l'aplicació de control adaptatiu en un procés "fed-batch" per maximitzar la producció de lisina (Flaus, 1991) o l'optimització del cultius de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzant xarxes neuronals (Costa, 1998).

1.7.1. OBJECTIUS DEL CONTROL

El primer pas a realitzar per dissenyar el sistema de control del bioprocés serà definir l'objectiu desitjat. Hi ha tres tipus de necessitats a satisfer en un sistema de control.

- ▶ **Eliminació de les pertorbacions externes.** Es considera com pertorbació externa l'efecte que pot tenir l'ambient exterior sobre el procés biotecnològic. Variables com la temperatura externa necessiten que s'afegeixi un mecanisme de control que reguli el seu impacte. Per exemple, si la temperatura que es vol mantenir dins el reactor és de 30 °C, aquesta depèn de l'època de l'any en que es realitzi el cultiu. La temperatura externa pot variar entre 10 i 35 °C, per tant el sistema de control haurà de ser capaç de compensar aquestes variacions per culpa de pertorbacions externes.
- ▶ **Estabilització del procés.** La majoria de cultius tenen la tendència a evolucionar espontàniament cap a la seva desestabilització, allunyant-se de les condicions de treball desitjades. Aquest tipus de comportament requereix l'aplicació de sistemes de control per estabilitzar-lo. Un clar exemple és el cas del pH, que s'ha de mantenir dins un rang relativament estret, per tal de permetre el creixement òptim del microorganisme. La producció de productes secundaris provoca, normalment, l'acidificació del medi i per tant, la desestabilització del sistema. El control de pH seria l'encarregat de contrarestar l'efecte dels productes de fermentació intentant mantenir les

condicions òptimes, en aquest cas de pH, pel creixement del microorganisme.

- **Optimització del rendiment.** Un problema habitual en els processos biotecnològics i especialment en les fermentacions fa referència a la possibilitat i/o necessitat d'establir diferents condicions de treball al llarg del procés per anar obtenint en cada moment aquelles que permetin un millor rendiment o simplement les desitjades.

Per portar a terme aquests objectius s'empren diferents tècniques de control que permeten mantenir les condicions desitjades de treball.

1.7.2. TÈCNiques DE CONTROL

Les tècniques de control són les diferents eines que es poden utilitzar per tal de controlar un procés. En primer lloc cal indicar les dues principals formes de disposar els diferents elements de control. Aquestes són el control per retroalimentació (també coneguda per control "feedback") i el control anticipat (control "feedforward").

Control per retroalimentació ("feedback")

És la tècnica de control més utilitzada i es pot esquematitzar com es mostra a la figura 1.13. El control per retroalimentació es caracteritza per controlar la variable a partir de la seva mesura un cop ja ha sortit del sistema. Seguint l'esquema de la figura 1.13, el cicle de control comença amb la mesura de la variable que es vol controlar amb el sensor adient i seguidament el transmissor transforma el senyal de l'element sensor amb un altre senyal (elèctric o pneumàtic) apte per a la transmissió a llarga distància.

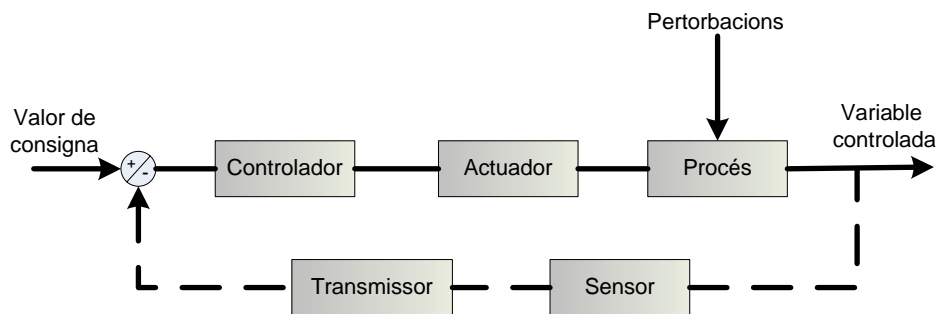


Figura 1.13. Esquema de control per retroalimentació.

El senyal arriba a l'element principal (ordinador, PLC) que s'encarrega de comparar la mesura de la variable del sistema amb el valor de consigna desitjat ("set point"), és a dir, calcular la desviació o error entre el valor desitjat i el real. El controlador és el responsable de decidir la variació de la variable manipulada per compensar aquest error. Finalment, l'actuador com element final del control permet regular la variable manipulada, que relacionada directe o indirectament amb la variable controlada, intenta disminuir la desviació d'aquest últim respecte el valor desitjat.

Control anticipat (“Feedforward”)

El control anticipat (Figura 1.14) es basa en la mesura contínua de les pertorbacions d'entrada al sistema i s'actua anticipant-se als seus efectes per intentar minimitzar-los.

Però, la dificultat de disposar de models eficients que puguin estimar l'efecte d'una pertorbació al sistema, juntament amb la impossibilitat d'identificar tots els tipus de pertorbacions a l'entrada del sistema, fan que sempre es treballi juntament amb el control de retroalimentació per acabar d'ajustar el valor de la variable controlada.

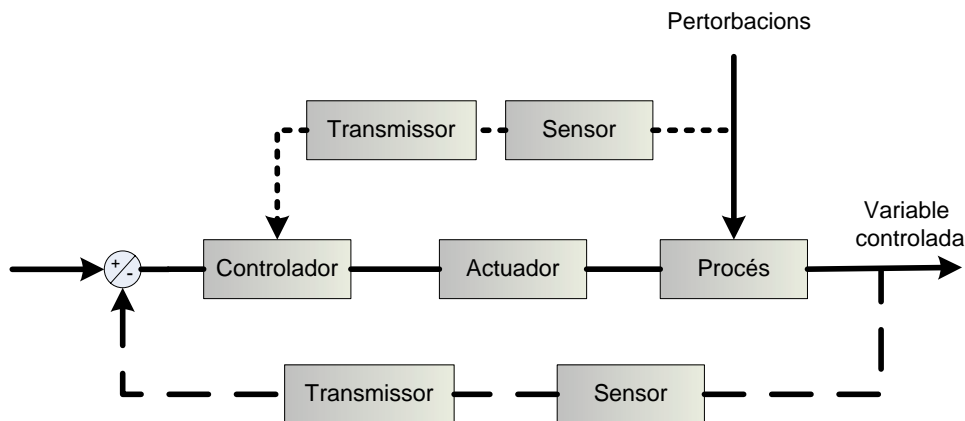


Figura 1.14. Esquema de control anticipat (“Feedforward”).

1.7.3. ELEMENTS DE CONTROL

Els principals elements que formen el llaç de control són:

- ▶ Element sensor.
- ▶ Transmissor.
- ▶ Element final de control (Actuador).
- ▶ Controlador.

Element sensor

És el primer dels requisits que ha de tenir un llaç de control per poder realitzar un seguiment de l'evolució a temps real de la variable a controlar. És vital disposar d'un element sensor que permeti mesurar fiablement tot el rang de valors possibles de la variable dins el sistema. És doncs important, tenir una especial incidència en l'elecció de l'element sensor perquè la precisió i bon funcionament del control depèn directament de la qualitat de la variable mesurada.

Transmissor

Sempre que s'utilitzin sensors, que normalment proporcionen un senyal elèctric no utilitzable directament pel controlador, s'han d'introduir els transmissors. Aquests s'encarreguen de convertir i filtrar el soroll del senyal emès pel sensor i passar-lo a un senyal elèctric (analògic o digital) o pneumàtic, apte per a la comunicació amb el controlador.

Element final de control o actuador

La seva funció és transmetre físicament al procés la resposta del control davant una pertorbació. L'element final de control varia segons el tipus de variable a controlar. Per exemple, quan es desitja controlar el pH del medi, el control actua sobre les bombes dosificadores d'àcid o base, o en el cas de l'agitació, l'element final és el motor responsable de la velocitat de gir de les pales.

Tot i la gran diversitat d'elements finals existents, els més utilitzats són les vàlvules de regulació, tradicionalment pneumàtiques, que permeten variar el pas del fluid (gas o líquid) en funció del senyal enviat pel controlador. El cabal d'aire, tant d'entrada com de sortida al reactor, el cabal d'aigua refrigerant, o el de substrat que s'afegeix al medi, són típics exemples de variables que es regulen mitjançant vàlvules.

La variació del grau d'obertura d'aquestes s'efectua modulant el subministrament de pressió (entre 0 i 1 bar) de l'aire a la membrana de la vàlvula provocant un desplaçament de l'èmbol.

Controlador

L'elecció del tipus de controlador que s'utilitzarà per construir el llaç de control, és una de les decisions més importants per assegurar el correcte funcionament d'aquest. A partir de l'error existent entre el valor real i el valor desitjat de la variable que es vol controlar, hi ha dos tipus d'actuacions clàssiques. La primera i més senzilla que consta en actuar independentment de la magnitud de l'error (Controlador ON/OFF), i una segona on l'actuació és en funció de la magnitud de l'error (Controlador P, PI, PID).

1.7.4. TIPUS DE CONTROL

Controlador "ON/OFF":

Aquesta és una configuració força utilitzada quan es vol controlar amb poca exactitud o simplement, la dinàmica de la variable no requereix un control molt complex. Aquest tipus de control no depèn de la magnitud de l'error, sinó que només quan es detecta la seva existència s'actua amb tota la seva intensitat sobre l'element final.

És imprescindible que la resposta del sistema de control sigui superior a la magnitud de la pertorbació per tal de poder corregir-la. Tot i ser un tipus d'instrumentació senzilla i de baix cost, provoca nombroses oscil·lacions. A més a més, en el cas que es desitgi controlar una variable de forma acurada, l'element final de control haurà d'actuar a elevada freqüència provocant-li consegüentment problemes mecànics.

Per solucionar aquest problema és habitual definir una banda morta al voltant del valor de consigna, evitant la contínua actuació del control per tal de mantenir la variable en el valor exacte. La magnitud d'aquesta banda dependrà del sistema a controlar, tenint en compte que si és molt estreta provocarà un gran esforç mecànic per part de l'element final.

Si pel contrari, la banda morta al voltant del valor de consigna és massa ample la precisió de la variable a controlar disminueix. És per aquests motius, que aquest tipus de controlador només s'utilitza en situacions on el control de la

variable no ha de ser molt estricta o no convé realitzar actuacions amb elevada freqüència, com per exemple, el pH o l'agitació.

Controlador PID (Proporcional Integral Derivatiu)

En molts casos un controlador ON/OFF no és suficientment precís per controlar variables que es desitgen mantenir estables dins un rang relativament estret. Una millora possible és modular l'actuació sobre l'element final de control en funció de la magnitud de l'error, coneguda com a control PID. Dins aquest tipus de control se'n poden diferenciar tres possibilitats, el control proporcional (P), el proporcional integral (PI) i el proporcional integral derivatiu (PID). En alguns casos, també es pot utilitzar el proporcional derivatiu (PD) prescindint de l'efecte integral.

El control Proporcional es basa en que la regulació de l'actuador sigui proporcional a la diferència entre el valor real i el desitjat de la variable a controlar. Es pot definir mitjançant la següent equació:

$$c(t) = K_C \cdot e(t) \quad (\text{Control P}) \quad \text{eq. 1.1}$$

on:

$c(t)$: Valor de la variable manipulada.

K_C : Guany del controlador proporcional.

$e(t)$: (Error) Diferència entre el valor real del sistema i el de consigna.

L'aparició d'un paràmetre de control que relaciona l'error amb l'actuació sobre el sistema implica trobar el valor òptim d'aquest, per tal de que el control sobre el procés funcioni de la forma desitjada. Valors elevats del guany (K_C) augmenten les oscil·lacions de la resposta (en el límit tendeix al control tipus ON/OFF), mentre que valors petits fan que la resposta sigui més lenta (en el límit es tendeix a un sistema sense control).

Un dels principals problemes d'aquest tipus de control és l'anomenat error residual ("offset"). Aquest fenomen succeeix quan una pertorbació provoca una important desviació entre el valor a controlar i el de consigna. És en aquest moment quan el control proporcional (P) intenta redreçar la desviació, però no és capaç de recuperar-la totalment apareixent un error residual.

Aquest error residual és menor quan més gran és el valor del guany. Per tant per aconseguir disminuir la magnitud de l'"offset", s'ha d'augmentar el valor de K_C , tenint en compte que un valor excessiu d'aquest paràmetre podria arribar a provocar grans oscil·lacions, i fins i tot, la desestabilització del sistema. Aquest problema es pot solucionar afegint l'efecte integral que quantifica la resposta tenint en compte l'error acumulat.

$$c(t) = K_C \cdot e(t) + \frac{K_C}{\tau_I} \cdot \int_0^t e(t) \quad (\text{Control PI}) \quad \text{eq. 1.2}$$

on:

$c(t)$: Valor de la variable manipulada.

K_C : Guany del controlador proporcional.

$e(t)$: (Error) Diferència entre el valor real del sistema i el de consigna.

τ_I : Paràmetre de l'efecte integral.

Aquest controlador afegeix a l'acció proporcional l'efecte integral, solucionant d'aquesta forma tots els problemes provocats per l'offset però augmentant la lentitud de resposta del controlador. Per disminuir les oscil·lacions d'aquest tipus de control, mantenint les seves virtuts, s'afegeix l'efecte derivatiu.

$$c(t) = K_C \cdot e(t) + \frac{K_C}{\tau_I} \cdot \int_0^t e(t) + K_C \cdot \tau_D \frac{de(t)}{dt} \quad (\text{Control PID}) \quad \text{eq. 1.3}$$

on:

$c(t)$: Valor de la variable manipulada.

K_C : Guany del controlador proporcional.

$e(t)$: (Error) Diferència entre el valor real del sistema i el de consigna.

τ_I : Paràmetre de l'efecte integral.

τ_D : Paràmetre de l'efecte derivatiu.

La clau per aconseguir un bon control mitjançant l'ús d'un PID és determinar correctament els valors dels paràmetres K_C , τ_I , τ_D , ja que una mala sintonia d'aquests pot provocar la desestabilització del sistema davant una petita oscil·lació. Metodologies com la de Ziegler-Nichols o Cohen-Coon permeten trobar el valor d'aquests paràmetres en funció del sistema que es vulgui controlar. Però, aquests són únicament vàlids per sistemes de primer ordre.

Es pot afirmar que aquest tipus de control és el més utilitzat en l'àmpli camp del control de processos, gràcies a la seva senzillesa, robustesa i versatilitat. Tot i això, el control PID no és aplicable en un reduït nombre de situacions on les condicions i resposta del sistema són variables. En aquests casos es poden utilitzar controladors alternatius com el control adaptatiu, el de lògica difusa o mitjançant xarxes neuronals, entre d'altres.

Control Adaptatiu

El control adaptatiu consisteix bàsicament en un estimador de paràmetres de l'algorisme de control que permet la seva contínua sintonia al llarg del procés. Aquesta sintonia es realitza, generalment, a partir de mesures en línia i/o un model del comportament.

La metodologia utilitzada per a la sintonia dels paràmetres de control és la que diferencia els diferents tipus de control adaptatiu. Els més utilitzats són els controladors autosintonitzables (STR) (Aström, 1989) i el control mitjançant un model de referència (MRAC). L'estimació dels paràmetres en tots aquests tipus de control es pot realitzar de diferents maneres, com poden ser: ajust per mínims quadrats, filtre de Kalman, (Ali, 1993) o filtres adaptatius (Queinnec, 1991) etc.. L'elecció del controlador a utilitzar vindrà donada per les necessitats i el coneixement adquirit del procés.

Controlador autosintonitzable (STR)

Per definició, els reguladors adaptatius autoajustables intenten aconseguir el control òptim subjecte a un tipus de controlador i obtenir informació del procés i de les seves senyals.

Un regulador autosintonitzable (STR) permet adequar els paràmetres del controlador (per exemple un PID) a les variacions de les condicions d'operació (Figura 1.15). El seu principal avantatge és que s'adapta en qualsevol cas i en particular per pertorbacions no mesurables.

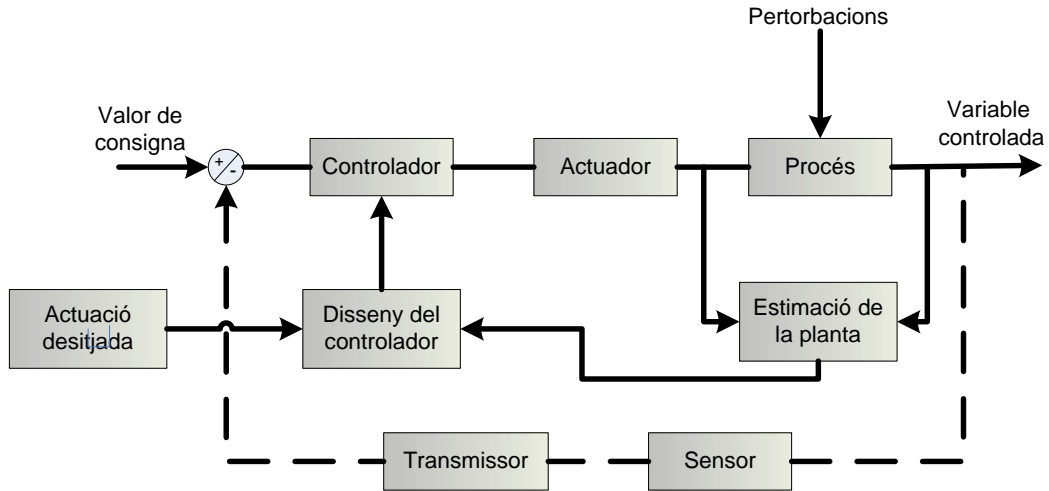


Figura 1.15. Esquema del llaç de control autosintonitzable (STR).

Controlador adaptatiu amb model de referència (MRAC)

Quan es disposi del suficient coneixement del sistema per poder construir un model del sistema que permeti explicar les seves reaccions davant una pertorbació, es pot emprar un control amb model de referència (MRAC). Com es pot observar a la figura 1.16, a partir del model de referència del sistema i del seu mecanisme d'ajust és decideix en línia quin són els paràmetres del controlador (Yao et al., 1997).

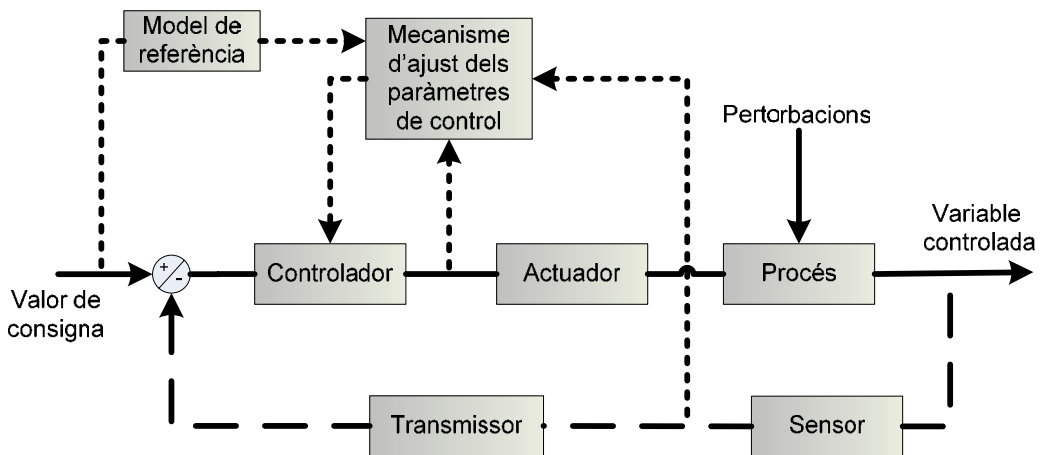


Figura 1.16. Esquema d'un llaç de control adaptatiu per model de referència (MRAC).

El principal avantatge del MRAC és la ràpida adaptació per una entrada ben definida i per la simplicitat del tractament de l'estabilitat. Malauradament, si la senyal d'entrada és pobre, el controlador no és capaç de mantenir la consigna fixada per l'usuari.

Control Predictiu

Els controladors predictius gestionen situacions complexes on es necessita una millora del control tradicional. En els últims deu anys el control predictiu basat en models (CPBM) ha assolit una àmplia acceptació a nivell industrial en aplicacions pràctiques de control de processos (Camacho et al., 1999).

Es conegut que la majoria de problemes de control es poden solventar raonablement mitjançant reguladors PID. Malgrat això, existeixen una sèrie de llaços de control que a causa de la seva complexitat (interacció de múltiples variables, retards, dinàmica complexa, etc..) requereixen tècniques de control més avançades. El CPBM es pot considerar com una bon compromís entre comportament i simplicitat de disseny.

Les principals avantatges del control predictiu són:

- ▶ Permet tractar de forma senzilla els sistemes multivariables amb un número diferent d'entrades i sortides.
- ▶ Incorpora de forma natural la compensació "feedforward", proporciona la mínima variança en les variables controlades i es pot utilitzar en sistemes de dinàmica difícil, amb retard, resposta inversa, etc...
- ▶ És possible introduir restriccions en les variables d'entrada i sortida.
- ▶ És conceptualment senzill de comprendre i ajustable pel personal tècnic.

Elements bàsics del control predictiu

Hi ha una sèrie d'elements que 'son comuns en tots els controladors predictius:

- ▶ El ús d'un model matemàtic del procés que s'empra per preveure l'evolució futura de las variables controlades sobre un horitzó de predicció.
- ▶ El establiment d'una trajectoria desitjada o de referència per les variables controlades.

La metodologia d'aquest tipus de controladors és senzilla; utilitzant conjuntament un model matemàtic amb l'informació d'entrada i sortida es poden calcular les prediccions de la variable controlada en funcions dels variables futurs de la variable manipulada. Aquest procés es repeteix per cada període de mostreig.

El control predictiu presenta un gran interès quan es volen controlar sistemes amb dinàmiques lentes (Moreno, 1992), ja que aquest tipus de controlador permet reduir els temps morts entre actuació i resposta del sistema. Aquest tipus de control no varia la resposta del sistema en funció de l'estat actual del sistema o de la seva història passada, sinó que decideix l'actuació a realitzar en funció de l'evolució prevista del sistema.

Per cada període de mostreig s'utilitza un sistema d'optimització que determina l'actuació del controlador a aplicar en el següent interval de temps, de forma que es minimitzi l'error previst del sistema.

Tant el control predictiu com el control amb model de referència (MRAC) necessiten un model matemàtic que descriu el sistema. Aquest requisit pot ser un gran inconvenient, ja que en molts casos la complexitat del sistema no permet disposar d'un model fiable i vàlid en tot el rang d'operació.

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball es centren en l'estudi i millora de la producció de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en el sistema hoste *Pichia pastoris*. A continuació es plantejen un seguit de mesures en aquesta direcció:

- ▶ **Estudi en cultiu discontinu i semicontinu.** El comportament de les diferents soques de *Pichia pastoris* (segons el fenotip i el nombre de còpies del gen hoste) difereix segons l'estratègia de cultiu utilitzada. Es portaran a terme diferents fermentacions en discontinu i semicontinu per veure l'evolució del creixement i producció de les diferents soques.
- ▶ **Selecció de la soca de producció.** De les diferents soques emprades en la realització del treball s'escollirà quina és la més adient per a la producció de ROL en cultiu semicontinu en funció de paràmetres com la productivitat i el rendiment.
- ▶ **Determinació dels paràmetres clau.** S'identificaran les diferents variables del procés que tenen relació amb la producció. S'analitzarà la influència que pot exercir la variació de cadascuna d'aquestes en els nivells de ROL produïts. Finalment, es proposarà l'actuació sobre algunes d'elles per incidir directament en la productivitat del cultiu.
- ▶ **Millora de la instrumentació.** L'increment de la producció passa inevitablement per conèixer amb més detall l'evolució de les principals variables del cultiu (biomassa, concentració de substrat i producte). És per això, que cal dotar-lo de la instrumentació adient per poder dur a terme el seguiment en línia de les mateixes. Per tant, es procedirà a la instal·lació dels equips necessaris per aconseguir aquesta fi.
- ▶ **Programari de control i monitorització.** El desenvolupament d'un programari que gestioni tota la informació generada durant la fermentació serà de gran ajuda per poder realitzar un seguiment en línia i una posterior anàlisi acurada dels principals paràmetres del sistema. El control i estimació en línia d'algunes variables d'especial interès també hauran de ser inclosos dins les principals funcions d'aquest programari.
- ▶ **Estimació en línia de la biomassa.** Es provaran diferents sistemes per estimar en línia la concentració de biomassa, necessària per seguir els principals paràmetres del cultiu (p.ex: velocitats específiques de creixement, consum i producció).
- ▶ **Control del paràmetre clau.** Atesa la influència de les variables clau amb la productivitat, s'integraran les eines necessàries per aconseguir mantenir-les dins el rang desitjat. S'implentaran diferents controladors i es decidirà en funció del resultats i la seva simplicitat, el més adient per aquest tipus de bioprocés.
- ▶ **Millora de la producció de ROL.** Utilitzant únicament la soca seleccionada, es portaran a terme una sèrie de cultius a diferents condicions, modificant principalment els paràmetres claus seleccionats.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. INSTAL·LACIÓ EXPERIMENTAL

En aquest apartat es descriu de forma detallada tot l'equipament utilitzat durant la realització d'aquest treball experimental.

3.1.1. FERMENTADORS

B.Braun Biotech Biolab

El model BIOLAB de la marca B.Braun Biotech (Melsungen, Alemanya) és un fermentador de dimensions reduïdes dissenyat especialment per a bioprocessos a petita escala. La configuració de mòduls individuals per monitoritzar i controlar cadascuna de les variables desitjades (T, pO₂, pH) dóna una gran versatilitat a aquest bioreactor.

Aquest equip consta d'un vas de vidre amb una tapa construïda en acer inoxidable amb dotze entrades mecanitzades, permetent l'entrada de sondes, tubs i altres accessoris, podent assegurar en tot moment l'esterilitat. L'aire s'introdueix per la part inferior de les pales amb l'ajuda d'un difusor ("sparger").

L'esterilització del bioreactor es realitza a l'autoclau, per tant, tot el reactor i sondes instal·lades estan preparades per suportar una temperatura de 121°C durant 30 minuts.

Les principals característiques d'aquest fermentador es descriuen a continuació:

- ▶ **Volum útil:** 1 litre.
- ▶ **Agitació:** Turbina de 6 pales planes. Rang d'agitació entre 100-1000 rpm. La junta mecànica instal·lada a la tapa permet l'agitació de l'interior del tanc en condicions estèrils. El mòdul de control disposa d'un tacòmetre analògic que permet regular la velocitat de gir.
- ▶ **Aeració:** Una bomba elèctrica de reduïdes dimensions, injecta a pressió constant l'aire a l'interior del bioreactor amb un cabal màxim de 3.5 l·min⁻¹. Aquest es regulat mitjançant un conjunt vàlvula-rotàmetre amb un rang de 0-6 l·min⁻¹. Per assegurar l'esterilitat en els corrents de gasos tant d'entrada com de sortida al reactor s'utilitzen filtres de 0.45 µm (MILLIPORE FG, cat n^o FGDN96042, Bedford,USA). A la sortida l'aire passa abans de sortir a l'exterior per un condensador evitant l'arrossegament de líquid que pot taponar el filtre de sortida i provocar pèrdues de volum de reacció.
- ▶ **pH:** Mòdul que permet la mesura (entrada analògica des del sensor) i control del pH mitjançant dues bombes dosificadores per a l'addició d'àcid i base mantenint aquesta variable dins el rang de consigna. El rang de mesura és entre 0 i 14.
- ▶ **Temperatura:** Mòdul de mesura (entrada analògica des del sensor) i control de temperatura. Per escalfar el reactor s'empra una manta tèrmica, i per al refredament un dit fred.

- ▶ **pO₂**: Només es contempla la monitorització d'aquesta variable. No existeix la possibilitat de controlar-la en cascada amb l'agitació i/o el cabal d'aire d'entrada.

Cal assenyalar que aquest equip només s'ha utilitzat per realitzar els inòculs previs a la fermentació. Tant el pH com la mesura del pO₂ no s'han volgut controlar per la poca durada i la funció per la qual s'ha utilitzat aquest equip.

B.Braun Biotech Biostat ED

El model Biostat ED (Figura 3.1), de majors dimensions que el Biolab, disposa de l'opció de triar entre dues mides de reactor, un de 5 i l'altre de 15 litres. Aquest equip està integrat per dos mòduls clarament diferenciats, un primer on s'integren tots els components mecànics com vàlvules, tubs, bombes, etc... Al segon mòdul (Digital Control Unit, DCU) hi ha tota la part electrònica que controla el procés i monitoritza les principals variables (T, pH, Agitació, pO₂, etc...) juntament amb la pantalla d'interfície amb l'usuari.



Figura 3.1. Vista del fermentador B.BraunBiostat ED en funcionament.

Fer notar que únicament s'ha utilitzat el reactor de 5 litres de volum útil que està format per una base i tapa d'acer inoxidable i un vas central de vidre (borosilicat) resistent a altes temperatures i pressions. El fermentador és autoesterilitzable, tret de les entrades i sortides de mostres. Aquestes s'esterilitzen a l'autoclau i es connecten al fermentador mitjançant un "sèptum" flamejat prèviament amb la solució etanol-aigua al 70%.

La connexió amb un ordinador es realitza directament de forma digital mitjançant el protocol RS-422. La comunicació és bidireccional i l'accés als paràmetres de configuració des del PC és total.

Les principals característiques d'aquest fermentador són:

- ▶ **Temperatura:** El sensor utilitzat per a la mesura d'aquesta variable és de tipus Pt-100 que juntament amb el mòdul de control dotat d'un PID evita eficaçment les possibles perturbacions. Tant el refredament com l'escalfament del reactor es realitzen mitjançant el pas d'un fluid (H_2O) a la temperatura desitjada a través d'un serpentí instal·lat a l'interior del reactor. El refredament utilitza aigua de xarxa a temperatura ambient, per tant, no es poden realitzar cultius a temperatures inferiors a aquesta. Per escalfar es fa passar prèviament l'aigua de xarxa per una resistència elèctrica que augmenta la temperatura del fluid.
- ▶ **pO₂:** El sensor és un elèctrode d'oxigen polarogràfic esterilitzable (Mettler Toledo, Küsnacht, Suïssa) El control d'aquesta variable es pot fer augmentant l'agitació o incrementant el cabal d'aire d'entrada dins el reactor. Un cabalímetre màssic (*Bronkhorst HITEC, Ruurlo, Holanda*) incorporat ja en el sistema controla la quantitat d'aire que s'introdueix dins el fermentador entre un rang de 0 – 20 l·min⁻¹.
- ▶ **pH:** L'element de mesura emprat és un elèctrode de vidre combinat amb un elèctrode de referència Ag/AgCl (*CRISON Inpro 300/120 N^o cat. 52000193, Alella, Espanya*) en la qual l'electròlit es troba en forma de gel. Aquesta característica evita la mescla de l'electròlit amb el medi de cultiu durant l'esterilització o el cultiu. El controlador per mantenir dins el rang desitjat aquesta variable és un PID que actua sobre les bombes dosificadoras d'àcid i base. El control permet definir una banda morta al voltant del valor de consigna, fixat normalment en 0.1 unitats de pH, evitant l'addició contínua tant d'àcid com de base per mantenir el pH en un valor exacte.
- ▶ **Agitació:** La mescla en el reactor és efectuada per un agitador amb quatre discs de 6 pales planes situades sobre l'eix de l'agitador. Aquestes es poden desplaçar verticalment pel que permeten treballar amb volums inferiors. La velocitat d'agitació es mesura mitjançant un tacòmetre i el controlador ajusta la potència a subministrar al motor. El rang d'agitació possible és entre 50 – 1500 rpm.
- ▶ **Nivell:** El fermentador utilitza un sensor de conductivitat que està col·locat a la part superior del reactor i s'ha de fer arribar el seu extrem just a l'alçada on es vulgui mantenir el líquid. Quan l'escuma o el líquid toquen la part final de l'elèctrode es tanca el circuit i es transmet un senyal al mòdul de control. En el cas que s'utilitzi aquest sensor per a la detecció d'escumes, el control de tipus ON/OFF activarà la bomba dosificadora d'antiescumejant per tal de disminuir aquest problema.

Altres elements disponibles en el fermentador són:

- ▶ Vàlvula de seguretat. Imprescindible durant el procés d'esterilització per evitar sobrepressió dins el reactor.
- ▶ Varies obertures al reactor que permeten afegir o extreure líquid al seu interior. Les entrades són utilitzades per afegir àcid, base, antiescumejant o altres compostos que es desitgin introduir durant el

cultiu. Les sortides són utilitzades majoritàriament per a l'extracció de medi, o per mantenir el nivell de líquid al reactor especialment en cultius continus.

- ▶ 3 bombes peristàltiques per a l'addició de base, àcid i antiescumejant amb uns rangs de cabal variables segons el diàmetre de tub utilitzat.
- ▶ Condensador col·locat a la sortida de gasos del bioreactor, on per la seva part externa es pot passar un corrent líquid d'aigua a temperatura desitjada, sempre menor a la del cultiu.

A la taula 3.1 es presenten detalladament les característiques tècniques del fermentador B.Braun Biostat ED.

Característiques tècniques del fermentador:

Agitació	
Motor	Motor DC
Sortida	0.75 kW a 1500 rpm.
Tacòmetre	DC tachogenerator
Rang de velocitat	50-1500 rpm
Desviació	< 1 %
Termostat	
Disseny	Circuit tancat d'aigua calenta a pressió
Bescanvi de calor	Serpentí interior al tanc
Vàlvules de control	Solenoides de 24 V (DC)
Mesura de Temperatura	Sensors PT100
Control de Temperatura	Sistema PID en cascada
Rang de Temperatures	Rang de treball (0 – 90°C)
Sistema d'Esterilització	
Modes	Esterilització in-situ
Control	Esterilització automàtica amb la mesura i control de temperatura i aeració.
Vàlvules	De membrana de funcionament pneumàtic
Subministre d'aire	
Cabal màxim	1.8 m ³ /h
Filtre d'entrada	Pall EMFLON II PTFE(0.2 µm)*
Filtre de sortida	Pall EMFLON II PTFE(0.2 µm)*
Vàlvula	Vàlvula pneumàtica
Senyals d'entrada/sortida	
E/S Digital	24 V
	0-10 V
E/S Analògica	+ 15 V/ 50 mA
	-15 V/ 50 mA

* (Pall , Portsmouth,Regne Unit)

Taula 3.1. Característiques tècniques del fermentador B.Braun Biostat ED.

3.1.2. INSTRUMENTACIÓ COMPLEMENTÀRIA

Analitzador d'oxigen i diòxid de carboni

Per realitzar l'anàlisi dels gasos de sortida del fermentador durant el cultiu l'equip utilitzat és un *Multor 610* (Maihak, Hamburg, Alemanya). Aquest equip permet la mesura en continu, amb una alta sensibilitat i baixa interferència per altres compostos, del CO₂ i l'O₂ existents al corrent de gasos de sortida del fermentador. El diòxid de carboni és mesurat mitjançant l'absorció d'infraroig no dispers (NDIR). En canvi, la concentració d'oxigen es mesura amb una cel·la

paramagnètica independent. Així doncs, dins un mateix equip de dimensions reduïdes s'integren dos sensors específics que treballen independentment.

L'equip és capaç de detectar si el cabal d'entrada és insuficient per a la mesura i la presència de condensats en aquest corrent, evitant d'aquesta manera problemes tant amb la mesura com en el funcionament de l'equip. També és capaç de compensar de forma automàtica l'efecte sobre la mesura que poden tenir les variacions de pressió de gas, causades generalment per la variació del cabal d'aire d'entrada.

La disponibilitat d'obtenir les mesures realitzades per l'analitzador amb un equip connectat via RS-232 facilita la monitorització i control sobre el bioprocés.

Microbureta d'alimentació

Un altre component important del muntatge és la microbureta automàtica *microBUR 2031* (CRISON, Alella, Espanya). Aquesta és emprada per a l'addició de metanol, glicerol o sulfat d'amoni durant l'etapa del semicontinu. L'esterilització d'aquest equipament és de tipus química, passant en primer lloc aigua estèril seguit d'una solució 0.5 M de HCl, aigua estèril, 0.5 M de NaOH i etanol-aigua al 70%. Finalment es torna a passar aigua estèril i a continuació la solució pertinent. La microbureta permet la utilització de múltiples mides de xeringa (sèrie 1000 TLL, Hamilton, Suïssa) de diferent volum (variable entre 0.5-10 ml), aconseguint triar l'opció més adient segons el cabal/precisió desitjada.

L'èmbol que desplaça la xeringa és desplaçat per un motor pas a pas amb un total de 2500 passos, al manual de l'equip s'aconsella utilitzar com a mínim increments de 50 passos. Així doncs, per treballar amb precisió cal escollir la xeringa més adient al rang de volums necessaris a addicionar durant tot el procés. El motor tarda uns 12 segons en realitzar tot el recorregut, i com és conegut després d'una addició cal recuperar la posició inicial de l'èmbol, omplint de nou la xeringa de solució. Per tant, l'operació de dispensació i càrrega triga un màxim de 24 segons, i és per aquest motiu que el període mínim utilitzat és de 30 segons per addició. L'equip disposa d'un port RS-232 per a la comunicació amb un ordinador personal des d'on s'envia una cadena de text indicant la direcció i el nombre de passos del motor, la velocitat i la posició de la vàlvula de tres vies.

Cabalímetres/Controladors màssics

El cabal de qualsevol fluid pot ser mesurat indiferentment amb el volum o amb la massa. No obstant això, el volum pot variar en funció de la temperatura i la pressió al contrari que la massa, la qual es manté inalterable davant les possibles variacions d'aquestes magnituds físiques. Aquesta propietat fa que la mesura de la massa sigui la forma més aconsellable de mesurar el cabal que passa a través d'una conducció.

En aquest treball s'han utilitzat diferents cabalímetres capaços de mesurar el cabal d'aire que passa per un corrent. Tots ells han estat calibrats per utilitzar com a únic fluid aire. Es disposa de diferents rangs de treball (0-1,2,10 i 20 l·min⁻¹) i d'aquesta manera podent triar el cabalímetre més adient segons la seva funció final.

Com indica el seu nom es pot controlar el cabal en un valor desitjat, ja que el mateix equipament regula mitjançant una vàlvula el cabal d'aire que passa pel seu interior (Figura 3.2).

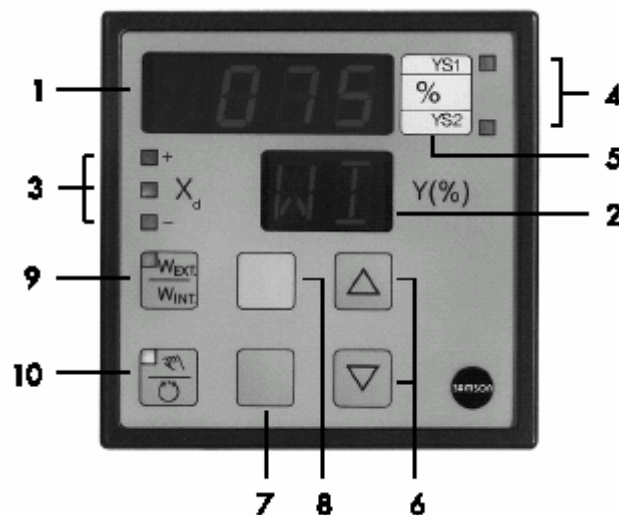


Figura 3.2. Cabalímetre/controlador màssic.

Sensor de pressió

Sensor de membrana extern de pressió (Phoenix Contact MCR- P/U/I-0-1000/DC, Blomberg, Alemanya). El rang de mesura va entre 0 i 1 atm en pressió relativa entre les dues entrades de que disposa.

Controlador TROVIS 6496



- 1.- Indicador del valor de la variable controlada.
- 2.- Indicador de la magnitud de la variable manipulada.
- 3.- Diferència entre mesura i consigna.
- 4.- Indicació dels contactes.
- 5.- Placa per indicar la magnitud física de treball.
- 6.- Tecler- cursor.
- 7.- Tecla de commutació.
- 8.- Tecla de confirmació.
- 9.- Commutador de consigna interna o externa.
- 10.- Commutador funcionament manual/automàtic.

Figura 3.3. Controlador Samson Trovis 6496.

Controlador compacte digital industrial TROVIS 6496 (Samson, Rubí, Espanya). Equip concebut per múltiples aplicacions en l'automatització de processos industrials (figura 3.3).

Aquest mòdul de control és el que rep el senyal del sensor i mitjançant un control de tipus P, PI o PID regula la variable manipulada del procés.

També disposa d'una funció d'autosintonia capaç de buscar un guany i constants de temps adients per controlar el sistema realitzant un esgló en llaç obert.

Estableix la comunicació amb un equip principal (ordinador) utilitzant el protocol RS-485 permetent la monitorització del sistema i el canvi de consigna des de l'exterior.

Vàlvula pneumàtica

Els tres elements necessaris per muntar el conjunt que forma la vàlvula pneumàtica són la microvàlvula (Samson, model 3510), l'actuador pneumàtic (Samson, model 3277) i el posicionador (Samson, model 3760).



Figura 3.4. Posicionador Samson 3760.

El posicionador (figura 3.4) és el responsable de convertir el senyal elèctric (4-20 mA) procedent del controlador al seu valor equivalent en el rang de pressió per modificar l'obertura de la vàlvula.

L'actuador pneumàtic (Figura 3.5) és la part mecànica que desplaça l'eix de l'obturador de la vàlvula proporcionalment a la pressió subministrada pel posicionador. Aquest model es caracteritza per la seva elevada velocitat de resposta i precisió en els moviments.

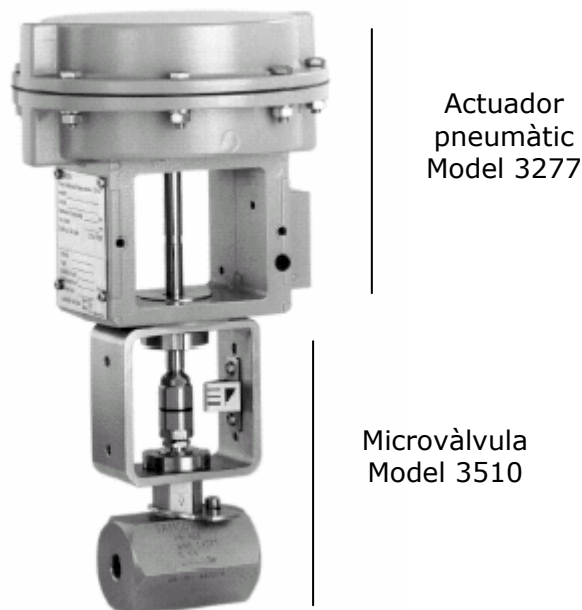


Figura 3.5. Vàlvula utilitzada per al control de la pressió al l'interior del reactor.

Finalment, la microvàlvula és un dispositiu mecànic que regula el flux que passa a través de la conducció mitjançant l'eixamplament o estretament de la mida de pas en un punt determinat. Segons el rang i precisió que es vulgui tenir sobre el flux poden variar les dimensions i tipus de vàlvula. El model seleccionat està especialment dissenyat per aplicacions a petita escala on es desitgi controlar amb força precisió (valor variable segons l'aplicació). També és capaç de suportar pressions i temperatures elevades i a través seu poden passar fluids altament corrosius.

3.1.3. ALTRES EQUIPS

La resta d'equipament utilitzat es detalla a continuació.

- ▶ Cambra de flux laminar Telstar BH-10 (Telstar, Terrassa, Espanya).
- ▶ Autoclau Varioklav 400 (Varioklav, Munich, Alemanya).
- ▶ Autoclau JP-Selecta Presoclave(JP selecta, Abrera, Espanya).
- ▶ Incubador Memmert BKE 40 (Memmert, Schwabach, Alemanya).
- ▶ Agitador orbital d'aire Infors AG Eroton (Infors AG, Bottmingen, Suïssa).
- ▶ Microscopi Olympus BH-2 (Olympus,Tokyo,Japó).
- ▶ Microscopi Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanya).
- ▶ Sonicador Braun Labsonic 2000 (B.Braun Biotech, Melsungen, Alemanya).
- ▶ Centrífuga Kontron Analytical Centrikon/H-401 (Kontron Hermle, Zurich, Suïssa).
- ▶ Centrífuga Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 (Sepatech, Hanau, Alemanya).
- ▶ Espectrofotòmetre UV-VIS PerkinElmer Lambda 5 (PerkinElmer Inc., Wellesley, USA).
- ▶ Espectrofotòmetre UV-VIS Varian Cary 3 (Varian Inc., Palo Alto, USA)

3.1.4. MATERIAL INFORMÀTIC

El maquinari informàtic utilitzat en el muntatge experimental, consta de dos ordinadors que monitoritzen i controlen la fermentació.

PC 1 (COMUNICACIONS):

Processador: Intel Pentium 200 MMX.

Memòria RAM: 64 Mb de RAM.

Disc dur: 2 Gb de disc dur.

Sistema Operatiu: Windows '98.

Targeta Ethernet 10/100 Kbs, connexió RJ-45.

Targeta comunicacions PCL-746.

Targeta comunicacions AC24AT Opto 22 (Opto 22, Temecula, USA).

2 ports de comunicació en sèrie estàndard (RS-232).

PC 2 (MONITORITZACIÓ I CONTROL):

Processador: Intel Pentium IV 1.5 GHz

Memòria RAM: 256 Mb de RAM a 133 MHz.

Disc dur: 40 Gb de disc dur.

Sistema Operatiu: Windows 2000.

Targeta Ethernet 10/100 Kbs, connexió RJ-45.

2 ports de comunicació en sèrie estàndard (RS-232).

3.2. SOLUCIONS I MEDIS DE CULTIU

En aquest apartat es detalla la composició química dels medis i solucions utilitzades per dur a terme la part experimental d'aquest treball.

La nomenclatura utilitzada en les solucions indica el nombre de vegades que està concentrada respecte a la concentració final que ha de tenir en el medi de cultiu. Per exemple, la biotina es prepara 500X indicant que la concentració en aquest recipient és cinc-centes vegades major a la concentració de biotina necessària dins el reactor.

La qualitat dels productes es classifica segons les indicacions del fabricant:

P: Puríssim.

PA: Per a anàlisi.

QP: Químicament pur.

3.2.1. SOLUCIONS

Solució 10X de dextrosa (D-glucosa)

Dissoldre 200 g de dextrosa (D- glucosa) en 1000 ml d'aigua. Filtrar en condicions estèrils amb un filtre de 0.2 µm. Aquesta solució no es pot esterilitzar ja que la glucosa es caramel·litza (reacció de Mallart). El temps de vida aproximat d'aquesta solució és d'1 any conservat a 4°C.

Solució 500 X Biotina (0.02%)

Dissoldre 20 mg de Biotina en 100 ml d'aigua destil·lada. Filtrar en condicions estèrils i guardar a 4 ° C. El temps de vida d'aquesta solució és de 1 any.

Solució 1000 X d'antiescumejant

Dissoldre 10 mg d'antiescumejant (AF) Strucktol en 1 L d'aigua destil·lada. La concentració òptima d'AF al medi de cultiu és al voltant de 10 mg/L. Per tant, s'ha de tenir en compte que només amb 5 ml d'aquesta solució d'AF s'aconsegueix la concentració òptima dins els 5 litres del reactor. Cal vigilar en no addicionar grans quantitats d'AF, ja que altera l'equilibri de l'oxigen dissolt entre la fase líquida i gasosa, dificultant la seva transferència.

Solució tampó Tris-HCl 200 mM a pH 7.4

Per preparar un litre de solució es necessita,

Nom	Pes (g.)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Tris (hidroximetil) aminometà	24.2	Panreac	131940	PA
Àcid clorhídric 37%	Fins arribar a pH 7.4	Panreac	131020	PA

Solució tampó Tris-HCl 400 mM+ CaCl₂ a pH 7.25

De forma similar a la solució anterior i abans de regular el pH amb l'àcid clorhídric, s'afegeix el clorur de calci.

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Clorur de calci anhidre	1.11	Panreac	121221	PA
Tris (hidroximetil) aminometa	48.4	Panreac	131940	PA
Àcid clorhídric 37%	Fins arribar a pH 7.25	Panreac	131020	PA

Solució tampó fosfat 1M, pH 6.00

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Potassi dihidrogen fosfat	22.97	Panreac	141509	P
Dipotassi hidrogen fosfat	118.05	Panreac	132333	PA

Es dissolen aquests dos components en un volum final d'un litre d'aigua destil·lada i es confirma que el pH és de 6.00 ± 0.1 (Si es necessita ajustar el pH es pot realitzar amb àcid fosfòric o hidròxid de potassi). Aquesta solució es pot autoclavar i emmagatzemar durant un any a temperatura ambient.

Solució Histidina 100X

Nom	Pes (mg)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
L-Histidina	400	Sigma	H-8125	

Dissoldre el sòlid pesat en 100 ml d'aigua desionitzada. Si no es dissolt, es pot escalfar a temperatures menors de 50°C. Aquesta solució no es pot autoclavar, cal utilitzar un filtre de 0.22 µm per esterilitzar-la. S'ha d'emmagatzemar a 4°C i es pot utilitzar durant un període màxim d'un any.

Solució Etanol 70 %

Per un litre de solució final:

Nom	Volum (ml)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Etanol 96 %	700	Panreac	161086	

Mesclar 700 ml d'etanol (96%) en 300 ml d'aigua destil·lada.

Solució Hidròxid de Potassi 5M

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Hidròxid de potassi	280	Panreac	141515	P

Es dissolt el sòlid amb aigua destil·lada fins un volum final d'un litre. Aquest procés és fortament exotèrmic i és aconsellable per tant, no afegir el sòlid de cop. Per esterilitzar la solució s'autoclava a 121 °C durant 30 minuts.

Solució "Trace Salts"

Pesar les quantitats indicades dels següents compostos:

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Sulfat de Coure pentahidratat	6.0	Merck	2790	PA
Iodur de Sodi	0.08	Panreac	141726	P
Sulfat de Manganès monohidratat	3.0	Panreac	131413	PA
Molibdat de Sodi dihidratat	0.2	Panreac	141701	P
Àcid Bòric	0.02	Panreac	131015	PA
Clorur de Cobalt	0.5	Merck	2539	PA
Clorur de Zinc	20.0	Panreac	141779	P
Sulfat de Ferro heptahidratat	65.0	R. Haen	31236	PA
Biotina	0.2	Sigma	B4501	
Àcid Sulfúric (96%)	5.0 ml	Panreac	211058	QP

Dissoldre'ls en aigua destil·lada fins arribar al volum final d'un litre. Un cop realitzada la mescla, cal filtrar-la a la cambra de flux amb un filtre estèril de 0.22 µm (Millipore, Bedford, USA). Aquesta solució s'emmagatzema a 4 °C i té una durada aproximada d'un any.

3.2.2. MEDIS DE CULTIU**Medi per cultius en discontinu.****BDMY (Buffered Dextrose-complex Medium)**

Nom	Pes (g.)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Extracte de Llevat	10	OXOID	L-21	
Peptona bacteriològica	20	OXOID	L-37	
Glicerol	60	Panreac	141339	P
YNB (Yeast Nitrogen Base)	1.7	DIFCO	223054	
Antiescumejant J673	1 gota	Strucktol	02041	

Es dissolen tots els components en aigua destil·lada en un volum final de 900 ml i s'hi afegeix 100 ml de la solució de tampó fosfat 1M (pH: 6.00). La solució s'autoclava i s'afegeixen 2 ml de biotina amb un filtre estèril de 0.22 µm. Es pot conservar fins a un màxim de dos mesos a 4°C.

BCM (Batch Complex Medium)

Per la preparació d'un litre de medi,

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Sulfat d'amoni	25	Panreac	141140	P
Metanol	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 peristàtiques. Abans d'inocular s'introdueixen $4.35 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ de "Trace salts" i $2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ de la solució de biotina 500X.

Medi per cultius en semicontinu

MFBD_1 (Medi Fed-batch definit 1)

Extret del manual que subministra Invitrogen (*Pichia* fermentation process guidelines, invitrogen), medi sintètic utilitzat per a cultius en semicontinu. La composició del medi per litre és,

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Àcid ortofosfòric (85%)	26.7 ml	Panreac	131032	P
Sulfat de calci	0.93	Panreac	121253	PA
Sulfat de potassi	18.2	Panreac	141532	P
Sulfat de magnesi heptahidratat	14.9	Panreac	131404	P
Hidròxid de potassi	4.13	Panreac	141515	P
Glicerol	40	Panreac	141339	P
Solució d'amoni 30 %	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 "Trace Salts" per litre de medi. Per controlar el pH s'utilitza la solució d'amoni al 30 %.

MFBD_2 (Medi Fed-batch definit 2)

Composició inicial del medi utilitzat en alguns estudis en cultiu en semicontinu (D' Anjou et al.,2001). La composició per litre és,

Nom	Pes (g)	Proveïdor	Ref.	Qualitat
Glicerol	40	Panreac	141339	P
Sulfat d'amoni	20	Panreac	141140	P
Potassi dihidrogen fosfat	12	Panreac	141509	P
Sulfat de magnesi heptahidratat	4.7	Panreac	131404	P
Clorur de calci anhidre	0.36	Panreac	121221	PA

Observacions: Medi sense precipitats i sense terbolesa. El medi és completat amb 4.35 ml de solució de "Trace Salts" per litre de medi. El pH es manté a 5.5 amb l'addició controlada d'hidròxid de potassi 5 M.

3.3. TÈCNiques MICROBIOLÒGIQUES

3.3.1. PREPARACIÓ PLAQUES DE PETRI (YPD)

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

- ▶ En una ampolla de 1 L esterilitzable addicionar :
 - 10 g. d'Extracte de Llevat.
 - 20 g. de Peptona.
 - 20 g. d'Agar.
- ▶ Dissoldre en 900 ml d'aigua destil·lada
- ▶ Esterilitzar a 121 °C durant 30 minuts.
- ▶ Quan encara estigui calent a l'ampolla estèril (35-40 °C), afegir 100 ml de solució de Dextrosa 10 X.
- ▶ En condicions estèrils (cambra de flux), omplir les plaques de Petri i esperar que solidifiquin en refredar-se.

3.3.2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE BIOMASSA TOTAL

Per 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

El més exacte és el de pes sec i consisteix en fer passar un volum conegut de mostra (8 - 10 ml) a través d'un filtre de microfibra de vidre (Whatman GF/F, Maidstone, Regne Unit) de 0.7 μm , prèviament tarat en sec. Seguidament es renta amb uns 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. Es prossegueix amb un procés d'assecament durant 24 hores en una estufa a 100°C. Finalment, es deixa que es refredi en un dessecador amb sílica gel i quan ha assolit un pes constant es dona per bo. 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.

Densitat òptica

Una forma més ràpida d'analitzar i conèixer la concentració de biomassa és mesurant l'absorbància de la solució a 600 nm (màxim d'absorbància pel llevat *Pichia pastoris*). Es pot relacionar linealment aquesta mesura amb el pes sec de la mostra mitjançant una senzilla correlació (Figura 7.1). Un dels principals problemes de la utilització d'aquest mètode és la interferència d'altres components del medi (coloració o sals del medi) que absorbeixin a aquesta longitud d'ona. No obstant això, aquest problema només és significatiu en aquest cas, per a concentracions de biomassa baixes (inferiors a 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Com descriu la Llei de Lambert-Beer, la linealitat entre la concentració d'un compost que adsorbeixi la llum i l'absorbància només es pot assegurar entre un cert rang. En el cas de la mesura de la biomassa aquest rang és, per aquestes condicions, entre 0 i 0.8. Per tant, cal realitzar nombroses dilucions amb aigua destil·lada fins aconseguir que el valor d'absorbància estigui entre aquests valors,

ja que a concentracions baixes de densitat cel·lular és supera ràpidament el límit superior.

3.3.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LIPOLÍTICA EXTRACEL·LULAR

Aquest anàlisi està basat en una modificació del test (nº 1821792, Roche, Mannheim, Alemanya) concebut per a la detecció de la lipasa humana. El pH i la temperatura fixades pel test han estat modificades 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) (S.Minning, 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 3.6).

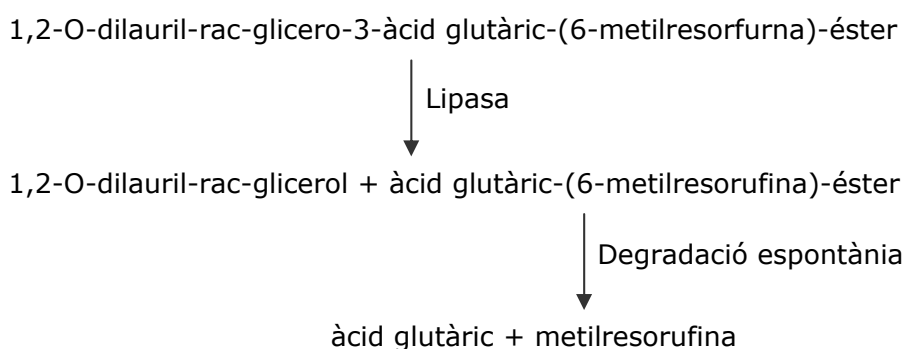


Figura 3.6. Reacció utilitzada per a la quantificació d'activitat lipolítica.

En solució alcalina, l'ester 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 (Figura 7.2).

3.3.4. 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 170-176 W/min 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 ($UA \cdot mg^{-1}$) 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 següent equació:

$$UA/mg \text{ de biomassa} = \frac{UA/ml \cdot 5ml}{V_{MOSTRA} \cdot X} \quad \text{eq. 3.1}$$

on:

UA: Unitats d'activitat lipolítica.

V_{MOSTRA} : Volum de la mostra utilitzada per a la determinació de lipasa (ml).

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

3.3.5. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ ELEMENTAL

Uns 10 ml de mostra de medi de cultiu es centrifuguen durant 5 minuts a 4°C a 4500 xg (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa). Es separa la part líquida i es resuspèn el sòlid amb 10 ml de solució tampó 10 mM Tris·HCl pH 8.0 i es torna a centrifugar amb les mateixes condicions.

Es redissol el sòlid amb la solució tampó anterior i es congela, posant el recipient en contacte amb gel sec i acetona, per una posterior liofilització (Virtis Sentry 5L, Virtis Company Gardiner, NY, USA), procés que dura aproximadament unes 24 h. Seguidament, s'asseca totalment el sòlid obtingut durant un període de 24-36 hores a l'interior d'un forn a 100 °C. Finalment, la composició elemental de C,H,N i S es mesurada amb l'analitzador elemental (Carlo Erba EA 1108, Carlo Erba Instruments, Milan, Itàlia). El contingut de cendres de la biomassa, és a dir, el material que no experimenta combustió amb O₂, va ser quantificat per triplicat en diferents mostres, sent en tots el casos al voltant del 9 % ($\pm 1\%$). Finalment, la quantitat d'oxigen es calcula com la diferència de la suma C,H,N,S i cendres fins arribar al 100% de la composició.

3.4. MÈTODES ANALÍTICS

3.4.1. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ D'AMONI

La concentració d'amoni és mesurada utilitzant un test colorimètric comercial (Dr. Lange LCK302 kit , Düsseldorf, Alemanya).

El principi de mesura es basa en que els ions d'amoni a pH 12.6 reaccionen amb els ions d'hipoclorit i salicilat en presència de sodi nitroprusit com a catalitzador per formar l'indofenol blau.

El rang de mesura d'aquest kit és entre 60-167 mg/l d'amoni. Les possibles interferències del mètode poden ser ions metàl·lics com Ag^+ , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{2+} . S'ha de tenir en compte que en cap dels medis de fermentació utilitzats es superen les concentracions crítiques d'aquests compostos que podrien provocar interferència en la mesura.

Només s'utilitzen 0.2 ml de mostra que es mesclen en un vial d'un únic ús que cal agitar vigorosament i esperar uns 15 minuts perquè la reacció arribi a la seva fi. A continuació, es mesura l'absorbància a 550 nm de la solució directament del vial en l'aparell subministrat per Dr.Lange (model CADAS, Dr. Lange, Düsseldorf, Alemanya). Aquest equip disposa ja internament del calibratge entre absorbància i concentració d'amoni, mostrant directament el resultat en unitats de concentració ($mg \cdot l^{-1}$).

La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és al voltant del 8 % del rang de mesura.

3.4.2. DETERMINACIÓ DE NITROGEN TOTAL

La concentració de nitrogen total és mesurada utilitzant el kit colorimètric comercial LCK 238 (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemanya). El rang de mesura de l'anàlisi oscil·la entre els 5-40 $mg \cdot l^{-1}$ de nitrogen.

El principi de mesura es basa en oxidar els enllaços del nitrogen fins a nitrit mitjançant la digestió amb peroxodisulfat. Els ions nitrat reaccionen amb el 2,6-dimetilfenol en una solució d'àcid sulfúric i fosfòric per formar el nitrofenol. La concentració d'aquest component es relaciona directament amb l'absorbància de la solució a 370 nm.

Durant el procés de preparació de la mostra analitzada, cal realitzar l'oxidació mantenint el recipient a 100 °C durant una hora. La resta de processos de separació es fan a temperatura ambient i simplement cal seguir l'ordre de mescla dels diferents reactius amb la solució inicial.

L'equip per realitzar la mesura és exactament el mateix que l'utilitzat per a la mesura de l'amoni amb el kit LCK302. El calibratge ja està internament guardat a l'aparell i mostra directament el resultat en $g \cdot l^{-1}$ de nitrogen total en realitzar la lectura d'absorbància.

La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és propera al 2% del rang de mesura.

3.4.3. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE GLICEROL

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 ml.

Les dades són monitoritzades i tractades pel programari comercial Millenium 2.15.10 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). La desviació estàndard residual (RSD) d'aquest mètode és del 3 % .

3.4.4. 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) amb un detector de tipus FID. Les condicions d'operació són 200°C i 280°C per l'injector i el detector, respectivament. La temperatura interior del forn segueix un perfil que comença a 40 °C (2 min), a 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 de 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 Millenium 32 software (Waters Corporation, Mildford, MA, USA). La desviació estàndard residual (RSD) del mètode és del 2 %.

3.5. PROTOCOLS DE FERMENTACIÓ

A continuació es presenten tots els passos que s'han de realitzar de forma cronològica per dur a terme les fermentacions en discontinu i semicontinu.

3.5.1. PRE-INÒCUL

Les soques utilitzades en aquest treball experimental són conservades en petites quantitats (recipients de 1 o 2 ml) a - 80 °C en un medi ric en glicerol, tal com recomana el manual de Invitrogen (*Pichia* fermentation manual). D'aquests se n'agafen 10 o 20 µl, que s'estenen sobre la placa de petri en condicions estèrils. La placa s'ha de mantenir durant 48 h dins una estufa a 30 °C, tapada amb parafilm o amb paper d'alumini per tal d'evitar que la contínua circulació d'aire a dins l'estufa assequi l'agar.

A continuació, es dissolen 0.5 g d'extracte de llevat i 1 g. de peptona en 40 ml d'aigua destil·lada en dos erlenmeyers de 250 ml. Es tapen els dos erlenmeyers amb taps de paper i s'autoclaven a 121 °C durant 30 min.

Un cop freds s'hi afegeix, en condicions estèrils (Cambra de flux), 5 ml de glicerol 10X i 5 ml de fosfat de potassi 1M pH 6.00, ambdós prèviament esterilitzats i a temperatura ambient. Mitjançant una xeringa de 1 ml amb un filtre de líquids estèril de 0.45 µm (Millipore, Bedford, USA), s'introdueixen al medi unes 4 o 5 gotes de la solució de Biotina 500X.

Finalment, s'inoculen amb un parell de nanses ben plenes de la placa de Petri els dos erlenmeyers (que ha d'estar a la nevera a 4°C si fa dies que ha crescut). Un cop inoculats s'introdueixen a l'orbital a 30 °C i 250 rpm durant 24 h.

3.5.2. INÒCUL

Dins el recipient del fermentador B.Braun Biolab s'hi dissolen en 300 ml d'aigua destil·lada, 5 g d'extracte de llevat i 10 g de peptona. El reactor s'autoclava amb el medi al seu interior, deixant una entrada semi-oberta per evitar sobrepressió. Juntament amb el reactor també s'autoclava un embut que es pugui introduir en alguna de les entrades del reactor, una proveta de 100 ml i dos pots de centrifuga de 250 ml (tot aquest material ha de ser embolicat en paper d'alumini per conservar posteriorment la seva esterilitat).

S'introdueix al fermentador en condicions estèrils, 100 ml de Glicerol 10 x, 50 ml de fosfat de potassi, ambdós utilitzant la proveta estèril, i 1 ml de Biotina 500X amb xeringa i filtre de baixa adsorció proteica.

Transcorregut el temps de cultiu dels erlenmeyers, es treuen de l'orbital i es mira la seva absorbància a l'espectrofotòmetre a 600 nm per conèixer quina és la concentració de biomassa aproximada. Fent una dilució 1:20, l'absorbància ha d'estar sobre 0.7-0.8 per tal d'aconseguir que tot el procés de fermentació sigui reproduïble. En el cas que sigui inferior o superior, s'ha de posar el volum necessari per aconseguir una concentració de microorganisme igual de l'absorbància recomanada en 50 ml.

Un cop ja s'han introduït a l'interior del reactor la totalitat dels compostos del medi i la biomassa, es tapen totes les sortides, assegurant-se que mantindran l'esterilitat a l'interior del recipient. Es connecten l'entrada i sortida d'aire, ambdues

protegides per filtres d'aire de 0.2 μm (MilliporeFG, Bedford, USA) regulant el cabal que passa pel difusor entre 2 i 3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura de treball és de 30°C i es manté mitjançant una manta tèrmica i un dit fred, que escalfen o refreden l'interior del bioreactor, respectivament.

Per últim, es posa en marxa el condensador i l'agitador a 500 rpm. El temps de cultiu és de 24 h.

3.5.3. POSADA EN MARXA DEL CULTIU

El protocol a seguir per portar a terme tant el cultiu discontinu com el semicontinu ("fed-batch") són idèntics en la seva fase inicial d'arrencada. L'únic que els diferencia és la utilització de diferent composició del medi inicial, amb les petites modificacions del protocol que això pot comportar.

Abans de procedir a l'esterilització del reactor cal que els següents complements del fermentador siguin esterilitzats per separat a l'autoclau :

- ▶ Punxó de 3 vies (per a l'addició de base, l'inòcul i l'antiescumejant) (almenys dues de les vies han d'estar preparades pel funcionament amb les bombes peristàltiques del Biostat ED). Tots els tubs han d'estar tancats amb claus Hoffman i embolicats amb paper d'alumini. A l'extrem dels tubs cal muntar les agulles metàl·liques.
- ▶ Punxó de 1 via (per a l'addició de glicerol). El tub tancat amb Hoffman i embolicat amb paper d'Alumini. El punxó es tapa amb la caputxa metàl·lica.
- ▶ Punxó de 1 via (per l'addició de metanol). El tub tancat amb Hoffman i embolicat amb paper d'Alumini.
- ▶ Els punxons es tapen amb la corresponent caputxa metàl·lica per mantenir la seva esterilitat fora de l'autoclau.
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 1 litre d'aigua destil·lada per ajustar el volum a 3.5 L després d'inocular.
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml amb 300 ml d'aigua destil·lada (per al inòcul).
- ▶ 1 ampolla amb sèptum d'antiescumejant Structol J673 1000X.
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml de HCL 1 M (per a l'esterilització química de la microbureta).
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml de NaOH 1 M (Esterilització química de la microbureta).
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml de H₂O (Esterilització química de la microbureta).
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml buida (per recollir el líquid sobrant de l'esterilització química de les microburetes).
- ▶ 2 pots de 250 ml de la Centrífuga KONTRON. Cal esterilitzar-los lleugerament oberts i tapats amb paper d'Alumini.

- ▶ La "T" de la sortida de gasos. Totes les sortides cal que estiguin embolicades amb paper d'Alumini.
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 250 ml de glicerol 50 % (v/v).

Cal posar-ho tot a una cistella metàl·lica i esterilitzar-ho a 121 °C durant 30 min.

A part, però sense passar per l'autoclau es preparen les següents ampolles:

- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 500 ml d'Etanol al 70 %
- ▶ 1 ampolla amb sèptum de 1 L de Metanol pur.

Segons la solució de base utilitzada, en funció del medi utilitzat, cal esterilitzar-la o no. Per exemple, en el cas de la solució d'amoni al 30% no es pot autoclavar i es pot utilitzar directament a la fermentació.

A continuació es procedeix al muntatge del reactor amb independència del medi de cultiu utilitzat (BMDY, BCM, MFBD_1 o MFBD_2). És important que en el procés de preparació en qualsevol dels medis utilitzats, el glicerol sigui l'últim component addicionat, ja que s'ha comprovat que això millora la solubilitat de les sals inorgàniques.

Preparació del reactor

- ▶ **Neteja:** Cal netejar amb aigua destil·lada l'interior del reactor i intentar treure tots els precipitats que puguin haver quedat adherits a les parets de les pales i del serpentí. No s'ha d'utilitzar ni sabó ni lleixiu, o en el cas que s'utilitzin, s'han de passar grans quantitats d'aigua destil·lada per tal d'evitar que quedin restes d'aquests components.
- ▶ **Instal·lació de les sondes:**
 - **Sonda de pH:** Abans de col·locar la sonda dins el reactor cal calibrar-la amb tampó pH 7.00 i pH 4.00 (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya). Per aquest fi, s'utilitza el menú de la Digital Control Unit-.DCU (Calibration→ pH).
 - **Sonda pO2 (Oxigen dissolt):** El calibratge d'aquesta sonda es realitza després de l'esterilització. El que s'ha de fer abans d'esterilitzar és el canvi d'electròlit i substituir la membrana en el cas que es vegi deformada. S'han de comprovar que en connectar la sonda la mesura va baixant progressivament fins arribar a un valor aproximat del 70–80 %. Si no és així, s'ha de substituir l'electròlit i la membrana.

Muntatge del fermentador:

Per dur a terme el muntatge i la preparació del fermentador cal:

- ▶ Assegurar-se que la junta de la tapa del reactor està en bon estat i untada de silicona.
- ▶ Addicionar el medi inicial i enrasar a 3.5 L amb aigua destil·lada.
- ▶ Col·locar la tapa i collar les rosques en forma d'estrella.

- ▶ Col·locar el manòmetre, la vàlvula de seguretat, l'entrada d'aire amb el filtre i el condensador més el portafiltres amb el filtre al seu interior.
- ▶ Assegurar-se que l'aire entra per capçalera del reactor i no s'introdueix pel difusor situat a la part inferior.
- ▶ Assegurar-se que no circuli aigua pel condensador. (L'aixeta ha d'estar ben tancada).
- ▶ A la resta d'entrades del fermentador col·locar-hi un sèptum amb el seu corresponent tap.
- ▶ Desconnectar la sortida de gasos del fermentador que es dirigeix a l'equip de pressió i a l'analitzador.

Esterilització:

- ▶ Abans d'esterilitzar es col·loca la camisa metàl·lica protectora al voltant del cilindre de vidre del reactor, com a mesura de seguretat.
- ▶ Cal assegurar-se que totes les entrades/sortides del reactor estan ben tancades.
- ▶ S'ha d'arrencar el programa automàtic d'esterilització de la DCU (Batch Process → F1 (Esterilitzation) → Start). El procés mantindrà el reactor durant 30 minuts a 121 °C.

Connexió de l'equip de gasos: Connectar l'equip de gasos, perquè s'escalfi progressivament i estigui operatiu quan es comenci la fermentació .

IMPORTANT: El tub dels gasos de sortida del fermentador ha d'estar desconnectat del control de pressió i de l'equip d'anàlisi de gasos durant el procés d'esterilització.

Finalment es deixa refredar el reactor durant unes dues hores fins que estigui a temperatura ambient.

3.5.4. POSADA EN MARXA DEL CULTIU DISCONTINU

Passos previs a la inoculació:

Per realitzar la inoculació, i com a passos previs cal:

- ▶ Instal·lar el punxó de 3 vies en una de les entrades superiors del fermentador. En les màximes condicions d'esterilitat, s'ha de col·locar el punxó, travessant el sèptum i enroscant amb força, per evitar fuites. Per un dels canals, hi passarà la solució d'amoni al 30 % (utilitzat com a base per controlar el pH a 5.5) i l'altre via, servirà per a la inoculació, després per afegir aigua per enrasar a 3.5 L i finalment per a l'addició puntual d'antiescumejant.
- ▶ Ajustar el pH del medi. Alguns dels medis utilitzats tenen un pH inicial força diferent a 5.5. Per ajustar el pH s'anirà afegint la base del medi seleccionat (per un dels canals del punxó de 3 vies) fins arribar a aproximadament a un pH de 5.3 (no arribar a pH 5.5, ja que encara s'ha d'afegir l'inòcul, aigua i les "Trace salts" que poden canviar el pH).

- ▶ Afegir per la sortida d'extracció de mostres 15.5 ml de "Trace salts" amb una xeringa de 20 ml i filtre estèril de 0.45 µm (Millipore).
- ▶ El calibratge de la sonda de pO₂ s'ha de fer just abans d'inocular, i amb el reactor i la sonda de pO₂ a temperatura ambient (si encara estan calents de l'esterilització, el calibratge no serà correcte). Per realitzar el calibratge cal seguir abans de tot els següents passos:
 - Posar l'agitació a la velocitat de 800 rpm. (Aquest valor ja es mantindrà constant durant tot el cultiu).
 - Connectar la sortida de gasos del fermentador a l'equip de pressió, per tal de que es realitzi la fermentació a una pressió coneguda. Amb l'objectiu que el gas arribi a l'equip d'anàlisi, s'ha de connectar el mòdul de control de cabalímetre/controlador màssic, en un valor de consigna d'aproximadament 0.5 l·min⁻¹.
 - Connectar l'aparell d'entrada d'aire al reactor per aconseguir que l'aire entri pel difusor.
 - Connectar el control de cabal d'aire a 4 l·min⁻¹.
 - S'espera uns 5 minuts (fins que la lectura sigui constant, es suposa estat estacionari). Es fixa aquest valor com a 100 % de saturació. (DCU, Calibration→pO₂→100%).
 - Per aconseguir el zero, cal tancar l'entrada d'aire al fermentador i substituir-la per l'entrada de nitrogen pur. Mantenir connectat fins arribar a l'estat estacionari. Comprovar que entren 4 l·min⁻¹ i que el control de pressió es manté a una consigna del 10 % (1.1 atm.).

Inoculació:

- ▶ Centrifugació de l'inòcul (BIOLAB): Un cop transcorregudes les 24 h de cultiu al BIOLAB, cal centrifugar-ho per canviar de medi complex a medi sintètic. Es transvasa tot el medi als 2 pots de la Centrifuga KONTRON de 250 ml prèviament esterilitzats i del mateix pes.
- ▶ El pots un cop ben tapats es porten a la Centrifuga (CentriKon H-401 ZK401, Kontron Hermle, Zurich, Suïssa), on a 4 °C i 8000 rpm, es separa la biomassa de la resta de medi.
- ▶ Tornant un altre cop a la cambra de flux, es llença el líquid del centrifugat, i es resuspèn la biomassa amb l'aigua estèril de l'ampolla estèril de 300 ml. Un cop tota la biomassa està en suspensió, es torna el líquid a l'ampolla amb sèptum destinada a l'inòcul.
- ▶ S'introdueix el líquid contingut en aquesta ampolla, mitjançant un dels canals del punxó de 3 vies amb la bomba de l'equip B.BRAUN. Tot seguit es connecta aquest canal amb l'ampolla d'aigua estèril per tal d'arrossegar la biomassa adherida a les parets del canal. Es continua introduint aigua fins arribar a un volum de 3.5 L (Per mesurar el volum inicial, cal parar l'agitació i l'addició d'aire).

- ▶ Es torna a connectar el cabal d'aire i l'agitació a les consignes de treball ($1.5 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ i 800 rpm, respectivament).
- ▶ S'addiciona manualment amb la bomba peristàltica del fermentador la quantitat necessària de solució d'amoni al 30 % per aconseguir el pH inicial de 5.5.
- ▶ Es connecten els programes de l'ordinador que s'encarreguen de la monitorització i control de totes les variables, i s'esperen breus instants fins que totes les variables es mantinguin constants (sobretot el pO_2 que ha disminuït quan s'ha parat momentàniament l'agitació).
- ▶ Es treu la primera mostra, i es comunica a l'ordinador que en aquest precís instant es comença la fermentació (PC2 → INICI → Comença Fermentació).

3.5.5. POSADA EN MARXA DEL CULTIU SEMICONTINU

Passos previs abans de començar el cultiu semicontinu:

Esterilització química de les microburetes automàtiques: Es connecta en el mateix pot d'aigua estèril destinat a aquest fi, i a través del sèptum, els tres canals d'entrada a les microburetes. Els tubs de sortida de les microburetes, es connecten a l'ampolla buida esterilitzada prèviament.

Per tal que les microburetes es rentin automàticament cal activar l'addició contínua des del programa de l'ordinador.

La seqüència de solucions a passar per les microburetes és aigua, àcid, aigua, base, aigua, etanol, aigua i finalment dos cicles de neteja del líquid que ha d'addicionar la microbureta (Metanol, Glicerol o Clorur d'amoni).

A continuació, treballant en condicions estèrils (Etanol 70%), es connecten al reactor els punxons per a cadascun dels canals provinents de les microburetes de les entrades a la posició corresponent (Cal recordar que si es mesura en línia la concentració de metanol amb l'equip MC-168, el punxó d'addició d'aquest substrat cal introduir-lo per la part inferior del reactor).

S'ha de connectar el tub de sortida de les microburetes automàtiques amb el tub de silicona del corresponent punxó, i omplir, mitjançant addicions manuals cadascun dels líquids fins que estigui a punt de caure la primera gota a l'interior del reactor.

En el moment que es decideixi començar el cultiu semicontinu, només cal prémer, en l'apartat de Transició del programa de l'ordinador, el botó START i les microburetes començaran a addicionar el volum desitjat per l'usuari o que decideixi l'algorisme de control.

3.5.6. POSADA EN MARXA DE L'EQUIP D'ANÀLISI EN LÍNIA DE METANOL

Com es veurà amb més profunditat en capítols posteriors, aquest equip permet la mesura en línia del metanol existent en el corrent gasós. Si es coneix aquesta concentració es pot establir una relació directe amb el metanol en fase líquida existent dins el reactor. Per assegurar-se que la mesura sigui correcte, cal

que el funcionament del reactor sigui el més estable possible. Per tant, variacions brusques del cabal d'aire, agitació o pressió, provoquen que es falsegi la mesura.

A continuació es detallen els principals aspectes que cal tenir en compte abans de connectar l'equip al fermentador:

El paràmetres de la corba de calibratge realitzat anteriorment a la fermentació, han d'estar inclosos al programa de l'ordinador, donant directament la quantitat que suposadament hi ha de metanol en la fase líquida i per tant accessible per al microorganisme.

Perquè la mesura del metanol tingui el menor temps mort possible, s'ha de col·locar una "T" estèril, després del portafiltres de sortida del reactor. Aquesta nova sortida de gas del fermentador es dirigeix directament a l'equip de mesura, el MC-168.

Un cop connectat, s'ha d'assegurar que la línia que es dirigeix cap a l'equip conté, en aquest ordre, una trampa de líquid, un prefiltre de cotó fluix i un filtre de gasos de 0.20 μm (Millipore FG, Bedford, USA). A continuació, i just abans que el canal de gas entri a l'equip de mesura, aquest canal passa per un cabalímetre/controlador màssic que assegura el pas constant, minimitzant les fluctuacions, de 0.3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ de gas provinent del fermentador.

Un cop finalitzat el muntatge de la línia, es pot connectar l'equip, i en 2 o 3 minuts ja es tindrà una mesura en línia del metanol.

3.6. LENGUATGE DE PROGRAMACIÓ UTILITZAT: VISUAL BASIC.

Una de les parts importants d'aquest treball experimental és la utilització d'un llenguatge de programació, el Visual Basic (VB), per realitzar un programa de monitorització, control i seguiment de la fermentació.

La programació en Windows (3.1, 95, NT) es pot realitzar usant diferents eines. Una aplicació Windows té diferències importants respecte un programa seqüencial clàssic i la seva interfície gràfica suposa també una dificultat afegida per al programador.

Amb l'aparició d'eines de programació específiques per al desenvolupament d'entorns Windows es proporcionen unes estructures d'interfície més adequades per al desenvolupament d'aplicacions (menús desplegable, botons d'ordres, quadres d'opció, etc.). D'aquesta manera, la creació d'interfícies d'usuari completes és més ràpida i eficaç, a més de permetre's el desenvolupament ràpid de prototips d'interfície per a la validació per l'usuari.

Aquests llenguatges es caracteritzen, principalment, perquè el programador desenvolupa l'aplicació bàsicament a partir del disseny d'una interfície. Crea una finestra, hi introdueix diversos objectes que simbolitzen dades o accions que ha de dur a terme, estableix propietats d'aquests objectes i afegeix codi on és necessari. D'una filosofia de codificació seqüencial es passa a una altra dirigida per esdeveniments.

Hi ha altres llenguatges per a la programació en Windows (C, C++, Visual C++, Pascal, Delphi, etc.), cadascun dels quals té els seus avantatges i inconvenients, i en general, parlem d'entorns de programació més que no pas de llenguatges de programació. Es tracta d'eines, basades sobre algun llenguatge de programació més o menys conegut.

L'elecció d'aquest llenguatge davant d'altres alternatives és principalment per la senzillesa (temps d'aprenentatge relativament curt), versatilitat i aparença (l'entorn Windows és més atractiu per a l'usuari final). A més, VB permet la generació (amb el mateix codi) de versions per a les distintes plataformes Windows 95, 98, NT, 2000 i XP (tant 16-bits com 32-bits).

La programació seqüencial parteix de la idea que una aplicació té unes dades d'entrada i mitjançant la implementació d'un algorisme proporciona unes dades de sortida. El programa bàsicament es dedica a recollir la informació necessària i realitzar els càlculs i operacions necessaris per proporcionar, generalment al final, el resultat objecte d'aquesta aplicació. L'aplicació mateixa controla les seccions de codi que s'han d'executar. L'execució s'inicia en la primera línia de codi, i continua una execució lineal fins a l'última, i es desvia per executar procediments a mesura que són cridats.

Una aplicació sota el sistema operatiu Windows sol estar fortament condicionada a l'ús d'una interfície gràfica que permet a l'usuari la introducció d'informació, i que reacciona enfront de diferents esdeveniments (o successos) que produeix tant l'usuari com altres fonts (p. e.: la pulsació d'una tecla o un clic amb el ratolí en punt determinat). Les aplicacions es centren en un funcionament guiat pels esdeveniments que es van produint.

És important assenyalar que l'entorn Windows preveu la possibilitat de tenir actives diferents aplicacions, que s'executen alhora. També podem tenir diferents instàncies de la mateixa aplicació en execució. Aquesta característica es coneix com multitasca i és una de les principals diferències entre el sistema operatiu Windows i el seu antecessor, MS-DOS.

3.7. CÀLCULS

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

3.7.1. CÀLCUL DEL'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 bombolreja 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:

$$\frac{dO_2}{dt} = OTR - OUR \quad \text{eq. 3.2}$$

on:

OTR = ("Oxygen Transfer Rate") Velocitat de transferència d'oxigen de la fase gasosa cap a la fase líquida.

O₂: Concentració d'oxigen dissolt en el reactor.

OUR: ("Oxygen uptake rate") Velocitat de consum d'oxigen per part del microorganismes.

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:

$$OTR = k_{LA} \cdot (O_2^{sat} - O_2) \quad \text{eq. 3.3}$$

on:

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

O₂^{sat}: Concentració de saturació d'oxigen dissolt.

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 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 en el temps es aproximadament zero, es pot calcular la velocitat de consum d'oxigen ($\text{mol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) com:

$$OUR = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{ent,O_2} - X_{sort,O_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O_2} - X_{ent,CO_2})}{(1 - X_{sort,O_2} - X_{sort,CO_2})} \right] \quad \text{eq. 3.4}$$

on:

k' : Factor de conversió ($2.65 \text{ mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (P: 1.1 atm i T: 303 K) (Per gas ideal).

V_R : Volum del reactor (l).

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

X_{ent,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent d'aire d'entrada.

X_{sort,CO_2} : Fracció molar de CO_2 del corrent de gas de sortida.

X_{ent,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent d'aire d'entrada.

X_{sort,O_2} : Fracció molar d' O_2 del corrent de gas de sortida.

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:

$$OUR = \left(\frac{1}{Y_{x/o}} \cdot \mu + m_{ox} \right) \cdot X \quad \text{eq. 3.5}$$

on:

$Y_{x/o}$: Rendiment ($\text{g X} \cdot \text{mol O}_2 \text{ consumit}^{-1}$).

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

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

X : Concentració de biomassa ($\text{g X} \cdot \text{l}^{-1}$).

m_{ox} : Coeficient de manteniment ($\text{mol O}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

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

Dinàmica del diòxid de carboni dissolt:

El diòxid de carboni també desenvolupa un paper important en les fermentacions aeròbiques 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:

$$\frac{dCO_2}{dt} = CER - CTR \quad \text{eq. 3.6}$$

on:

CO_2 : Concentració de diòxid de carboni a la fase líquida.

CER: (CO_2 Evolution rate) Velocitat de producció de CO_2 a causa del creixement del microorganisme.

CTR: (CO₂ Transfer rate) Velocitat de transferència de diòxid de carboni de la fase líquida cap a la fase gasosa.

El diòxid de carboni es 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 dihidrogen carbonat (HCO₃⁻) i carbonat (CO₃²⁻). A la figura 3.7 es descriu el seguit de reaccions d'associació i dissociació que tenen lloc en el procés.

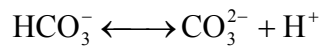
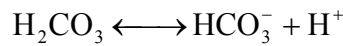
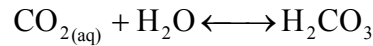
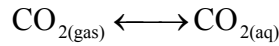


Figura 3.7. Reaccions del diòxid de carboni a la fase líquida.

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.

$$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_{2(\text{aq})}]} = 10^{-3} \quad \text{eq. 3.7}$$

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{2.5 \cdot 10^{-4}}{[\text{H}^+]} \quad \text{eq. 3.8}$$

$$\frac{[\text{CO}_3^{2-}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{6 \cdot 10^{-11}}{[\text{H}^+]^2} \quad \text{eq. 3.9}$$

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 pH's àcids la concentració de les espècies derivades de l'àcid carbònic és menor que a pH's 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 et al., 2004).

Si es considera que el pH és constant, és a dir, que no hi ha pràcticament reacció del CO₂ en fase aquosa per formar carbonat, llavors es pot definir la velocitat de producció de CO₂ (CER mol CO₂·L⁻¹·h⁻¹) com:

$$\text{CER} = \frac{k'}{V_R} \cdot F_{ent} \cdot \left[X_{ent,CO_2} - X_{sort,CO_2} \cdot \frac{(1 - X_{ent,O_2} - X_{ent,CO_2})}{(1 - X_{sort,O_2} - X_{sort,CO_2})} \right] \quad \text{eq. 3.10}$$

on:

k' : Factor de conversió ($2.65 \text{ mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (P: 1.1 atm i T: 303 K)
(Per gas ideal)

V_R : Volum del reactor (l).

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

$X_{\text{ent,CO}_2}$: Fracció molar de CO_2 del corrent d'aire d'entrada.

$X_{\text{sort,CO}_2}$: Fracció molar de CO_2 del corrent de gas de sortida.

$X_{\text{ent,O}_2}$: Fracció molar d' O_2 del corrent d'aire d'entrada.

$X_{\text{sort,O}_2}$: Fracció molar d' O_2 del corrent de gas de sortida.

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:

$$CER = \left(\frac{1}{Y_{x/\text{CO}_2}} \cdot \mu + m_{\text{CO}_2} \right) \cdot X \quad \text{eq. 3.11}$$

on:

Y_{x/CO_2} : Rendiment ($\text{g X} \cdot \text{mol CO}_2 \text{ consumit}^{-1}$).

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

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

X: Concentració de biomassa ($\text{g X} \cdot \text{l}^{-1}$).

m_{CO_2} : Coeficient de manteniment ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

El coeficient de manteniment té en compte la respiració endògena de 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 (Montague, 2000) anomenat quocient respiratori, RQ (Respiration Quotient).

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad \text{eq. 3.12}$$

És conegut que el RQ varia segons la naturalesa dels 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.

3.7.2. 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.

Cultiu en discontinu

BIOMASSA

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

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.13}$$

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.

$$0 + r_x \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.14}$$

Reordenant els diferents termes s'obté:

$$r_x \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot X \quad \text{eq. 3.15}$$

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

$$r_x = \mu \cdot X \quad \text{eq. 3.16}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{eq. 3.17}$$

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

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{eq. 3.18}$$

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

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.19}$$

SUBSTRAT

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

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.20}$$

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

$$0 - r_s \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.21}$$

Reordenant l'equació

$$-r_s \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot S \quad \text{eq. 3.22}$$

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

$$r_s = Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X \quad \text{eq. 3.23}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{eq. 3.24}$$

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

$$-Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V \quad \text{eq. 3.25}$$

Simplificant el terme del volum,

$$-r_s = -Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X = \frac{dS}{dt} \quad \text{eq. 3.26}$$

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

$$q_s = Y_{s/x} \cdot \mu \quad \text{eq. 3.27}$$

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

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \quad \text{eq. 3.28}$$

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

$$q_s = -\frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.29}$$

PRODUCTE

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

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.30}$$

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

$$0 + r_p \cdot V = 0 + \frac{d(P \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.31}$$

Reordenant els termes

$$r_p \cdot V = \frac{dP}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot P \quad \text{eq. 3.32}$$

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

$$r_p = Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X = q_p \cdot X \quad \text{eq. 3.33}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{eq. 3.34}$$

Substituint les eq. 3.33 i eq. 3.34 a l'expressió del balanç,

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X \quad \text{eq. 3.35}$$

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,

$$q_p = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.36}$$

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,

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.37}$$

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,

$$0 + r_x \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.38}$$

Reordenant els termes,

$$r_x \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot X \quad \text{eq. 3.39}$$

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

$$r_x = \mu \cdot X \quad \text{eq. 3.40}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{eq. 3.41}$$

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

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F \cdot X}{V} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot X \quad \text{eq. 3.42}$$

Aïllant el valor de la velocitat específica de creixement,

$$\left(\mu - \frac{F}{V} \right) = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.43}$$

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} + \frac{F}{V} \quad \text{eq. 3.44}$$

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 discontinu,

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.45}$$

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.

$$F \cdot S_0 - r_s \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.46}$$

Reordenant els termes del balanç,

$$F \cdot S_0 - r_s \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot S \quad \text{eq. 3.47}$$

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

$$r_s = Y_{s/x} \cdot \mu \cdot X = q_s \cdot X \quad \text{eq. 3.48}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{eq. 3.49}$$

Substituint les equacions de 3.48 i 3.49 al balanç de matèria s'obté la següent expressió,

$$F \cdot S_0 - q_s \cdot X \cdot V = \frac{dS}{dt} \cdot V + F \cdot S \quad \text{eq. 3.50}$$

Dividint l'equació anterior pel volum

$$\frac{F \cdot S_0}{V} - q_s \cdot X = \frac{dS}{dt} + \frac{F \cdot S}{V} \quad \text{eq. 3.51}$$

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

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X - \frac{F \cdot (S - S_0)}{V} \quad \text{eq. 3.52}$$

$$q_s = -\left(\frac{dS}{dt} + \frac{F \cdot (S - S_0)}{V}\right) \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.53}$$

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 un cultiu en semicontinu,

$$E + G = S + A \quad \text{eq. 3.54}$$

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

$$0 + r_p \cdot V = 0 + \frac{d(P \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 3.55}$$

Reordenant els termes del balanç,

$$r_p \cdot V = \frac{dP}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot P \quad \text{eq. 3.56}$$

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

$$r_p = Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X = q_p \cdot X \quad \text{eq. 3.57}$$

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

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{eq. 3.58}$$

Substituint les dues últimes equacions al balanç de matèria,

$$q_p \cdot X = \frac{dP}{dt} + \frac{F \cdot P}{V} \quad \text{eq. 3.59}$$

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

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X - \frac{F \cdot P}{V} \quad \text{eq. 3.60}$$

$$q_p = \left(\frac{dP}{dt} + \frac{F \cdot P}{V} \right) \cdot \frac{1}{X} \quad \text{eq. 3.61}$$

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.

3.7.3. 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. 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 exacte. 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 dels 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).

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 3.8).

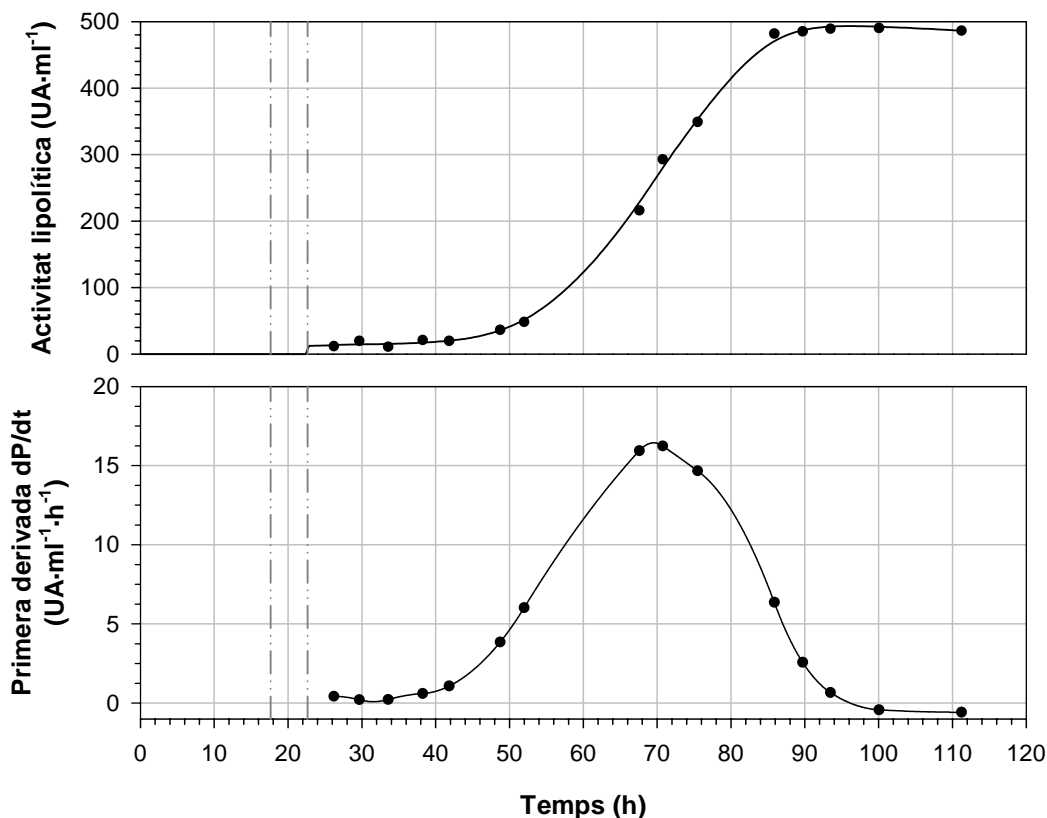


Figura 3.8. Exemple de càlcul de la derivada dP/dt utilitzant l'aproximació per splines.

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).

3.7.4. 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 dividir aquest valor per al increment de temps, com s'indica a l'equació 3.62.

$$\bar{x} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \int_{t_1}^{t_2} x(t) \cdot dt \quad \text{eq. 3.62}$$

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 3.62 el valor mitjà de la variable.

3.7.5. 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 dóna 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 totals.

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 (Pirt,1975) 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,

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{X/S} \cdot \frac{dS}{dt} \quad \text{eq. 3.63}$$

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.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{eq. 3.64}$$

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,

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{eq. 3.65}$$

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.

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad \text{eq. 3.66}$$

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

3.7.6. 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,

$$\text{Productivitat Volumètrica} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{eq. 3.67}$$

$$\text{Productivitat específica} = \frac{\Delta P}{\Delta X \cdot \Delta t} \quad \text{eq. 3.68}$$

on

ΔP : Increment de productivitat ($\text{UA} \cdot \text{l}^{-1}$).

Δt : Increment de temps (h).

ΔX : Increment de la concentració de biomassa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

3.7.7. 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 $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, 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 3.69.

$$V_b = \frac{X \cdot V}{\sigma \cdot \rho} \quad \text{eq. 3.69}$$

on:

V_b : Volum total de cèl·lules (l).

σ : Fracció de matèria seca a la biomassa (g X seca · g X humida⁻¹)

ρ : Densitat del microorganisme (g · l⁻¹)

Per tant, el volum de la fase aquosa es calculat per la diferència entre el volum total i el volum ocupat per les cèl·lules (eq. 3.70).

$$V_a = V - V_b = V \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad \text{eq. 3.70}$$

S'han emprat els valors bibliogràfics de la fracció de matèria seca i de densitat de 0.3 g X seca · g X humida⁻¹ i 1.07 g · l⁻¹, valors mitjans per llevats (Borzani et al., 2003; Borzani et al., 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 3.71 i 3.72 mostren com es modifica la concentració de substrat i producte en funció del moment en que s'ha realitzat el cultiu.

$$S' = S \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad \text{eq. 3.71}$$

$$P' = P \cdot \left(1 - \frac{X}{\sigma \cdot \rho} \right) \quad \text{eq. 3.72}$$

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. ESTUDI DE LA FERMENTACIÓ

4.1.1. ANTECEDENTS PREVIS

Aquest treball experimental parteix del coneixement adquirit en estudis anteriors on es va iniciar la producció de lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) expressada en *Pichia pastoris*. Els resultats previs han ajudat a decidir quina era la millor direcció a seguir per tal d'aconseguir els objectius fixats.

La primera soca que es va utilitzar, descendent de la salvatge, era una Mut⁺ "singlecopy" (anomenada X33 clon7/ROL) facilitada per S. Minning (1998). A partir d'aquesta es van començar a realitzar alguns cultius amb el propòsit d'aconseguir millorar substancialment els nivells de producció de ROL.

Atesa la poca experiència que es tenia en la realització de cultius amb aquesta soca es va seguir metòdicament el protocol d'operació i es van utilitzar els medis proposats per Invitrogen (Invitrogen Fermentation guidelines, <http://www.invitrogen.com/>).

L'estratègia de cultiu més utilitzada i que ha donat millors resultats en la producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris* ha estat el cultiu en semicontinu o "fed-batch". Aquesta estratègia d'operació, utilitzada en aquest cas concret, es pot diferenciar en tres etapes. Una primera etapa destinada al ràpid creixement del microorganisme en presència de glicerol (40 g·l⁻¹), substrat repressor del sistema d'inducció. L'exhauriment de la font de carboni de l'etapa anterior, detectat per una accentuada pujada de l'oxigen dissolt, es continua amb una segona etapa on s'addiciona glicerol a cabal constant (18.5 ml·l⁻¹·h⁻¹), amb l'única intenció d'aconseguir una concentració de biomassa prou elevada per a la posterior inducció. L'última etapa, és on s'addiciona únicament el metanol utilitzant diferents estratègies per tal d'induir la producció de la proteïna hoste.

Conegut que altes concentracions de metanol són tòxiques per al creixement d'aquest microorganisme (Hellwig et al., 2001), l'alimentació del metanol a l'última etapa es realitza seguint l'esquema d'addició recomanat per Invitrogen per a una soca del tipus Mut⁺ (Invitrogen Fermentation guidelines).

L'estratègia a la fase d'inducció consisteix en anar modificant el cabal d'alimentació de metanol per tal de mantenir constant la mesura d'oxigen dissolt (pO₂) del medi. Així doncs, una pujada del pO₂, s'interpreta com un exhauriment del metanol existent al medi i s'actua incrementant progressivament el cabal d'entrada d'aquest substrat. Atès que no hi ha cap mesura directe que indiqui l'acumulació de metanol a l'interior i que en teoria, la demanda de metanol augmenta per l'increment de la concentració de biomassa al medi, en cap moment es redueix el cabal d'addició de substrat.

Es van realitzar una sèrie de cultius seguint aquesta metodologia utilitzant un primer medi de cultiu complex BDMY (Apartat 3.2.2) i després amb un medi de cultiu sintètic (MFBD_1). En ambdós cultius les produccions d'enzim no van ser molt elevades. El mal funcionament d'aquesta estratègia es va atribuir a les altes concentracions de metanol acumulades al fermentador, fins a nivells descrits com a tòxics per *Pichia pastoris* (>10 g·l⁻¹). Per altra banda, la forta demanda d'oxigen del microorganisme en l'última etapa a elevades concentracions de biomassa va provocar que les condicions d'operació (agitació i cabal d'aire a l'entrada) fossin extremes, dificultant enormement el bon funcionament dels cultius.

Treballs posteriors a aquests primers contactes, van comparar el creixement de la soca X33/ROL (Mut⁺ "singlecopy") amb les soques comercials control GS115 i KM71 (Mut⁺ i Mut^s, respectivament) que no contenien el gen de ROL (Serrano, 2002). Es van realitzar una sèrie de cultius en erlemeyer utilitzant un medi mínim (BMM) amb metanol com a única font de carboni i substrat inductor. Aquests experiments van demostrar que la velocitat específica de creixement (μ) de la soca X33/ROL era superior a la soca control de Mut^s (KM71), com era d'esperar, per les característiques fenotípiques de cada soca. El que potser va sorprendre, en primera instància, va ser la diferència entre la μ de les dos soques Mut⁺ (GS115 i X33/ROL), sent la velocitat específica de creixement de la soca comercial superior a la soca que contenia el gen de ROL.

Aquesta variació va ser atribuïda al possible efecte tòxic de l'expressió de la ROL sobre el creixement cel·lular, degut a la possible activitat de la fosfolipasa de l'expressió recombinat de l'enzim madur, com havia estat observat prèviament en *E. coli* (Beer et al., 1996).

Existeixen diferents treballs que descriuen l'expressió de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris* on la seva expressió provoca una disminució de la velocitat específica de creixement comparada amb la soca salvatge, causant un efecte aparentment tòxic sobre la cèl·lula hoste Mut. En aquests casos s'han aconseguit nivells de producció més elevats mitjançant la disminució de la velocitat d'addició de metanol, frenant d'aquesta forma la velocitat d'expressió del promotor d'AOX1 (Brierley et al., 1990).

Efecte de la variació de fenotip

Arribat aquest punt es va decidir començar a estudiar l'expressió de ROL en un cultiu amb una soca Mut^s en medi sintètic, ja que la seva velocitat específica de creixement seria inferior a la soca Mut⁺. Aquesta elecció comporta treballar amb un sistema amb una dinàmica de creixement més lenta, assegurant-se una major facilitat per controlar el cultiu.

La construcció d'aquesta nova soca va ser realitzada per Serrano (2002) transformant per electroporació de cèl·lules de la soca comercial KM71 (Mut^s his⁻) amb el vector pPICZA α -ROL (Invitrogen). Es van aïllar els clons de Mut^s que resistien la presència de zeocina a les plaques, obtenint la soca KM100_0/ROL (Mut^s his⁻). En cultius en erlenmeyer es va poder comprovar per la seva baixa velocitat de creixement que la soca era de fenotip Mut^s i que contenia el gen de ROL, ja que es va detectar la presència de lipasa extracel·lular. L'únic problema que presentava la nova KM100_0/ROL era l'auxotrofia per histidina, que incapacitava al microorganisme a créixer sense la presència externa d'aquest aminoàcid, ja que no era capaç de sintetitzar-lo. Aquesta característica venia heretada de la soca comercial KM71. Es va considerar oportú realitzar la reversió d'aquest defecte seguint la tècnica detallada per Serrano (2002). El resultat final va ser l'obtenció d'una soca Mut^s his⁺ ROL, anomenada KM100_1.

Seguint el protocol de fermentació proposat per Invitrogen, a l'igual que els altres casos, es va començar el cultiu amb una primera etapa en discontinu de 40 g·l⁻¹ de glicerol. L'augment sobtat de pO₂ al medi de cultiu indicava l'exhauriment del glicerol, dada que era ratificada per l'anàlisi mitjançant HPLC. A continuació es va addicionar directament un cabal de metanol de 5 ml·h⁻¹, suprimint l'etapa intermèdia, mantenint l'addició constant durant un període de dues hores amb l'únic propòsit d'adaptar les cèl·lules a la nova font de carboni.

Després d'aquest període, la velocitat d'addició de metanol era incrementada un 10 % cada 30 minuts fins arribar a un cabal màxim de 15 ml·h⁻¹. A partir

d'aquest moment, es modificava la velocitat d'addició segons la lectura de l'oxigen dissolt existent al medi. Un augment de l'oxigen dissolt del medi s'interpretava com l'exhauriment del metanol existent al medi, i per tant s'augmentava un 10 % el cabal de metanol.

Els millors resultats en termes de productivitat es van obtenir amb medi complex, obtenint un 50 % més d'activitat lipolítica que amb el medi sintètic. L'anàlisi posterior de les mostres extretes durant la fermentació va assenyalar que durant bona part de la fase d'inducció, la concentració de metanol al medi havia superat valors de més de $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Aquestes concentracions són considerades com a tòxiques per al creixement de *Pichia pastoris*, i molt per sobre dels $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bibliogràficament recomanats (Swartz et al., 1981, Stratton et al., 1998).

Altes concentracions de metanol al medi provoquen la generació de concentracions elevades de metabòlits de naturalesa tòxica per la cèl·lula com el formaldehid, l'àcid fòrmic o en la seva forma ionitzada, el format. L'acumulació d'algun d'aquests compostos pot suposar un efecte tòxic fins a cent vegades major per a la cèl·lula que el propi metanol (Jones et al., 1991).

D'altra banda, està descrit a la bibliografia (Cregg et al., 1993) que elevades concentracions de metanol al medi produeixen un efecte negatiu sobre els nivells de transcripció iniciats pel promotor del gen AOX1 (P_{AOX1}) els quals poden arribar a ser entre 3 i 5 vegades superiors quan la concentració de metanol al medi és limitant.

D'aquesta forma es va arribar a la conclusió que la millor forma de treballar era mantenint, durant l'etapa d'inducció, la concentració de metanol per sota dels nivells tòxics. Pel que fa a l'estratègia de cultiu, els negatius resultats obtinguts fent un seguiment del pO_2 desaconsellaven la utilització d'aquesta tècnica. Atès que cap mesura indirecta de la concentració de metanol era molt fiable es va decidir treballar mesurant directament la concentració de metanol. Mitjançant cromatografia gasosa (CG) d'una mostra filtrada del medi es coneixia la concentració de metanol i es modificava el cabal d'addició en funció d'aquest valor. Evidentment, aquesta estratègia suposava una gran esforç per part de la/les persona/es que realitzava/en la fermentació, però davant la falta d'equipament de monitorització en línia de la concentració de metanol, es presentava com la solució més raonable.

El ràpid processament i anàlisi de la mostra del bioreactor permetia saber, en un període curt de temps, la concentració de metanol i modificar el cabal d'alimentació amb l'objectiu de controlar la seva concentració al medi de cultiu. Amb aquesta nova estratègia es va aconseguir que el metanol no superés en cap moment una concentració superior a $2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. No obstant això, durant alguns períodes de la fermentació es va arribar a exhaurir totalment el metanol, ja que el microorganisme consumia el substrat a una velocitat superior a la de subministrament.

La producció va augmentar amb un factor de 2.5 vegades respecte a l'obtinguda utilitzant l'estratègia d'addició de l'oxigen dissolt. Tot i això, es va detectar, després de la primera fase de creixement amb glicerol, en canviar bruscament de font carboni al medi, l'existència d'una fase de latència. En aquest període d'adaptació d'una durada aproximada de 30 hores, no hi havia ni creixement del microorganisme ni expressió de l'enzim d'interès. Ja que un dels objectius principals era millorar la productivitat, la reducció d'aquest temps necessari per a l'adaptació a la nova font de carboni era essencial.

Existeixen varis exemples a la bibliografia de cultius amb llevats metilotròfics, com *H. polymorfa*, *P. Pinus*, *C. boindinii* o la mateixa *P. pastoris* on s'ha augmentat el rendiment biomassa/substrat, utilitzant metanol com a substrat, mitjançant l'addició d'aquest amb una altra font de carboni en concentracions limitants (Müller et al., 1986). A més s'ha observat que l'addició de substrats mixtes augmenta la velocitat de consum de metanol, millorant substancialment la productivitat final del cultiu (Chirovolu et al., 1997, Katakura et al., 1998). Aquestes millores són en bona part gràcies a la reducció del temps de latència entre el canvi de fonts de carboni.

Així doncs, es van dissenyar una sèrie d'experiments introduint una nova fase dins el cultiu entre l'etapa en discontinu i la d'inducció, en la que es va utilitzar una mescla de glicerol i metanol. El propòsit d'aquesta era aconseguir un canvi més progressiu de la font de carboni, aconseguint reduir el temps d'adaptació.

Aquesta nova fase de transició es va implementar seguint l'esquema d'addició de substrats mixtes descrit per Katakura et al. (1998). Per tant, en acabar la primera fase en discontinu i per un període total de cinc hores, es començà a addicionar un cabal decreixent de glicerol en presència de metanol. Més concretament, un flux de glicerol constant durant les dues primeres hores de 300 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, baixant a 160, 100 i 65 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ les últimes tres hores de l'etapa, respectivament. Aquests cabals estan calculats per mantenir en tot moment la concentració de glicerol pràcticament a zero, en condicions limitants. És a partir de la tercera hora que s'introdueix un cabal constant de 100 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ de metanol, garantint que la concentració d'aquest component al final de l'etapa estigui entre els límits aconsellats (1–5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Seguidament, la fase d'inducció es realitzà utilitzant la mateixa metodologia que la fermentació anterior, analitzant les mostres de cultiu per cromatografia de gasos i modificant, pràcticament en línia, el cabal de substrat a addicionar en funció del consum de metanol del microorganisme.

Els resultats de la fermentació van ser esperançadors, en part gràcies a la reducció del temps d'adaptació al canvi de font de carboni. Es va observar que, durant aquesta etapa de transició el metanol existent al medi es va acumular i no va ser fins que es va exhaurir totalment el glicerol quan es va detectar un consum significatiu de metanol. Tot i així, la presència anterior de metanol al medi escurçava clarament el període d'adaptació al nou substrat. D'altra banda, també es demostrava l'efecte repressor que exercia el glicerol sobre l'expressió de l'AOX.

La producció es va incrementar unes 4 vegades i la productivitat unes 6 vegades respecte la mateixa estratègia d'operació prèvia sense aquesta etapa de transició.

També es va estudiar quin era l'efecte que tenia sobre el creixement del microorganisme la utilització de la soca de *P. pastoris* amb i sense la proteïna d'interès. Comparant dues fermentacions, seguint la mateixa estratègia de fermentació, amb l'única variació del tipus de soca utilitzada, es va veure clarament l'efecte negatiu que té la inclusió de la ROL dins el material genètic del microorganisme. La soca utilitzada com a control mantenia la mateixa velocitat específica de creixement que la X33/ROL quan la font de carboni utilitzada era glicerol. Les diferències entre ambdues augmentaven clarament quan l'únic substrat del medi era metanol, la velocitat específica de consum d'aquest component era molt més gran al utilitzar la soca GS115 sense ROL. Així doncs, és clar que per algun fenomen, l'expressió de la ROL té un efecte negatiu en el creixement de *P. pastoris*.

Efecte de l'augment de la dosi gènica.

Treballs previs dins el mateix projecte d'investigació, van estudiar l'efecte de l'augment de la dosi gènica heteròloga per als fenotips Mut^s i Mut⁺, en l'expressió de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *Pichia pastoris* (Serrano, 2002).

Anteriorment s'havia millorat la producció de forma operacional, modificant l'estratègia de cultiu, però és clar que hi ha altres formes d'augmentar la quantitat d'enzim expressat. Les dues probablement més importants són variar el fenotip cel·lular de la soca utilitzada respecte la forma d'assimilar el metanol (fenotip Mut) i per altra banda, incrementar el nombre de còpies del gen extern dins el genoma de la cèl·lula hoste.

Pel que fa la primera, com s'ha detallat a l'apartat anterior es van provar els dos fenotips Mut⁺ i Mut^s amb una única còpia del gen de ROL. Els resultats a nivell de producció van ser millors per a la soca KM100_1 (Mut^s his⁺) però la manca de control sobre la fermentació, en especial sobre la concentració de metanol, i la constant variació d'estratègia de cultiu van aconsellar no afirmar amb rotunditat aquesta conclusió.

Existeixen nombrosos exemples bibliogràfics que demostren que els nivells de producció en *P. pastoris* amb diferent fenotip són comparables (Loewen et al., 1997, Hochstrasser et al., 1998, Abiodum et al., 1999). No obstant això, les soques Mut⁺ són més indicades per a cultius d'alta densitat cel·lular, normalment quan es requereixen grans volums de producció a causa de que les soques de tipus Mut^s necessiten temps de cultiu més elevats per arribar a la mateixa concentració de biomassa (Digan et al., 1989, Clare et al., 1991, Potter et al., 2000, Ecamilla et al., 2000). La soca Mut⁺ també pot semblar més adient en processos on l'expressió de la proteïna va lligada estretament a la gemmació cel·lular, però només pel fet d'arribar a altes concentracions de microorganisme amb el menor temps possible.

També s'ha descrit que per a l'expressió de determinades proteïnes resulten més favorables velocitats de creixement lentes, típiques de les soques Mut^s. Per exemple, la major producció de l'enzim invertasa glicosilada es va aconseguir en un cultiu de fenotip Mut^s (Tschoop et al., 1987). A més, el fet de que la soca Mut^s no sintetitzi grans quantitats de l'enzim alcohol oxidasa (AOX) pot resultar una avantatge per l'expressió heteròloga de determinades proteïnes, ja que la síntesi d'aquestes com la de la mateixa AOX depenen del mateix substrat inductor (Sreekrishna et al., 1989).

Una altra característica que afavoreix la utilització de la soca Mut^s és el fet que són més tolerants a possibles canvis a la concentració de metanol residual en el medi de cultiu, i consegüentment, als seus possibles efectes tòxics (Stratton et al., 1998). També és coneguda la millor resposta d'aquesta tipus de soca a estratègies de cultiu que combinin diferents font de carboni (Glicerol, Metanol), incrementant la velocitat de consum de metanol així com la productivitat final (D'Anjou et al., 2001).

És clar doncs, que no existeixen unes regles ben definides per decidir quin tipus de fenotip Mut de la cèl·lula hoste donarà millors resultats, sinó que sembla ser que depèn de la proteïna a expressar. Al mateix temps, cadascun d'aquests fenotips pot ser més o menys favorable en relació amb el nombre de còpies del gen extern introduïdes dins el genoma.

Nombrosos treballs demostren que la utilització d'una soca multicòpia està relacionada directament amb un augment de la producció final i un increment dels nivells de RNA missatger a la cèl·lula. No obstant això, el nombre òptim de còpies

del gen que aporten una quantitat màxima de mRNA o la quantitat màxima produïda de proteïna sembla ser una característica particular de cada proteïna (Thill et al., 1990).

Un efecte positiu de la soca multicòpia ha estat descrit en els nivells d'expressió intracel·lular de l'antigen de superfície de la hepatitis B en soques de Mut^s multicòpia (Vassileva et al., 2001). La influència del nombre de còpies del gen en els nivells de producció aconseguits es manifesta en un increment important de la concentració intracel·lular de la proteïna d'interès.

És conegut que incrementar el nombre de còpies del gen a expressar pot tenir diferents efectes segons el fenotip Mut de la cèl·lula de *Pichia pastoris* hoste. Per exemple, en el cas de la producció del fragment C de la toxina del tètanos utilitzant soques Mut^s i Mut⁺ que contenen una única còpia del gen heteròleg, les produccions són similars (Clare et al., 1991). En canvi, en incrementar a catorze el nombre de còpies del gen heteròleg en soques de fenotip Mut^s, la producció va ser sis vegades major. Al contrari que el seu anàleg de Mut⁺, on la producció va disminuir un 20% respecte la soca d'una sola còpia.

Un augment amb el nombre de còpies del gen heteròleg pot tenir un efecte directe sobre la velocitat específica de creixement de soques Mut⁺ en metanol, reduint-la notablement. Aquest fet pot estar relacionat amb l'efecte negatiu de la proteïna heteròloga expressada en grans quantitats. En aquests casos, els millors resultats a nivell de producció s'han obtingut quan es disminueix la velocitat d'alimentació de metanol a valors de la soca Mut^s, rebaixant l'actuació del promotor AOX1. Aquest efecte també ha estat aconseguint disminuint la temperatura del cultiu de Mut⁺ de 30 a 25°C, obtenint-se, per tant, una velocitat de creixement més propera a la descrita per soques Mut^s.

Així doncs, l'efecte que tenen les soques multicòpies sobre la producció pot ser molt divers segons el tipus de fenotip Mut utilitzat, el nombre de còpies i el gen expressat. Per tant, l'experimentació serà l'única via per conèixer amb certesa l'efecte de les multicòpies sobre la productivitat en la producció de la ROL.

La construcció de soques ROL multicòpia es va realitzar seguint la metodologia descrita per Higgins et al. (1998), basant-se amb la utilització del gen de resistència a la Zeocina contingut en el vector pPICZcLA-ROL com a medi de selecció de les soques que han incorporat un major nombre de còpies del gen d'interès (Serrano, 2002). La selecció d'aquestes soques es feia a elevades concentracions de Zeocina on només hi creixien les que contenien aquesta resistència a l'antibiòtic i el gen heteròleg a expressar.

Aquest tipus de tècnica és la que presenta més avantatges que les altres estratègies d'obtenció de soques multicòpia en *Pichia pastoris* en quan a la manipulació i selecció de soques transformants (Higgins et al., 1998).

Es va comprovar que els clons seleccionats contenien múltiples còpies del vector que contenia la ROL, utilitzant la tècnica del southern blot (Cos et al., 2005), i que en cultius en erlenmeyer i en discontinu les produccions eren superiors a les obtingudes per la soca amb una única còpia. De tots els clons obtinguts es va seleccionar el que produïa una quantitat més elevada d'enzim en cultius discontinu en erlenmeyer, anomenat GSR500_3 (Mut⁺ "multicopy"his⁻). No obstant això, en realitzar experiments en semicontinu ("fed-batch") en un volum final de 5 L., les produccions eren inferiors a les obtingudes utilitzant la soca d'una única còpia. Cal assenyalar que les condicions no eren exactament les mateixes donada l'auxotròfia de la histidina de les soques comercials utilitzades de les soques amb múltiples còpies de ROL. Per tal de compensar aquesta mancança, es va anar afegint 4

ml d'histidina ($0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) cada 24 h., quantitat en excés per a les necessitats del microorganisme. Els resultats negatius a nivell de producció van fer pensar que aquesta addició afectava a l'expressió del promotor del gen d'AOX, però no es va poder comprovar, ni es va trobar cap informació relativa a aquesta hipòtesi.

Per poder continuar la investigació, es va creure necessari revertir l'auxotrofia de la soca utilitzada per anar eliminant les possibles diferències entre soques, que explicaria la variació del comportament de cadascuna d'elles a nivell de productivitat.

La reversió es va fer utilitzant el vector pPIC9K (Invitrogen) que conté el gen HIS4. Es va seleccionar la soca capaç de créixer en absència d'histidina al medi i d'aquestes la que en cultiu en erlenmeyer donava una major activitat lipolítica, anomenada finalment X33500_3 (Serrano, 2002).

Amb el fenotip Mut^s es va realitzar el mateix estudi, construint una nova soca multicòpia seguint la mateixa metodologia que per la soca Mut⁺, però en aquest cas no es va revertir la seva auxotrofia per a histidina per manca de temps. De la nova soca obtinguda, anomenada KM1500_3 (Mut^s multicòpia his⁻), només se'n van realitzar els cultius previs en erlenmeyer i discontinu. En aquests, es va complementar els medis amb histidina, corroborant que la soca contenia múltiples còpies del gen al genoma d'acord amb nivells de producció obtinguts superiors a la soca d'una sola còpia. No es va realitzar cap cultiu en semicontinu per poder comparar el seu comportament amb la resta de soques.

Treballs posteriors a Serrano (2002) dins el mateix grup d'investigació, van quantificar el nombre de còpies de ROL existents en les soques GSR500_3 (Mut⁺"multicopy"his⁻) i KM1500_3 (Mut^s"multicopy"his⁺) mitjançant la tècnica de hibridització Southern Blot seguint el protocol de MSI Nylon Membranes (<http://www.msifilters.com>). El nombre de còpies de cadascuna de les còpies era aproximadament 5 i 23 per la soca Mut⁺ i Mut^s, respectivament. Atès que la soca X33500_1 (Mut⁺"multicopy"his⁺) prové directament de la reversió de l'auxotrofia d'histidina de la soca GSR500_3 (Mut⁺"multicopy"his⁻), conté exactament el mateix nombre de còpies del gen de ROL.

Conclusions extretes dels treballs anteriors

De la revisió dels treballs anteriors realitzats amb llevats metilotròfics i més concretament en *Pichia pastoris* expressant lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) se'n poden treure les següents conclusions:

- ▶ La introducció d'una proteïna heteròloga a l'interior de la soca salvatge de *Pichia pastoris* modifica el comportament d'aquesta. Més concretament, la producció de la ROL amb aquesta soca disminueix la velocitat específica de creixement i sembla tenir un efecte negatiu sobre el microorganisme.
- ▶ S'ha comprovat i confirmat en la majoria de treballs relacionats amb l'expressió de proteïnes amb llevats metilotròfics amb concentracions de substrat inductor superiors a $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, produeixen un efecte tòxic sobre la soca, disminuint la producció de la proteïna d'interès. Es recomana doncs, treballar durant la fase d'inducció en un rang de concentració de metanol entre 1 i $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- ▶ L'estratègia d'addició de metanol durant la fase d'inducció mitjançant el seguiment de l'oxigen dissolt no es aconsellable ja que no es pot

garantir que la concentració de metanol es mantingui dins els nivells desitjats. Els millors resultats s'han obtingut variant el cabal d'addició d'aquest substrat inductor en funció de la mesura directe del metanol existent al medi i calculant, per balanç de matèria el consum real de substrat.

- ▶ El temps de latència existent al canviar bruscament de glicerol com a única font de carboni a metanol per a la fase d'inducció es redueix notablement incloent-hi una etapa de transició. Aquesta consisteix en combinar durant un període de 5 h les dues fonts de carboni amb l'única intenció d'accelerar el temps d'adaptació al nou substrat. Aquesta millora de l'estratègia de cultiu suposa un important increment en la productivitat.
- ▶ En general, s'ha observat que cultius de producció amb llevats metilotròfics a velocitats de creixement cel·lular en metanol baixes, afavoreixen l'activitat dels enzims responsables de la utilització de l'energia obtinguda de la combinació de substrats mixtes cap a la síntesi de proteïnes heteròlogues (Müller et al., 1986; Egli et al., 1980, 1982, 1986). Han estat descrits resultats concrets de cultius de producció de proteïnes recombinats expressades en *P. pastoris* i *H. polymorpha* en els quals s'observa que en condicions limitants de metanol, la inducció de les proteïnes augmenta a velocitats de creixement baixes (Van Dijcken et al., 1976; Eggeling et al., 1980; Boze et al., 2001). Kobayashi et al., (2000) descriuen que la velocitat òptima per a la màxima producció d'albúmina del sèrum humà en *P.pastoris* és per sota de la màxima que pot créixer aquesta cèl·lula, aconseguint aquest valor mitjançant l'addició limitada de metanol al sistema. De les primeres proves en cultius en semicontinu amb la soca X33/ROL s'ha observat que les productivitats més altes es van obtenir quan la velocitat de creixement era inferior a la màxima. Semblava a priori, que la utilització d'una soca amb fenotip Mut^s, on la seva velocitat de creixement ja era de forma inherent baixa, era més aconsellable per obtenir una quantitat més elevada d'enzim.
- ▶ Els resultats aconseguits en cultius en discontinu en erlenmeyer per comparar els nivell de producció de cadascuna de les soques són molt dispers respecte els obtinguts en cultiu semicontinu en fermentador. Per tant, s'aconsella únicament la utilització en discontinu a petita escala per poder treure resultats qualitius. Per comparar les produccions aconseguides s'utilitzarà com a cultiu estàndard el de tipus semicontinu o "fed-batch".
- ▶ La construcció de les soques Mut⁺ i Mut^s amb múltiples còpies del gen de ROL es presenta com una via clara per a la millora de la producció. Tot i això, les primeres proves no han donat resultats molt esperançadors. Cal però, seguir realitzant més experiments en aquesta direcció per tal de poder jutjar amb més resultats la viabilitat d'aquesta línia d'investigació.

De les soques construïdes per Serrano (2002), se n'ha seleccionat cinc (taula 4.1) per realitzar un estudi de la millora de la producció del procés. Les diferències entre les soques són a nivell de fenotip (Mut⁺ o Mut^s), del número de còpies de ROL incloses dins el genoma i de l'auxotròfia per histidina.

SOCA	Fenotip	Nº còpies gen ROL	Auxotròfia his
X33 clon7	Mut ⁺	Single	his ⁺
X33500_1	Mut ⁺	Multi (5)	his ⁺
GSR500_3	Mut ⁺	Multi (5)	his ⁻
KM100_1	Mut ^s	Single	his ⁺
KM1500_3	Mut ^s	Multi (23)	his ⁻

Taula 4.1. Construccions de soques de Pichia pastoris per realitzar el treball experimental.

4.1.2. CULTIUS EN DISCONTINU

La primera presa de contacte amb les fermentacions amb *Pichia pastoris* es va realitzar en cultius en discontinu o "batch". Els principals objectius d'aquests experiments eren: familiaritzar-se amb el microorganisme, detectar els problemes que presentava el muntatge experimental, començar a perfilar l'estratègia a seguir per millorar la producció i calcular uns primers valors de rendiments i productivitats.

A l'apartat 3.5 hi ha una descripció detallada del procediment experimental seguit per tal de portar a terme aquest tipus de cultiu.

NOTA:

Els diferents cultius són identificats amb un codi que dona informació sobre el tipus d'estratègia del cultiu i la soca utilitzada. Aquest codi està compost per tres caràcters alfanumèrics seguit dos de numèrics.

- El primer caràcter s'assigna en funció de l'estratègia de cultiu,

Caràcter	Estratègia
B	Discontinuu o "Batch"
F	Semicontinu o "Fed-Batch"

- El segon caràcter indica el tipus de fenotip,

Caràcter	Estratègia
M	Mut ⁺
S	Mut ^s

- El tercer caràcter indica si la soca té una o més còpies del gen de ROL.

Caràcter	Estratègia
S	1 còpia o "Singlecopy"
M	Múltiples còpies o "Multicopy"

Finalment la numeració es correlativa per diferenciar els cultius que utilitzen la mateixa soca i estratègia de cultiu.

Proves preliminars utilitzant la soca amb el fenotip Mut^s, van desaconsellar la utilització d'aquest tipus de soques en cultius en discontinu. El principal motiu d'aquesta decisió es basava en la baixa velocitat de creixement utilitzant el metanol com a única font de carboni. En partir inicialment d'una biomassa força baixa (aproximadament 1 g·l⁻¹) el temps necessari per consumir la totalitat de font de

carboni era extremadament llarg i consegüentment inviable. En canvi, les soques amb el fenotip Mut⁺ si que van permetre estudiar el seu comportament en cultiu en discontinu.

Es van portar a terme un total de quatre fermentacions, dos d'elles amb la soca X33 clon7 (Mut⁺ "singlecopy" his⁺) i les dues restants amb GSR500_3 (Mut⁺"multicopy"his⁻), aquesta última defectiva en histidina, requerint per tant, l'addició inicial d'aquest aminoàcid al medi. En aquest nivell del treball experimental encara no es disposava de la nova soca X33500_3 (Mut⁺, his⁺, multicopy) sense auxotrofia per histidina.

Si s'analitza l'evolució de les fermentacions BMS_01 i BMS_02 (Figures 4.1 i 4.2), utilitzant X33 clon7 es pot apreciar que el comportament d'aquesta soca es força reproducible per a les condicions d'operació utilitzades. La principal diferència, entre les dues fermentacions, és el temps d'exhauriment del metanol, on en una d'elles el substrat s'acaba deu hores abans que l'altre, degut principalment a que l'etapa de latència es força diferent. Tot i això, les dues fermentacions tenen uns perfils força similars i del mateix ordre de magnitud.

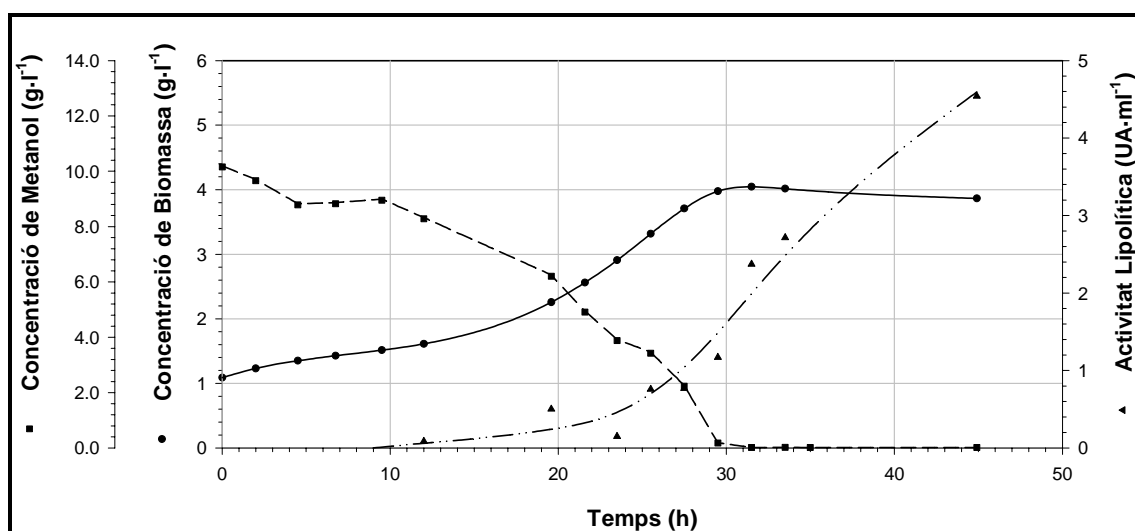


Figura 4.1. Fermentació BMS_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

És important assenyalar que en ambdós casos la producció de lipasa augmenta substancialment a la part final del cultiu, quan la concentració de metanol existent al medi està per sota de 1 g·l⁻¹.

Cal destacar l'evolució de l'activitat lipolítica a la fermentació BMS_02 que arribant a un màxim quan encara no s'ha exhaurit totalment el metanol del medi, per algun mecanisme no identificat, comença a disminuir la concentració de la lipasa. Aquesta davallada d'activitat, mirant-ho en termes relatius, és força important, aproximadament un 30% de la concentració màxima aconseguida. En apartats posteriors s'estudiarà aquest fenomen de la caiguda de l'activitat juntament amb dels cultius en semicontinu.

Atesa la impossibilitat de seguir en línia aquestes tres variables graficades, s'han aproximat, i en el cas del metanol interpolat, una funció per cadascuna d'elles que marqui la tendència que segueixen. En qualsevol cas, aquests perfils només pretenen aproximar l'evolució dels paràmetres i per tant, cal ser conscient de la seva naturalesa sense oblidar que només intenten ajudar a obtenir més informació. També la falta d'una freqüència de mostreig més elevada pot donar problemes a

l'hora d'unir els punts mitjançant una funció, provocant fortes oscil·lacions o tendències que no s'aproximen a la realitat.

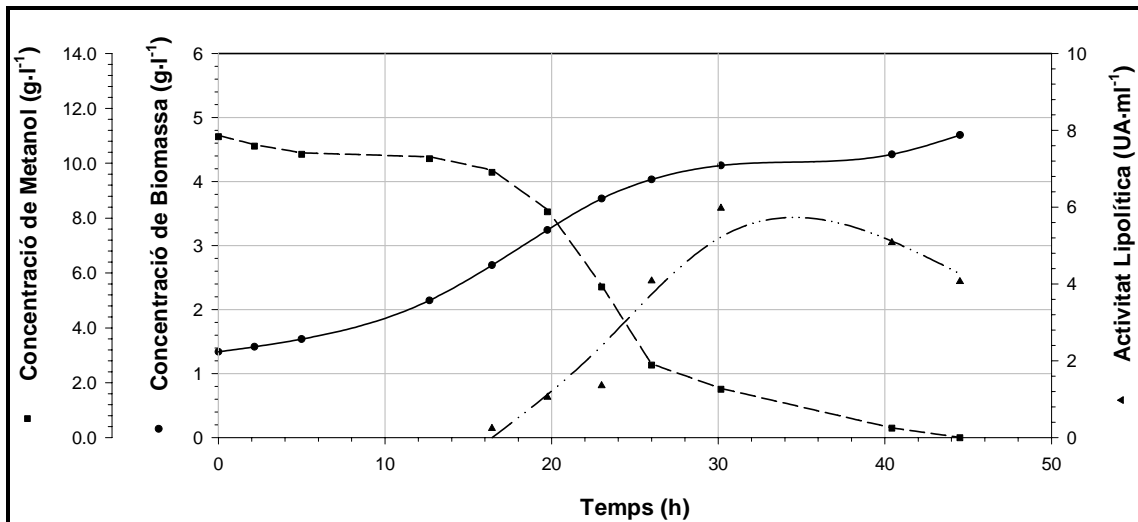


Figura 4.2. Fermentació BMS_02. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

És a partir d'aquestes tendències que es poden calcular les velocitats específiques de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa (Figures 4.3 i 4.4), resultats que ajuden a comprendre millor el comportament del microorganisme en aquests tipus de cultius. La metodologia de càlcul està detalladament descrita al detall a l'apartat 3.7.2.

En ambdues fermentacions la velocitat específica de creixement (μ) va augmentant el seu valor des de l'inici fins assolir un màxim al voltant de 0.06 h^{-1} . A partir d'aquest punt, disminueix progressivament fins a arribar a valors propers a zero a causa de l'exhauriment del substrat en el medi de cultiu.

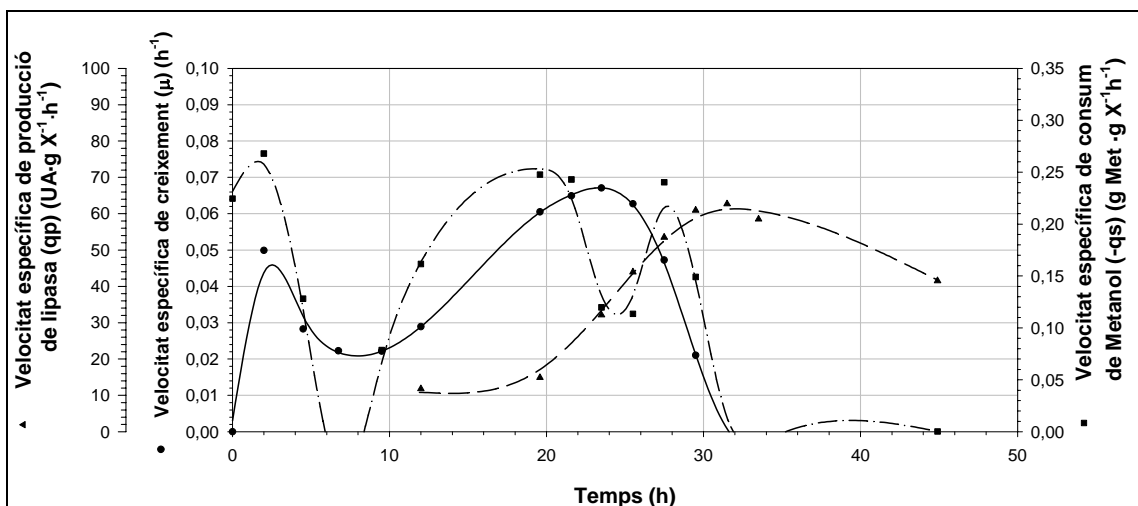


Figura 4.3. Fermentació BMS_01. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

La velocitat específica de consum de metanol ($-q_s$) en representar el valors d'exhauriment d'aquest component dóna valors negatius. Per tal de facilitar millor la seva comprensió e interpretació s'ha cregut oportú mostrar el seu valor positiu

multiplicant per -1 . Així doncs, una elevada velocitat de consum de metanol es indicada per un valor gran i positiu. Aquesta mesura ha estat aplicada a aquest paràmetre al llarg de tot aquest treball experimental. L'evolució d'aquesta variable segueix la trajectòria esperada en les dues fermentacions, augmenta progressivament fins arribar a un valor màxim i a partir d'aquest valor cau ràpidament a causa de l'exhauriment del substrat. L'estreta relació entre les velocitats específiques de consum i creixement fa que, com era d'esperar, existeixi entre elles una relació directament proporcional.

Finalment, la q_p (velocitat específica de producció de lipasa) arriba a un valor màxim temporalment proper als màxims de les altres dues velocitats, la de creixement i consum de metanol. Tot i això, no s'ha trobat una clara relació entre la velocitat específica de creixement i la de producció.

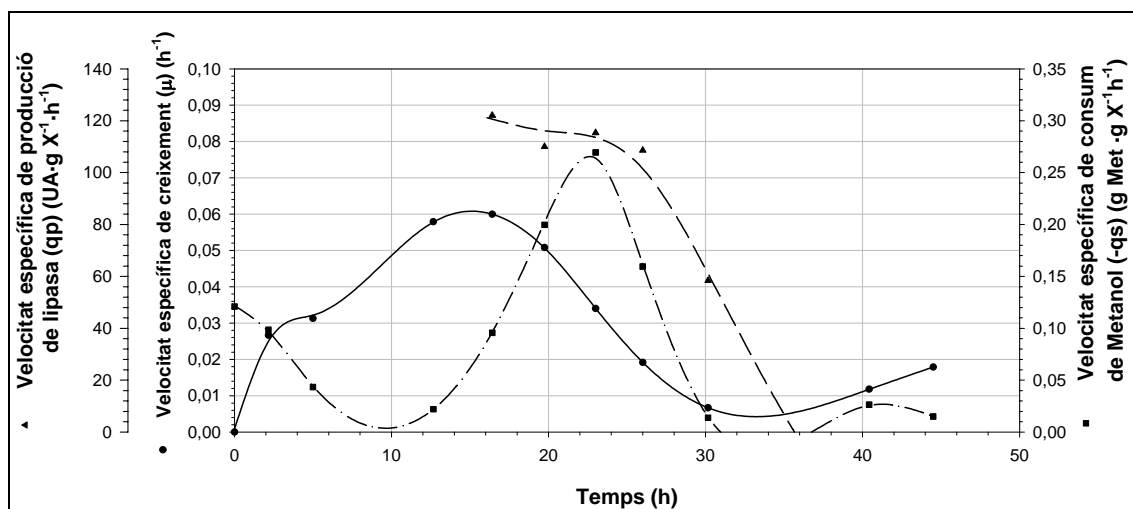


Figura 4.4. Fermentació BMS_02. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

Seguidament es van portar a terme, també per duplicat, els cultius en discontinu de la soca Mut⁺ multicòpia his⁻ (GSR500_3) amb l'objectiu de veure si l'increment de còpies de la ROL al genoma del microorganisme es traduïa amb un augment important de la producció.

L'evolució de la concentració de biomassa, metanol i activitat lipolítica de les fermentacions BMM_01 i BMM_02 es presenten a les figures 4.5 i 4.6. El primer que es pot apreciar és que els nivells d'activitat final aconseguits no són significativament molt més grans que els aconseguits amb la soca del mateix fenotip, però amb una única còpia del gen de ROL. Es descarta la influència de la histidina, ja que la quantitat subministrada inicialment (indicat a l'apartat 3.5) és més que suficient pels nivells de biomassa aconseguits.

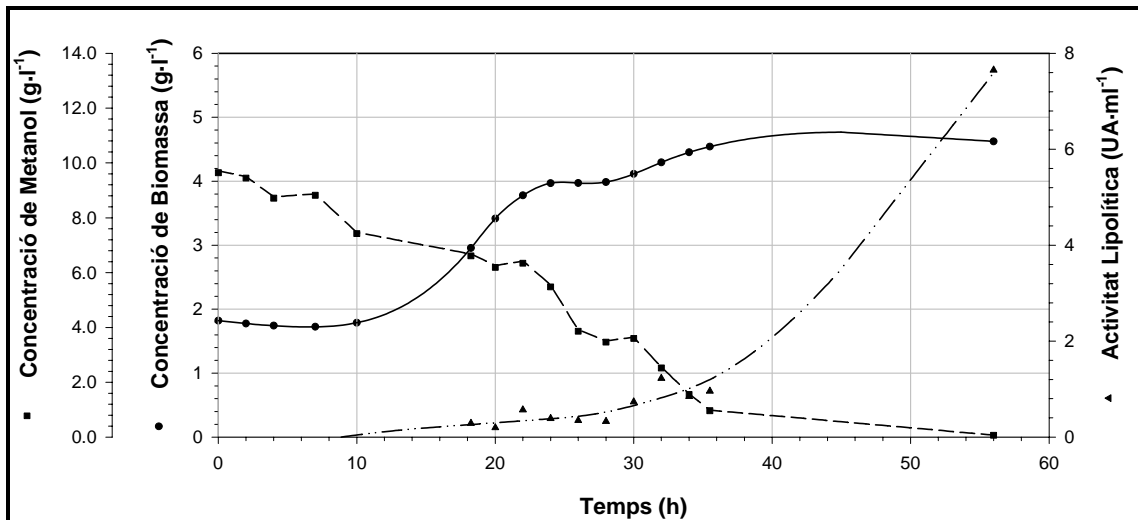


Figura 4.5. Fermentació BMM_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

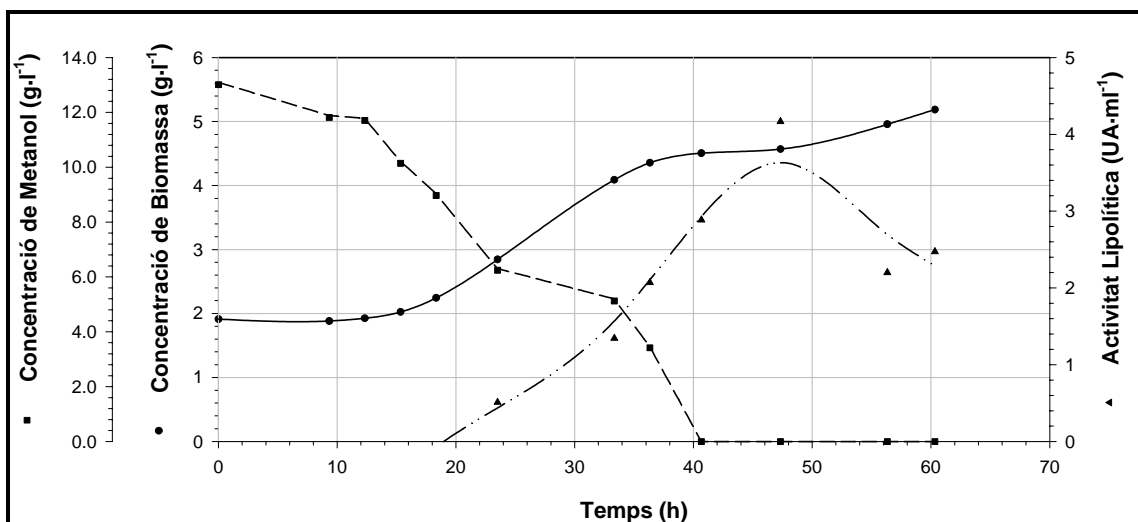


Figura 4.6. Fermentació BMM_02. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

La principal diferència entre els cultius en discontinu realitzats amb la soca Mut⁺ multicòpia, és que el cultiu BMM_01 arriba a una activitat lipolítica final un 50% més que en el cultiu BMM_02. Es descarta que aquest valor sigui erroni ja que es va analitzar més d'una vegada i de diferents mostres preses al mateix temps. A les altres dues fermentacions (BMS_01 i BMS_02) també es va mesurar l'activitat hores després d'haver exhaurit el substrat, però el no es va poder reproduir aquest resultat.

De la mateixa manera que la fermentació BMS_02 (Figura 4.2) el perfil de l'activitat lipolítica al cultiu BMM_02 no té una línia ascendent sinó que arriba a un valor màxim a partir del qual baixa.

A continuació es presenten les gràfiques (Figura 4.7 i 4.8) de les velocitats específiques de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa dels dos cultius en discontinu realitzats amb la soca GSR500_3 (Mut⁺ multicòpia his⁻). Aquests perfils tot i ser aproximatius, donen una informació valuosa, com per exemple que el màxim de producció de lipasa, en tots els casos es situa

temporalment al final dels cultius, quan la concentració de substrat és força baixa (menor de $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$).

En aquests dos cultius (BMM_01 i BMM_02) també coincideix temporalment la situació del valor màxim de la velocitat específica de creixement, tot i que el valor d'aquest punt es força diferent en ambdós casos. Aquest perfil confirma que la producció de l'enzim no està estretament lligada al creixement del microorganisme, per tant, la utilització d'estratègies dirigides a aconseguir la major concentració de biomassa al medi no són les més indicades per obtenir una producció més elevada.

De la variació de la velocitat específica de consum de metanol no se'n pot extreure massa informació ja que les oscil·lacions no semblen estar molt lligades ni al creixement ni a la producció. Sembla però tractar-se d'un problema de caire matemàtic per la falta de més punts experimentals, que provoca una forta oscil·lació de la funció utilitzada en l'aproximació.

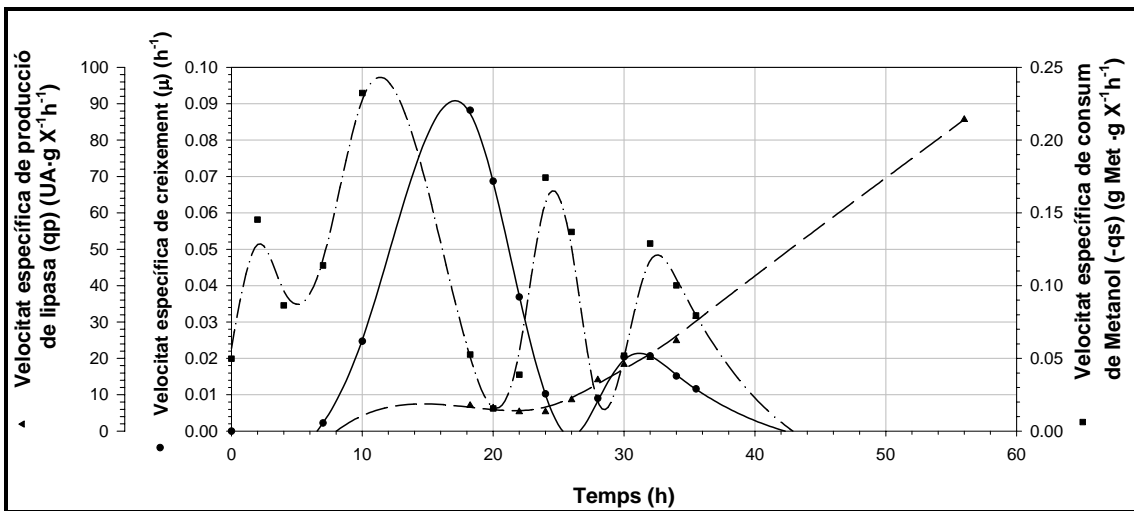


Figura 4.7. Fermentació BMM_01. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

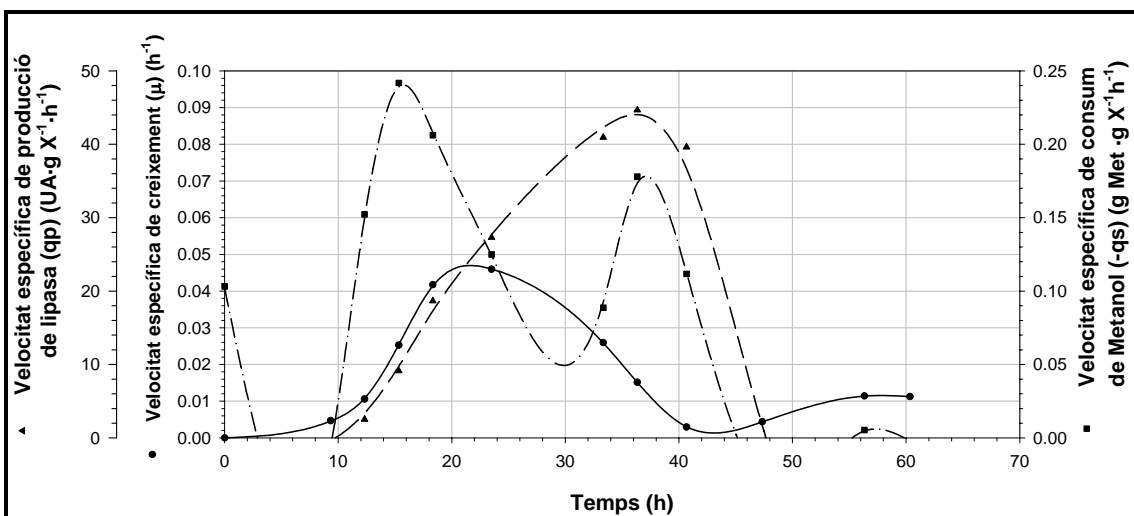


Figura 4.8. Fermentació BMM_02. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

A la taula 4.2 es poden comparar rendiments i velocitats dels diferents cultius en discontinu analitzats.

Tot i que el cultiu que va produir una quantitat més elevada d'enzim (BMM_01) era utilitzant una soca que contenia múltiples còpies del gen, la utilització d'una soca multicòpia respecte la d'una còpia no millora substancialment la producció. És conegut que la soca GSR500_3 conté aproximadament 5 còpies del gen que expressa la proteïna heteròloga, i per aquest motiu també s'esperava que la producció d'enzim fos al voltant de cinc vegades superior a l'obtinguda amb la soca d'una única còpia. Per tant, es pot descartar en primera instància la possible relació entre el nombre de còpies del gen i els nivells finals de producció, almenys amb aquesta proteïna.

Alguns autors descriuen l'estratègia d'utilitzar una soca de múltiples còpies del gen com una de les millors per augmentar substancialment la producció de proteïnes heteròlogues en *P. pastoris*, tot i que aconsellen no passar un cert límit de còpies del gen d'interès (McGrew et al., 1997, Vassileva et al., 2001). Altres estudis però adverteixen de la disminució de la producció en el cas d'incrementar el nombre de còpies en l'expressió d'algunes proteïnes extracel·lulars (Kobayashi et al., 2000; Hohenblum et al., 2004). Sembla ser doncs que els nivells finals d'excreció de la proteïna depenen directament de la naturalesa de la proteïna, i de moment només l'experimentació confirma si aquesta estratègia pot ser útil per millorar de forma significativa la producció.

Nom fermentació	BMS_01	BMS_02	BMM_01	BMM_02
Soca	X33 clon7 Mut ⁺ singlecopy his ⁺		GSR500_3 Mut ⁺ multicopy his ⁻	
Activitat Màxima (UA·ml ⁻¹)	4.6	6.1	7.8	4.2
Y _{p/x} (UA·g X ⁻¹)	1189	1424	1679	925
Productivitat (UA·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	102	201	139	89
Productivitat específica (UA·gX ⁻¹ ·h ⁻¹)	26.5	47.2	30.0	19.5
μ màxima (h ⁻¹)	0.07	0.06	0.09	0.05
μ mitjana (h ⁻¹)	0.027	0.029	0.017	0.017
q _s max (g MetOH·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.27	0.27	0.23	0.24
q _s mitjana (g MetOH·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.10	0.08	0.08	0.08
q _p max (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	62.7	122.0	85.6	43.8
q _p mitjana (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	39.4	47.8	37.9	16.1
Y _{x/MetOH} (gX·g MetOH ⁻¹)	0.27	0.31	0.29	0.32

NOTA: Càlculs realitzats en el període des de l'inici del cultiu fins el punt de màxima activitat lipolítica.

Taula 4.2. Valors finals dels rendiments i velocitats específiques dels cultius realitzats en discontinu.

Pel que fa al rendiment $Y_{p/x}$ (UA·g X⁻¹), que dóna una idea de la quantitat de lipasa excretada per gram de biomassa, no s'observa una clara diferència entre les dues soques, evidenciant de nou que la soca multicòpia no suposa una clara millora en la producció (Taula 4.2).

El valor més gran de la productivitat ($UA \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$) i productivitat específica ($UA \cdot g X^{-1} \cdot h^{-1}$) pertany a la fermentació BMS_02, soca amb una única còpia del gen. Per tant, sembla ser que la inclusió de les multicòpies de ROL dins el genoma dificulta i/o retarda la seva expressió. Aquest fenomen està estretament relacionat amb el valor de les velocitats específiques de creixement mitjanes (μ) que per la soca X33 clon7 és aproximadament 1.6 vegades més gran que l'aconseguit per GSR500_3. Així doncs, el fet d'incloure múltiples còpies del gen ROL té un efecte negatiu sobre el creixement. Aquesta afirmació s'ha de matisar ja que els càlculs de la velocitat específica de creixement inclouen el temps de latència, que varia segons cada cultiu.

La velocitat específica de consum de metanol ($-q_s$ en $g \text{ MetOH} \cdot g X^{-1} \cdot h^{-1}$) per part de les dues soques es força similar, així com els rendiment biomassa substrat en tots els casos proper al valor de 0.3 ($g X \cdot g \text{ MetOH}^{-1}$). Les diferències existents entre les dues soques de diferent dosis gènica no afecta de forma significativa la velocitat de consum del metanol ni la quantitat generada de biomassa per gram de metanol.

Per tant, després d'haver realitzat diferents cultius en discontinu de les soques X33 clon7 i GSR500_3 sota les mateixes condicions, es considera que la construcció d'una soca multicòpia de ROL, almenys pel nº de còpies i pel tipus d'estratègia emprada, no comporta una millora substancial de la producció de lipasa.

4.1.3. CULTIUS EN SEMICONTINU

Un dels passos més importants que es pot fer per millorar la producció és realitzar el cultiu en semicontinu. Aquesta forma d'operar ja ha estat utilitzada en estudis anteriors (Serrano, 2002), obtenint resultats més que acceptables a nivell de producció. Les importants diferències entre el cultiu en discontinu i el semicontinu (medi, concentració cel·lular, etc..) fa que els resultats/conclusions no siguin extrapolables entre ells.

S'ha realitzat una fermentació per cadascuna de les soques de treball (Taula 4.1) excepte la GSR500_3 (Mut^+ "multicopy" his^-), ja que es disposava de la X33500_1 (Mut^+ "multicopy" his^+) de les mateixes característiques amb l'auxotrofia d'histidina revertida. Per tant, es van portar a terme quatre fermentacions, dues Mut^+ i dues Mut^s , i per cadascun dels fenotips una amb la soca amb una única còpia i l'altra amb les múltiples còpies de ROL.

El principal objectiu d'aquest apartat és la comparació de comportaments de cadascuna de les soques en cultiu semicontinu per poder seleccionar la soca que pot ser més útil a nivell de producció.

Els quatre cultius s'han portat a terme amb el mateix medi, seguint la mateixa estratègia i sota les mateixes condicions d'operació (T, pH, agitació, etc...). L'estratègia de cultiu emprada en tots el casos és la proposada per Serrano (2002) com a millor opció per obtenir elevades produccions d'enzim en *Pichia pastoris*.

Com ja s'ha comentat anteriorment, el cultiu es pot diferenciar en tres etapes, una primera fase en discontinu, amb l'única funció d'incrementar ràpidament la concentració de biomassa del medi. Seguidament l'etapa de transició, on es subministren conjuntament glicerol amb metanol, per adaptar el microorganisme de la forma més ràpida al nou substrat inductor. Finalment, un tercer període on es subministra únicament metanol induint la producció de proteïna heteròloga.

L'única variació entre fermentacions ha estat l'addició inicial d'histidina al medi del cultiu de la soca KM1500_3 (Mut^s "multicopy" his⁻) ja que al contrari que la resta de soques, no pot sintetitzar aquest aminoàcid. Tot i que a aquestes alçades del treball ja es disposava d'aquesta soca sense auxotròfia per aquest aminoàcid, el creixement de la nova soca consumint metanol era pràcticament nul, pel que es va decidir tornar a emprar la original.

Tant la preparació, la posada en marxa com el seguiment de la fermentació en semicontinu són descrits detalladament a l'apartat 3.5.

A continuació es mostra l'evolució de les variables més importants per cadascun dels cultius. Tota aquesta informació es presenta en tres gràfiques per fermentació. En totes elles es pot observar dues línies discontinues en disposició vertical que fan de separació entre les tres fases del cultiu (Discontínua, Transició, Inducció).

Observant els gràfics (p.ex figura 4.9), cal apuntar que l'espai temporal des de l'inici fins arribar a la primera línia indica la durada de la fase discontínua on s'ha consumit la quantitat inicial de glicerol de 40 g·l⁻¹. La funció d'aquesta part del cultiu és aconseguir un ràpid augment de la concentració de biomassa. La utilització d'aquesta font de carboni reprimeix l'expressió de la proteïna i per tant el comportament de les diferents soques és exactament el mateix. El rendiment biomassa-substrat ($Y_{x/s}$) és aproximadament 0.5 (g X · g GliOH⁻¹) en tots els casos i la màxima velocitat específica de creixement ($\mu_{\text{màx}}$) en aquesta part del cultiu oscil·la entre 0.13 i 0.18 h⁻¹.

Les cinc hores de transició separen la primera de la segona línia vertical on s'afegeix contínuament un cabal de glicerol decreixent, juntament amb un cabal fixat de metanol durant les tres hores finals d'aquesta fase seguint l'esquema proposat per Katakura et al. (1998).

A partir de la segona línia és la fase corresponent a la inducció, on es va modificar el cabal d'alimentació de metanol per tal de mantenir la concentració d'aquest en uns valors entre 1 i 5 g·l⁻¹.

L'estratègia per controlar la concentració de metanol en aquesta última etapa es realitza utilitzant la mateixa tècnica que el treball portat a terme anteriorment per Serrano (2002). A partir d'una mostra extreta periòdicament es mesura el metanol per cromatografia gasosa (Apartat 3.5) i fent uns càlculs basats en el balanç de matèria s'obté la velocitat de consum, i segons aquest resultat es varia manualment el cabal d'alimentació de metanol.

De les tres gràfiques de cada cultiu, a la primera es grafica l'evolució de la concentració de biomassa, la concentració de metanol en el medi i l'activitat lipolítica, variables mesurades a partir de les mostres extretes durant la fermentació. En el segon gràfic es mostra per segona vegada la concentració de metanol relacionant-la amb la velocitat específica de creixement (μ) i el cabal de metanol addicionat durant l'etapa d'inducció. I el tercer gràfic combina la representació de les tres velocitats específiques calculades que són la de creixement (μ), la de consum de metanol i la de producció de lipasa.

En totes les fermentacions, durant la fase de transició la concentració de glicerol al medi està per sota dels límits detectables, fet que permet l'aturada de la repressió dels enzims que controlen les rutes d'assimilació de metanol. L'aparició de valors mesurables d'activitat extracel·lular i el consum de metanol en aquest període ho confirmen.

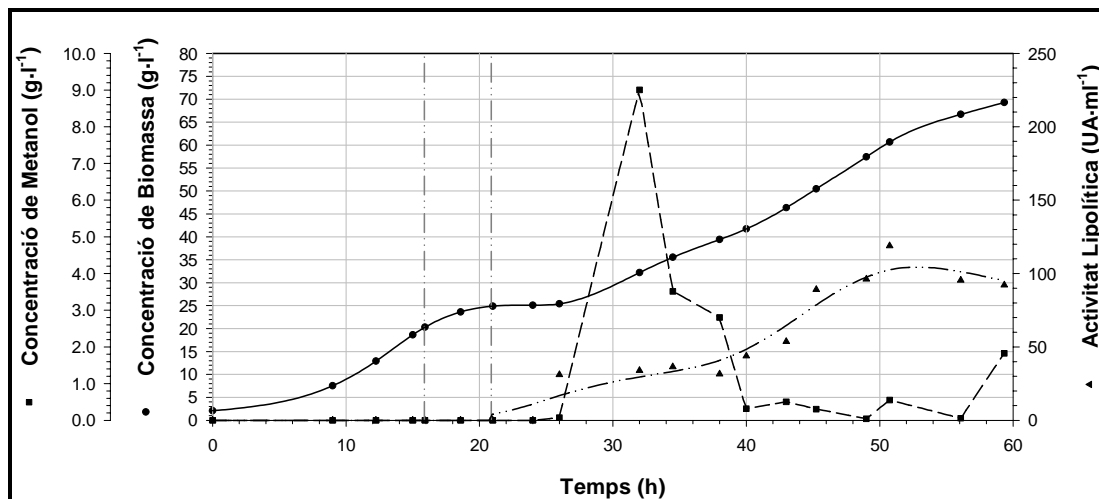


Figura 4.9. Fermentació FMS_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

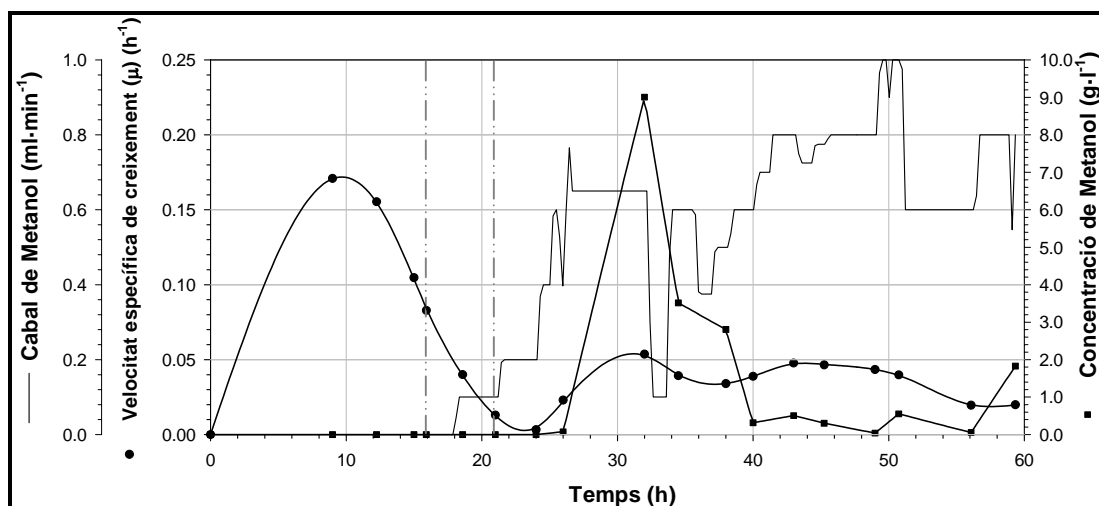


Figura 4.10. Fermentació FMS_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

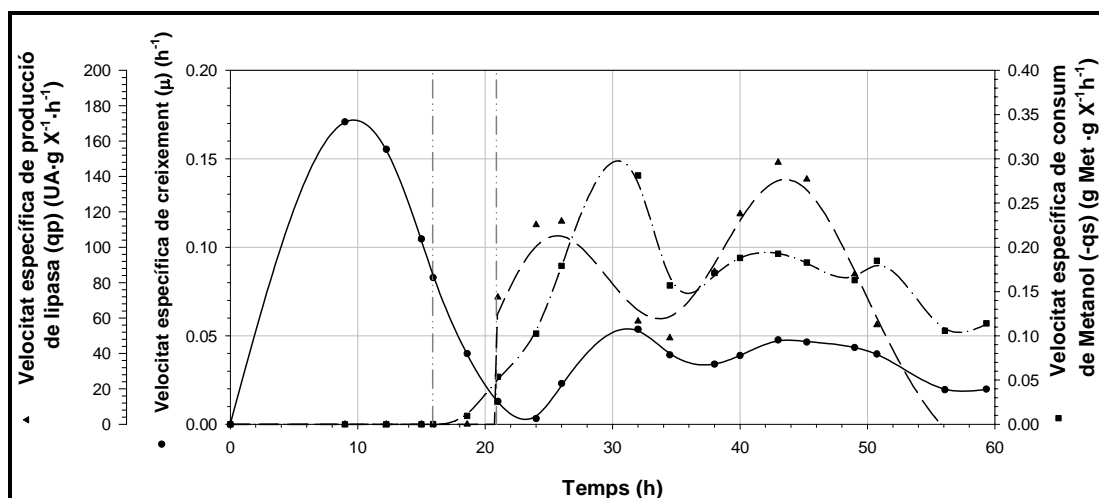


Figura 4.11. Fermentació FMS_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), de consum de metanol (-qs) i de producció de lipasa (qp).

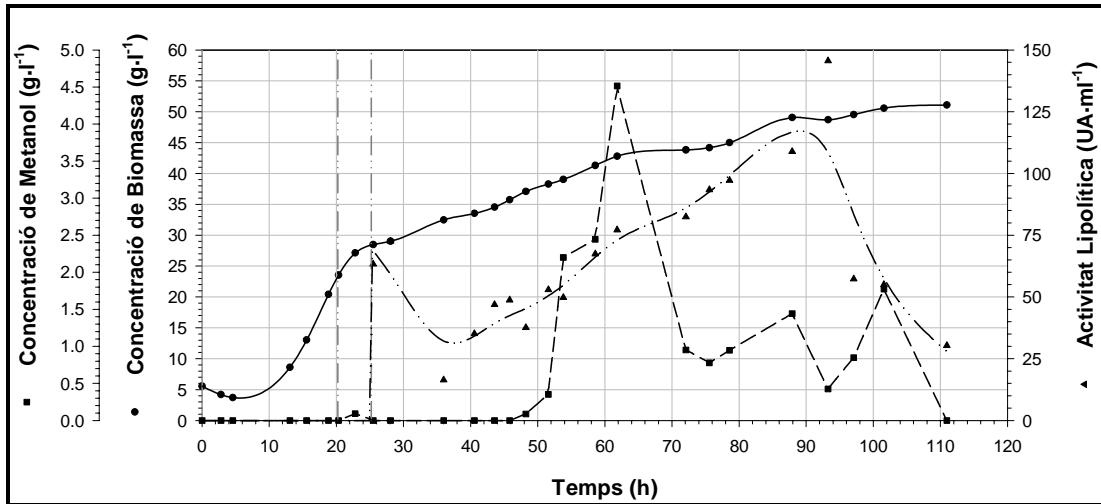


Figura 4.12. Fermentació FMM_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

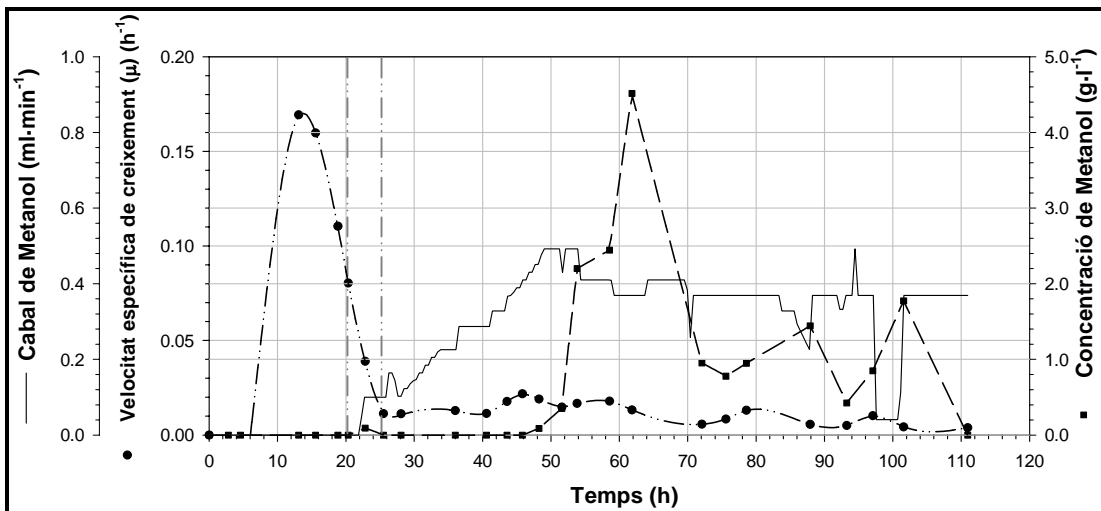


Figura 4.13. Fermentació FMM_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

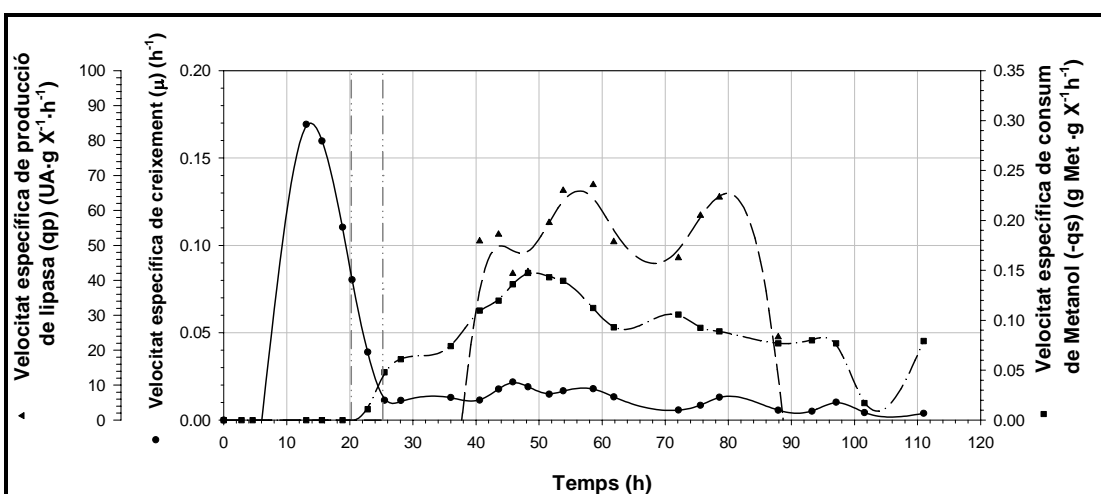


Figura 4.14. Fermentació FMM_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), de consum de metanol ($-qs$) i de producció de lipasa (qp).

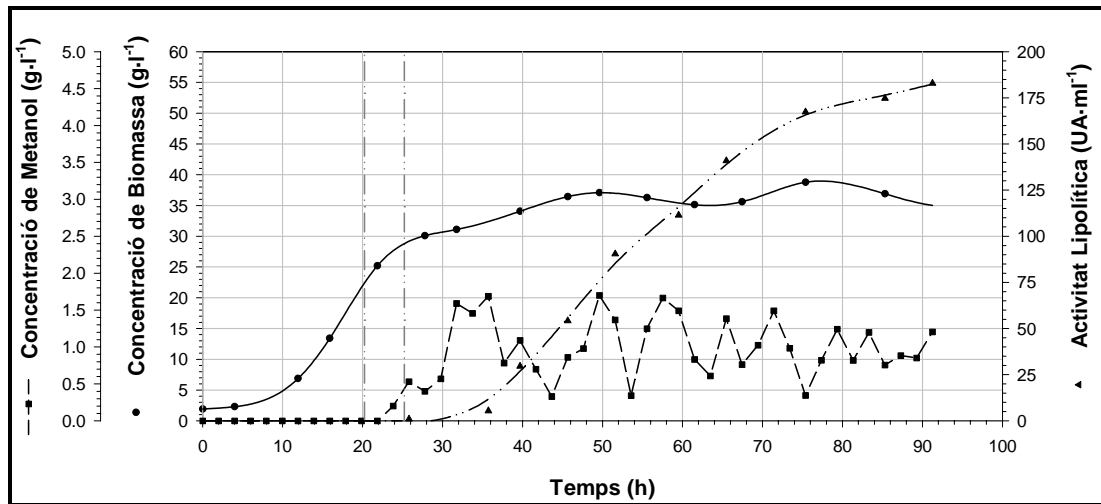


Figura 4.15. Fermentació FSS_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

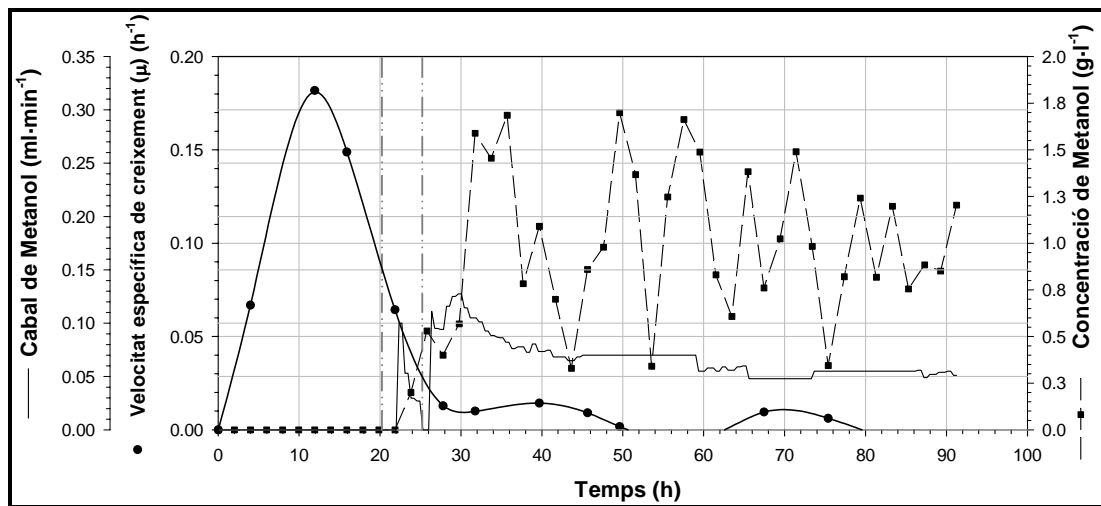


Figura 4.16. Fermentació FSS_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

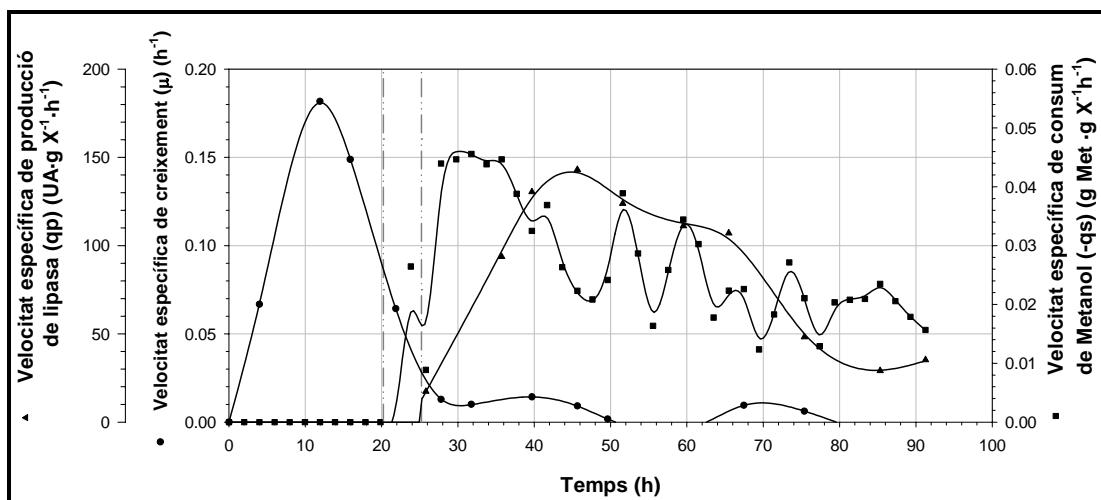


Figura 4.17. Fermentació FSS_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), de consum de metanol (-qs) i de producció de lipasa (qp).

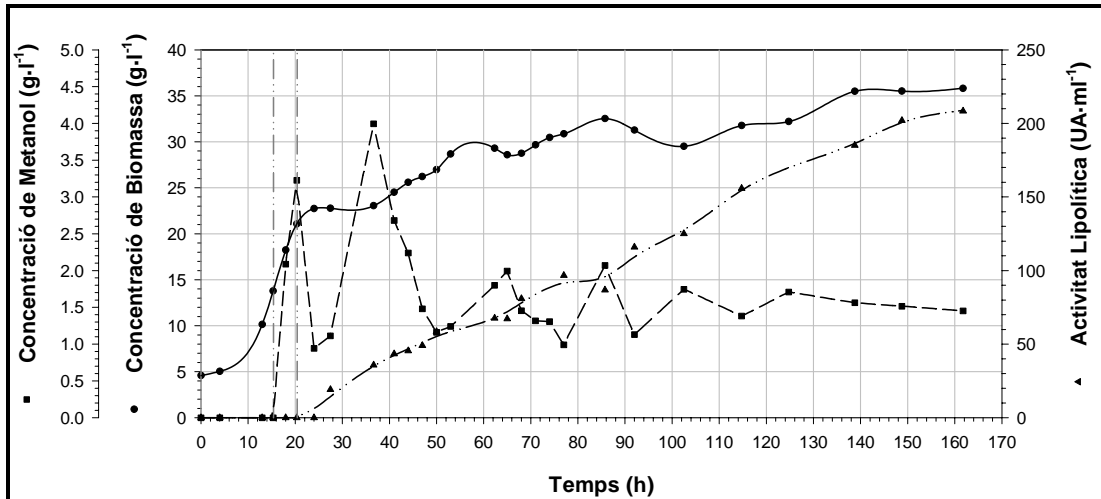


Figura 4.18. Fermentació FSM_01. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

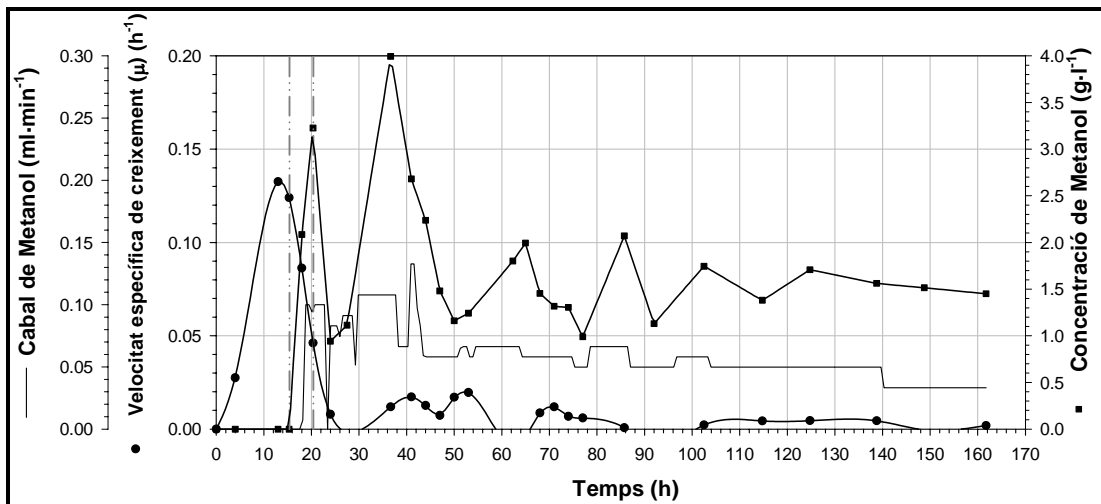


Figura 4.19. Fermentació FSM_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

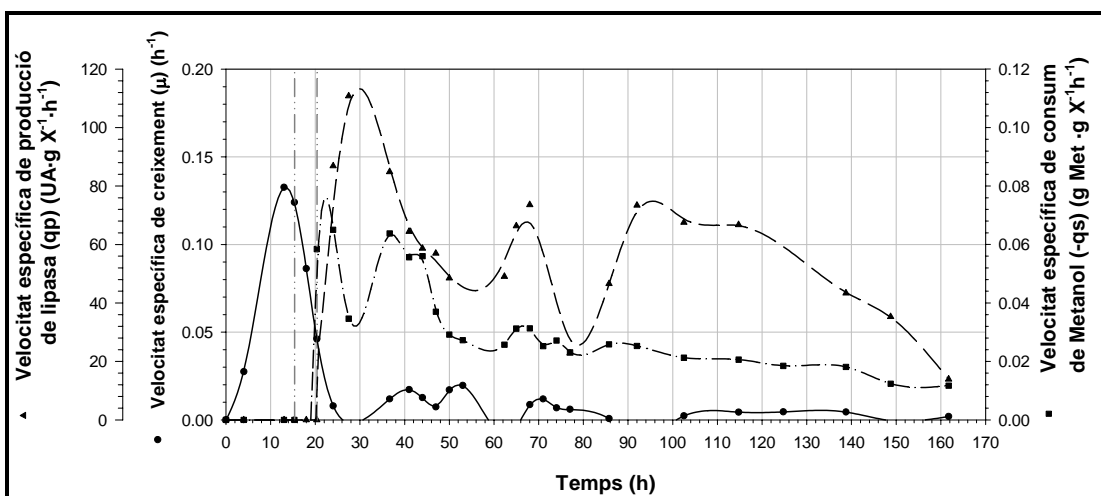


Figura 4.20. Fermentació FSM_01. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), de consum de metanol (-qs) i de producció de lipasa (qp).

A la taula 4.3 es mostren tots els rendiments, productivitats i velocitats específiques de creixement, consum i producció calculats per cada cultiu. La metodologia de càlcul emprada està detalladament descrita a l'apartat 3.7.2.

DADES CULTIU				
Nom Fermentació	FMS_01	FMM_01	FSS_01	FSM_01
Soca	X33 clon7 Mut ⁺ singlecopy his ⁺	X33500_1 Mut ⁺ multicopy his ⁺	KM100_1 Mut ^S singlecopy his ⁺	KM1500_3 Mut ^S multicopy his ⁻
Durada (h.)	59.7	111.2	90.8	162.3
Activitat Màxima (UA·ml ⁻¹)	119	146	183	208
Yp/x (UA·g X ⁻¹)	1958	2991	5221	5818
Productivitat (UA·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	2341	1561	2004	1288
Productivitat específica (UA·gX ⁻¹ ·h ⁻¹)	38.6	32.1	57.2	36.0
FASE DISCONTÍNUA				
Durada (h)	15.8	20.2	20.1	15.6
Yx/Gli (g X ·g Gli ⁻¹)	0.454	0.444	0.512	0.467
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)				
μ màxima (h ⁻¹)	0.054	0.022	0.014	0.020
μ mitjana (h ⁻¹)	0.034	0.011	0.005	0.004
qs max (g MetOH·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.281	0.147	0.046	0.065
qs mitjana (g MetOH·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.179	0.098	0.027	0.027
qp max (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	148	67	143	111
qp mitjana (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	96	20	84	56
Yx/MetOH (gX·g MetOH ⁻¹)	0.215	0.094	0.115	0.163

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.3. Valors finals dels rendiments i velocitats específiques dels cultius realitzats en semicontínu.

Efecte de la dosi gènica

Comparació entre els dos cultius Mut⁺

Comparant els cultius FMS_01 (figures 4.9, 4.10 i 4.11) i FMM_01 (figures 4.12, 4.13 i 4.14), de soques Mut⁺ amb una o múltiples còpies de ROL respectivament, s'observa en primer lloc la gran diferència de durada entre cultius, sent casi el doble en el cas de la Mut⁺ multicòpia. El paràmetre que marca la durada de la fermentació és principalment la concentració de biomassa del cultiu, que quan arriba al voltant dels 50 g·l⁻¹, comencen a aparèixer problemes operacionals. El gran consum d'oxigen a aquestes densitats cel·lulars no permet

mantenir el nivell d'oxigen dissolt prou elevat ($> 30\%$) tot i treballar amb el cabal d'entrada i la velocitat d'agitació màximes, $20 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ i 1000 rpm .

La gran demanda de metanol per part del microorganisme a aquestes alçades del cultiu dificulta el control manual sobre la concentració d'aquest substrat, havent de realitzar contínues mesures "off-line" si es vol mantenir en el rang desitjat, entre 1 i $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

La soca X33500_1 (Mut^+ "multicopy" his^+) produeix fins un màxim de $146 \text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ en unes 70 h d'inducció arribant a una concentració final de biomassa propera als $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. En canvi, la soca X33 clon7 (Mut^+ "singlecopy" his^+) amb només una còpia de ROL aconsegueix un màxim de $119 \text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$ en només 30 h d'inducció i una concentració de biomassa al voltant de $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Únicament amb aquestes dades ja es pot veure els efectes que provoquen la utilització d'una soca multicòpia, la velocitat de creixement es redueix pràcticament una tercera part comparant-la amb la soca Mut^+ d'una sola còpia. No obstant això, en qualsevol dels dos casos, el seu valor màxim durant l'etapa d'inducció (0.054 h^{-1} i 0.022 h^{-1} per una i múltiples còpies, respectivament) és inferior al valor d'aquest en soques Mut^+ salvatge en cultius en semicontinu de condicions similars (per exemple, 0.071 h^{-1} , Zhang et al., 2002). En conclusió i confirmant les hipòtesis anunciades per Serrano (2002), la producció de la ROL disminueix la velocitat de creixement comparat amb la soca salvatge i sembla ser funció de la proteïna heteròloga a produir. Aquest fenomen s'accentua en augmentar el nombre de còpies del gen.

Pel que fa al perfil de la concentració de metanol durant la fase d'inducció, i com ja s'ha comentat anteriorment, l'elevat consum d'aquest substrat va complicar les tasques de control per mantenir-lo en un rang prou estret. En cap moment però, en els dels dos cultius no es va superar la concentració marcada com a tòxica de $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Cal assenyalar però, que durant alguns períodes del cultiu, la concentració de metanol va arribar, en ambdós casos, a ser nul·la. Aquest fet pot fer relativament incomparables les fermentacions entre sí, ja que alteracions d'aquest tipus poden afectar de forma important el metabolisme del microorganisme.

Les diferències de creixement entre els dos cultius també es poden apreciar amb els perfils de cabal de metanol subministrat al reactor, sent en el cas de la fermentació FMS_01 pràcticament el doble que en la fermentació FMM_01.

L'activitat lipolítica màxima aconseguida per la soca multicòpia és de valor absolut superior, però a nivell de productivitat ($\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) i productivitat específica ($\text{UA}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) les coses canvien per la curta durada del cultiu amb la soca Mut^+ "singlecopy".

De la mateixa manera que en els cultius en discontinu realitzats amb la soca X33 clon 7 (BMS_01 i BMS_02) es pot apreciar la baixada que té la concentració de ROL extracel·lular al final del cultiu. Aquesta disminució durant les últimes hores de la fermentació en ambdós casos coincideix amb l'arribada a una concentració de biomassa propera als $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Es van estudiar quins fenòmens podien provocar aquesta baixada d'activitat. En una primera instància, es van contemplar els fenòmens aliens al microorganisme que podien provocar aquest canvi de tendència.

El primer d'aquests era pensar en la dilució del medi, ja que el cultiu és en semicontinu. Però les addicions no són prou significatives per rebaixar tant bruscament la concentració lipolítica, i a més aquest efecte també quedaria manifest en la biomassa, ja que l'addició és únicament metanol pràcticament pur.

Una altra possibilitat és que part de la lipasa es trobi en alguna interfase orgànico-aquosa donada la seva afinitat cap aquest tipus de localitzacions. No obstant això, no es va trobar visualment (microscopi òptic) la presència de cap fase orgànica insoluble en medi aquós.

La formació d'escumes podia propiciar l'acumulació de l'enzim a la interfase entre el medi aquós i l'enzim (Balashev et al., 2001). Però, a part que la presència d'escumes no coincidia temporalment amb la disminució d'activitat, les escumes també apareixien en els cultius amb la soca Mut^s i en canvi no s'apreciava cap disminució de l'activitat d'enzim.

Paral·lelament es va estudiar de forma preliminar, l'efecte que podia tenir l'antiescumejant de naturalesa orgànica amb aquesta variació, però es va desestimar principalment per dos motius; Primerament per la seva baixa concentració en el medi (<10 mg·l⁻¹) i en segon lloc que s'afegia inicialment, per tant el seu efecte no hauria de ser a partir d'un moment determinat, sinó constant durant tota la fermentació.

La degradació de l'enzim per temperatura, pH, o per les característiques del medi no es va contemplar, ja que aquestes condicions van romandre constants durant tota la fermentació i les fermentacions amb altres soques no presentaven cap problema.

El que sí era clar, és que en un moment determinat de la fermentació es desencadenava algun procés que provocava la degradació del producte d'interès. Aquest efecte no es veia en les soques Mut^s, per tant no estava relacionat ni amb el temps de cultiu ni amb la concentració de lipasa.

Una revisió bibliogràfica de les fermentacions realitzades en *Pichia pastoris* va permetre trobar una altra via que expliqués aquesta disminució de la concentració de lipasa. L'aparició de proteases extracel·lulars a la fase final de la fermentació amb la consegüent proteòlisi de la lipasa estava àmpliament descrita per alguns autors (Kobayashi et al., 2000).

Per poder identificar l'existència de proteases en els cultius, es va realitzar una segona fermentació amb la soca X33500_1 (Mut⁺ multicòpia his⁺), anomenada FMM_02, seguint exactament la mateixa estratègia que el seu cultiu anàleg, FMM_01.

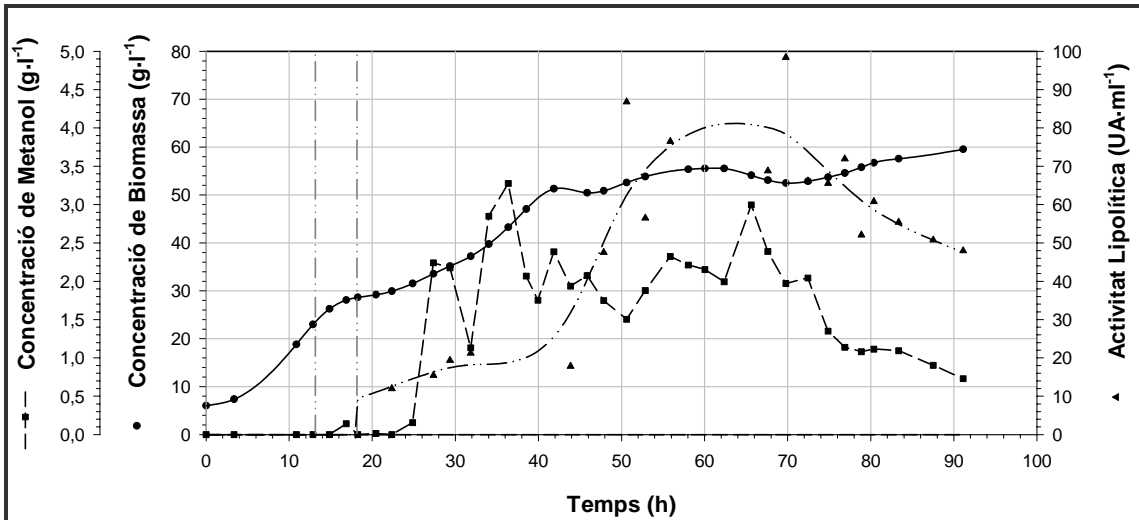


Figura 4.21. Fermentació FMM_02. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i activitat lipolítica.

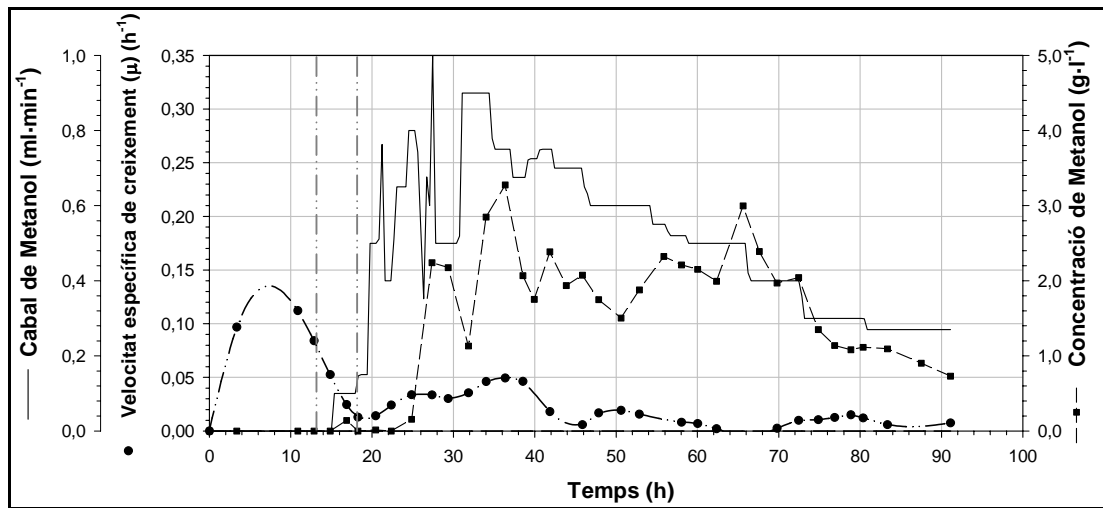


Figura 4.22. Fermentació FMM_02. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

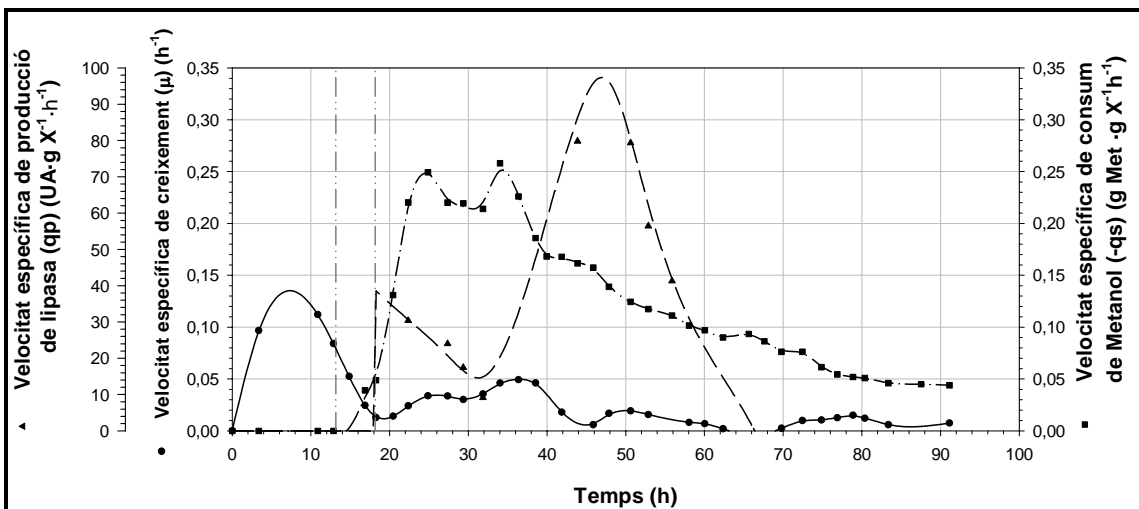


Figura 4.23. Fermentació FSM_02. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), de consum de metanol ($-q_s$) i de producció de lipasa (q_p).

DADES CULTIU	
Soca	X33500_1 Mut ⁺ "multicopy"his ⁺
Durada (h.)	91.4
Activitat màx. (UA·ml ⁻¹)	98
Rendiment Producte/biomassa Y _{P/X} (UA·g X ⁻¹)	1875
Productivitat (UA·l ⁻¹ ·h ⁻¹) *	1410
Productivitat específica * (UA·gX ⁻¹ ·h ⁻¹)	32
FASE DISCONTÍNUA	
Durada (h.)	15
Rendiment biomassa/glicerol Y _{XG} (g X·g S ⁻¹)	0.44
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)	
μ màxima (h ⁻¹)	0.05
μ mitjana (h ⁻¹)	0.016
-qs màxima (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.26
-qs mitjana (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.16
qp màxima (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	105
qp mitjana (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	40.1
Rendiment Biomassa/Metanol Y _{X/M} (g X·g S ⁻¹)	0.11

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.4. *Valors finals dels rendiments i velocitats específiques del cultiu FMM_02.*

L'evolució al llarg del temps dels principals paràmetres, així com els valors mitjans d'aquests en l'etapa d'inducció es mostren a les figures 4.21, 4.22, 4.23 i a la taula 4.4.

Si es comparen els valors d'aquest cultiu amb el FMM_01 s'aprecien algunes diferències, algunes d'elles significatives com els valors de μ i qs. Aquestes variacions són majoritàriament causades per la diferència en el perfil de concentració de metanol entre les dues fermentacions.

L'objectiu però d'aquesta fermentació era identificar l'aparició de proteases i com a primer requisit, s'havia de produir una baixada substancial de l'activitat lipolítica a la part final del cultiu. Observant la figura 4.21 es pot apreciar que a les 70 h. de cultiu el nivell d'activitat és proper als 100 UA·ml⁻¹, i només en les 20 h. següents aquesta concentració és redueix a la meitat. Així doncs, si es confirma que aquest descens és degut a la proteòlisi de la ROL, s'haurien d'identificar una quantitat elevada de proteases.

Per tal de confirmar l'existència d'aquests enzims degradadors es va realitzar l'anàlisi específic per la determinació d'activitat proteolítica amb azocaseïna. Tot i que es va poder demostrar la seva existència al medi, va ser impossible quantificar-la amb precisió per falta de reproductibilitat.

Una altra metodologia per detectar la presència de proteases al medi és la realització d'una electroforesi emprant mostres extracel·lulars lliures de biomassa a diferents temps. El resultat de l'electroforesi de la fermentació FMM_02 es mostra a la figura 4.24.

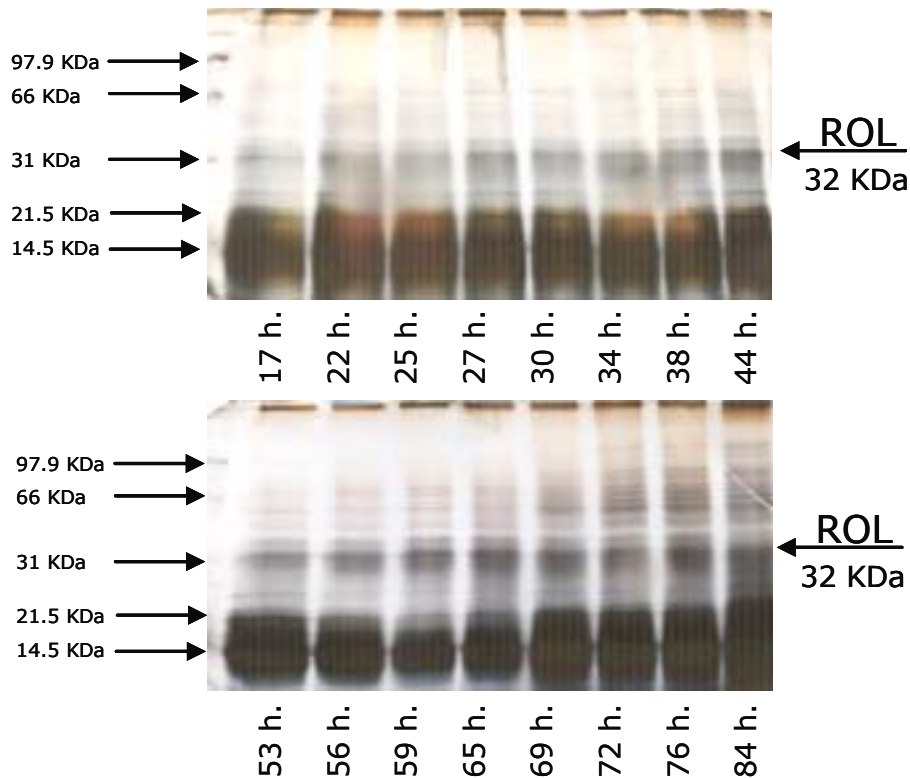


Figura 4.24. Electroforesis del cultiu FMM_02.

En primer lloc es pot apreciar com es va incrementant la intensitat de la banda situada a 32 KDa, indicant el progressiu augment de concentració de ROL. És però a partir de les 65-69 h. que s'aprecia la màxima intensitat i seguidament la intensitat disminueix sensiblement. El que potser ens dóna més informació és la intensitat de les múltiples bandes per sota de la de 32 KDa, que augmenta progressivament amb el temps, fins ocupar pràcticament per complet el rang entre la ROL i les proteïnes de menys pes. Aquesta banda s'ha interpretat com la suma de la possible acció de les proteases i la lisi cel·lular. Es pot veure com adquireix especial intensitat a partir de les 69 h. La identificació d'aquestes bandes ve recolzada per l'observació d'electroforesis en un cultiu Mut^s, on no s'observa ni l'aparició de proteases ni lisi cel·lular.

Confirmada l'existència de proteases i lisi cel·lular al medi de cultiu calia buscar la causa o causes que produïen la seva aparició i existència.

Bibliogràficament, aquest problema també ha estat detectat en la producció d'albumina humana multicòpia a partir de valors de biomassa del mateix ordre de magnitud i utilitzant el mateix microorganisme, estratègia i medi (Kobayashi et al., 2000). Els autors van relacionar l'aparició de l'activitat proteolítica amb l'exhauriment del nitrogen en el medi en concentracions per sota de 0.3 mg·l⁻¹, suggerint que l'aparició de proteases és causada directament per la deficiència de font de nitrogen al medi.

Per confirmar aquest fet, es va comprovar la concentració de nitrogen a les mostres finals de la fermentació FMM_02, i es va observar que l'exhauriment de nitrogen al medi coincidia amb la baixada d'activitat a partir de les 70 h. de cultiu.

Arribats a aquestes alçades de la investigació, es va calcular estequiomètricament a quins valors de biomassa es podia arribar amb la quantitat

de nitrogen addicionat al llarg de la fermentació. Però, per trobar aquest valor era necessari conèixer la composició del microorganisme.

Utilitzant tres mostres de la fermentació FMM_02, totes elles de l'etapa d'inducció (mostres de les 30, 44 i 59 h. de cultiu) es van realitzar anàlisi, per duplicat, de la composició elemental de la biomassa seguint el protocol descrit a l'apartat 3.3.5.

Mostra 1 (30 h.)		Composició (% en pes)						Composició estequiomètrica (molar)				
		% C	% H	% N	% S	% cendra	% O	C	H	O	N	S
	Anàlisi 1	42,68	6,64	8,9	0,94	10	30,84	1	1.85	0,54	0,179	0,008
	Anàlisi 2	41,79	6,64	8,73	0,82	10	32,02	1	1.89	0,57	0,179	0,007
	Mitjana	42,23	6,64	8,815	0,88	10	31,43	1	1.87	0,56	0,178	0,008
	Error*								0.08	0.07	0.0007	0.002
Mostra 2 (44 h.)		Composició (% en pes)						Composició estequiomètrica (molar)				
		% C	% H	% N	% S	% cendra	% O	C	H	O	N	S
	Anàlisi 1	41.2	6.5	9.26	1.12	10	31.92	1	1.88	0.58	0.192	0.01
	Anàlisi 2	40.02	6.37	9.13	1.32	10	33.16	1	1.9	0.62	0.195	0.012
	Mitjana	40.61	6.43	9.19	1.22	10	32.54	1	1.89	0.60	0.194	0.011
	Error*								0.04	0.09	0.006	0.005
Mostra 3 (59 h.)		Composició (% en pes)						Composició estequiomètrica (molar)				
		% C	% H	% N	% S	% cendra	% O	C	H	O	N	S
	Anàlisi 1	42.79	6.73	9.37	0.77	10	30.34	1	1.87	0.53	0.187	0.006
	Anàlisi 2	43.68	6.86	9.57	0.78	10	29.11	1	1.87	0.50	0.187	0.007
	Mitjana	43.23	6.79	9.47	0.775	10	29.72	1	1.87	0.51	0.187	0.007
	Error*								0.006	0.07	0.0002	0.0001

* 95 % d'interval de confiança.

Taula 4.5. Càlcul de la composició elemental de la biomassa per diferents mostres de la mateixa fermentació, FMM_02.

Composició estequiomètrica (molar)					
	C	H	O	N	S
Mostra 1	1	1.87	0.56	0.18	0.008
Mostra 2	1	1.89	0.6	0.19	0.011
Mostra 3	1	1.87	0.52	0.19	0.007
Mitjana	1	1.88	0.56	0.187	0.009
Error*		0.02	0.08	0.01	0.004

* 95 % d'interval de confiança.

Taula 4.6. Valor mig de la composició molar de la soca GSR500_3 (*Pichia pastoris*) en cultiu semicontinu (FMM_02).

A la taula 4.5 es presenten els valors resultants de les anàlisi (en tant per cent en pes) i posterior càlcul de la composició en fraccions molars prenent el carboni com a referència. A la taula 4.6 s'obté el valor promig de la composició a

partir de les tres mostres i es calcula l'error final. En ambdós taules l'error es calculat mitjançant la t d'Student fixant el nombre de rèpliques (n) a dues i per un interval de confiança del 95 %.

Així doncs, la composició elemental mitjana de la biomassa durant els cultius semicontinus és de $\text{CH}_{1.88 \pm 0.02} \text{O}_{0.56 \pm 0.08} \text{N}_{0.187 \pm 0.01} \text{S}_{0.0086 \pm 0.004}$ i per tant té un pes molecular de $25.7 \text{ kg} \cdot \text{Kmol}^{-1}$. Com es sabut, aquesta fórmula pot variar en funció del tipus de cultiu, medi i fonts de carboni emprades, però els valors no haurien de variar molt, tot i canviant algunes d'aquestes variables. Per tenir alguna altra referència, la composició elemental mitjana d'una soca de *Pichia pastoris* Mut⁺ que produeix β -glucanasa (Valdez, 2004) és $\text{CH}_{1.972} \text{O}_{0.532} \text{N}_{0.152}$ (condicions: cultiu semicontinu, font de carboni: Glicerol i metanol, i un medi força diferent al utilitzat) amb un pes molecular de 24.6. És clar, que tot i que les condicions de treball poden ser diferents la composició no varia de forma significativa.

Si es coneix la composició mitjana de la biomassa i la quantitat d'amoni (NH_4OH) afegit a l'inici i durant el cultiu, es pot calcular a quina densitat cel·lular s'exhaureix teòricament la font de nitrogen. Al llarg del cultiu es van consumir al voltant de 150 ml de NH_3 (solució al 25 % en pes) per un volum total de 5 litres de reactor. Si es considera que el tot el nitrogen va destinat a biomassa, aquest component s'exhaureix per una densitat cel·lular teòrica propera als $54 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Davant aquest resultat, es pot relacionar directament l'aparició d'activitat proteolítica amb la manca de font de nitrogen al medi de cultiu.

Aquest efecte és particularment evident en la utilització de soques Mut⁺, ja que per la seva naturalesa s'aconsegueix amb relativa facilitat densitats cel·lulars elevades. Aquesta explicació també ratificaria el perquè en el cas de soques Mut^s no hi ha una degradació de l'enzim d'interès tot i una durada més elevada de cultiu. El creixement més lent provoca que difícilment s'arribin a densitats cel·lulars superiors a $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ i com es veu a les gràfiques s'evita l'activitat proteolítica sobre la ROL.

Per solucionar aquesta aparició de proteases a la fase final del cultiu, es poden realitzar diferents accions:

- ▶ Disminuir el pH de treball a un valor prou àcid per allunyar-se de les condicions òptimes a les que les proteases treballen. El principal inconvenient d'aquesta mesura és la disminució de la velocitat de creixement del microorganisme a pH inferior a 4 (pH recomanat per Invitrogen). El pH òptim de l'activitat proteolítica oscil·la al voltant de 7, per tant al treballar a pH 5.5 ja s'està intentant aplicar aquesta mesura, però com es veu no és suficient.
- ▶ L'addició de quantitats suficients de casaminoàcids al medi de cultiu inhibeixen la formació de proteases per part del microorganisme. Però, l'elevat cost econòmic d'aquest producte fa que aquesta mesura sigui inviable per volums de cultiu grans.
- ▶ La manipulació genètica de la soca per aconseguir que sigui defectiva en proteases. Tot i semblar a priori una bona solució, cal assenyalar que és molt laboriosa i difícil. Primer de tot, s'han d'anar identificant una per una les proteases i eliminar les seves possibles fonts contingudes en l'ADN del microorganisme.
- ▶ Una solució trivial pot ser senzillament no arribar a les densitats cel·lulars considerades límit, evitant tots aquests problemes. Aquesta mesura però va en detriment d'obtenir una producció de ROL prou elevada.

- Finalment, assegurar al llarg del la fermentació una quantitat suficient de font de nitrogen. No obstant això, aquesta tasca no es pot realitzar utilitzant la solució d'amoni (NH_4OH) pel seu fort caràcter bàsic. La solució passa per afegir suplementàriament algun component que contingui nitrogen però sense cap altre efecte secundari, com sulfat d'amoni ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) o clorur d'amoni (NH_4Cl).

Totes aquestes alternatives venen subjectes a la decisió d'utilitzar la soca Mut⁺ com a fenotip escollit per realitzar la producció de ROL en *Pichia pastoris*. En el cas que s'esculli la soca Mut^s, els problemes derivats de l'aparició de proteases desapareixen, sota les condicions actuals de treball.

Comparació entre els dos cultius Mut^s

Observant l'evolució de les dues fermentacions Mut^s, FSS_01 (Figura 4.15, 16 i 17) i FSM_01 (Figura 4.18, 19 i 20) i complementant la informació amb la taula 4.3, es poden detectar nombroses diferències.

En primer lloc, i al contrari que els resultats obtinguts en cultiu amb erlenmeyer (Serrano, 2002), els nivells d'expressió de proteïna aconseguits amb la soca KM1500_3 (Mut^s "multicopy" his⁺), emprant el cultiu semicontinu, no han donat el resultat esperat. La producció final de ROL d'aquesta soca no és significativament superior a l'obtinguda per la soca anàloga d'una sola còpia (KM100_1, Mut^s "singlecopy"). També s'ha confirmat la hipòtesis que l'augment de còpies de ROL té un efecte negatiu sobre la velocitat específica de creixement caient fins a valors de manteniment de metabolisme, és a dir, valors de μ propers a zero. Aquest fenomen també ha estat observat anteriorment per altres estudis (Clare et al., 1991b, Sinha et al., 1993).

Tot i que la soca Mut^s multicòpia ha arribat al valor més gran d'activitat final dels quatre cultius, la llarga durada del cultiu disminueix significativament els valors de productivitat ($\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Tot i això, pel que fa a rendiment $Y_{p/x}$ ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}$) és més gran que l'obtingut per la KM100_1, indicant l'únic efecte positiu que té l'increment de la dosis gènica, més producció per unitat de biomassa.

En ambdues soques Mut^s les velocitats específiques de creixement estan per sota de 0.01 h^{-1} després de la transició. Aquests valors són menors que els indicats per la mateixa soca control KM71 no transformada (0.04 h^{-1} , Brierley et al., 1990). A mesura que transcorre el temps de fermentació, la μ disminueix progressivament fins arribar a valors propers a zero. És també important assenyalar l'evolució de les velocitats específiques de consum de metanol ($-q_s$) i producció de lipasa (q_p) durant la tercera fase del cultiu, l'etapa d'inducció. Els valors més elevats d'aquests dos paràmetres s'aconsegueixen al principi d'aquesta fase, seguits per una tendència a la baixa de forma exponencial. Es pot apreciar l'efecte de "l'envelliment" que experimenta la soca en utilitzar com a únic substrat el metanol reduint progressivament tant el creixement i el consum de substrat inductor com la producció d'enzim.

Però, en els dos casos la velocitat específica de creixement mitjana és força similar, tot i que extremadament baixa. No s'aprecia clarament l'efecte que les múltiples còpies disminueixi la μ , com és manifesta en el fenotip Mut⁺.

Respecte als valors de la concentració de metanol, i a diferència dels cultius Mut⁺, s'ha pogut controlar en millor proporció estrenyent el rang, en gran part del cultiu, entre 0.5 i $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en ambdós casos. La dinàmica més lenta de les soques

Mut^s faciliten el control, ja que els canvis en el consum són molt menys bruscos i el consum molt baix. El perfil del cabal addicionat de substrat així ho indica, un rang de variació petit i constant durant llargs períodes de temps.

En aquests dos cultius Mut^s no s'aprecia la degradació de la ROL com passava amb les de fenotip Mut⁺, i potser aquesta dada confirma una vegada més que l'aparició d'activitat proteolítica va estretament lligada a l'exhauriment de la font de nitrogen en superar una densitat cel·lular entre 50 i 55 g·l⁻¹.

Efecte del fenotip Mut

La comparació entre les soques de diferents fenotip només es pot realitzar en les dues soques d'una única còpia, ja que no té sentit veure les diferències de les múltiples còpies quan cadascuna d'aquestes té un nombre molt diferent de còpies.

Observant l'evolució de les diferents variables en els gràfics (de 4.9 a 4.11 i de 4.15 a 4.17) se'n poden veure clares diferències. En primer lloc, la concentració de biomassa final i el temps tardat en aconseguir-la per la soca Mut⁺ posa de manifest la major facilitat d'aquesta en créixer i consumir metanol. En aquesta mateixa direcció, la gran diferència de cabals de metanol utilitzats per mantenir la concentració de metanol constant durant la fase d'inducció és de 6 a 10 vegades més petit comparant la soca Mut^s amb la Mut⁺. Queda clar doncs, que si el criteri de finalització de la fermentació és assolir un nivell determinat de biomassa, el cultiu Mut⁺ ho assolirà amb més rapidesa. Malgrat això, els consums d'oxigen i metanol al llarg del procés seran molt més elevats respecte als de la soca Mut^s, augmentant les exigències del subministrament i control d'aquestes variables.

Com era d'esperar, les velocitats específiques de creixement entre els dos fenotips també són clarament dispars així com la velocitat específica de consum de metanol (-q_s). El que sí es comparable són les productivitats (UA·L⁻¹·h⁻¹) de les dues soques, on la ràpida producció de lipasa per part de la soca Mut⁺ es compensa per la major quantitat de lipasa excretada per part de la Mut^s. Per tant, atès que la soca Mut^s no arriba a les elevades concentracions de biomassa de la X33 clon7, la productivitat específica (UA·g X⁻¹·h⁻¹) d'aquesta primera és força superior a la soca Mut⁺.

De forma resumida, es podria afirmar que la productivitat amb la soca Mut⁺ es basa en arribar a nivells alts de biomassa amb temps força curts de fermentació, compensant un rendiment $Y_{p/x}$ baix. Pel contrari, la soca Mut^s amb un rendiment $Y_{p/x}$ força més elevat, requereix més temps de cultiu i la concentració final de biomassa és menor. Aquest efecte es pot apreciar clarament en els valors de la velocitat específica de producció (q_p, UA·gX⁻¹·h⁻¹) de la taula 4.3, on malgrat les clares diferències entre les concentracions de biomassa i temps de cultiu, aquest paràmetre assoleix en els dos casos un valor proper a 90 UA·gX⁻¹·h⁻¹.

El que potser pot sobtar a primer cop d'ull és el valor del rendiment biomassa/substrat $Y_{x/MetOH}$ (g X·g MetOH⁻¹) calculat únicament, com és lògic, durant l'etapa d'inducció. El seu valor és força baix, entre 0.1 i 0.2 i significa que de cada gram de metanol al sistema, només el 10-20 % passa a forma part de la biomassa. Recordar, que aquest valor per als cultius en discontinu (Taula 4.2) és proper a 0.3 (soques X33 clon7 i GSR500_3).

Com ja s'ha detectat en treballs anteriors (Serrano, 2002), els diversos rendiments varien de manera important en funció de les diferents estratègies de cultiu (discontinuu i semicontinuu) seleccionades. És doncs desaconsellable comparar

resultats entre estratègies de cultiu, on hi ha multitud de variables que canvien (durada, composició del medi, concentració de substrats, nivells de biomassa, etc..).

A l'igual que en les soques Mut^s, la quantitat de producte per unitat de biomassa en les soques Mut⁺, indicat pel paràmetre $Y_{p/x}$, és superior a la soca X33500_1 que no en la X33 clon7, fent valer la seva condició de multicòpia. No obstant això, el nivell de biomassa final aconseguit així com el temps de cultiu són molt millors en la soca d'una única còpia, fent que aquesta sigui més rendible a nivell de productivitat i producció. Aquest efecte es manifesta en ambdós fenotips, poden afirmar que no es pot correlacionar entre el nombre de còpies de gen de ROL de les soques amb els nivells de producció i valors de $Y_{p/x}$. Això queda de manifest amb el valor de la productivitat ($UA \cdot g X^{-1} \cdot h^{-1}$) de cadascuna de les soques, on els valors de les d'una única còpia són més grans que les seves anàlogues multicòpia. Casualment, en ambdós fenotips el valor de la productivitat és aproximadament 1.5 vegades superior per la soca d'una còpia respecte a la de múltiples còpies del gen de ROL.

4.1.4. CONCLUSIONS

Les principals conclusions que es poden extreure d'aquest apartat són:

- ▶ La utilització de soques amb múltiples còpies de ROL al genoma, tant per Mut⁺ com Mut^s, no representen una millora respecte les d'una sola còpia. Aquestes últimes, tot i produir una quantitat final inferior en cadascun dels casos, com que ho fan amb un període més curt de temps, la productivitat en tots dos casos és superior.
- ▶ En el cas de les soques Mut⁺, l'augment del nombre de còpies també afecta reduint la velocitat específica de creixement.
- ▶ Els cultius estan limitats estequiòmicament per font de nitrogen utilitzant el medi MFBD_1 quan es sobrepassa una densitat cel·lular entre 50 i 55 $g \cdot l^{-1}$. La manca de font de nitrogen provoca l'aparició de lisi cel·lular i proteases que degraden les proteïnes extracel·lulars, entre elles la ROL.
- ▶ Com era d'esperar, per la naturalesa fenotípica de cadascuna de les soques, les Mut⁺ tenen una dinàmica més ràpida, per tant són fermentacions amb una durada menor, on la velocitat específica de creixement i consum de metanol són un ordre de magnitud superior a les soques Mut^s. No obstant això, es demostra que la producció enzimàtica no va lligada al creixement cel·lular, ja que són les soques Mut^s amb les quals s'arriba a valors més alts de rendiment producte/biomassa, $Y_{p/x}$ ($UA \cdot g X^{-1}$).
- ▶ El control manual de la concentració de metanol al medi és més fàcil realitzar-lo en les soques de fenotip Mut^s. El seu menor consum de metanol i dinàmica de creixement més lenta possibiliten que la concentració de substrat inductor es pugui mantenir més constant.
- ▶ Les importants oscil·lacions de les velocitats específiques de creixement, consum de metanol i producció, complica la interpretació dels resultats i la comparació dels mateixos entre cultius. La principal causa d'aquestes variacions són les contínues fluctuacions de la concentració de substrat inductor.

- S'identifica la concentració de metanol com un paràmetre clau per augmentar la producció de ROL. Es creu doncs, que el control sobre aquesta variable permetrà establir clarament la relació entre la velocitat de creixement, consum de substrat i producció de ROL.

4.1.5. SELECCIÓ DE LA SOCA DE TREBALL

Arribats a aquest punt del treball experimental, es va plantejar la opció de continuar únicament amb la soca més adient per la producció de ROL. El fet de centrar-se amb una soca permetria el seu estudi amb més profunditat i la possibilitat de comparar els resultats entre cultius sense atribuir els canvis a diferències de fenotip o el nombre de còpies.

La selecció de la soca de treball es va realitzar en funció de principalment dos criteris, la productivitat i la dinàmica del procés. Atès que un dels principals objectius és incrementar la producció de ROL, l'elecció de la soca més adient vindria determinada en gran part per la productivitat.

Com s'ha detallat anteriorment, les dues soques amb una productivitat major són les d'una sola còpia del gen de ROL de diferent fenotip. Aquests oscil·len entre els 2000 i 2350 ($\text{UA}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), valors molt similars. En principi, es descarta la utilització de soques multicòpia ja que les seves productivitats són menors.

La decisió però, també es condiona en funció de la dinàmica del sistema, que si és ràpida, els canvis i variacions en les diferents variables (pO_2 , pH , concentració de metanol) del sistema són bruscos. Això comportarà la desestabilització del bioprocés si no s'actua amb suficient previsió i celeritat per contrarestar-ho. Treballar en aquestes condicions fa que el sistema sigui susceptible a un gran nombre d'accidents, allunyant-se de les condicions òptimes. Aquest aspecte dificulta la reproductibilitat entre fermentacions. Per tant, es preferible treballar amb dinàmiques més lentes assegurant que els principals paràmetres del cultiu segueixin els perfils assignats per l'usuari.

L'aparició d'activitat proteolítica a la fase final del cultiu de tipus Mut^+ , per exhauriment de la font de nitrogen, també és un factor important a tenir en compte. La selecció d'una soca tipus Mut^+ comporta la posterior reformulació del medi o canvi del mode d'operació per tal d'evitar la síntesi de proteases.

Davant d'aquests resultats, la soca que es presenta com la millor alternativa és la KM100_1 (Mut^s "singlecopy"). La seva alta productivitat (només es veu superada per la soca X33 clon7), una dinàmica de fermentació lenta i la no presència de proteases en les condicions de cultiu, fa d'aquesta soca l'opció més vàlida.

4.1.6. DEFINICIÓ D'OBJECTIUS

Seleccionada la soca de treball i analitzada l'evolució dels diferents cultius, es plantegen nombrosos objectius amb la intenció d'incrementar la producció de ROL en *Pichia Pastoris*.

Principalment es passa per tenir un bon control del procés, sent necessària una millora en els següents aspectes:

- **Reproductibilitat:** No és possible realitzar un estudi acurat dels cultius sense tenir la capacitat de reproduir-lo en les mateixes

condicions. La monitorització i control de les principals variables físiques, químiques i biològiques del procés són les principals eines per aconseguir-ho.

- ▶ **Robustesa:** Atesa la llarga durada del cultiu, és probable que durant el procés hi hagin nombroses pertorbacions que alterin el seu bon funcionament. Per tant, és creu necessari la instal·lació de mesures que ajudin a mantenir el cultiu dins els paràmetres desitjats.
- ▶ **Autonomia:** També s'ha marcat com objectiu, aconseguir la mínima intervenció del personal responsable, alleujant significativament l'esforç a realitzar per portar a terme la fermentació.
- ▶ **Informació:** La falta de dades obliga al investigador a intentar explicar alguns fenòmens observats com a simples hipòtesis o conjetures. La monitorització de l'evolució de gran part dels paràmetres importants del cultiu és una eina imprescindible per poder analitzar i treure conclusions amb suficient certesa.
- ▶ **Versatilitat:** Totes les millores cal que estiguin orientades a permetre una ràpida i flexible adaptació a noves condicions de treball. S'ha d'evitar que la instrumentació estigui lligada a condicions molt específiques de la soca, medi o condicions d'operació.

La introducció de nombrosa instrumentació al muntatge es presenta com una de les solucions per assolir les necessitats plantejades.

A part, com s'ha anat insistint al llarg d'aquest apartat és vital mantenir el més controlat possible la concentració de metanol durant la fase d'inducció, variable en la que descansa una part important de l'èxit a nivell de producció. Per tant, també es requereixen nombroses millores en el muntatge per aconseguir aquest fi.

4.2. MILLORES A LA INSTAL·LACIÓ EXPERIMENTAL

Analitzats els resultats de l'apartat anterior, una de les conclusions extretes era la importància de millorar el muntatge experimental per tal d'aconseguir més informació i control sobre el bioprocés.

Per aquest motiu es van proposar inicialment una sèrie de mesures en aquesta direcció, resumides en els següents punts:

- ▶ **Anàlisi de gasos:** La mesura en línia de la concentració d'oxigen i diòxid de carboni a la sortida del fermentador dóna una informació molt valuosa que es pot relacionar directament amb l'estat fisiològic del microorganisme. Una intoxicació, falta de substrat o el canvi de font de carboni són esdeveniments que es poden detectar fàcil i ràpidament veient l'evolució de l'O₂ i el CO₂. Aquestes dues variables són especialment sensibles davant de qualsevol problema del cultiu. A part, si es disposa d'una mesura en continu d'aquestes es pot arribar a estimar altres variables importants com la concentració de biomassa i la velocitat específica de creixement.
- ▶ **Mesura de la concentració de metanol:** Una de les conclusions de l'apartat anterior és la necessitat de mantenir la concentració del substrat inductor dins un rang prou estret. És important doncs, en primer lloc trobar una tècnica suficientment bona per conèixer, amb la major freqüència possible, la concentració de metanol existent a l'interior del reactor.
- ▶ **Sistema automàtic d'extracció de mostres:** Els cultius en semicontinu es caracteritzen pel canvi constant de les principals variables d'estat del procés (X, MetOH, Activitat) al llarg del temps. Per poder realitzar un seguiment exhaustiu i fer una anàlisi acurada de l'evolució de la fermentació es necessiten un nombre elevat de mostres a diferents temps. La solució més viable en aquest cas és la utilització d'un sistema automàtic capaç de treure una mostra representativa del cultiu freqüentment i conservar-la posteriorment en condicions on les seves propietats no es vegin modificades.
- ▶ **Programari de monitorització i control:** Per poder fer unes anàlisis acurades durant o un cop finalitzada la fermentació calia registrar l'evolució temporal de les principals variables (T, pH, pO₂, etc..). També es va creure necessari deixar aquesta infraestructura preparada per poder controlar de forma centralitzada alguns dels paràmetres i/o variables importants del procés.

4.2.1. ANÀLISI DE GASOS

Com ja s'ha apuntat, l'anàlisi de la composició dels gasos de sortida pot ser de vital importància per conèixer l'estat fisiològic del microorganisme.

L'equip emprat és un *Multor 610 (Maihak, Hamburg, Alemanya)* que permet la mesura en continu amb una alta sensibilitat, i baixa interferència per altres compostos, del CO₂ i l'O₂ existents al corrent gasós de sortida del fermentador. El diòxid de carboni és mesurat mitjançant l'absorció d'infraroig (NDIR) no dispers. En canvi, la concentració d'oxigen es mesura amb una cel·la paramagnètica

independent. Així doncs, dins un mateix equip de dimensions reduïdes s'integren dos sensors específics que treballen independentment.

Les primeres proves es van realitzar connectant directament l'analitzador de CO₂ i O₂ al corrent d'aire de sortida del fermentador, i es van detectar uns quants problemes que falsejaven fortament la mesura, detallats a continuació:

- ▶ Les variacions en el cabal d'aire a l'entrada al fermentador, per tal de controlar la concentració d'oxigen dissolt a l'interior, provoquen alteracions en la mesura a causa de les constants variacions de pressió del sistema. S'observa que l'equip de mesura funciona millor quan el cabal d'entrada és constant durant un llarg període de temps.
- ▶ Per aconseguir una mesura estable i per allargar la vida de l'analitzador és aconsellable introduir el corrent gasós lliure de partícules i reduir el seu elevat contingut en aigua.
- ▶ Tant les oscil·lacions de cabal d'aire; pressió, com la variació de la velocitat d'agitació provoquen una alteració en les concentracions de CO₂ i O₂ a l'equilibri gas-líquid. La variació d'aquestes concentracions pot ser un tant per cent important de la concentració final analitzada provocant una interpretació errònia dels resultats obtinguts. Així doncs, cal realitzar un esforç en mantenir les condicions el més estables possibles i en el cas que es necessiti variar alguna d'aquestes assegurar que siguin de poca magnitud i lentes.

La solució de tots aquests problemes passava en primer lloc per instal·lar un sistema de control de la pressió tant dins com en tot el canal de sortida de gasos del fermentador. D'aquesta forma s'aconseguia mantenir constant el cabal gasós de sortida, estabilitzant així l'anàlisi de la composició d'aquest corrent.

Per aconseguir aquest fi, es va proposar el següent esquema experimental (4.25), on es garantia l'estabilitat del cabal d'aire que entrava a l'analitzador.

La línia principal de sortida de gasos del fermentador es bifurca en tres branques. La primera va directament al sensor sensible en un rang entre 1 i 2 atmosferes absolutes.

Una altra branca es dirigeix cap a l'analitzador, però es passa prèviament el corrent saturat d'aigua arrossegada per un dessecador ple de partícules de sílica gel que el deshumidifica. Seguidament passa per un filtre d'aire de 0.22 µm (Millipore FG, Bedford, USA) evitant el pas de partícules arrossegades pel corrent. Finalment i abans d'entrar al analitzador, s'ha col·locat un cabalímetre massic capaç de fixar el cabal d'aire a 500 ml·min⁻¹ amb força precisió (± 1 ml·min⁻¹).

La tercera i última branca es dirigeix cap a la vàlvula pneumàtica, element final d'actuació en el llaç de control de pressió, capaç de modificar el cabal d'aire de sortida a l'exterior amb l'únic objectiu de mantenir la pressió constant a l'interior de la línia.

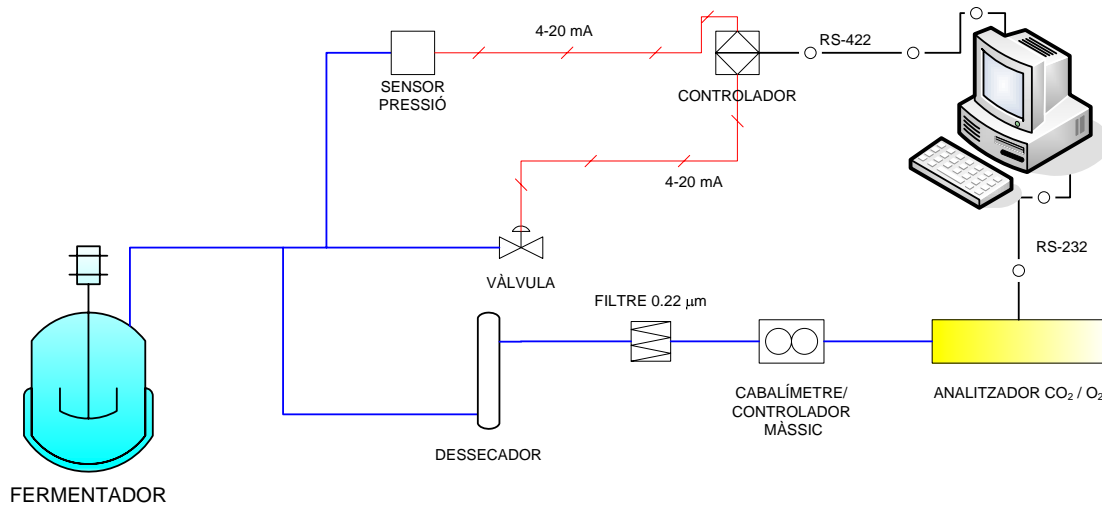


Figura 4.25. Esquema del muntatge experimental del llaç de control de pressió i l'analitzador de gasos.

Es podria pensar en un muntatge més senzill, format únicament per una vàlvula d'agulla capaç de mantenir amb precisió una obertura a la sortida. El problema és que el cabal d'aire a l'entrada del fermentador pot anar variant per tal de pal·liar les necessitats d'oxigen del microorganisme. Així doncs, la pressió a la capçalera del fermentador canvia en funció del cabal d'aire d'entrada.

El llaç de control de pressió està format per tres elements, un sensor, una vàlvula de regulació i un controlador. És aquest últim, a partir del senyal detectat al sensor, qui regula l'obertura de la vàlvula pneumàtica amb l'objectiu de mantenir la pressió el més pròxima possible al valor de consigna fixat per l'usuari.

A l'apartat 3.1 es descriu detalladament la instrumentació utilitzada per construir aquest llaç de control.

El principal problema d'aquest muntatge és la utilització d'un sensor situat a l'exterior del fermentador, per tant no es mesura directament la pressió al seu interior. Això implica que problemes d'obturació de filtres de sortida per escumes o aigua poden provocar que la pressió a l'interior sigui diferent a la de la línia on es mesura aquesta variable. Tot i això, aquest problema no passa amb freqüència i, en conseqüència, no s'ha cregut convenient buscar cap solució alternativa.

Des de l'ordinador es pot monitoritzar l'evolució de la pressió i modificar en línia els valors de consigna i dels paràmetres del controlador de tipus PID.

Amb aquestes condicions d'operació s'ha aconseguit obtenir perfils de la composició dels gasos de sortida molt estables i sense pràcticament soroll, com es mostra a la figura 4.26.

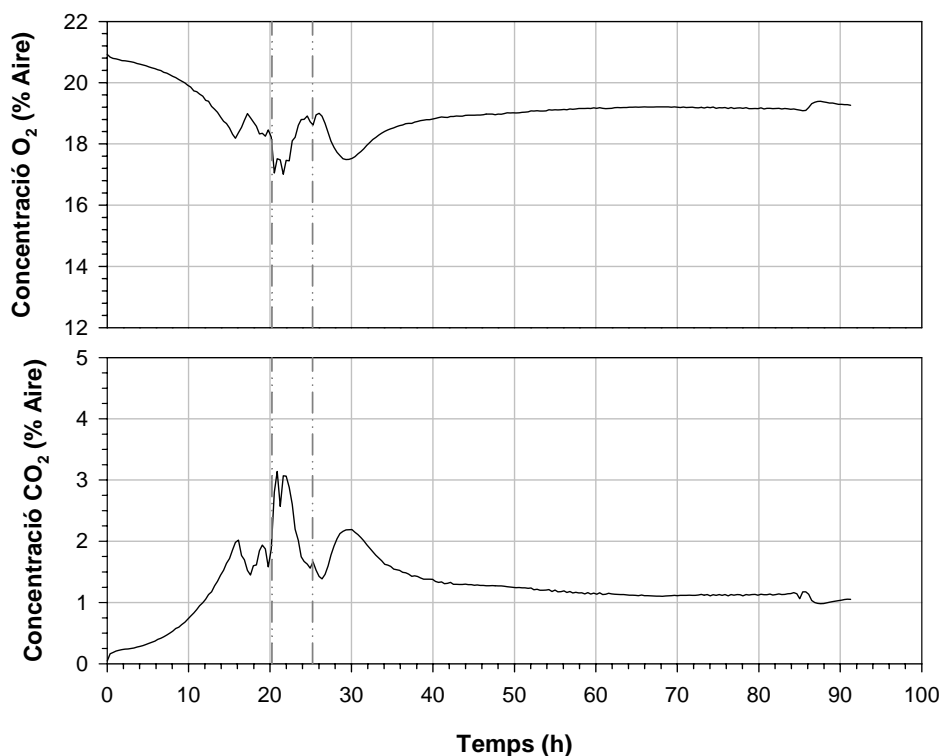


Figura 4.26. Evolució de la concentració d'oxigen i diòxid de carboni durant un cultiu.

4.2.2. MESURA DE LA CONCENTRACIÓ DE METANOL

És conegut que el metanol a elevades concentracions ($> 10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) és tòxic per al microorganisme *Pichia pastoris*. D'altra banda, s'ha descrit bibliogràficament que s'aconsegueix la màxima productivitat de la proteïna desitjada a velocitats específiques de creixement fixades i/o mantenint la concentració de metanol constant.

Principalment per aquests dos motius, és necessari controlar la concentració de metanol en un rang prou estret, però per fer això, cal abans de tot conèixer amb la millor precisió possible la concentració de metanol al fermentador.

Bibliogràficament, es poden trobar nombroses referències que utilitzen diferents tècniques per realitzar aquesta mesura en fermentacions de llevat metilotròfics, com ara *Pichia pastoris*.

Una possible classificació d'aquestes tècniques més emprades es presenta a la figura 4.27.

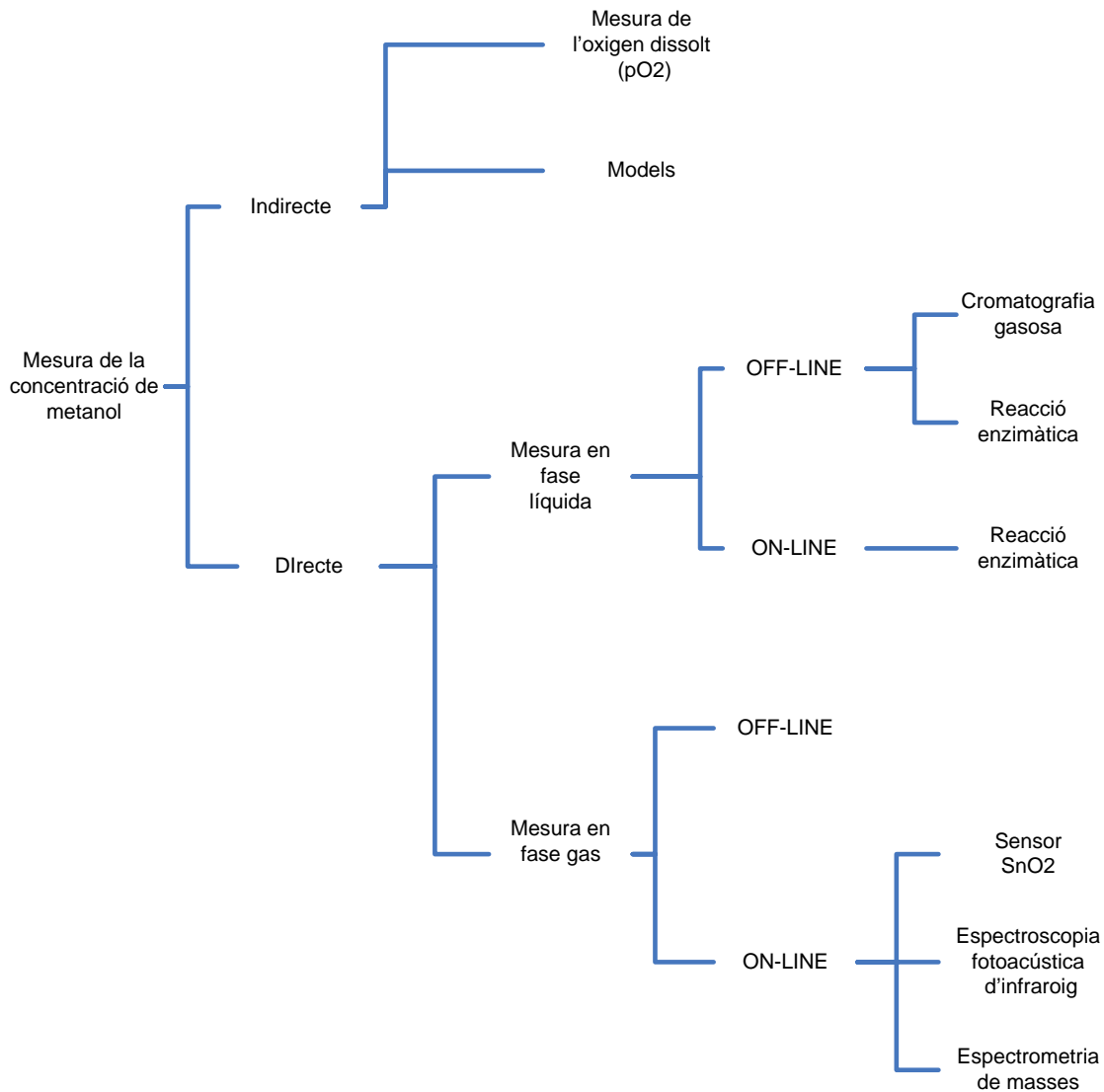


Figura 4.27. Classificació de les tècniques més emprades per la mesura de la concentració de metanol en cultius de *P.pastoris*.

En primera instància, es pot diferenciar entre els mètodes de mesura directes i indirectes. Com indica el seu nom, els mètodes de mesura directes es basen en determinar, utilitzant alguna tècnica analítica, la concentració real de metanol a l'interior del fermentador.

Pel contrari, en la mesura indirecte s'utilitza alguna altra variable del sistema relacionada amb la concentració del substrat (per exemple el pO_2). Per tant, seguint l'evolució d'algun d'aquests paràmetres i coneixent la relació que té amb la concentració de metanol és possible fer el seguiment indirecte d'aquesta última. Però en la majoria dels casos, aquestes relacions entre variables no és trivial i a més canvia al llarg del cultiu.

Els models matemàtics poden ser una altra solució per estimar la concentració de substrat inductor en cada moment a l'interior del fermentador. Aquestes tècniques han estat i són àmpliament utilitzades, ja que si no es disposa de la instrumentació adient, són l'única alternativa.

És indubtable però, que si es vol conèixer realment quina és la concentració de metanol a l'interior del fermentador, la millor manera de fer-ho és mesurar-la directament.

Dins les tècniques quantitatives d'anàlisi de la concentració de metanol es poden diferenciar dos grans grups. Els que quantifiquen aquest substrat a la fase líquida i els que ho fan a la fase gas.

El microorganisme utilitza el metanol existent al medi de fermentació (fase líquida), per tant es preferible realitzar la mesura sota les mateixes condicions. Tot i això, la mesura a la fase gas es presenta com una bona solució si les condicions durant la fermentació no varien bruscament al llarg del cultiu. Garantint el funcionament del cultiu en "pseudo estat estacionari", l'equilibri entre fases és força estable i per tant la concentració al medi és proporcional al metanol existent a la fase gas.

La forma més senzilla de realitzar aquesta mesura, i que implica menys alteracions en el muntatge és la mesura "off-line" a partir de l'extracció de mostres periòdiques. Com s'apunta a l'apartat 3.4, la mostra és centrifugada, filtrada i analitzada per cromatografia de gasos (CG).

Aquesta és la tècnica utilitzada en les primeres fermentacions amb *Pichia pastoris* d'aquest treball, on tot i obtenir bons resultats, presenta els següents problemes:

- ▶ Per poder fer un bon control de la concentració del substrat inductor es requereix una freqüència d'extracció de mostres elevada, com a mínim cada dues hores. Tot i així, en el cas d'utilitzar soques de *Pichia pastoris* de fenotip Mut⁺, s'hauria d'augmentar encara més la freqüència (cada 30 min), ja que el ràpid augment de biomassa i una gran velocitat de consum de metanol (unes sis vegades més ràpid que la soca Mut^s) canvien ràpidament les necessitats de metanol. Cal assenyalar que la màxima freqüència de mesura possible, és a dir, el temps que es tarda en conèixer la concentració d'una mostra és al voltant de 30 minuts. Aquesta freqüència de mesura està directament relacionada amb la reproductibilitat entre fermentacions i queda clar que utilitzant aquesta tècnica és molt difícil aconseguir que dos cultius siguin comparables, ja que els perfils de concentracions seran força diferents.
- ▶ Lògicament, un dels principals problemes d'aquest sistema de mesura és el temps d'anàlisi sent com a mínim d'uns 20 minuts, excessiu per portar un bon control de la variable.
- ▶ La contínua extracció de mostres i posterior processament per conèixer el valor de la mesura requereix una constant i laboriosa dedicació per part de la persona que porta a terme el control. És a dir, la necessitat de personal per tal de portar a terme aquesta tècnica és massa elevada.
- ▶ Per últim, cal comentar que l'elevat nombre de mostres extretes (d'un volum de 5 ml per mostra) incrementa el risc de contaminació i el volum acumulat final pot arribar a significar un tant cent important del volum total del fermentador.

Aquests punts són igualment aplicables en utilitzar la tècnica colorimètrica (reacció enzimàtica).

La solució a tots aquests problemes passa per trobar una tècnica capaç d'augmentar la freqüència de mesura, que sigui un sistema automàtic (sense que hi hagi de realitzar la mesura manualment) i que redueixi el risc de contaminació i el volum de mostra utilitzat.

Durant els últims anys, s'han desenvolupat multitud d'equips capaços de mesurar automàticament un elevat nombre de variables en un bioprocés. Entre aquestes variables, la mesura d'alguns nutrients o productes ha experimentat especial èmfasi per la seva rellevant importància dins l'evolució del cultiu. Sistemes basats amb principis de mesura molt estudiats, com les reaccions enzimàtiques o la mateixa cromatografia fins sistemes complexes com el NIR (Near Infrared) han estat aplicats de nombroses formes diferents amb un únic objectiu, monitoritzar alguna de les variables del procés (Arnold et al., 2002).

El metanol no ha estat una excepció, i és fàcil trobar al mercat un elevat nombre d'equips automàtics per a la seva mesura (Guarna et al., 1997; Zhou et al., 2002) i aplicables a bioprocessos. A continuació es presenten les diferents alternatives estudiades per realitzar la mesura en línia d'aquesta variable.

Mesuradors de metanol en fase líquida

SIA (UAB)

L'experiència que es tenia en la construcció de sistemes automàtics de mesura utilitzant tècniques FIA (Flow Injection Analysis) i SIA (Sequential Injection Analysis) dins el grup d'investigació (Cos et al., 2000; Almuzara et al., 2002), va facilitar ràpidament l'adequació d'un aparell, utilitzat anteriorment per altres aplicacions, a la mesura en línia de la concentració de metanol.

El principi emprat per a la determinació del metanol pel sistema SIA es basa en les reaccions enzimàtiques de l'alcohol oxidasa (AOX) i la peroxidasa (POD) següents:

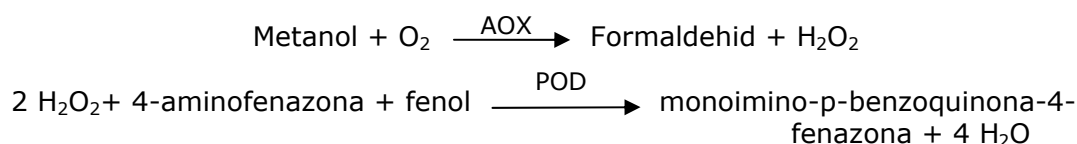


Figura 4.28. Reaccions utilitzades per la detecció de la concentració de metanol

Així doncs, el metanol en presència d'aquests enzims i reactius reacciona fins formar un producte de color, el monoimino-p-benzoquinona-4-fenazona i la seva concentració es relaciona directament amb l'absorbància a 470 nm. Aquesta mesura es pot relacionar linealment amb la concentració de metanol.

La tècnica SIA (Sequential Injection Analysis) realitza aquestes reaccions de forma automàtica. Mitjançant la vàlvula de sis vies es poden configurar seqüències de petits volums de mostra i reactius dins un tub de diàmetre reduït (0.8 mm de diàmetre intern) que després de restar 90 segons reaccionant s'envien al detector.

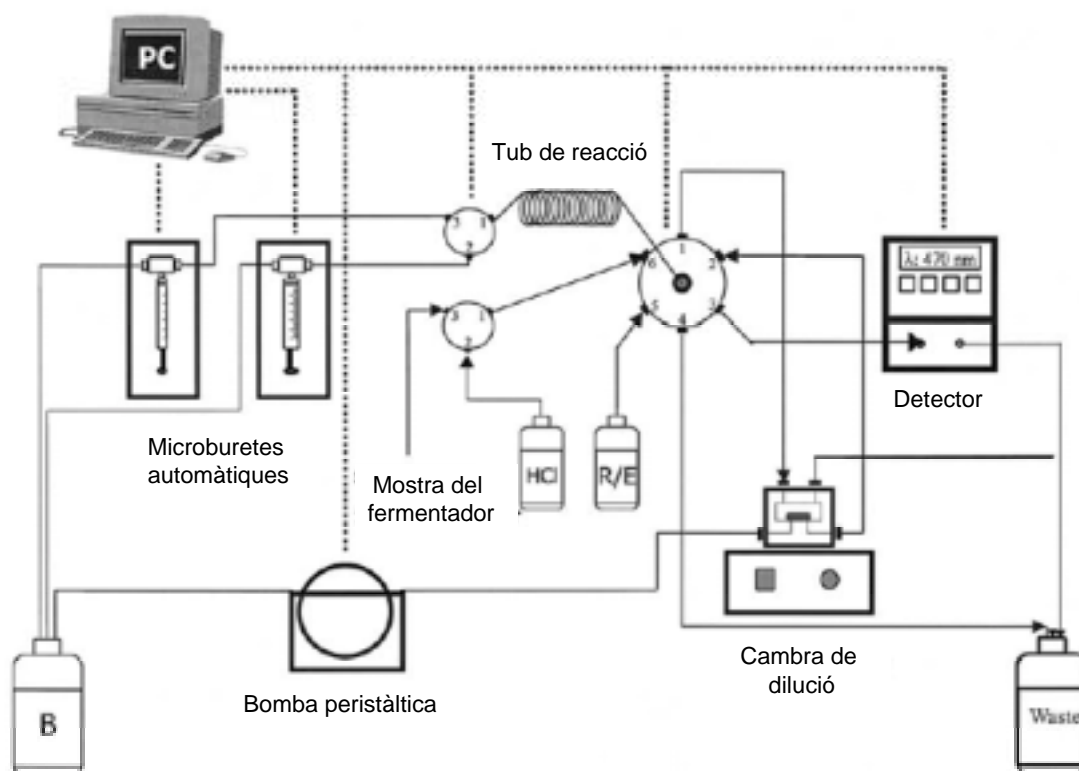


Figura 4.29. Esquema de l'equipament automàtic d'anàlisi utilitzant la tècnica SIA.

El rang de mesura aconseguit és de 0 a $0.1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ amb una desviació estàndard del 4 % i una freqüència màxima de mesura de 7 mostres per hora. L'equip disposa d'un sistema automàtic de dilució, permetent analitzar concentracions fins a $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Almuzara et al., 2002; Surribas et al., 2003).

Un dels requisits indispensables és que necessita que la mostra en línia provinent del fermentador, estigui lliure de biomassa. Aquest problema es soluciona amb la col·locació d'una sonda esterilitzable (Eppendorf ESIP 5441, Hamburg, Alemanya) a l'interior del reactor (Cos et al., 2000).

Mesuradors de metanol en fase gas

YSI 2700 Select Analyzer.

L'empresa YSI (Ohio, USA) comercialitza el model 2700, equip preparat per a la connexió en línia amb bioreactors per l'anàlisi de metanol. El principi de mesura és la reacció enzimàtica amb el component a mesurar resultant-ne una diferència de potencial proporcional a la concentració. L'enzim està immobilitzat en una membrana amb un temps de vida mig no molt gran (en el cas del metanol, 5 dies). Segons l'anàlit que es vulgui mesurar, cal modificar els reactius i l'enzim immobilitzat a emprar.

La gran virtut d'aquest sistema és la utilització de molt poc volum de mostra (al voltant dels $25 \mu\text{L}$) i que no és necessari, en tots els casos, filtrar-la o diluir-la prèviament. No obstant això, s'hauria de comprovar com afecten elevades densitats cel·lulars al sistema d'anàlisi.

La freqüència de mesura es pot preprogramar, amb un valor màxim de cada 60 segons i el mateix equipament pot, després d'una prèvia configuració, activar una bomba o altre mecanisme compatible per mantenir un valor determinat de consigna. Cal destacar però, que aquest tipus de control és molt senzill (On/Off) i en funció de la complexitat del cultiu podrà ser insuficient per mantenir el valor prou estable.

Les diferents parts del sistema que entren en contacte amb el medi de cultiu es poden esterilitzar per temperatura (121 °C durant 30 min.).

El calibratge es realitza amb un únic punt a $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ d'una solució preparada per l'usuari, i el rang de mesura lineal va de $0\text{-}2.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. L'equip és totalment autònom i realitza totes les tasques de mesura i calibratge de forma automàtica.



Figura 4.30. YSI 2700 Select Analyzer

La precisió de la mesura és al voltant del 2 %. I les possibles interferències de l'equip són l'etanol i altres alcohols de cadena curta.

El preu final d'aquest equipament amb els accessoris necessaris per connectar-lo en línia supera els 18.000 €.

Frings ALKOSENS

La sonda ALKOSENS (Frings America, Illinois, USA) és una membrana esterilitzable que es submergeix directament al medi de cultiu. El principi de mesura està basat en la selectivitat d'aquesta membrana de silicona semipermeable per components orgànics volàtils. La concentració de metanol a la fase líquida serà proporcional a la de la fase gas de l'interior de la sonda, on un sensor de diòxid d'estany (SnO_2) detecta la quantitat de metanol existent donant per resposta un senyal elèctric proporcional a aquesta.

L'etanol i en menor grau altres alcohols volàtils, interfereixen en la mesura sense poder diferenciar-los.

El temps de resposta (95 % del senyal) és al voltant de 5 minuts, amb una sensibilitat elevada, de 0.1 %. El rang de mesura és molt extens, poden arribar a concentracions fins el 15 % en volum del total.

El fabricant assegura que el sistema és robust i que el temps de vida de la membrana i el sensor són elevats, sense indicar un període concret. És resistent a la temperatura (<143 °C) i a la pressió (<2 bar). El tipus de connexió de la sonda

és compatible amb els ports d'entrada del fermentador que es disposa (B.Braun Biostat ED) per la qual cosa no caldria cap tipus d'adaptació. El cost de tot l'equipament oscil·la al voltant dels 15.000 €.



Figura 4.31. Frings Alkosens. Sonda per a components orgànics volàtils .

MC-168

El MC-168 (PTI Instruments Inc., Kathleen, USA) és un equip comercial dissenyat específicament per monitoritzar i controlar la concentració metanol en fermentacions amb *Pichia pastoris*.



Figura 4.32. MC-168. Equip comercial de mesura de metanol en línia.

La concentració de metanol existent en el corrent gasós de sortida del fermentador, que resta en equilibri amb la seva concentració a la fase líquida, pot ser detectada pel sensor.



Figura 4.33. Sensor de Metanol TGS 822.

L'element sensor (TGS 822, Figaro, Osaka, Japó) d'aquest equip està construït amb un semiconductor de diòxid d'estany (Figura 4.33), a l'igual que l'equip FRINGS ALKOSENS. En presència d'un solvent orgànic volàtil, la conductivitat del sensor augmenta proporcionalment segons la seva concentració en l'aire. Un senzill circuit elèctric converteix la variació de conductivitat en voltatge, variable que es relaciona amb la concentració d'aquest solvent.

Tant la temperatura com la humitat afecten la conductivitat del sensor, per tant, cal treballar sempre a les mateixes condicions d'aquestes dues variables.

El rang de mesura fins als $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ i una precisió del $\pm 0.2 \%$ són valors prou acceptables per satisfer els requisits necessaris per al sistema de treball.

Així doncs, abans d'adquirir aquest equipament caldria assegurar-se de la no existència d'algun d'aquests compostos que interferís en la mesura. En el cas de *Pichia pastoris*, no s'ha detectat cap tipus de compost orgànic volàtil al qual el sensor sigui sensible.

El seu cost econòmic és relativament baix, al voltant dels 2900 €.

1313 Fermentation Monitor

Aquest equip construït per INNOVA (Ballerup, Dinamarca) integra en un espai reduït els sensors de mesura de la concentració d'oxigen, diòxid de carboni i hidrocarburs volàtils, com l'etanol o el metanol. Un corrent gasós de $130 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ es bifurca per analitzar els diferents components en dos sensors diferents. Per analitzar l' O_2 , s'empra l'espectroscopia magnetoacústica i pel CO_2 i els hidrocarburs es mesuren per espectroscopia fotoacústica.



Figura 4.34. 1313 Fermentation Monitor.

La principal avantatge d'aquest equip és la rapidesa d'anàlisi i la senzillesa de la instal·lació requerida.

Tot i que no s'ha aconseguit conèixer exactament el seu preu al mercat s'ha pogut averiguar que és superior als 8.000 €.

Espectrometria de masses

L'espectrometria de masses també representa una solució molt vàlida, destacant respecte la resta de tècniques per la seva gran precisió i sensibilitat, capaç de detectar concentracions a nivell de traces en l'aire. Aquesta tècnica utilitza les característiques dels moviments dels ions a l'interior d'un camp magnètic o elèctric per classificar-los segons la seva relació massa-càrrega.

En aquest cas, les interferències d'altres compostos en l'aire es poden solucionar fàcilment. Si per casualitat dues molècules coincideixen a nivell de pes

molecular, el fraccionament en trencar-se a l'interior de l'equip és diferent i únic per cada compost, podent-lo identificar consultant bases de dades específiques.

La seva adaptació per connectar-lo en línia amb la sortida de gasos del reactor no sembla complicada. No obstant això, les interferències produïdes per la gran quantitat d'aigua que arrossega el gas obligarà a que l'equip treballi a temperatures elevades, augmentant el seu desgast.

El preu d'aquest equipament és molt variable ja que depèn de la marca i de les nombroses especificacions i accessoris que pot portar l'aparell. El que és clar però, és que es tracta d'una instrumentació molt cara, en tots els casos superior als 30.000 €.

Un cop descrites les principals característiques de les diferents possibilitats existents per realitzar automàticament la mesura de metanol, a continuació es comparen entre sí (taula 4.7). S'han seleccionat una sèrie de criteris en base als quals s'ha escollit l'equipament més adient. La qualificació per cadascun dels equips s'ha fet en relació als seus competidors. Cal tenir en compte però, que a l'hora de realitzar la selecció no s'ha donat el mateix pes a cadascun d'ells.

	SIA (UAB)	YSI 2700	Frings ALKOSENS	MC-168	1313 Fermentation Monitor	Espectrometria de masses
Tècnica d'anàlisi	Reacció enzimàtica (Colorimètric)	Reacció enzimàtica (diferència de potencial)	Membrana permeable. Sensor de SnO ₂	Sensor de SnO ₂	Espectroscopia fotoacústica i magnetoacústica	Espectrometria de masses
Fase	Líquida	Líquida	gas	gas	gas	gas
Pretractament de la mostra	Sí	No	No	No	No	No
Freqüència de mesura	↓↓	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑
Temps de resposta	↑↑	↑	↓	↓	↑	↓
Manteniment	↑↑	↑	↑	↓↓	↓↓	↑
Risc de contaminació	↑↑	↑	↓	↓↓	↓↓	↓↓
Precisió	↓	↑	↓	↓	↓↓	↑↑
Rang de Mesura	↓↓	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Sensibilitat	↑	↑	↑	↑	↓	↑↑
Mètode Invasiu	Si	Si	No	No	No	No
Cost econòmic	↑	↑	↑	↓↓	↑	↑↑

↑↑ Molt alt ↑ Alt ↓ Baix ↓↓ Molt Baix

Taula 4.7. Comparació relativa entre diferents equips de mesura de metanol en línia.

No existeix, en aquest cas, un dels equips que reuneixi les millors qualitats en tots els aspectes, però sí que algun d'ells destaca positivament en molts d'ells. Després d'una anàlisi i descartar alguns dels equips per l'elevat preu, es va decidir utilitzar el MC-168. Aquest equip presenta moltes qualitats, entre elles les més destacades són la freqüència i el rang de mesura, així com el baix manteniment i que es basi en un mètode no invasiu. Es potser l'equip que reuneix de forma més compensada les principals característiques que es demanen a un sistema d'aquest tipus.

Instal·lació del MC-168

En adquirir el nou equip de mesura MC-168, es va procedir a realitzar el muntatge i posterior calibratge per posar-lo en línia.

Segons el manual subministrat amb l'equip, s'aconsella que el tub que connecta el fermentador i l'equip de mesura, ha de ser el més curt possible, evitant d'aquesta manera un temps mort excessiu en la mesura. També a la línia del corrent gasós que va cap el sensor es recomana col·locar-hi un filtre (cotó fluix) per evitar el pas de partícules de gran mida que podrien obstruir el sensor (Figura 4.35).

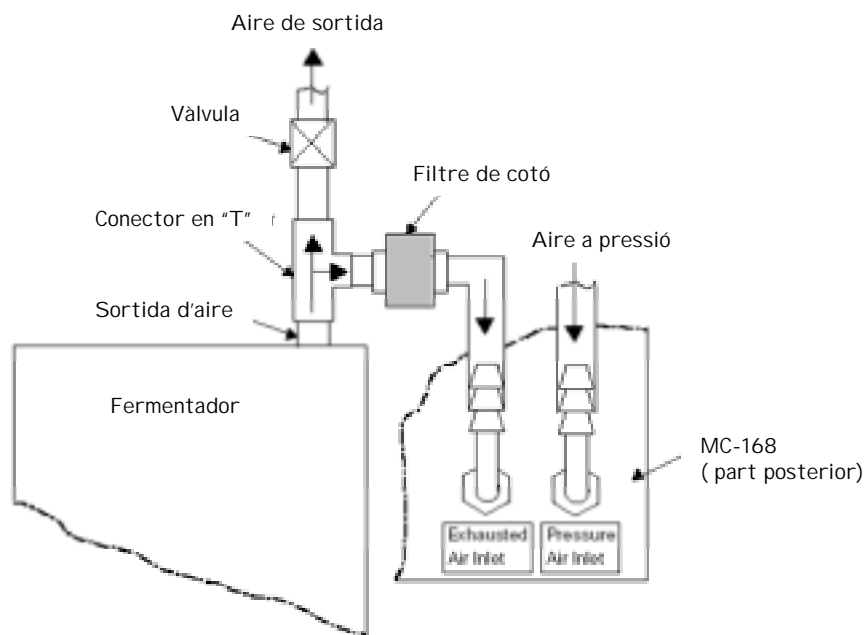


Figura 4.35. Esquema de la connexió de la línia de gas del fermentador amb el sensor de Metanol.

No obstant això, les primeres proves realitzades sota aquest esquema muntatge van comportar diferents problemes:

- ▶ El sensor no estava protegit davant d'accidents com la sortida de líquid i/o escuma pel corrent gasós, comuns en aquest tipus de processos.
- ▶ L'equip era molt sensible a petites oscil·lacions de pressió, sobretot les pertorbacions en el corrent d'aire de línia. Aquestes variacions provocaven un soroll continu en el senyal de sortida de l'equip.

- Es va detectar l'existència de partícules dins l'equip sensor, conclouent que la mida de porus de la fibra de cotó no era suficientment per filtrar els sòlids arrossegats provinents del bioreactor.

En un primer moment, es va pensar no variar el muntatge original i disminuir el soroll del senyal fent un tractament posterior, una solució en aquesta direcció podria ser incorporar un filtre digital. Aquest es podria sintonitzar per aconseguir reduir l'oscil·lació a altes freqüències del sensor. Malgrat això, es va optar en primer lloc per millorar la qualitat del senyal realitzant modificacions en el muntatge i si després d'aquest encara no fos prou bona, llavors s'estudiaria a fons l'alternativa del filtre digital.

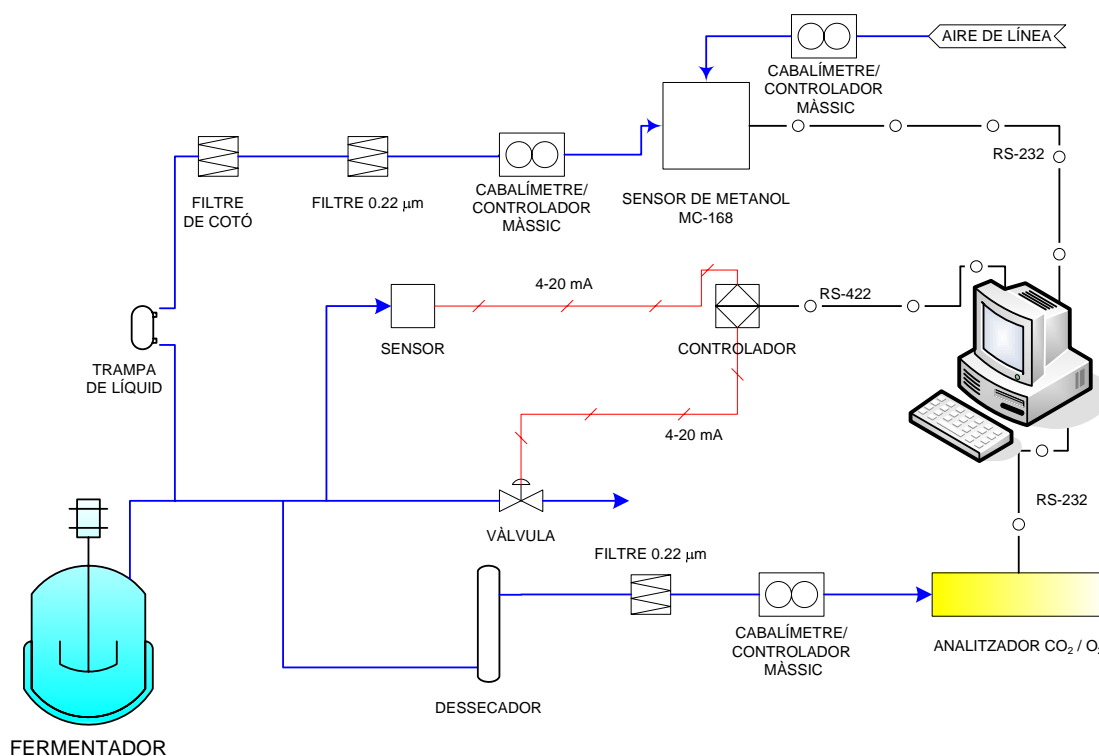


Figura 4.36. Esquema final del muntatge utilitzat pel sensor de metanol, integrat amb el sistema d'anàlisi de gasos.

Si s'analitzen les millores instal·lades (Figura 4.36), seguint el corrent de sortida del fermentador cap a l'analitzador de metanol, en primer lloc s'ha col·locat una trampa de líquid. Aquest recipient pot evitar que possibles escumes o líquid sortint del fermentador entrin dins l'equip de mesura. Pot arribar a contenir un volum final de 200 ml, i la seva utilització no augmenta significativament el temps mort de la mesura.

A continuació s'ha instal·lat el filtre de cotó, recomanat pel fabricant de l'equip de mesura, amb l'única funció de no deixar passar possibles partícules de gran mida arrossegades pel corrent.

Just immediatament abans de que el corrent gasós entri a l'interior de l'equip de mesura, s'ha col·locat un cabalímetre/controlador màssic (de rang entre 0-1 l·min⁻¹), capaç de regular amb molta precisió el cabal d'entrada al MC-168 (± 1 % del rang de mesura de l'aparell). Aquesta mesura també s'ha adoptat pel corrent d'aire de línia, on s'hi ha instal·lat un cabalímetre màssic del mateix model i dimensions. En ambdós casos, el control del cabal minimitza les oscil·lacions de

pressió i garanteix una estabilitat del senyal de l'equip de mesura de metanol més que suficient.

Per garantir el bon funcionament dels cabalímetres màssics s'ha col·locat un filtre de $0.2 \mu\text{m}$ de mida de porus (Millipore FG, Bedford, USA), evitant que alguna partícula taponi la vàlvula d'aquests aparells.

Davant de la necessitat d'ajustar la mesura de metanol a diferents rangs de concentració, l'equip disposa d'un sistema de dilució en línia. Consisteix simplement en mesclar el corrent de gas que prové del fermentador amb un corrent secundari que conté aire de línia (lliure de metanol). Lògicament, el rang de mesura més petit s'aconseguirà quan no es dilueixi el cabal gasós provinent del fermentador. En funció de la relació de cabals d'aquests dos corrents s'aconseguirà augmentar i disminuir el rang de mesura de concentració de metanol (Figura 4.37). És imprescindible que per obtenir una mesura fiable la relació entre els dos cabals sigui constant.

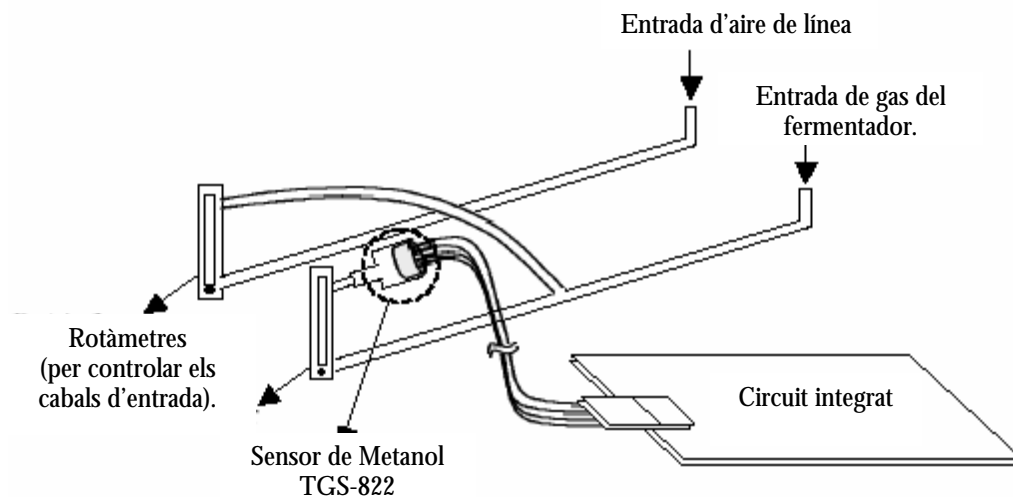


Figura 4.37. Esquema intern del sensor de Metanol MC-168.

Per trobar la relació de cabals òptima entre el provinent del fermentador i el corrent d'aire de línia, en primer lloc es van contemplar les restriccions a la que estava sotmès el muntatge:

- ▶ El MC-168 permet com a màxim un cabal de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ per cadascun dels corrents.
- ▶ El rang de mesura desitjat oscil·la entre 0 i $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Per tant, per aconseguir la millor precisió i sensibilitat, els $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a la fase líquida del fermentador han de donar el màxim senyal en l'equip de mesura de metanol (5 V).
- ▶ Atès que el cabal mínim d'entrada d'aire al fermentador és de $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, dels quals $0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ van destinats al l'equip d'anàlisi de CO_2 i O_2 , el cabal destinat a la mesura de metanol no podia superar $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Tot i així, és aconsellable no apropar-se excessivament a aquest valor ja que per controlar la pressió a la capçalera del reactor cal un excés de cabal d'aire.

- ▶ Per evitar un excessiu temps mort en la mesura, el fabricant aconsella un cabal superior a $300 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, en el corrent gasós de mostra.
- ▶ Després de provar diferents valors, tots ells complint les restriccions anteriorment comentades, el cabal que es va triar del corrent del fermentador va ser de $500 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ i $700 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pe l'aire de línia. Aquesta parella de valors eren valors compatibles amb l'equip de mesura, amb el muntatge i el rang de mesura era el desitjat ($0 - 5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Pel que fa el temps mort, aquest era entre 2 i 3 minuts, acceptable per l'ús final del senyal.

Calibratge de l'equip

La metodologia per calibrar el MC-168 és força senzilla. Tan sols cal anar variant la concentració de metanol en el fermentador, i esperar que la mesura del sensor es mantingui estable, és a dir que arribi l'equilibri d'aquest entre la fase líquida i gas. D'aquesta forma es coneix quin és el valor de voltatge de sortida de l'equip de mesura per cadascuna de les concentracions a la fase líquida.

Tot i que la concentració de metanol a la fase líquida del medi és coneguda aproximadament per la quantitat addicionada, es realitza un anàlisi més exacte per cromatografia gasosa seguint la mateixa metodologia utilitzada en la detecció d'aquest component en mostres de fermentació (Apartat 3.3).

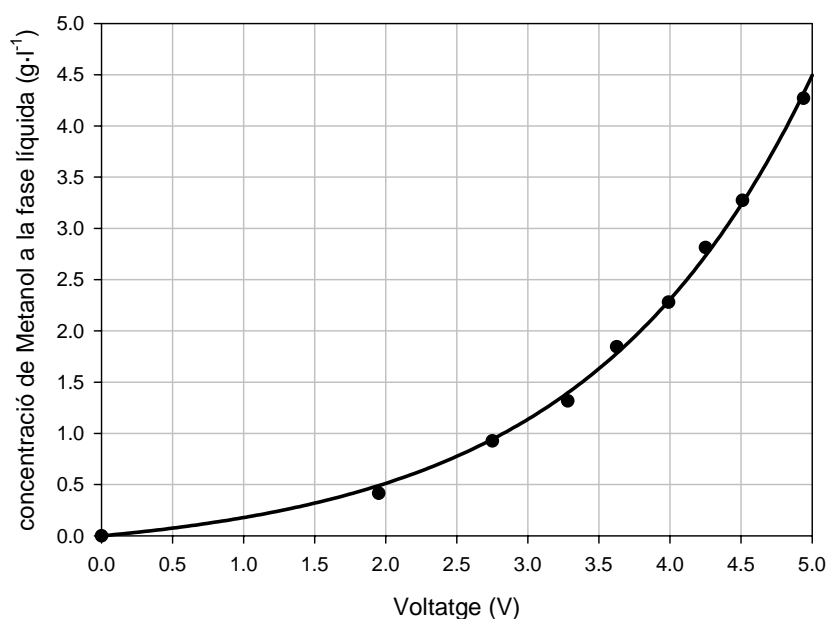


Figura 4.38. Corba de Calibratge entre el voltatge del sensor i la concentració de metanol a la fase líquida per CG.

La relació entre el senyal de voltatge del sensor i la concentració real a la fase líquida del fermentador no segueix una relació lineal, sinó una funció exponencial creixent, com es pot observar a la figura 4.38. Aquesta particularitat implica que segons la zona escollida es tindrà més o menys sensibilitat. Per exemple, entre 0 i $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a la fase líquida, una lleugera variació de concentració produeix un canvi notable en el voltatge, implicant una bona sensibilitat del sensor per detectar petits canvis en la concentració. A partir de $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, es dona l'efecte contrari, la variació del voltatge és menor respecte a un salt de la mateixa magnitud en la concentració de metanol, disminuint la sensibilitat de l'aparell.

Com s'ha comentat anteriorment, la relació entre el voltatge detectat pel sensor i la concentració real de metanol a la fase líquida és de tipus exponencial creixent. S'han introduït unes petites modificacions a aquest tipus d'equació perquè pugui aproximar la tendència dels punts passant pel punt d'inici (0 V. \rightarrow 0 g·l⁻¹). Aquesta equació és de la següent forma:

$$[\text{MetOH}] = A \cdot (e^{B \cdot V} - 1) \quad \text{eq. 4.1}$$

On [MetOH] és la concentració de metanol a la fase líquida (g·l⁻¹), V és el voltatge del sensor i A i B són constants. Aquests paràmetres es troben mitjançant la utilitat "Regression Wizard" del software comercial Sigma Plot 8.0 (Systat Software Inc., Richmond, USA). El mètode matemàtic per obtenir aquesta parella de valors que aproxima més correctament les dades experimentals, està basat en una variant del mètode de Gauss.

Tant en el manual subministrat pel fabricant de l'equip com en alguns treballs que utilitzen el mateix sensor, s'indica que el medi emprat en el cultiu no influeix sobre la corba de calibratge (Guarna et al., 1997). Fins i tot, s'aconsella realitzar la corba de calibratge utilitzant només aigua a la fase líquida.

No obstant això, s'ha observat en múltiples proves i experiments que tant la composició del medi de cultiu com la presència de biomassa afecten al calibratge, especialment per valors de voltatge elevats.

A la Figura 4.39. es pot observar la influència que té la realització del calibratge sota diferents condicions, amb només aigua destil·lada, amb el medi MFBD_1 sense i amb presència de biomassa inactiva. Apuntar que la concentració de microorganisme utilitzada és al voltant de 30-35 g·l⁻¹, valor mitjà durant l'etapa de transició i que la seva inactivació, per evitar en continu consum de metanol, es fa mitjançant l'addició de 400 µg·l⁻¹ d'azida sòdica.

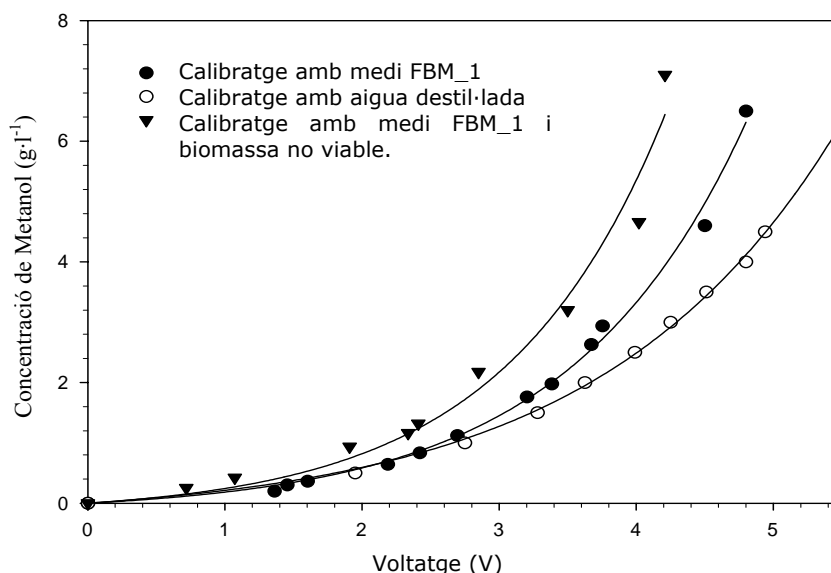


Figura 4.39. Diferències en la corba de calibratge segons el medi utilitzat en el fermentador.

Les diferències en el calibratge per aquestes tres condicions són clares i queda de manifest la importància de portar a terme aquest procés en les mateixes condicions finals de cultiu, és a dir, amb el medi de fermentació i biomassa.

Altres variables com la temperatura, el pH, etc.. també poden afectar amb major o menor grau el procés de calibratge, per tant s'aconsella utilitzar en tot moment les mateixes condicions utilitzades durant el cultiu (Ramón et al., 2004).

Interferències

Com s'ha assenyalat anteriorment, el sensor TGS 822 (Figaro, Osaka, Japó) no és específic del metanol, també es capaç detectar altres solvents orgànics volàtils com etanol i té especial sensibilitat per detectar compostos com l'amoni. Però, és conegut que *Pichia pastoris*, per condicions aeròbiques, no produeix etanol ni altres solvents en quantitats suficients per interferir en la mesura de metanol.

No obstant això, el medi FBM_1 utilitzant en els cultius en semicontinu empra l'hidròxid d'amoni per controlar el pH durant la fermentació. El sensor es capaç de detectar quantitats superiors a 3 ppm d'aquest compost en l'aire.

El hidròxid d'amoni per controlar el pH a 5.5 també és utilitzat com a font de nitrogen necessari per al creixement. Aquest compost bàsic és addicionat per la part de la capçalera del fermentador mitjançant un punxó que el permet afegir gota a gota. El temps de caiguda d'aquesta gota a través de l'espai situat a la capçalera és suficient per vaporitzar parcialment part de l'amoni i interferir en la mesura del MC-168. Cal assenyalar que la magnitud d'aquesta interferència és directament proporcional al cabal d'aire d'entrada al bioreactor, a major cabal d'aire d'entrada el de solució d'amoni interfereix més al senyal.

En controlar el pH amb addicions esporàdiques de base, les pertorbacions causades pel hidròxid d'amoni poden perllongar-se algunes hores després d'aquesta addició, retornant finalment al mateix valor anterior que es produeixi la interferència.

Per solucionar aquest problema, no descrit a la bibliografia, es van proposar dues alternatives. La primera era la reformulació del medi i la segona era buscar alguna manera d'addicionar l'hidròxid d'amoni per tal que no afectés el senyal del sensor.

L'objectiu de modificar la composició del medi era trobar una base per controlar el pH i una nova font de nitrogen que no produïssin cap tipus d'interferència. Es van seleccionar com a primera alternativa la utilització d'una solució 5 M d'hidròxid de potassi (KOH) com a base i l'addició inicial de $57.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sulfat d'amoni $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, respectivament. Aquesta elevada quantitat inicial de font de nitrogen és l'estequiomètricament necessària per assolir una concentració final de biomassa al voltant de $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, tenint en compte la composició elemental mitjana de la biomassa ($\text{CH}_{1.88\pm 0.02}\text{O}_{0.56\pm 0.08}\text{N}_{0.187\pm 0.014}\text{S}_{0.009\pm 0.004}$).

La nova composició del medi no afectava el sensor de metanol però augmentava de forma alarmant la quantitat de sals al medi de cultiu. Bibliogràficament, està descrit l'efecte negatiu d'una excessiva força iònica tant en el creixement del microorganisme com per la producció de la proteïna heteròloga (Ramón et al., 2004).

Per tal d'evitar-ho, es van addicionar inicialment la tercera part de la quantitat estequiomètricament calculada i una vegada acabada la fase discontinua del cultiu s'anava addicionant periòdicament (cada tres hores i mitja) 25 ml d'una

solució 3 M sulfat d'amoni. L'objectiu d'aquesta estratègia era addicionar la font de nitrogen a mesura que s'anava necessitant, evitant concentrar grans quantitats de sals des d'un bon principi, però fins arribar a la mateixa concentració final.

En portar a terme aquest cultiu en semicontinu amb una soca Mut⁺ "singlecopy", segons la metodologia ja comentada en l'apartat 4.1 amb aquestes petites variacions en el medi, es va detectar una lleugera baixada (al voltant del 10%) en la velocitat de creixement en comparació amb la utilització del medi MFBD_1. La producció en aquesta fermentació va ser molt pobre, no arribant al 15 % de la concentració de proteïna final de la fermentació de referència (FMS_01). Aquest problema està descrit a la bibliografia (Wood and Komives, 1999) observant també que el creixement del llevat metilotròfic *Pichia pastoris* en un medi amb elevada força iònica es menor i afecta directament a la producció.

Es va continuar la investigació en aquesta línia canviant el sulfat d'amoni pel clorur d'amoni. Ara però, estequiomètricament es necessitava 23.3 g·l⁻¹ de clorur d'amoni per satisfer les necessitats de font de carboni fins una concentració final de biomassa de 60 g·l⁻¹. Tot i rebaixar substancialment la força iònica del medi, els valors encara eren força superiors als del medi inicial i encara afectava el creixement.

L'altra alternativa per evitar les interferències de l'amoni al sensor de metanol era introduir la base directament a la fase líquida, evitant el seu pas per la fase gasosa. La simple mesura d'introduir el punxó d'addició d'aquest component per la part inferior del bioreactor, en contacte directe amb el medi, elimina per complert les pertorbacions al senyal de l'equip de mesura MC-168. Per tant, aquesta opció es presenta com l'alternativa més senzilla i factible per solucionar els problemes d'interferències i es la que ha estat utilitzada com a part final del treball.

Els resultats finals de les modificacions en el muntatge han estat positius, demostrant que la utilització d'aquest aparell aporta nombroses avantatges davant altres sistemes directes de mesura de metanol. A partir d'aquest punt ja es poden desenvolupar algorismes de control basats en aquesta mesura amb l'objectiu de mantenir la concentració de metanol estable dins el reactor. Aquesta tasca però, s'explica detalladament en apartats posteriors.

L'experiència adquirida amb la utilització de l'equip i el muntatge desenvolupat per obtenir una mesura més estable han facilitat una bona coneixença del sistema. D'aquesta informació se n'han deduït una sèrie de precaucions a l'hora d'utilitzar aquest aparell, que poden ser de molta ajuda a l'hora d'instal·lar un equip com aquest (Ramón et al., 2004).

- ▶ No utilitzar un dessecador en el tram entre el fermentador i l'equip MC-168, ja que el metanol també s'adsorbeix sobre el sòlid adsorbent d'humitat.
- ▶ El condensador de sortida del bioreactor ha de funcionar sempre sota les mateixes condicions, ja que variacions del cabal de refrigeració poden augmentar o disminuir la quantitat de metanol a la fase gas, falsejant la mesura final d'aquest substrat.
- ▶ S'han d'evitar variacions sobtades de cabal d'entrada d'aire al fermentador (amb la intenció de controlar l'oxigen dissolt) perquè s'altera l'equilibri de la concentració de metanol entre la fase gas i líquida. Cal recordar que el principi de funcionament d'aquesta tècnica rau en mantenir en estat estacionari l'equilibri d'aquest component entre les dues fases.

- ▶ Es desaconsella la variació de la velocitat d'agitació per les alteracions que pot comportar sobre l'equilibri entre fase líquida i gas. L'augment o disminució de la velocitat de gir de les pales canvia la mida de la bombolla, amb ella la superfície de transferència entre fases i conseqüentment, es modifica l'equilibri de la concentració de metanol.
- ▶ Evitar qualsevol canvi en la temperatura, pH o també de tipus mecànic que pugi alterar l'equilibri del metanol entre les dues fases. En cas que el canvi estigui justificat, cal tornar a calibrar el sistema utilitzant les noves condicions de treball.
- ▶ El sensor va perdent sensibilitat de forma progressiva a mesura que es va utilitzant. Aquesta pèrdua és inapreciable durant un cultiu, però sí que pot ser important després de 2 o 3 cultius. Així doncs, cal calibrar-lo de nou, com a mínim, transcorregut un període de funcionament d'aproximadament 200 hores.

4.2.3. SISTEMA AUTOMÀTIC D'EXTRACCIÓ DE MOSTRES

Tant en els cultius discontinus com semicontinus la variació de les diferents paràmetres i/o variables d'interès és constant. Atès que moltes de les variables és impossible o suposa un esforç econòmic massa important fer un seguiment en línia de cadascuna d'elles, cal anar extraient mostres periòdicament per fer-ne un seguiment extern.

En funció de la rapidesa amb què variïn les condicions (creixement del microorganisme, consum del substrat o aparició de subproductes) s'hauran de tenir mostres representatives en més o menys freqüència, tot i que també depèn de la variable que es vulgui seguir externament. En el cas de *Pichia pastoris*, la velocitat amb què varien els paràmetres pot ser molt diferent segons el fenotip de la soca utilitzada (Mut⁺ o Mut^s). En qualsevol d'aquests casos, disposar d'un sistema automàtic d'extracció de mostres capaç de funcionar de forma autònoma pot servir de gran ajuda per realitzar un seguiment a diferents moments de la fermentació, alleujant la càrrega que comporta treure mostres manualment.

En primer lloc, es va realitzar una recerca per veure si comercialment existia algun equip amb aquestes característiques. Moltes de les aplicacions per extreure mostres automàticament no estan dissenyades per treballar en condicions estèrils, almenys assegurar l'esterilitat a dins el reactor.

Només es va identificar una empresa, LOKAS AUTOMATION Corporation (Japó), que fabrica un equip (Biomate 2000 A) d'aquestes característiques, especialment pensat per processos biològics. Aquest permet realitzar l'extracció automàtica de mostres directes del fermentador mantenint l'esterilitat a l'interior i posteriorment mantenint-les a 4°C, per conservar les seves principals característiques. L'elevat cost econòmic de l'equip va fer inviable la seva adquisició per part del grup d'investigació i es va optar per realitzar un muntatge inspirat amb la mateixa idea.

En primer lloc es van definir les principals característiques que havia de complir el nou equip:

- ▶ Les mostres havien de ser representatives de l'interior del fermentador.
- ▶ S'havia de garantir l'esterilitat del procés durant l'extracció per evitar contaminar el cultiu.
- ▶ S'havia de minimitzar el volum mort de mostra.

- ▶ L'equipament havia de ser independent de les condicions de cultiu (capaç d'extreure mostra a altes densitats cel·lulars, en un rang de cabal d'aire d'entrada entre 0 i 20 l·min⁻¹, etc..).
- ▶ Muntatge pràctic i fàcil de utilitzar, muntar i desmuntar.
- ▶ Autonomia com a mínim de 12–15 h sense atenció per part de l'usuari.
- ▶ Mantenir les mostres extretes a 4°C.
- ▶ Sistemes de seguretat en cas de mal funcionament (ex. evitar que el reactor es buidés en cas d'accident).
- ▶ El preu de l'equipament havia de ser suficientment raonable.

Atès que molt de l'equipament necessari era material comú de laboratori que es podia reutilitzar, la despesa final es va reduir notablement, sobre un ordre de magnitud inferior a l'equip comercial (7500 €).

Per automatitzar tot el procés es va escollir un mòdul lògic programable ZEN (OMRON) on s'ha programat la seqüència d'obertura i tancament de vàlvules, l'accionament de la bomba que fa possible l'extracció de la mostra i el gir del col·lector de mostres. Aquest dispositiu electrònic, més barat que un PLC, es capaç d'obrir i tancar circuits amb l'ordre temporal especificat per l'usuari.

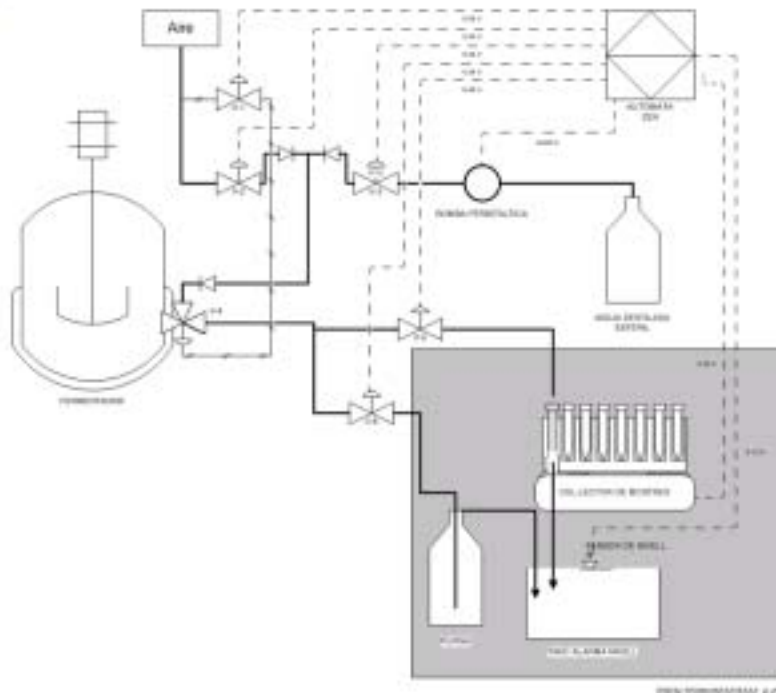


Figura 4.40. Esquema del muntatge utilitzat per a l'extracció automàtica de mostres.

A la figura 4.40 es mostra tot el muntatge i les seves connexions amb l'autòmat ZEN. Les línies discontinues són de tipus elèctric i les contínues amb dues ratlles que la seccionen de tipus pneumàtic. Amb una línia contínua més gruixuda que la resta, s'indiquen els tubs per on passen l'aire, la mostra i el líquid de neteja.

Les vàlvules emprades en el muntatge estan destinades cadascuna d'elles a una funció determinada com s'apunta a la taula 4.8.

Nom	Tipus	Descripció
V-1	electrovàlvula	Activació/Desactivació obertura de Vàlvula V-4
V-2	electrovàlvula	Entrada d'aire al circuit
V-3	electrovàlvula	Entrada de líquid estèril al circuit
V-4	pneumàtica	Sortida de mostra del fermentador
V-5	electrovàlvula	Entrada al col·lector de mostres
V-6	electrovàlvula	Purga

Taula 4.8. Nom, tipus i descripció de les diferents vàlvules utilitzades en el muntatge.

A la taula 4.9 es descriu detalladament la seqüència temporal seguida per l'extracció de mostra programada al autòmat ZEN. Per cada franja de temps es poden activar alhora diferents elements del muntatge i no canvien la seva posició fins que l'autòmat de nou modifica el seu circuit d'alimentació. Al principi tot resta desactivat (posició OFF), és a dir, vàlvules tancades i bombes parades, pels tubs no hi passa ni aire ni cap líquid.

Les electrovàlvules són de pinçament, pel que no entren en contacte amb el líquid. Totes les conduccions utilitzades en el circuit es poden autoclavar per separat. Només la vàlvula pneumàtica del fermentador entra en contacte amb el líquid i s'esterilitza químicament amb el pas d'una solució etanol-aigua al 70 %.

La contaminació a l'interior del fermentador es complicada ja que el recipient està a pressió i en obrir la vàlvula la tendència del líquid es a sortir cap a l'exterior.

El volum de mostra que es vol extreure ha de ser igual al tram de tub que va des de la vàlvula de mostreig fins a la bifurcació entre les vàlvules V-5 i V-6. La velocitat en que surt el líquid del fermentador depèn directament de la pressió interior del recipient.

Per aconseguir un sistema robust, havia de ser independent de les condicions del fermentador i més concretament de la velocitat en que sortia el líquid. Això es va aconseguir fent que, durant l'obertura de la vàlvula de mostreig, el líquid es dirigís cap a la purga. El que sí s'havia d'acomplir es que el tram de tub entre la vàlvula de mostreig (V-4) i la bifurcació entre les vàlvules V-5 i V-6 havia d'estar plena de mostra. Aquesta distància de tub és la que marca el volum desitjat que es vol guardar en un tub a 4 °C.

Es va comprovar la fiabilitat del sistema observant la densitat òptica d'una mostra extreta amb el sistema i una mostra directa del fermentador. El resultat va ser totalment comparable. Més contretament, la desviació estàndard residual (RSD) entre mostres era en tots el casos menor al 6 %.

L'únic que s'ha de tenir en compte en sistemes com aquest és netejar automàticament tot el circuit cada vegada que es treu mostra i passar durant llargues estones aire per arrossegar el possible líquid que hagi pogut quedar a les parets, per evitar una posterior contaminació de la mostra amb una mostra anterior.

El període màxim d'extracció és inferior als 15 minuts, prou ràpid per a la majoria de processos biològics d'aquest tipus. En aquest treball s'ha utilitzat amb un període de dues hores, sent totalment suficient per veure l'evolució de les principals variables que es segueixen.

Temps total (min:s:ms)	Temps Parcial	Element	Posició	Descripció
00:00:00	0	Bomba peristàltica	ON	Introducció d'aigua estèril per la conducció fins a la botella de purga.
		Vàlvula V-3	Oberta	
		Vàlvula V-6	Oberta	
00:15:000	15 s	Bomba peristàltica	OFF	Es para l'entrada d'aigua i s'introdueix aire de línia a pressió per arrossegar el líquid.
		Vàlvula V-3	Tancada	
		Vàlvula V-2	Oberta	
02:15:000	2 minuts	Vàlvula V-2	Tancada	Es para l'entrada d'aire i s'obre la vàlvula del fermentador per extreure la mostra.
		Vàlvula V-4	Oberta	
02:16:500	1s 500 ms	Vàlvula V-4	Tancada	Es tanca la vàlvula de mostreig i s'impulsa amb aire la mostra cap al col·lector de mostres.
		Vàlvula V-6	Tancada	
		Vàlvula V-5	Oberta	
		Vàlvula V-2	Oberta	
02:21:500	5 s	Bomba peristàltica	ON	S'introdueix aigua i es gira el col·lector omplint un nou tub amb el líquid de neteja.
		Vàlvula V-3	Oberta	
		Vàlvula V-2	Tancada	
		Col·lector mostres	Gir (nou tub)	
02:23:000	1 s 500 ms	Bomba peristàltica	OFF	S'atura l'entrada d'aire i s'introdueix aire al circuit.
		Vàlvula V-3	Tancada	
		Vàlvula V-2	Oberta	
02:28:000	5 s	Vàlvula V-5	Tancada	S'obre el circuit cap a la purga i es neteja amb aigua estèril.
		Vàlvula V-6	Oberta	
		Vàlvula V-2	Tancada	
		Bomba peristàltica	ON	
		Vàlvula V-3	Oberta	
07:28:000	5 minuts	Bomba peristàltica	OFF	S'arrossega tot el líquid amb aire.
		Vàlvula V-3	Tancada	
		Vàlvula V-2	Oberta	
12:28:000	5 minuts	Vàlvula V-2	Tancada	Es para l'aire i es deixa un nou tub preparat per la nova mostra.
		Col·lector mostres	Gir (nou tub)	

Taula 4.9. Seqüència temporal d'esdeveniments portats a terme automàticament per a l'extracció de mostres.

Tot aquest dispositiu treballa independentment de la resta de l'equipament del fermentador, facilitant així que la seva connexió i desconnexió no alteri el funcionament global del procés.

4.2.4. PROGRAMARI DE MONITORITZACIÓ I CONTROL

Introducció

Un dels grans esforços realitzats en aquest treball ha estat el disseny i escriptura d'un programari específic per a la monitorització i control del bioprocés. La principal funció d'aquest és enregistrar el seguiment temporal de les diferents variables del procés, així com a partir d'aquestes controlar el procés segons les directrius marcades per l'usuari.

Es va decidir, des d'un bon principi, realitzar l'adquisició de dades de les diferents variables mitjançant l'ordinador, aprofitant la potència que oferia en rapidesa i versatilitat. Tots els equips amb els quals s'havia de connectar ja disposaven d'una sortida digital, simplificant així l'esforç a realitzar ja que no calia emprar cap tipus de convertidor analògic/digital.

Una segona decisió important era escollir quin tipus de plataforma es feia servir per realitzar el programari que gestionés la fermentació. En primer lloc, calia escollir entre la utilització d'un programari comercial o pel contrari escriure el programa des del seu inici amb un llenguatge de programació determinat.

Fent un anàlisi de les diferents possibilitats que oferia el mercat es va veure que la millor opció pel que fa a plataformes comercials, que estalviessin gran part de l'esforç de programació, era LabView[®] (National Instruments corporation, Austin,USA). El principal avantatge d'aquest programa era la facilitat amb què es podia configurar un entorn gràfic per monitoritzar la fermentació. No obstant això, tot i la flexibilitat que oferia aquest programari es va creure que en algun moment no es podria fer el que es desitjés per la manca d'eines subministrades pel paquet comercial. Per exemple, el control sobre la comunicació amb els ports de l'ordinador, que per alguns dels equips no és estàndard.

Així doncs, es va optar per realitzar el programa des de l'inici emprant un llenguatge de programació que permetés més llibertat a l'hora de realitzar les tasques més o menys complexes, tot i ser l'opció més laboriosa. Prèviament es tenia experiència amb el llenguatge C per programar sobre MS-DOS (Microsoft, USA), però es va creure necessari utilitzar-ne un capaç de fer-ho en entorn gràfic, més modern i fàcil d'utilitzar per l'usuari final.

Un cop es tenia clar quin era el perfil de programari que es desitjava calia escollir el llenguatge amb el que s'havia de fer. L'experiència prèvia que es tenia amb el llenguatge C, orientava la solució per utilitzar la programació en entorn gràfic del mateix llenguatge, el Visual C+. Però, durant el primer contacte amb aquest es va veure que tot i tenir alguna similitud amb el seu antecessor (llenguatge C), l'esforç d'aprenentatge que s'havia de realitzar era el mateix que començar de nou amb qualsevol d'altre de característiques similars.

En aquest moment, es van avaluar les principals característiques de les diferents opcions de llenguatges de programació. Ràpidament va sorgir amb força la possibilitat de realitzar el programari en Visual Basic[®], que combinava potència, flexibilitat i senzillesa de programació. Altres llenguatges com el Visual C+ permetien un millor control del flux del programa però, en conseqüència, un elevat augment en la complicació de la programació.

Finalment, i basant la decisió en gran part per reduir al màxim el període d'aprenentatge necessari per realitzar una aplicació de les característiques que es necessitava es va optar per utilitzar el Visual Basic[®]. Més concretament es va

utilitzar l'entorn de Microsoft Visual Basic 6.0[®] amb el qual es podien crear programes en entorn Windows[®] de 16 o 32 bits sense la necessitat de conèixer el funcionament de baix nivell d'interacció entre l'aplicació i el sistema operatiu.

Esquema general

La primera tasca a realitzar va ser dissenyar físicament l'esquema de muntatge. Atès el nombre d'equips perifèrics amb què s'havia d'establir comunicació, es va decidir separar físicament les tasques a realitzar en dos ordinadors. Un primer, que es va anomenar PC1, dedicat exclusivament a la comunicació amb tots els equips (Figura 4.41), amb l'única funció de recopilar totes les dades i posteriorment enviar-les, via TCP/IP, a un segon ordinador, de nom PC2, on s'havia de realitzar la resta de tasques de monitorització i control. Per tant, per cadascun dels ordinadors es va de dissenyar un programari específic per les funcions per les que s'havia destinat.

Les especificacions tècniques del material informàtic necessari per portar a terme aquesta tasca estan detallades al apartat 3.1.

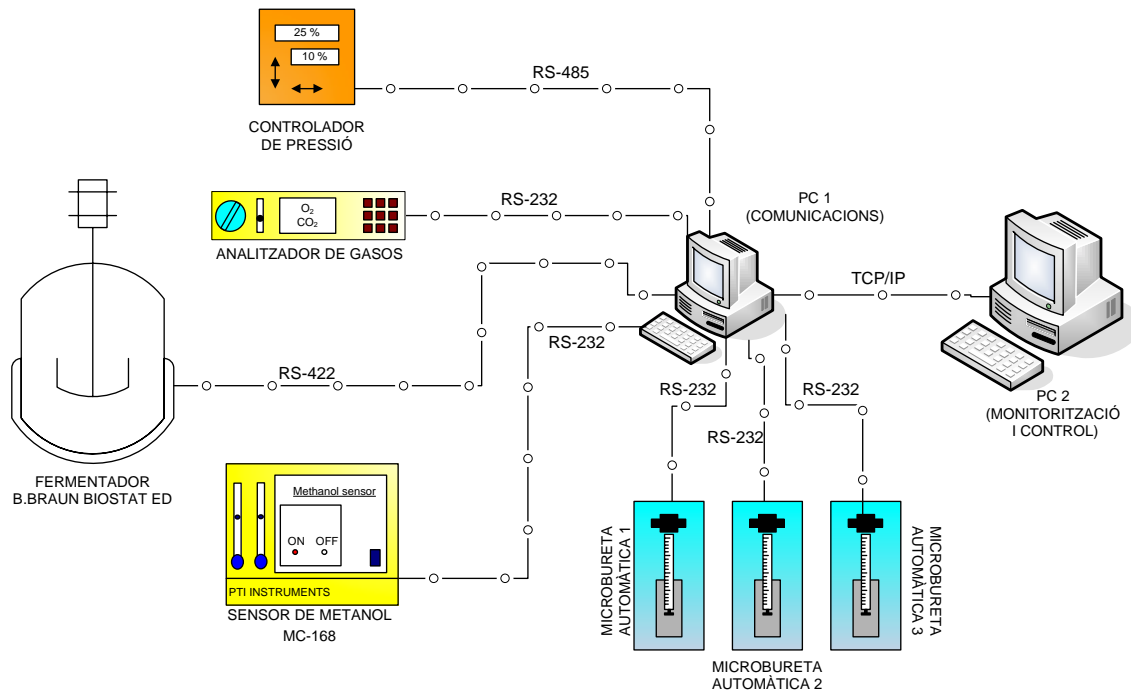


Figura 4.41. Esquema de les connexions entre els ordinadors i la resta d'equipament per portar a terme la monitorització i control del bioprocés.

Si es mostra aquest esquema segons la posició jeràrquica que ocupa cadascun dels elements (Figura 4.42), es pot apreciar quines són les funcions de cadascun dels programaris.

El programari de monitorització i control situat a la part superior de l'estructura jeràrquica, reuneix tota la informació provinent tant de l'adquisició en línia com de l'anàlisi externa de les variables no monitoritzades. Les fletxes de connexió entre els diferents blocs indiquen la direcció de transferència.

A partir del processament d'aquestes dades, i segons les directrius marcades per l'usuari, s'actua sobre les consignes d'algunes de les variables i sobre el cabal d'alimentació de substrats.

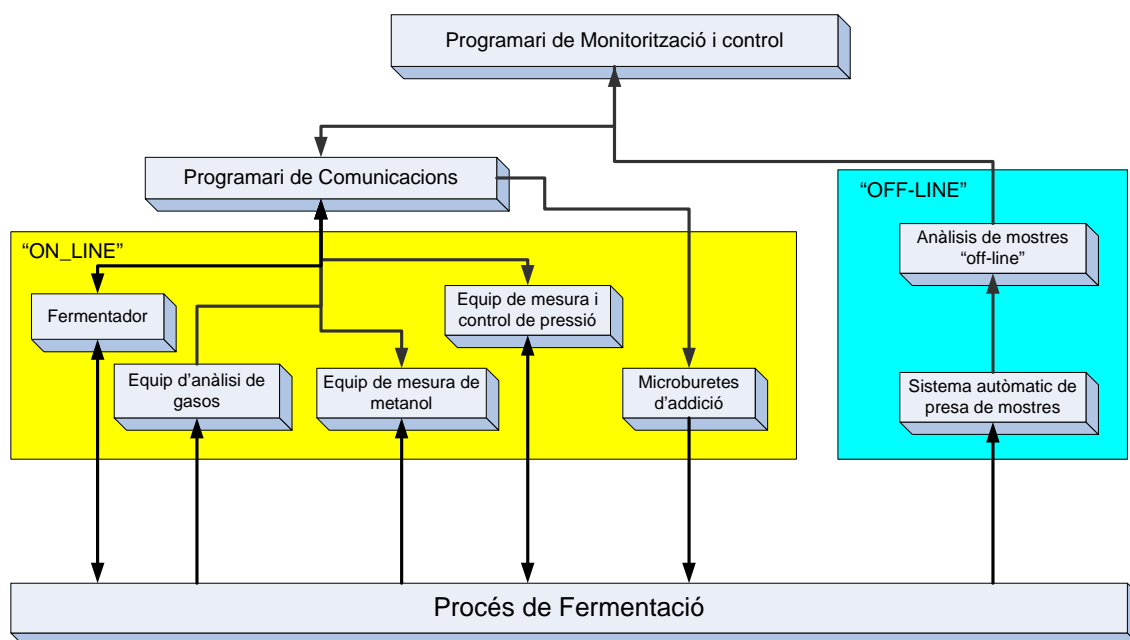


Figura 4.42. Esquema jeràrquic del programari de monitorització i control.

Criteris de programació

La programació de sistemes d'aquest tipus no és senzilla, per tant és important des d'un bon inici seguir les mateixes pautes i metodologia de programació. En aquest cas, s'han seguit les següents directrius amb la intenció d'obtenir un programari alhora robust, versàtil i eficaç.

- ▶ **Menor consum de temps.** Tot i que avui en dia no sol haver-hi limitacions de maquinari ("hardware"), el procés de comunicació i posterior comprovació amb alguns equips consumeix força temps. Cal optimitzar el codi per tal de que les subrutines que realitzin la funció per la qual estan destinades, ho facin en el menor temps possible.
- ▶ **Identificació dels errors.** Ha de ser capaç d'identificar els possibles errors i indicar-ho a l'usuari en forma d'alarma perquè es solucioni el més ràpid possible i en el cas que sigui possible, no aturar el flux normal del programa. El sistema ha d'estar protegit per la possibilitat de captura de dades errònies. Per tant, cal validar les dades d'entrada i sortida per comprovar si estan dins el rang del senyal desitjat.
- ▶ **Restauració automàtica.** El sistema ha de ser capaç de posar-se en marxa automàticament davant d'una possible errada (tall de corrent, etc..) i continuar, sense canvis respecte les tasques que s'estaven realitzant anteriorment. Cal doncs, la creació d'un fitxer amb tota la configuració i que s'actualitzi constantment.
- ▶ **Comprovació.** S'ha de testejar el sistema sota diferents situacions i veure si la seva resposta és favorable. Sobretot comprovar que la freqüència amb què es realitzen els processos és la desitjada pel

programador i que en cap moment es produeixen endarreriments importants.

- ▶ **Programació modular.** S'ha de programar de forma modular i clara, incloent nombrosos comentaris en el codi per facilitar la tasca al programador. Els diferents mòduls han de realitzar tasques molt específiques i senzilles. La repetició de codi és totalment desaconsellable i només s'ha de permetre en casos puntuals.
- ▶ **Estructuració.** Cal ordenar de forma jeràrquica els diferents mòduls, facilitant així la introducció de codi nou i que el programari sigui el més flexible possible.

Comunicacions

Uns dels apartats importants a conèixer abans de començar la tasca de programació són els protocols per establir la comunicació entre els diferents equips. No s'està parlant del tipus de connexió física entre ells, explicada a l'apartat 1.6, sinó quina és i com cal interpretar la informació enviada/rebuda. Es tracta doncs, de com interpretar les cadenes de números o text transmeses entre els equips.

Normalment, les empreses dissenyen un protocol específic per cada aparell i algunes vegades empren parcialment protocols estàndard. En ambdós casos acostumen a incloure tota aquesta informació en el manual d'instruccions de l'equip.

A continuació es detalla el protocol usat en la connexió entre l'ordinador i cadascun dels equips emprats en el sistema.

Comunicació PC1 – Equip de mesura de metanol (MC-168).

La comunicació es fa mitjançant el port sèrie de l'ordinador utilitzant la connexió de tipus RS-232 i de manera bidireccional, on l'equip de mesura resta a l'escolta per respondre les peticions que s'envien des del PC. Només cal enviar un "0" pel port sèrie i la resposta de l'equipament és una cadena de text on s'indica el valor en voltatge del sensor de mesura. Així doncs, el pas del valor de voltatge a concentració de metanol ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) cal fer-la posteriorment l'ordinador.

Comunicació PC1- equip de pressió.

La comunicació és de tipus bidireccional via RS-485 utilitzant l'estructura del protocol de comunicació estàndard Modbus a través d'un dels ports configurables de la tarjeta PCL-746 (Veure apartat 3.1).

Tota la comunicació es realitza en notació hexadecimal, seguint de forma ordenada la següent estructura:

Direcció, funció, paràmetre_a, paràmetre_b, paràmetre_control

Direcció – Atès que aquest tipus de connexió (RS-485) permet la col·locació de diferents equips en sèrie utilitzant la mateixa línia, cal que el primer valor de la cadena que s'envia indiqui a quin equip va dirigit. En aquest cas només hi ha el controlador de pressió, per tant, com a primer valor sempre s'enviarà un "1" (en hexadecimal).

Funció – Aquest valor serveix per indicar la funció a realitzar, per exemple, si es volen llegir les dades o canviar alguna consigna. En aquest cas només s'utilitzen la funció amb valor 3, per a la petició de dades i la de valor 6, per fer el canvi d'alguna variable. En tots dos casos s'envien les peticions des del PC cap a l'equip, aquest realitza l'acció i finalment respon.

Paràmetre_a i paràmetre_b – El significat que tenen aquests valors depèn directament de la funció seleccionada. Per exemple, si es fa una petició de dades des de l'ordinador s'ha d'enviar la següent informació:

1 3 0 50

On s'indica primer la direcció de l'equip ("1"), seguit del valor de la funció de petició de dades ("3"), i en aquest cas el paràmetre_a i b indiquen que es desitja rebre les primeres 50 variables.

Cadascuna de les variables, consignes o paràmetres de configuració de l'equip té assignat un número que el diferencia respecte la resta. En aquest treball només s'han emprat els següents:

Número	Variable
9	pressió
10	Kp
11	Ti
12	Td

Taula 4.10. Assignació numèrica de les variables de l'equip de pressió segons el protocol de comunicació.

Així doncs, en el cas que es volgués canviar el valor de la Kp per 25, la instrucció que caldria enviar en hexadecimal seria: 1 6 10 25

Paràmetre_control - Com és comú en molts protocols de transmissió de dades, s'afegeixen alguns valors o caràcters més al missatge que serveixen per comprovar que les dades enviades han estat rebudes correctament. Aquests valors són normalment funció del valor numèric del missatge, i tant l'equip com el PC en rebre la informació han de comprovar que aquest valor és correcte abans de processar la informació. Aquest mecanisme evita possibles pèrdues i errors en el missatge.

En el cas que ens ocupa, el protocol modbus utilitza un vector predefinit de valors hexadecimal amb tantes posicions com possibles valors pot tenir cadascun dels paràmetres. Cadascun dels valors hexadecimal del missatge indiquen una posició d'aquest vector. Els valors numèrics assignats a aquestes posicions del vector són sumats, conformant així el valor final del paràmetre de control.

Comunicació PC1-equip de gasos.

Per a la transmissió de dades entre el PC i aquest equipament s'utilitza un dels ports sèrie configurables de la targeta PCL-746 amb connexió de tipus RS-232. La comunicació és unidireccional, sent l'equipament que envia automàticament cada dos segons (freqüència configurable des de l'equip) una cadena de text amb la data, hora actual juntament amb les concentracions d'O₂ i CO₂ en percentatge. En aquest cas no s'inclou cap valor de comprovació al final, només a l'inici hi ha uns caràcters "#MS" que indiquen l'inici de la cadena.

La cadena de text és doncs del tipus:

"#MS 01.09.04 12:30:19 21.146 0.042"

Tot aquest missatge és tractat posteriorment, i es fragmenta en els diferents trossos, convertint el text en valors numèrics.

Comunicació PC1- fermentador.

Comunicació bidireccional de tipus RS-422 entre la DCU (Digital Control Unit) del B. Braun Biostat ED amb el port de la targeta Opto 22 AC24AT (Temecula, USA). A part de rebre tota la informació dels valors de les variables mesurades pel fermentador, es poden modificar paràmetres de control i consignes de les variables més importants. El protocol de comunicació és específic per tots els equips de la marca comercial B.Braun.

Comunicació PC1-microburetes.

L'enviament de dades entre les microburetes és força senzill. Emprant un port sèrie per aparell, en tots el casos es tracta d'una connexió tipus RS-232. La comunicació és unidireccional del PC cap a l'equip, on s'envia una cadena de text l'equip que conté la informació necessària per a l'actuació. La comanda enviada consta de quatre parts, havent-hi una primera on s'indica el número d'equip dins la mateixa línia de comunicació. Si es tracta de l'únic equip dins la mateixa línia de transmissió de dades, només cal enviar un "00".

En segon lloc, la posició de la vàlvula de 3 vies situada a la part superior de la xeringa. Aquesta comunica la xeringa amb els dos canals, el d'entrada (per carregar la xeringa de substrat) i el de sortida (connectat amb el fermentador). Enviant una "I" es connecta amb el corrent d'entrada i amb una "O" amb el de sortida.

I finalment s'indica la direcció de l'èmbol (si expulsa o aspira líquid) seguit del nombre de passos a realitzar en aquesta direcció. Enviant una "D" s'impulsa cap a l'exterior i amb una "P" s'aspira, carregant així la microbureta de substrat. El nombre de passos del motor indica el desplaçament i és independent de la xeringa que se li pot col·locar (0.5,1,2.5,5,10 ml). Per tant, és necessari calcular prèviament, segons el volum a addicionar i el volum de xeringa, quants passos s'ha de moure el motor. El recorregut d'aquest motor pas a pas és de 2500 passos, i per evitar problemes de precisió s'aconsella no realitzar moviments de menys del 5 % d'aquest valor. El nombre de passos es calcularà segons la formula:

$$n^{\circ} \text{ passos} = \frac{\text{Volum a addicionar}}{\text{Volum de la xeringa}} \cdot 2500 \quad \text{eq. 4.2}$$

Per exemple, si es vol dispensar cap al reactor 500 ml amb una xeringa de 1000 ml, cal enviar la comanda "N00OD1250". L'ordre de les comandes dins la cadena final de text és important.

Comunicació entre PC1 i PC2.

La comunicació entre els ordinadors es realitza via TCP/IP. La utilització d'aquesta comunicació per Ethernet permet que l'ordinador de control pot estar físicament localitzat a qualsevol altre punt on es disposi d'aquest tipus de connexió. Només cal una connexió a internet (de banda ample) per aconseguir controlar i monitoritzar el procés. S'utilitza el port 1001 per establir l'enllaç entre els dos

programaris, i el PC1 sempre està a l'escolta per contestar el missatge rebut del PC2.

Per l'intercanvi d'informació entre els ordinadors s'ha creat un protocol específic que permet un control en el flux de dades àgil i segur. Aquest està inspirat en la transferència de dades entre la DCU del fermentador amb un ordinador. Es basa senzillament en una cadena de text formada per una seqüència numèrica ordenada seguint la següent construcció:

opció:valor: opció:valor: opció:valor:@checksum\$

El valor de l'opció pot descriure la tasca a realitzar o indicar quina és la variable. El valor que segueix l'opció indica en el cas que sigui una tasca l'activació (1) o la desactivació(0) d'aquesta, i en el cas d'una variable, conté el seu valor.

Així doncs, s'ha assignat un número específic per a cada tasca i variable, com es mostra a la taula 4.11.

En darrer terme s'inclou el "checksum", que és un valor numèric de comprovació per garantir que el missatge arriba al seu destí correctament i sencer. Aquest s'inclou al final de la seqüència i es calcula com la suma del valor decimal de cadascun dels caràcters utilitzats en codi ASCII.

Aquest estàndard codifica l'equivalència en bits de tots els números, lletres i símbols especials, ja que és l'única forma en que es poden processar per un ordinador. En una estructura de 8 bits (byte) és possible representar 256 combinacions diferents on s'hi ha assignat un caràcter a cadascun d'ells. Per exemple la lletra "A", es representa en forma binària com "01000001", i la "Z" equival a "01011010", on els seus equivalents en notació decimal són 49 i 90, respectivament.

Així doncs, per calcular el valor de comprovació ("checksum") d'una seqüència senzilla com "1:1:" on el PC2 fa una petició de dades al PC1, s'ha de sumar l'equivalència de cadascun d'aquests valors en ASCII ("1"=49 i ":"=58). Per tant, seria $49 + 58 + 49 + 58 = 214$, i construint la cadena de text a enviar "1:1:@214\$". El "checksum" és inclòs a la cadena de text just abans d'enviar-la i és el primer que es comprova al rebre-ho per part de l'altre ordinador. En el cas que el valor enviat del "checksum" no coincideixi amb el valor calculat a l'arribada, no es processa la cadena de text i s'envia un missatge d'error.

A la taula 4.11 es descriuen les diferents opcions i el rang de valors dins el qual poden oscil·lar. Les opcions numerades de l'1 al 5 són instruccions a realitzar i la dada que els acompanya sempre és el valor de la unitat.

Numero opció	Descripció	Tipus de dada	Rang	Unitats
1	Petició dades al PC1	Lògica	1	-
2	Petició consignes i valors control al PC1	Lògica	1	-
3	Borra base dades de PC1	Lògica	1	-
4	Inicialitza hora fermentació al PC1	Lògica	1	-
5	Error en el missatge enviat	Lògica	1	-
30	Activació control Temperatura	Lògica	0-1	-
31	Consigna Temperatura	Real	20-150	°C
32	Activació control agitació	Lògica	0-1	-
33	Consigna Agitació	Real	0-1500	rpm
34	Activació control Oxigen dissolt	Lògica	0-1	-

35	Consigna Oxigen dissolt	Real	0-100	%
36	Banda morta Oxigen dissolt	Real	0-100	%
37	Kp Oxigen Dissolt	Real	0-1000	-
38	Ti Oxigen Dissolt	Real	0-200	-
39	Td Oxigen dissolt	Real	0-200	-
40	Activació control pH	Lògica	0-1	-
41	Consigna pH	Real	2-10	-
42	Banda morta pH	Real	0-100	%
43	Kp pH	Real	0-1000	-
44	Ti pH	Real	0-200	-
45	Td pH	Real	0-200	-
46	Activació control Cabal d'aire	Lògica	0-1	-
47	Consigna Cabal d'aire	Real	0-20	l·min ⁻¹
48	Cabal d'aire mínim	Real	0-20	l·min ⁻¹
49	Cabal d'aire màxim	Real	0-20	l·min ⁻¹
50	Activació control Pressió	Lògica	0-1	-
51	Consigna Pressió	Real	0-100	%
52	Kp Pressió	Real	0-100	-
53	Ti Pressió	Real	0-200	-
54	Td Pressió	Real	0-200	-
55	Activació Microbureta de Metanol	Lògica	0-1	-
56	Freqüència Addició Metanol	Real	30-300	s
57	Cabal Addició Metanol	Real	0-1000	µl·min ⁻¹
58	Activació Microbureta de Glicerol	Lògica	0-1	-
59	Freqüència Addició Glicerol	Real	30-300	s
60	Cabal Addició Glicerol	Real	0-1000	µl·min ⁻¹

Taula 4.11. Protocol d'intercanvi d'informació entre PC1 i PC2 via TCP/IP.

Davant la possibilitat de rebre dades en el format correcte però il·lògiques pel que fa al procés, per exemple una temperatura negativa o una velocitat d'agitació superior als 1500 rpm, s'ha establert un rang dins el qual la variable té un valor coherent. Valors fora dels límits marcats són ignorats i s'envia un missatge d'error (opció 5) a l'ordinador que ha enviat la cadena de comandes errònia.

També han estat contemplades situacions on s'ha de fixar un valor màxim i mínim d'alguna variable (Ex. El cabal d'aire) que tot i posar valor dins el rang, es possible cometre l'error de fixar el valor del mínim superior al del màxim. El programa abans d'enviar les dades a l'equip corresponent revisa totes aquestes possibilitats, avisant del possible error sense parar el flux normal del programa.

Tot i utilitzar un llenguatge de programació que permet la programació en multitasca (que es realitzin diverses tasques al mateix temps) el cos principal del programari de comunicacions (PC1) es va realitzar de forma seqüencial. D'aquesta forma es pot mantenir un major control sobre el flux del programa, minimitzant el risc d'errors.

Programari de Monitorització i control (PC2)

Característiques generals

Aquest programari s'ha desenvolupat íntegrament en Visual Basic i ocupa, jeràrquicament, l'esglaió més alt de l'arquitectura del sistema. S'encarrega de recopilar, gestionar i controlar tots els paràmetres i processos de la fermentació.

Les principals tasques d'aquest programari són:

- ▶ Monitorització de les variables en línia i seguiment de les variables "off-line" del procés.
- ▶ Gravació de tota la informació relativa a la fermentació en una base de dades.
- ▶ Centralització dels controls sobre el procés.
- ▶ Control sobre la variable clau del sistema, la concentració de metanol.
- ▶ Càlcul en línia d'algunes variables d'interès.
- ▶ Estimació de variables segons un model de mesura.

Un dels primers passos a realitzar en escriure el programari va ser definir en detall totes les variables a tractar segons l'esquema proposat. A la taula 4.12, es presenta una relació de totes les variables de les quals es fa un seguiment continu, les unitats de treball i el rang de mesura. Algunes d'elles però, no són mesurades directament ja que són deduïdes a partir del càlcul o combinació d'altres, com poden ser la CER, OUR o RQ. D'altra banda, algunes altres variables són estimades a partir de models que relacionen la seva evolució amb la d'una altra variable. Aquest és el cas de la biomassa, velocitat específica de creixement o concentració de glicerol i metanol estimada.

A partir de la mesura en les mostres extretes, s'obté puntualment el valor d'una sèrie de variables que s'utilitzen per confirmar el valor mesurat en línia (en el cas del metanol) o per rectificar la tendència del model de mesura que les estima (biomassa, glicerol). Aquestes variables són:

- ▶ Biomassa
- ▶ Concentració de metanol
- ▶ Concentració de Glicerol
- ▶ Activitat lipolítica

El seguiment d'aquestes variables mesurades externament també es realitza en el programari. Com es veurà posteriorment tota aquesta informació es recopila en un mateix entorn per poder visualitzar i detectar de forma ràpida i clara canvis o problemes durant el cultiu.

Conegudes les variables de treball, s'ha definit també quines d'aquestes han de mantenir-se constants segons la consigna marcada per l'usuari. A la taula 4.13 es detallen els controls i les seves principals característiques. El tipus de control es refereix a l'algorisme matemàtic emprat pel controlador amb l'objectiu de mantenir el valor d'operació el més proper a la consigna possible.

L'apartat de gestió del control es refereix a l'aparell que físicament realitza aquest control. Pel que fa al sensor es descriu quin és el model d'aquest amb el qual es realitza la mesura. I per últim també s'indica sobre quina variable s'actua per tal de controlar la variable desitjada.

Nom	Símbol	Unitats	Rang		Descripció
			Màx.	Min.	
Temperatura	T	°C	150	0	Temperatura del cultiu
Agitació	Agit	rpm	1500	0	Velocitat d'agitació
pH	pH	-	10	2	pH
Oxigen dissolt	pO2	%	100	0	Oxigen dissolt a la fase líquida.
Cabal d'aire	Aire	l·min ⁻¹	20	0	Cabal d'aire d'entrada
Volum	Volum	l	6	2	Volum de líquid al fermentador
Àcid	Àcid	ml	1000	0	Volum de àcid addicionat acumulat
Base	Base	ml	1000	0	Volum de base addicionat acumulat
Antiescumejant	Afoam	ml	1000	0	Volum d'antiescumejant addicionat acumulat
Pressió	Press	%	100	0	Pressió a la capçalera del fermentador
Concentració CO ₂	CO2	%	15	0	Concentració de diòxid de carboni a la sortida de gasos del bioreactor
Concentració O ₂	O2	%	30	0	Concentració d'oxigen a la sortida de gasos del bioreactor
Velocitat de producció de CO ₂	CER	mol·l ⁻¹ ·h ⁻¹ (·10 ⁻⁵)	5000 0	0	Velocitat de producció de diòxid de carboni al cultiu (Carbon Evolution Rate)
Velocitat de consum d'O ₂	OUR	mol·l ⁻¹ ·h ⁻¹ (·10 ⁻⁵)	5000 0	0	Velocitat de consum d'oxigen al cultiu (Oxygen Uptake Rate)
Quocient respiratori	RQ	-	10	0	Quocient respiratori (CER/OUR)
Concentració de Biomassa	X	g·l ⁻¹	200	0	Concentració de biomassa.
Velocitat específica de creixement	μ	h ⁻¹	1	0	Velocitat específica de creixement
Metanol addicionat	Metad	μl·min ⁻¹	2500	0	Cabal de metanol d'alimentació
Metanol Analitzat	Metana	g·l ⁻¹	30	0	Concentració de metanol al medi.
Metanol estimat	Metest	g·l ⁻¹	30	0	Concentració estimada de metanol al medi.
Glicerol addicionat	Gliad	μl·min ⁻¹	2500	0	Cabal de glicerol d'alimentació
Glicerol Estimat	Glicest	g·l ⁻¹	100	0	Concentració estimada de metanol al medi.

Taula 4.12. Variables de seguiment continu des del programari.

Les variables del fermentador com temperatura, agitació, pH, o oxigen dissolt es controlen des de la DCU (Digital Control Unit) del mateix aparell. El mateix passa amb el control de la pressió que funciona independentment del programa. Aquest únicament s'encarrega d'activar o desactivar-lo, canviant les consignes o el valor dels paràmetres de control. D'aquesta manera s'assegura que un problema als ordinadors no provoqui la parada del sistema, sinó que aquest segueixi funcionant amb els últims paràmetres marcats.

Temperatura	
Tipus de control	PID
Gestió del control	DCU B.Braun Biostat ED
Sensor	Tipus PT-100 (Metler Toledo, Küsnacht, Suïssa)
Variable manipulada	Temperatura de l'aigua del serpentí intern del reactor.
Agitació	
Tipus de control	PID
Gestió del control	DCU B.Braun Biostat ED
Sensor	Tacòmetre intern
Variable manipulada	Voltatge al motor d'agitació
Oxigen dissolt	
Tipus de control	PID
Gestió del control	DCU B.Braun Biostat ED
Sensor	(Metler Toledo, Küsnacht, Suïssa)
Variable manipulada	Cabal d'aire d'entrada
pH	
Tipus de control	PID
Gestió del control	DCU B.Braun Biostat ED
Sensor	(Crison, Alella, Espanya)
Variable manipulada	Cabal d'addició d'àcid i base
Pressió	
Tipus de control	PID
Gestió del control	Samson TROVIS 6496
Sensor	Phoenix Contact MCR- P/U/I-0-1000/DC (Blomberg, Alemanya)
Variable manipulada	Obertura de la vàlvula pneumàtica Samson 3510
Concentració de Metanol	
Tipus de control	Seleccionat per l'usuari (PI,PI adaptatiu, etc..)
Gestió del control	Programari de monitorització i control - PC2-
Sensor	MC-168 (PTI Instruments, Kathleen, USA)
Variable manipulada	Cabal d'alimentació de Metanol

Taula 4.13. Variables controlades del procés.

Estructura del programari

Des d'un bon inici s'ha intentat realitzar el programa de forma modular, independitzant les principals tasques unes de les altres. És des del programa principal que es van cridar de forma seqüencial els diferents mòduls segons les necessitats del programari.

La base de dades és responsable d'emmagatzemar ordenadament tota la informació relativa a la fermentació. Enregistra des dels valors de les principals variables fins observacions sobre el cultiu. També permet la consulta en línia d'aquestes dades per poder mostrar gràficament a l'usuari l'evolució d'alguna d'aquestes variables. Gràcies a la fàcil interconnexió del Microsoft Visual Basic amb el Microsoft Access (específic per realitzar bases de dades), es possible realitzar les tasques de gravació, indexació i consulta de forma ràpida i eficaç.

La modelització, com s'explicarà més detalladament en capítols posteriors, s'utilitza per estimar algunes variables davant de la impossibilitat de mesurar-les en línia. Per realitzar aquests càlculs s'aprofita la potència del programari comercial MATLAB (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA). Es tracta d'un llenguatge d'alt nivell especial per a la computació matemàtica avançada. El programa de control i monitorització fa una crida al MATLAB per realitzar els càlculs de modelització pertinents i aquest retorna els resultats.

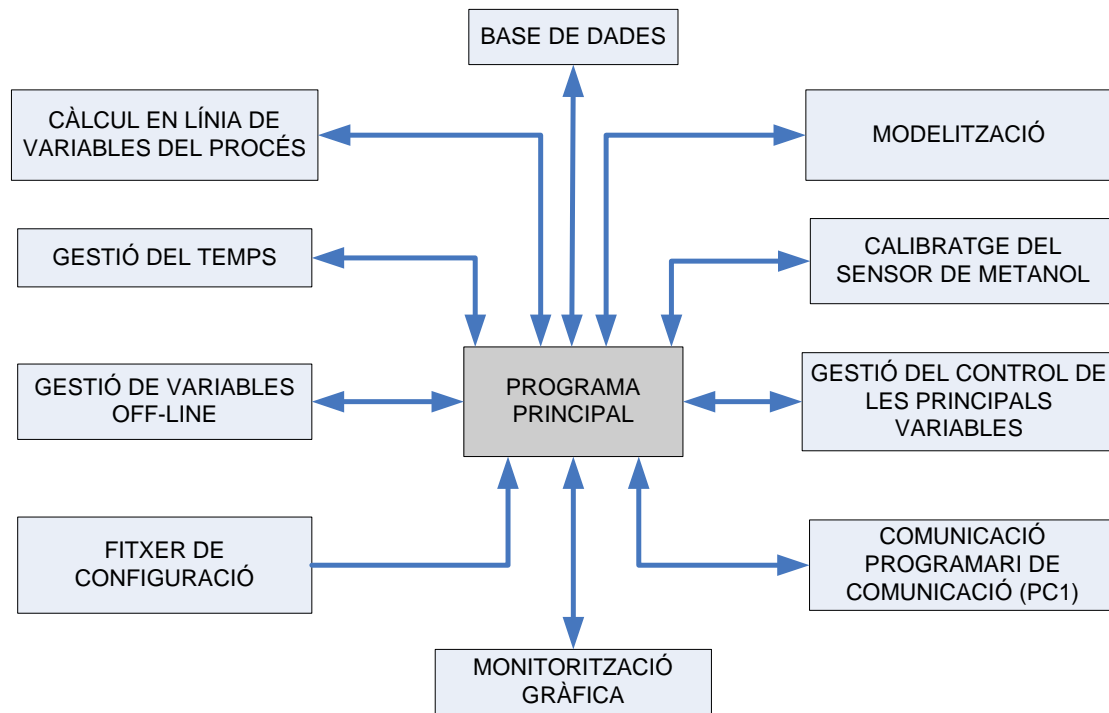


Figura 4.43. Mòduls principals del programari de monitorització i control.

En el fitxer de configuració es guarden totes les opcions que l'usuari ha definit durant la fermentació. Si accidentalment (tall de corrent, etc..) es para l'ordinador, en reiniciar-se novament es carrega el fitxer de configuració amb les mateixes característiques anteriors.

Variables com la CER, OUR o RQ són calculades en línia a partir d'altres mesures. En ser càlculs senzills, es realitzen internament en el programari sense la necessitat d'accedir a cap programari específic de càlcul numèric, com es fa amb la modelització.

A la figura 4.44 es presenta de forma simplificada el diagrama de flux del programari de control i monitorització. Com s'ha comentat anteriorment, la programació és seqüencial, no es realitzen dues tasques al mateix temps per evitar conflictes entre elles, ja que algunes d'elles empenen valors comuns.

Després de realitzar les tasques d'inicialització, es comproven la transmissió de dades via TCP/IP i es restauren el sistema en el cas que la fermentació ja estigui en marxa, es comencen les tasques ubicades al bucle principal. Cada 20 segons es realitzen seqüencialment funcions que van des de l'adquisició de dades, la monitorització gràfica o la gravació d'aquestes a la base de dades. Aquest procés es repeteix infinitament fins que l'usuari no l'atura expressament.

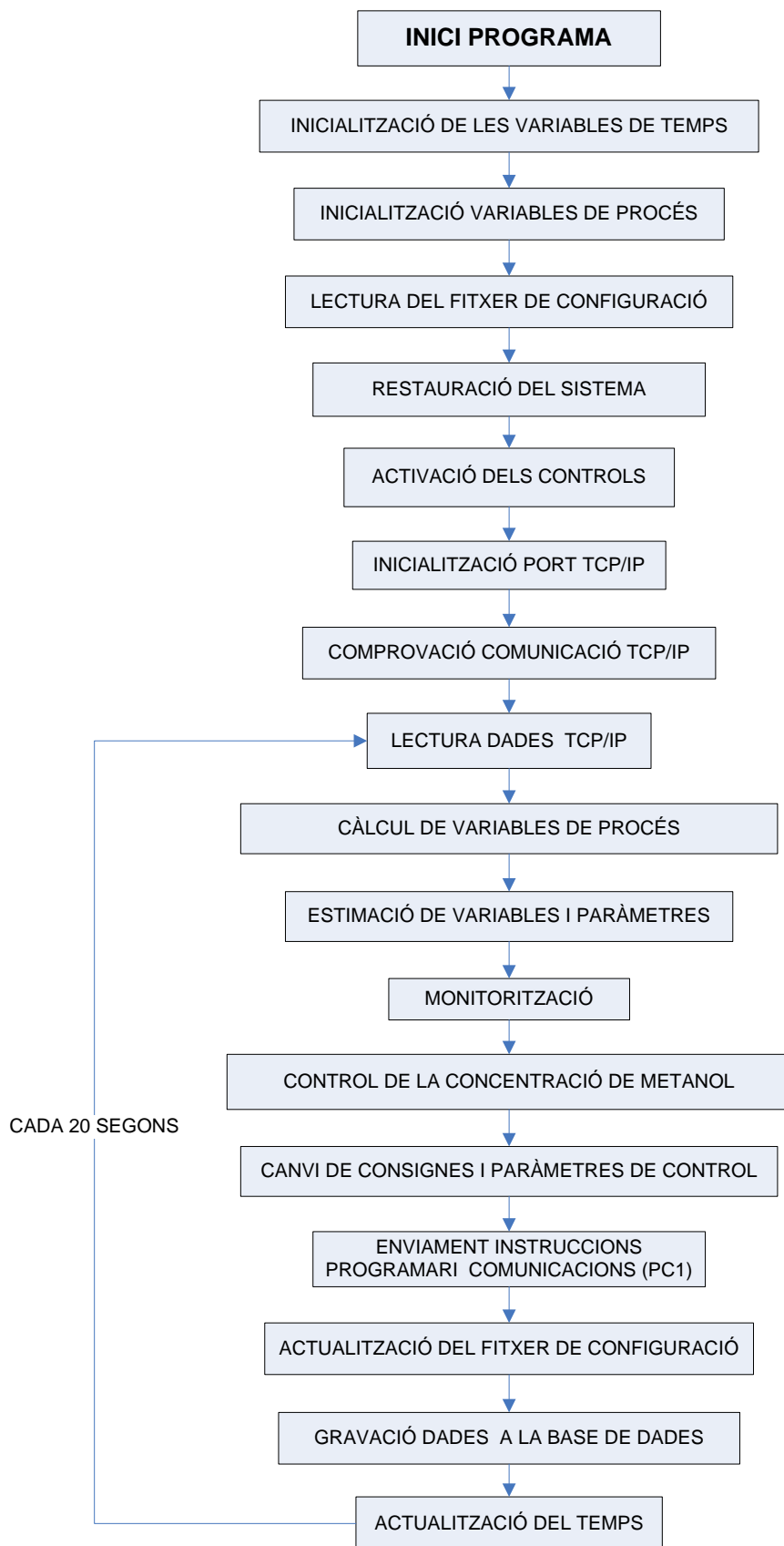


Figura 4.44. Diagrama de flux del programari de control i monitorització.

Interfície Gràfica

Pantalles inicials. En arrencar l'ordinador, s'activa directament el programari (figura 4.45), que espera durant 20 segons que l'usuari decideixi si vol començar una nova fermentació. En el cas que es premi el botó de continua fermentació o s'exhaureixi el temps, el sistema accedeix al fitxer de configuració de la fermentació actual (o que estava en procés) i restaura les opcions triades anteriorment per l'usuari. D'aquesta forma s'aconsegueix que qualsevol problema al programa o tall de corrent no signifiqui la parada del programari, i en conseqüència l'aturada del control.

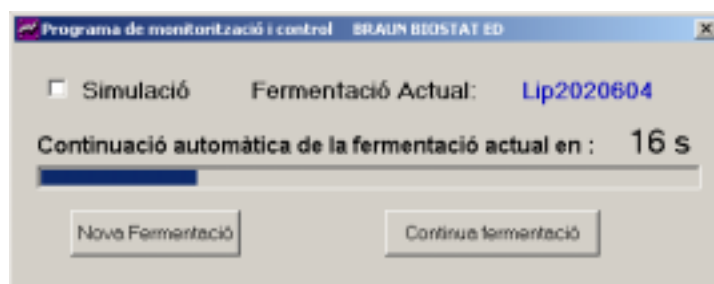


Figura 4.45. Pantalla inicial en arrencar el programa de monitorització i control.

Des d'aquesta pantalla inicial també es permet triar l'opció de simulació, on en el programa funciona desvinculat de tot el sistema utilitzant uns valors ficticis per les variables. Aquesta opció és emprada a l'hora de testejar noves subrutines al programa, quan no s'està realitzant cap fermentació.

En el cas que es vulgui començar de nou un cultiu, cal prémer el botó de nova fermentació (Figura 4.46) i seguidament introduir el nom que la identifica.

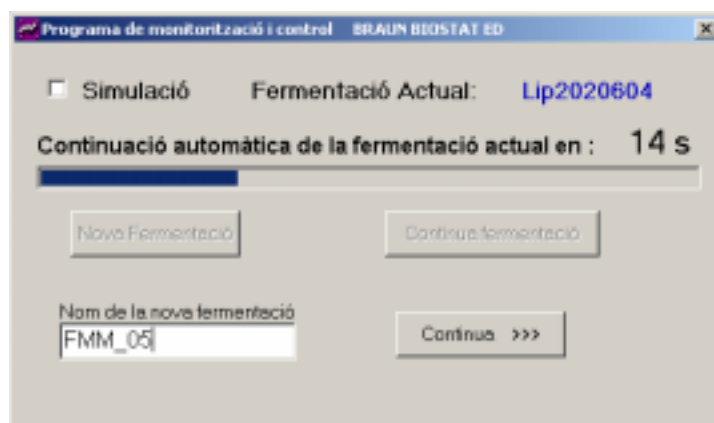


Figura 4.46. Introducció del nom a la pantalla inicial per començar un nou cultiu.

En continuar el procés s'obre una nova pantalla gràfica destinada a recopilar informació inicial necessària per arrencar la nova fermentació (Figura 4.47). Es demana a l'usuari que indiqui les principals característiques de la fermentació com són el tipus de soca, medi, cultiu i reactor utilitzat, i se li facilita un espai per si vol complementar aquesta informació amb alguna observació.

Seguidament s'introdueixen els valors de les concentracions inicials de diòxid de carboni i oxigen que s'utilitzaran com a referència per calcular la producció i

consum d'aquests components respectivament. També cal introduir el volum total amb el qual es comença el cultiu, així com la concentració inicial de glicerol i de biomassa (mesurats prèviament "off-line").

Figura 4.47. Pantalla d'introducció dels valors i informació inicial en començar un nou cultiu.

Introduïts tots aquests termes ja s'accedeix a l'entorn gràfic amb què es farà el seguiment i control al llarg del cultiu.

Pantalla principal.

Per facilitar l'accés, per part de l'usuari, a tota la informació i opcions contingudes en el programa s'han separat les diferents tasques en diverses carpetes dins de la mateixa finestra gràfica. Els únics elements que es mostren independentment de la carpeta, són la barra d'informació situada a la part inferior de la pantalla i l'indicador d'operativitat situat al marge superior dret (Figura 4.48). Mitjançant les contínues pampallugues d'un petit gràfic animat en forma de sirena es pot conèixer si el sistema està funcionant correctament o pel contrari si està bloquejat (quan no hi ha moviment del gràfic animat).

La barra inferior, amb la mateixa funció que l'emprat pel programari de comunicació (PC1) està subdividida en quatre parts, on s'indica el temps de fermentació, la hora i dia actuals i en un últim requadre que s'utilitza per donar missatges d'error o avís a l'usuari.

A continuació es detallen les principals funcions de cadascuna de les subcarpetes

INICI → Realitzats els passos previs d'inicialització, cal accedir en primer lloc a aquesta pantalla per determinar el moment just en que comença la fermentació (Figura 4.48). Fins que no es prem el botó de "comença fermentació" el programa resta inactiu. D'aquesta forma es pot configurar tot el programa abans de començar la fermentació i en el moment de la inoculació només cal accionar un botó i el programa comença realitzar totes les funcions de monitorització i control.

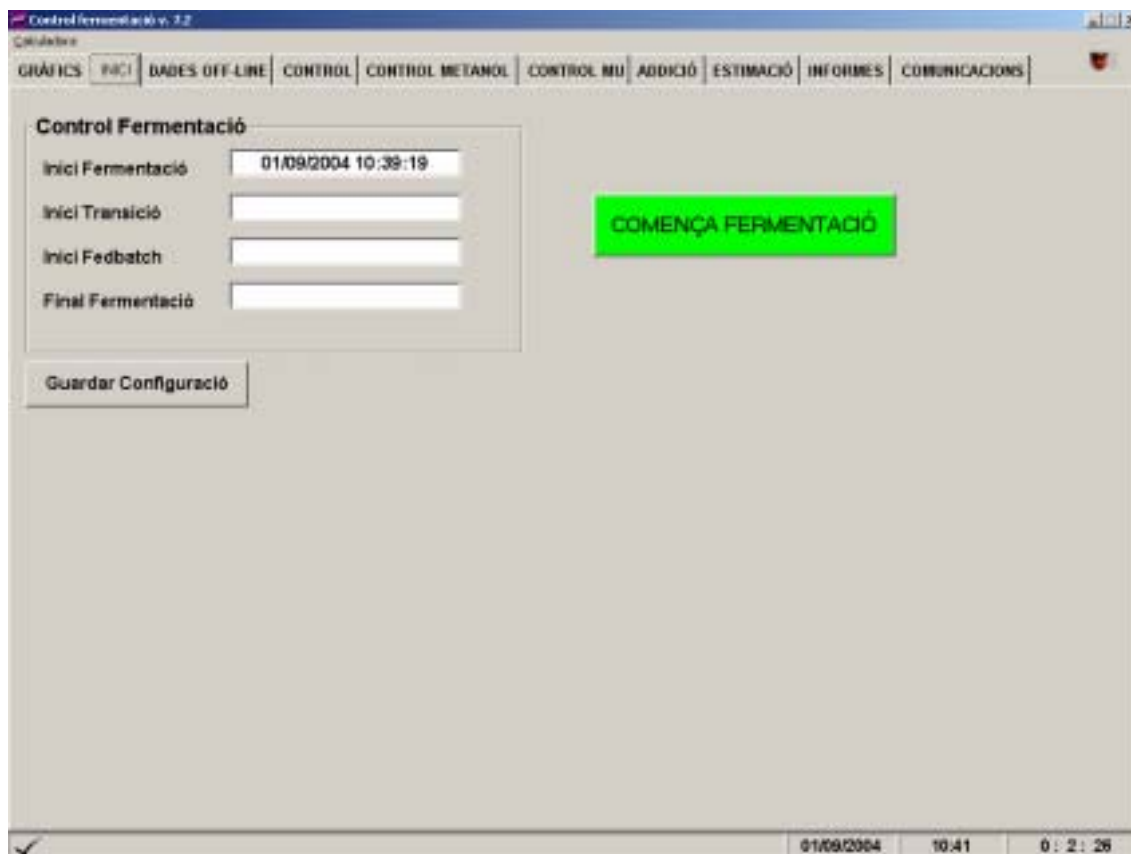


Figura 4.48. Vista general de l'aparença de la pantalla principal on hi ha seleccionat la subcarpeta inici.

També s'indiquen els temps d'inici i fi de cada etapa de la fermentació, que són detectats automàticament per les diferents accions de l'usuari en el programa, com es veurà posteriorment.

Tot i que es guarda la configuració automàticament en el cas que es canviï algun paràmetre del programa, s'ha col·locat un botó per accionar manualment aquesta funció.

GRÀFICS → En aquesta subcarpeta es realitza la monitorització de les totes les variables del cultiu. A la part superior de la pantalla es va actualitzant contínuament el valor d'aquestes a la seva casella corresponent (Figura 4.48).

Es pot seguir l'evolució de cadascuna de les variables al llarg del temps amb el gràfic activant el botó de la variable desitjada situat a la part superior. Per exemple, com es mostra a la figura 4.49, en prémer el requadre amb el títol "T" simbolitzant la temperatura, es pot apreciar l'evolució d'aquesta variable al llarg del temps.

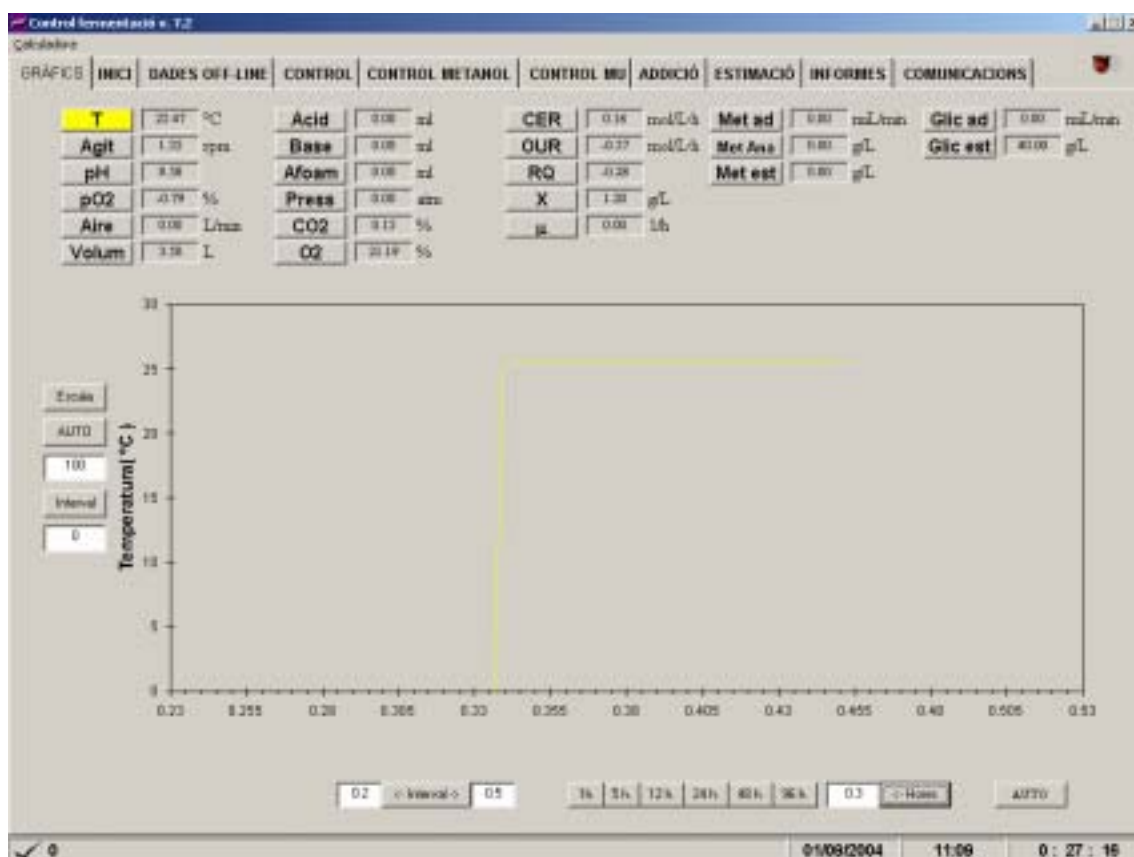


Figura 4.49. Vista de la subcarpeta de gràfics on es pot observar l'evolució de les variables del sistema.

Com és lògic, les diferents variables del sistema es representen a l'eix de les ordenades en funció del temps (eix de les abscisses). A cada variable se li ha assignat un color diferent i el rang amb què pot oscil·lar.

Els dos eixos es poden configurar fàcilment per veure tant el període de temps com el rang de mesura desitjats. L'activació del sistema "AUTO" en els dos eixos permet que el programa s'encarregui de dimensionar-los automàticament en funció del rang de dades utilitzat. També es pot veure l'evolució de la variable en un interval predefinit per l'usuari utilitzant la funció "interval" situada a cada eix.

Tot i això, les funcions de configuració de l'eix més emprades són les que mostren les últimes hores de fermentació (1 h, 5 h, 12 h, 24 h, 48 h o 96 h) ja que es pot veure ràpidament la seva evolució global només prement un botó.

Cal comentar que el gràfic es redibuixa automàticament en actualitzar els valors de les variables i que es poden mostrar més d'una variable al mateix temps.

La gran versatilitat i senzillesa en la utilització de les funcions gràfiques d'aquesta carpeta permeten veure ràpidament i de diferents punts de vista l'evolució temporal de les diferents variables del sistema. És imprescindible que un programari de monitorització disposi d'una eina com aquesta, amb la qual es puguin apreciar, en línia, l'evolució de les diferents variables i en funció d'aquestes poder prendre les decisions corresponents.

DADES OFF-LINE → Per complementar la monitorització de totes les variables en línia s'utilitza una altra subcarpeta on l'usuari guarda, consulta i grafica els resultats de les mesures fetes de les mostres extretes (Figura 4.50).

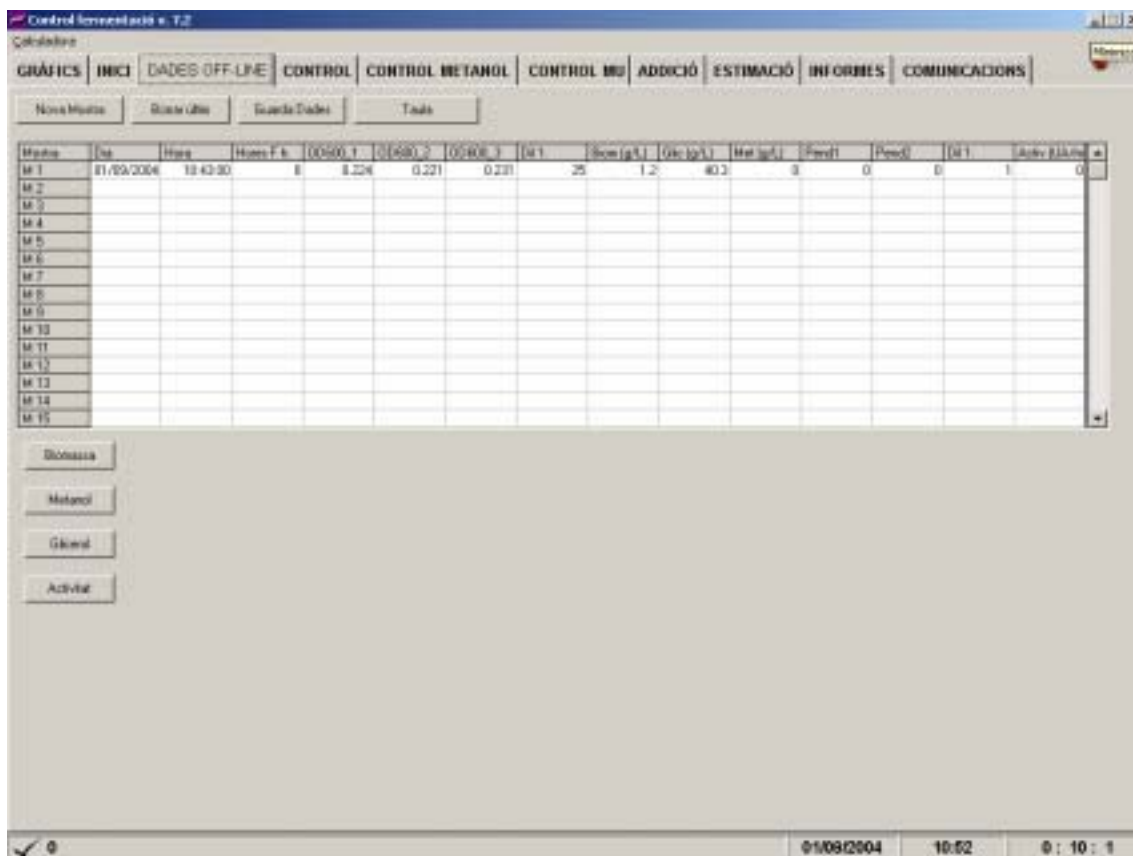


Figura 4.50. Pantalla gràfica on s'enregistren les variables "off-line" del sistema.

Per tant, cada vegada que s'extreu una mostra, sigui de forma automàtica amb el sistema d'extracció o manualment, l'usuari apunta el dia i l'hora i seguidament el valor de les mesures de densitat òptica (biomassa), la concentració de glicerol i metanol, i l'activitat lipolítica.

Les dades es poden graficar individualment en prémer el botó de cadascuna de les variables situat al lateral esquerra de la pantalla.

CONTROL → Subcarpeta destinada a la gestió dels controls d'algunes variables del sistema. Tots aquests controls funcionen de forma independent en cadascun dels equips, des del programa però, es poden activar o desactivar i canviar els paràmetres de configuració dels controladors (Figura 4.51).

Al requadre situat a la part superior esquerra és on es pot activar i desactivar individualment cadascun dels controls. Cal assenyalar que dues de les variables a controlar, l'oxigen dissolt i el cabal d'aire d'entrada estan estretament relacionades entre sí. Atès que per mantenir una concentració determinada d'oxigen a la fase líquida es regula el cabal d'aire d'entrada, no es pot independitzar un control de l'altre. Per tant, quan es vol controlar el pO_2 , el cabal d'aire d'entrada a addicionar queda supeditat a aquesta variable. Per aquest motiu, quan el control de l'oxigen dissolt resta actiu el control de cabal d'aire queda en cascada, ja que es va modificant el seu valor de consigna per aconseguir mantenir a un cert nivell l'oxigen dissolt.

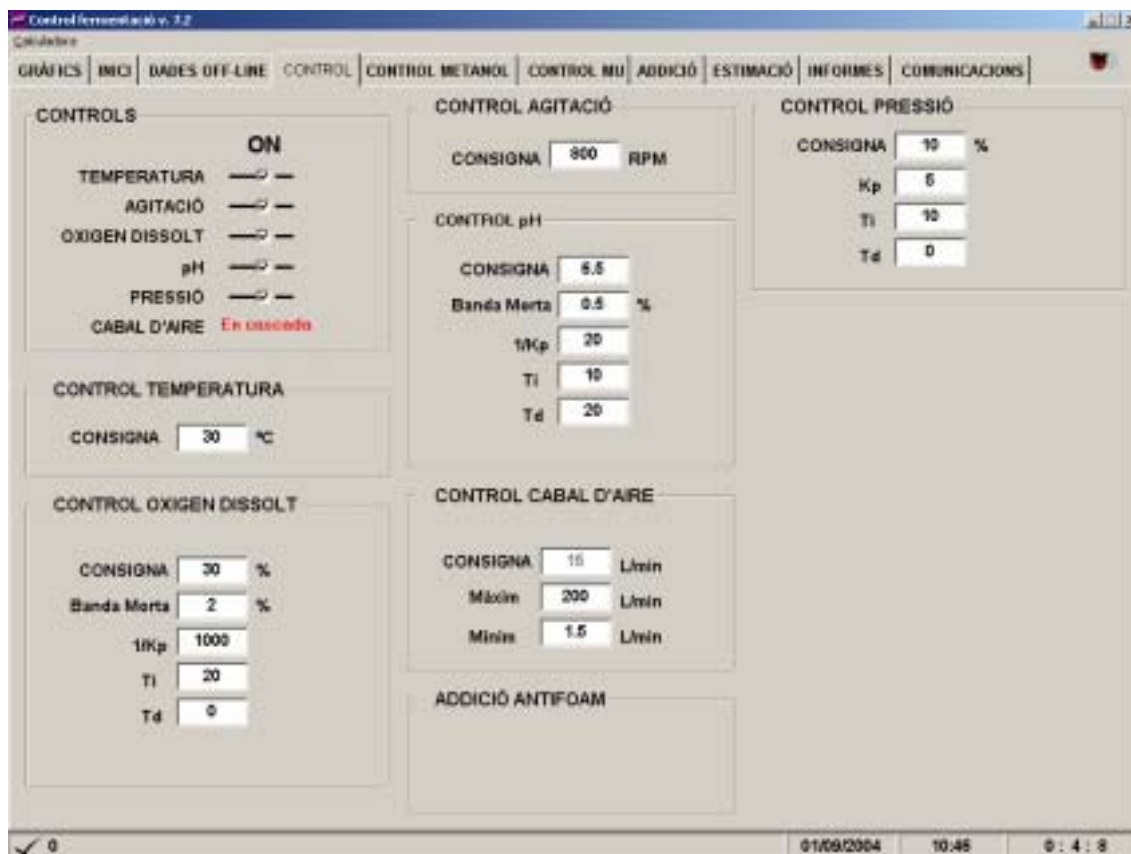


Figura 4.51. Subcarpeta destinada a la gestió d'algunes de les variables controlades del sistema.

Tant en el control de la temperatura com el de la velocitat d'agitació, només es permet variar el valor de la consigna. Pel que fa el pH i l'oxigen dissolt, a part de modificar la consigna i els paràmetres del controlador PID, es pot canviar la banda morta, zona al voltant del valor de la consigna on no s'actuarà. Aquesta mesura és especialment aconsellable en el cas del pH, ja que les contínues petites oscil·lacions d'aquesta mesura provocarien la contínua addició de àcid i base per compensar-les, amb el consegüent elevat consum i ràpid increment de volum al reactor.

Una característica a tenir en compte dels control tipus PID del fermentador, és que el paràmetre del guany del controlador és la inversa del valor que s'envia a l'equip. Per tant, quan s'envia un valor pel primer paràmetre del controlador igual a 20, realment el guany és de 0.05 (1/20).

Pel control del cabal d'aire d'entrada, quan el control de l'oxigen dissolt és desactivat, es pot modificar la consigna i el cabal màxim i mínim que es pot utilitzar.

Finalment, del control de la pressió de capçalera del reactor se'n pot modificar tant la consigna com els paràmetres del controlador, també de tipus PID. La consigna en aquest cas s'indica en tant per cent del rang total de mesura. Així doncs, sabent que el sensor es capaç de mesurar entre 0-1 bar, la consigna està fixada per mantenir la pressió al voltant de 0.1 bar de sobrepressió respecte l'atmosfèrica.

S'ha deixat sense completar el control de l'addició d'antiescumejant, ja que durant aquest treball no ha estat necessari. No obstant això, el programari està

totalment preparat per gestionar-lo, només cal realitzar algunes modificacions en el codi.

CONTROL METANOL → L'única variable per la qual l'ordinador s'utilitza com a controlador és la concentració de metanol al medi. En aquesta subcarpeta es presenten tots els sistemes emprats que es disposa per a tal fi. La base teòrica per entendre el funcionament d'aquestes finestres està en detall explicat a l'apartat 4.3.

Tots aquests algorismes actuen sobre el cabal d'alimentació de metanol al reactor i lògicament, el programari només permet que sols un d'ells funcioni al mateix temps.

Situat a la part superior esquerra, es pot activar el PID de velocitat. L'usuari pot modificar els paràmetres de control i el rang de banda morta (dins el qual no s'altera el cabal d'alimentació). A la part final d'aquest requadre es pot activar l'opció per fer anar un controlador adaptatiu en funció de l'OUR (Oxygen Uptake Rate), on també es pot introduir el valor de l'exponent "n".

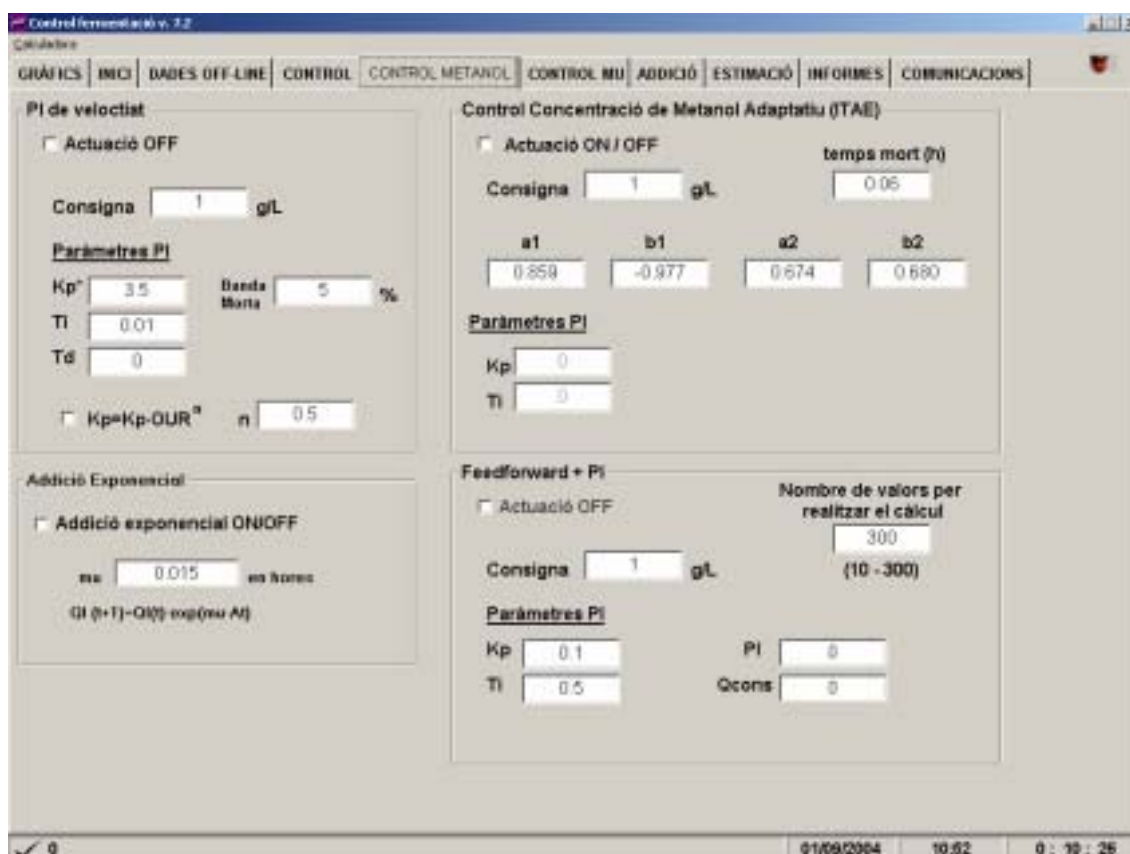


Figura 4.52. Pantalla de control de la concentració de metanol.

A la part inferior del PI de velocitat, hi ha el requadre d'Addició exponencial. Aquest afegeix un cabal de metanol segons el model predefinit,

$$QI(t+\Delta t) = QI(t) \cdot e^{\mu \cdot \Delta t} \quad \text{eq. 4.3.}$$

on:

QI: Cabal d'alimentació de metanol ($l \cdot h^{-1}$)

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

Δt : increment de temps (h)

El nou cabal a addicionar depèn del cabal de metanol utilitzat anteriorment per l'exponencial de la velocitat específica de creixement pel temps. L'interval de temps es va fixar a un minut i l'usuari pot modificar la velocitat específica de creixement. Atès que aquest sistema no és un controlador i per tant, el cabal d'alimentació no depèn de la mesura de metanol, es pot emprar independentment de la font de carboni desitjada.

El següent requadre, permet la utilització d'un PI on els paràmetres s'han sintonitzat segons la metodologia ITAE per minimitzar l'error entre la resposta i la consigna. L'usuari pot introduir el valor de la consigna i els paràmetres característics d'aquesta tècnica com són el temps mort, a_1 , a_2 , b_1 i b_2 . A partir d'aquests valors el programari calcula el guany (K_p) i la constant de temps integral (T_i).

Finalment, en el requadre anomenat "Càlcul de consum + PI" es pot modificar la consigna, el guany (K_p) i la constant de temps integral (T_i). A part, es pot indicar el nombre de valors utilitzats per calcular el consum de metanol. El quadres de text PI i Q_{cons} serveixen per indicar a l'usuari, en tant per cent, la contribució de cadascuna de les parts del controlador en el cabal d'alimentació. Aquest valor depèn directament de l'error i el consum de metanol per part del llevat metilotròfic.

La subcarpeta de "control μ " ha estat inclosa per introduir, en un temps no molt llunyà, les funcions de control de la velocitat específica de creixement. Actualment però, no conté cap funció en el seu interior.

ADDICIÓ → En aquesta finestra s'inclou tot el que està vinculat directament amb l'addició (Figura 4.53). El programari està preparat per administrar al mateix temps tres microburetes (Metanol, Glicerol i font de Nitrogen), on l'usuari pot modificar el cabal a addicionar i la freqüència d'addició. Per accionar-les només cal prémer el botó "Start" i repetir la mateixa operació si es vol parar.

Una de les microburetes és utilitzada per a l'addició de font de nitrogen i l'addició d'aquesta es pot fer de dues maneres. La primera, a l'igual que les microburetes per addicionar metanol i glicerol, consisteix senzillament en fixar un cabal constant. En segon lloc, es pot realitzar l'addició de la font de nitrogen en proporció estequiomètrica amb la font de carboni, segons la composició del microorganisme. Per tant, el cabal d'alimentació de font de nitrogen depèn directament dels cabals d'addició de metanol i glicerol. Aquesta relació depèn de la concentració de C i N a les solucions, per tant cal que l'usuari introdueixi els ml de font de nitrogen per ml de font de carboni estequiomètricament equivalents.

Al la part inferior esquerra de la finestra gràfica es troba el requadre anomenat "Transició". Aquest està especialment dissenyat per la mateixa etapa de temps on s'addiciona glicerol i metanol segons l'esquema proposat per adaptar el microorganisme a la nova font de carboni.

L'usuari pot modificar el cabal en $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a addicionar per als diferents intervals d'una hora. En prémer "Start" en aquest apartat, el programari bloqueja els requadres de Metanol i Glicerol, evitant que l'usuari modifiqui per equivocació els seus valors, que passen a estar controlats per la seqüència definida de la transició. El cronòmetre interior indica el temps transcorregut des de que s'ha començat a questa etapa. Tot i que aquest requadre està pensat per gestionar els cabals de metanol i glicerol simultàniament, es permet que l'usuari pugui desvincular el cabal d'addició d'algun d'ells momentàniament. Per fer-ho, cal desactivar el petit requadre situat sota el botó d'accionament pel substrat pel qual es desitja parar la seva alimentació, segons el cabal fixat per a la transició.

És important assenyalar que en el moment que s'acciona aquest apartat, el programari identifica que s'ha acabat l'etapa discontinua i comença l'etapa de transició. En acabar aquest període de 5 hores s'actualitza de nou l'etapa passant a ser la semicontínua o "fed-batch".

Finalment, el requadre d'addicions i extraccions de volum, situat a la banda dreta de la subcarpeta és utilitzat per portar un control estricte sobre el volum de l'interior del reactor. A la part superior d'aquest requadre es va actualitzant la contribució de cadascuna de les entrades de líquid al sistema. Per tant, el volum final de líquid al reactor serà la suma del volum inicial més el volum afegit de metanol, glicerol, font de nitrogen i àcid/ base per controlar el pH.

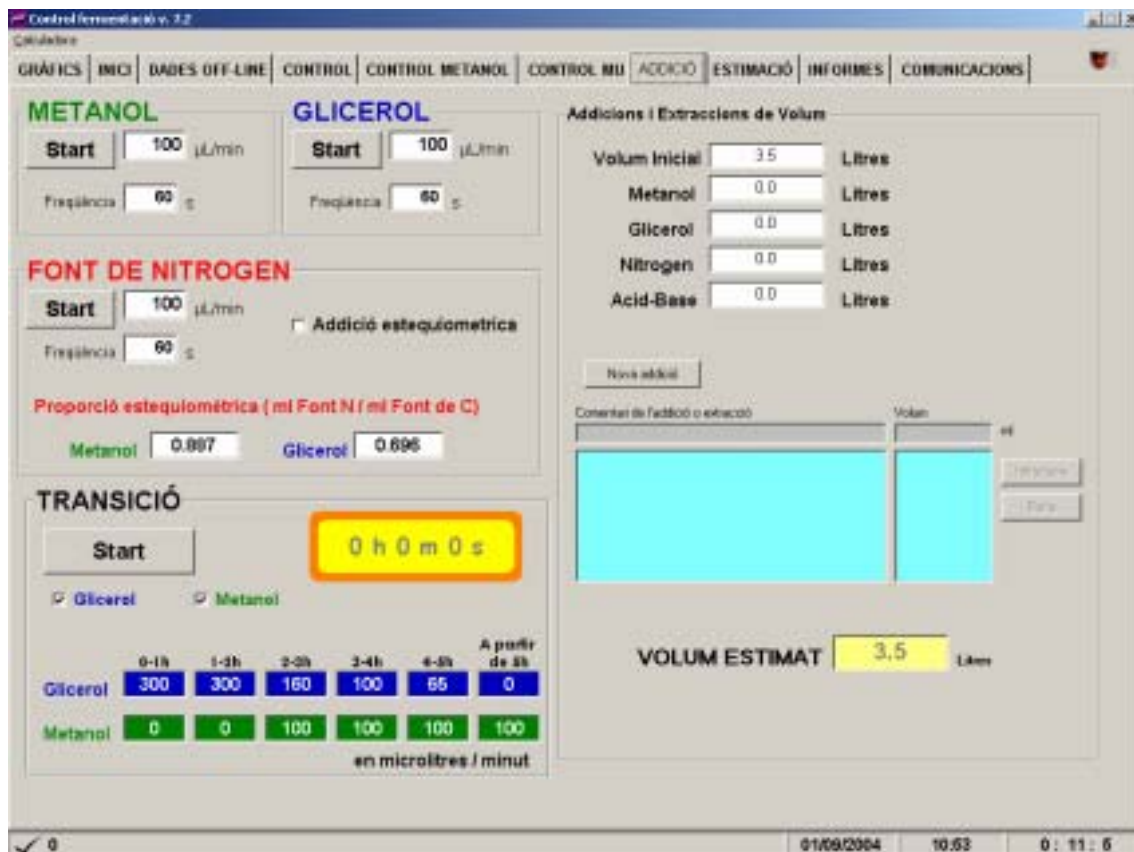


Figura 4.53. Des d'aquesta pantalla es gestiona tot el referent al volum i a l'addició d'aliment al reactor.

Falta però contemplar les extraccions de mostra i addicions d'algun compost que es fan de forma esporàdica i poden alterar aquesta estimació del volum. Per aquest fi, s'utilitza el botó anomenat "Nova addició". En activar-lo es pot escriure en els requadres inferiors un petit comentari sobre el que s'ha fet i al costat apuntar, en mil·lilitres, el volum addicionat o extret. Si el volum és de signe positiu serà una addició al medi i si es tracta d'una extracció s'haurà d'indicar amb signe negatiu. Als requadres de sota, es van recollint les diferents extraccions i addicions fetes al llarg de la fermentació.

A la part inferior del requadre s'estima el volum del reactor a partir de totes les addicions i extraccions. Com es veurà més endavant, algunes de les variables que s'empren per fer un seguiment de la fermentació (com la CER, o l'OUR) són calculades en línia a partir d'altres mesures. Entre elles el volum de cultiu, i per aquest motiu és necessari estimar-lo amb la major exactitud possible. Per

aconseguir-ho és imprescindible apuntar sistemàticament el volum de les extraccions i addicions puntuals al medi.

També, és important calibrar correctament les bombes peristàltiques d'addició d'àcid i base per controlar el pH. Per una major exactitud s'aconsella fer-ho sota les mateixes condicions d'operació que s'utilitzen durant el cultiu, pensant sobretot amb la pressió a l'interior que poden afectar fortament aquests sistemes d'impulsió de líquid.

S'ha procurat, especialment en aquesta part, que el programari fos especialment flexible i versàtil, poden adaptar-se fàcilment a múltiples i diferents configuracions a l'hora d'addicionar els substrats.

ESTIMACIÓ → En aquest apartat del programa es reuneix la informació necessària per al càlcul i estimació de variables d'interès com la CER, OUR o la concentració de biomassa (Figura 4.54).

Situat al cantó superior esquerre de la imatge, es troben els valors inicials de diferents variables com la concentració dels gasos de sortida, el volum, la biomassa i la concentració de glicerol. Tot i haver-los introduït a una de les pantalles inicials en començar la fermentació, aquí es poden modificar a l'igual que actualitzar els valors actuals de la biomassa i la concentració de metanol. Aquesta última opció s'ha incorporat per corregir els possibles errors que es poden cometre en l'estimació de la biomassa i el glicerol durant el cultiu.

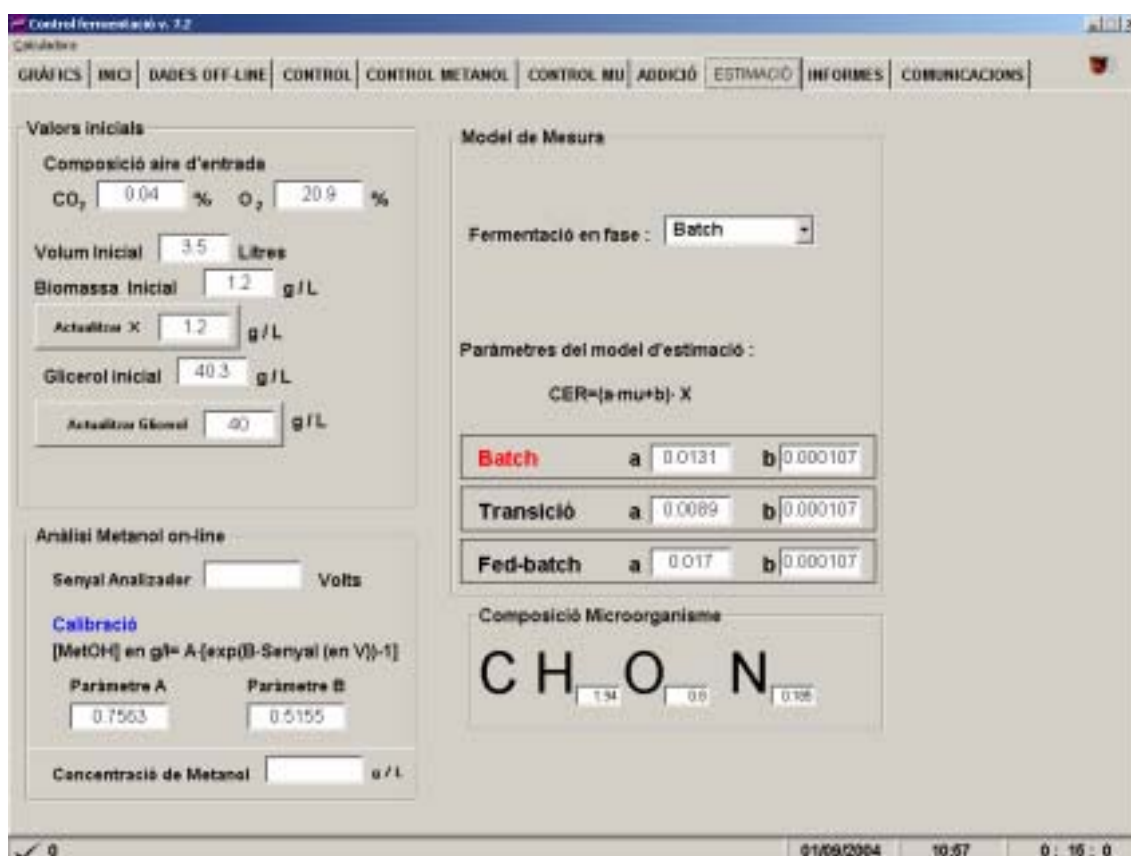


Figura 4.54. Pantalla de configuració de les variables estimades.

Sota aquest requadre es troba l'apartat dedicat al calibratge del sensor de metanol. On a partir del voltatge del sensor es determina concentració de metanol a la fase líquida mitjançant l'equació:

$$[MetOH] = A \cdot (e^{B \cdot V} - 1) \quad \text{eq. 4.4}$$

On $[MetOH]$ és la concentració de metanol en $g \cdot l^{-1}$, V és el voltatge del sensor i A i B són les constants de la corba exponencial de calibratge. Quan es rep la mesura del voltatge de l'ordinador de comunicacions (PC1) es calcula automàticament, mitjançant l'equació de calibratge, el valor de la concentració de metanol a la fase líquida.

El model de mesura, com serà explicat amb més detall posteriorment, és l'eina matemàtica emprada per estimar l'evolució de la biomassa i la velocitat específica de creixement a partir de velocitat la producció de diòxid de carboni (CER). Atès que les constants que relacionen aquestes dues variables són diferents segons la font de carboni consumida, els paràmetres del model són diferents per cada una de les etapes del cultiu. Per aquest motiu s'inclouen dins aquest requadre la possibilitat d'utilitzar uns valors diferents de les constants a i b del model segons la fase del cultiu on s'estigui. Tot aquest procés és realitza automàticament sense la intervenció de l'usuari, ja que, com s'ha comentat anteriorment, el programari ja s'encarrega d'identificar l'etapa del cultiu.

Per últim, es possible indicar al programari la composició elemental del microorganisme. Tot i que actualment no s'empra per a cap funció en concret, es va col·locar amb la intenció d'utilitzar-la per realitzar el balanç de carboni en línia al llarg de la fermentació i eventualment estimacions de biomassa i/o substrat.

INFORMES → Espai reservat per conèixer les principals característiques del cultiu, apuntar observacions sobre el seguiment i assabentar-se dels últims successos i errors que es produeixen en la fermentació (Figura 4.55).

El requadre blanc que ocupa tota la part esquerra de la carpeta és on l'usuari pot anar escrivint diferents comentaris durant la fermentació. D'aquesta manera queden enregistrades totes aquestes observacions en un fitxer de format rtf (Rich Text Format) que es pot consultar posteriorment amb la gran majoria d'editors de text comercials (Microsoft Word, WordPad, Wordperfect, etc.). Tot i que el sistema guarda aquest fitxer automàticament cada 15 minuts, es pot realitzar aquesta tasca manualment al prémer el botó "guardar" adjunt al requadre. El botó situat al seu costat amb el nom de "Nou apunt", introdueix en activar-lo una línia transversal juntament amb la hora i data actual, així com el temps de fermentació transcorregut. Aquesta funció serveix per situar cronològicament el comentari i poder contextualitzar-lo en l'anàlisi posterior de les dades obtingudes.

Desplaçats una mica més a la dreta hi ha els tres botons per canviar el format del text, en el cas que es vulgui diferenciar de la resta. En aquest cas s'ha optat per incloure la funció de negreta, augmentar i disminuir la mida de la font.

A la part superior dreta de la finestra es troba part de la informació que s'ha subministrat alhora de començar el cultiu. Per tant, utilitzant aquest requadre es pot modificar aquesta informació inicial i també es pot emprar per informar a algun altre usuari quines són les principals característiques del cultiu que s'està portant a terme.

Finalment, situat al cantó inferior dret, es troba el requadre de successos, pensat per que el programari comuniqui a l'usuari possibles incidències, problemes o avisos que vagin apareixen al llarg del cultiu. A l'igual que el requadre de text per realitzar comentaris, el contingut d'aquest també es guarda en un fitxer de format rtf.

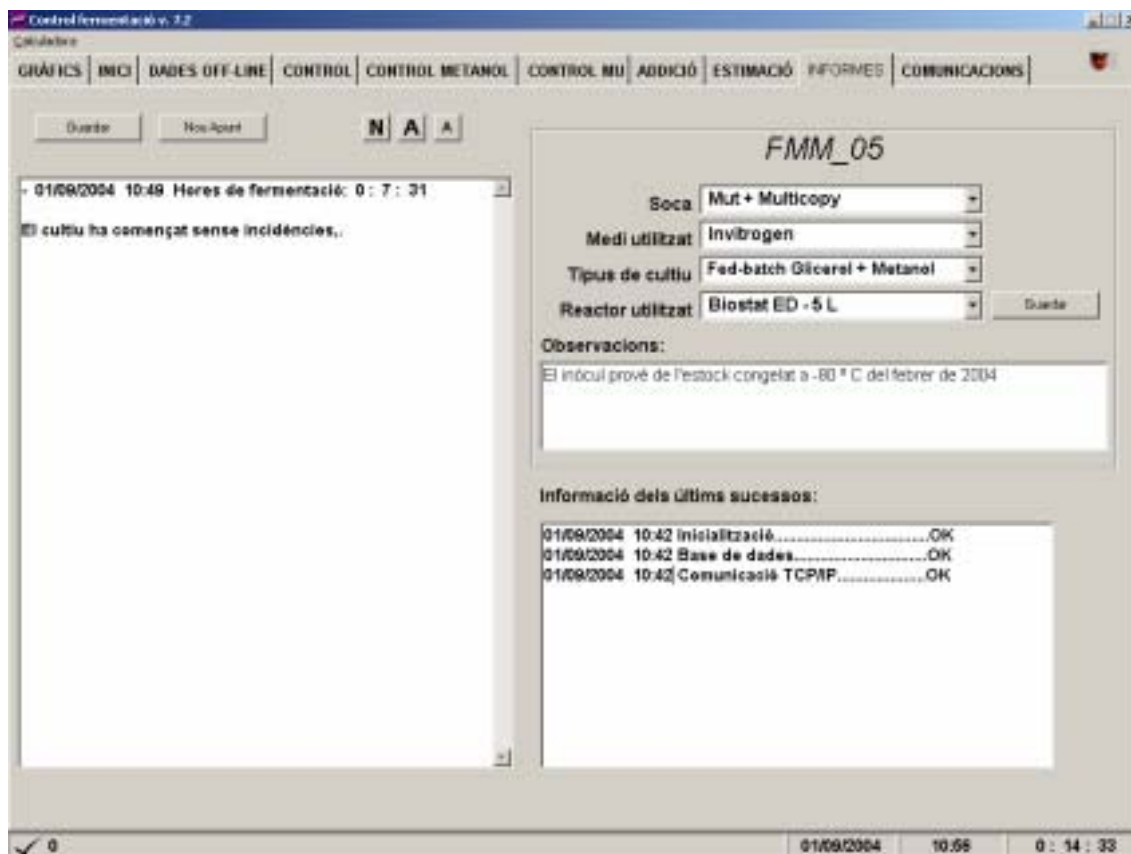


Figura 4.55. Subcarpeta d'informes i successos.

COMUNICACIONS → A la part superior d'aquesta carpeta es troba el requadre on es mostra a l'usuari l'estat i la informació sobre la comunicació TCP/IP entre els ordinadors PC1 i PC2 (Figura 4.56).

Des d'aquesta finestra es pot anar observant la informació que s'envia i es rep entre ordinadors i la hora de l'última comunicació. Pel que fa l'estat de la transmissió de dades, Visual Basic assigna una numeració a cadascun dels possibles estats. El número 7 indica que la connexió i transmissió de dades és correcte i pel contrari el zero informa que no es pot establir la comunicació entre equips.

El requadre inferior és utilitzat pel sistema d'alarma sonora del sistema. El programari en cas d'error greu, com pot ser la desconnexió durant un temps superior a 3 minuts de l'ordinador PC1 sense poder restablir la comunicació, emet un senyal sonor pels altaveus per cridar l'atenció de l'usuari. Es pot parar aquest senyal al prémer el botó "Parar Alarma" i mirar a la subcarpeta "INFORMES" a l'apartat de successos per identificar l'error que ha activat l'alarma.

El botó per activar l'alarma serveix únicament per provar si el sistema d'emissió d'aquest senyal sonor funciona correctament.

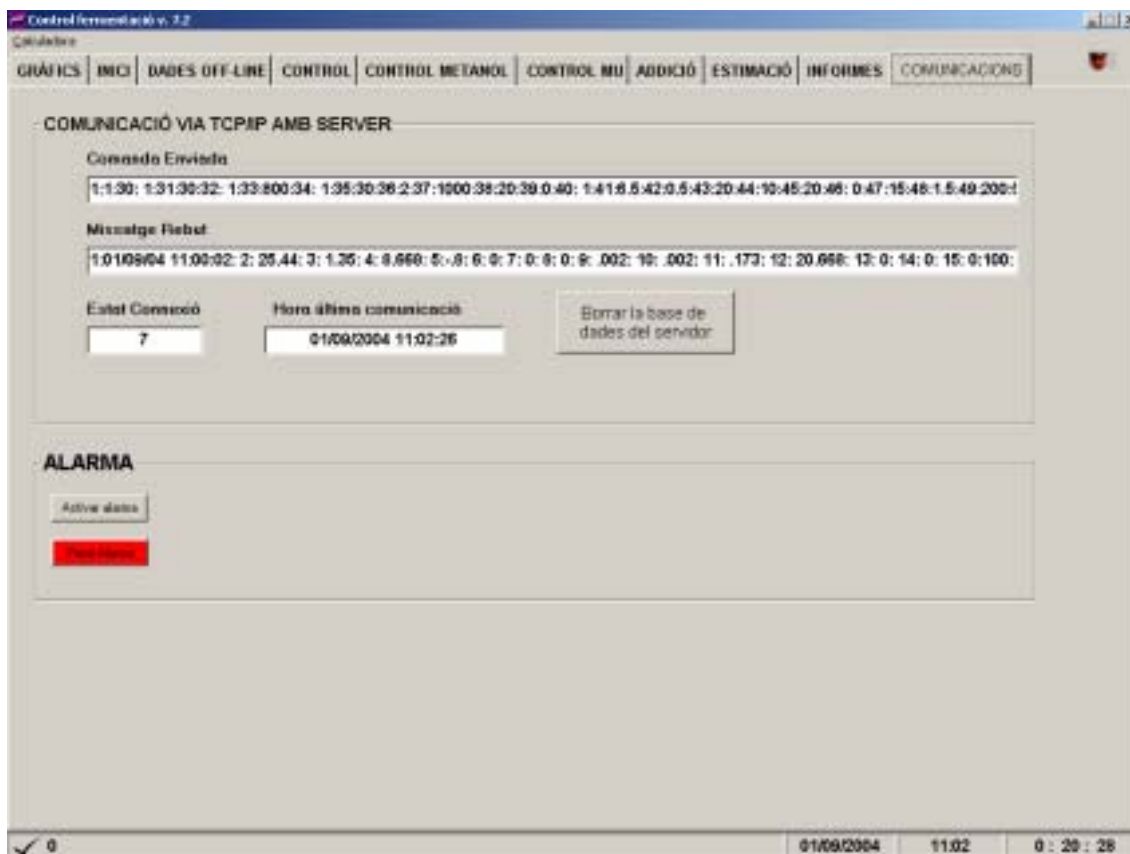


Figura 4.56. Pantalla gràfica per controlar l'estat de les comunicacions.

Programari de Comunicacions (PC1)

Característiques bàsiques

Seguint les característiques anteriors, s'ha desenvolupat un programari del PC1, destinat a la comunicació amb tot l'equipament amb la principal funció d'establir un pont de comunicacions entre l'ordinador de control i monitorització (PC2) i la resta d'equipament.

Més detalladament, les principals funcions del programari són:

- ▶ Captura i posterior tractament de les dades dels diferents equips connectats.
- ▶ Enviament de dades al PC2.
- ▶ Enviament de comandes als diferents equips segons les directrius marcades pel PC2. (Canvis de consigna, ordres d'actuació o petició de dades)
- ▶ Emmagatzemar les variables en una base de dades (Fitxer Microsoft Access) per seguretat.

Estructura interna

L'esquema general del programa PC1 es mostra a la figura 4.57 cada mòdul representat té les seves funcions específiques descrites breument a continuació:

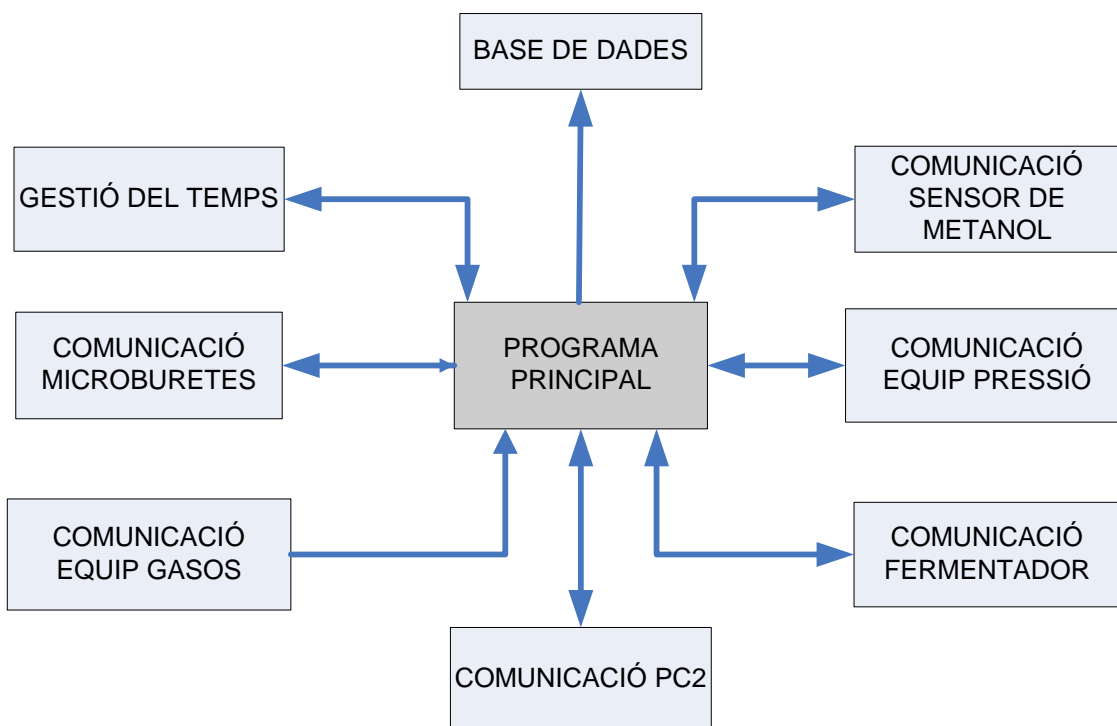


Figura 4.57. Mòduls que componen el programari de comunicacions (PC1).

En aquest cas la base de dades és únicament un mòdul de sortida. La seva funció es guardar totes les variables, consignes i canvis al llarg de la fermentació. Tot i que aquesta tasca s'ha de realitzar al PC2, també es realitza aquí per seguretat en cas de mal funcionament en el programari de monitorització i control. Les dades són guardades en un fitxer de Microsoft Access[®], programari específic per a la gestió de bases de dades. La integració d'aquest tipus de fitxers en un programa de Visual Basic és senzilla.

El mòdul de la gestió del temps té una funció molt important dins el programa perquè aquest marcarà la freqüència amb què s'han de realitzar les diferents tasques. En iniciar-se el programa, s'estableix el punt inicial a partir del qual es calcularà el temps transcorregut.

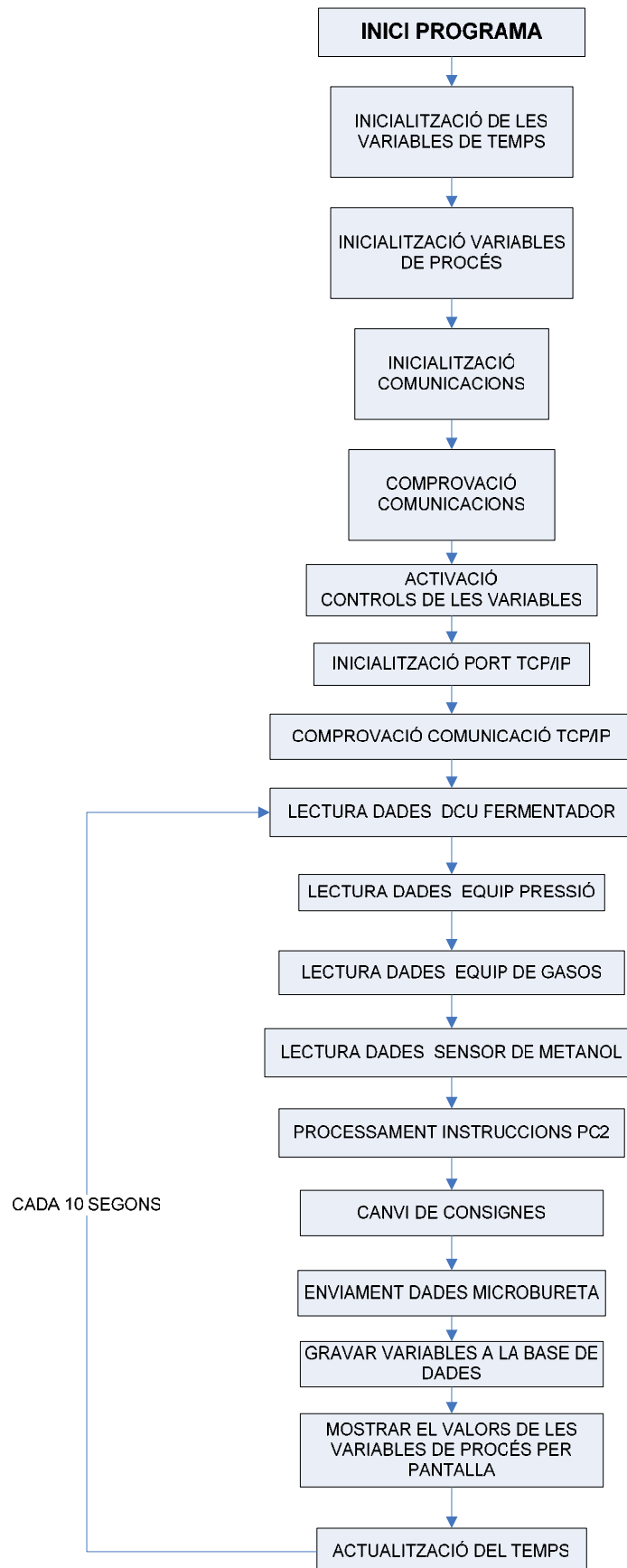


Figura 4.58. Diagrama de flux del programa de comunicacions (PC1).

La resta de mòduls són dedicades a la comunicació entre equips i segueixen el protocols indicats a l'apartat anterior.

A la figura 4.58 es mostra el diagrama de flux del programari de forma seqüencial. Tot i que el Visual Basic permet la programació per successos i multitasca, la programació ha estat realitzada linealment.

En cap moment es realitzen dues tasques al mateix temps, evitant errors d'accés a dades simultàniament. Després de realitzar-se les primeres tasques de configuració, inicialització i comprovació, s'entra dins un bucle que es repeteix infinitament fins que l'usuari para el programa. A l'interior d'aquest bucle es realitzen de forma lineal totes les funcions a realitzar periòdicament, com són la comunicació amb els diferents equips o la gravació de dades.

Cal indicar que la comunicació amb els equips per realitzar el canvi de consignes o paràmetres només es realitza si s'han produït modificacions. La comunicació amb el sensor de metanol i les microburetes també és realitza a partir del moment que l'usuari ho indica.

Interfície gràfica

En iniciar-se el programari, es mostra en primer lloc una finestra gràfica (Figura 4.59) on s'indica el progrés de la comprovació de la comunicació amb la DCU (Digital Control Unit) del Biostat ED, l'equip de gasos i el controlador de pressió. Aquesta tasca no es realitza amb la comunicació del sensor de metanol i les microburetes perquè no s'utilitzen des del principi del cultiu.

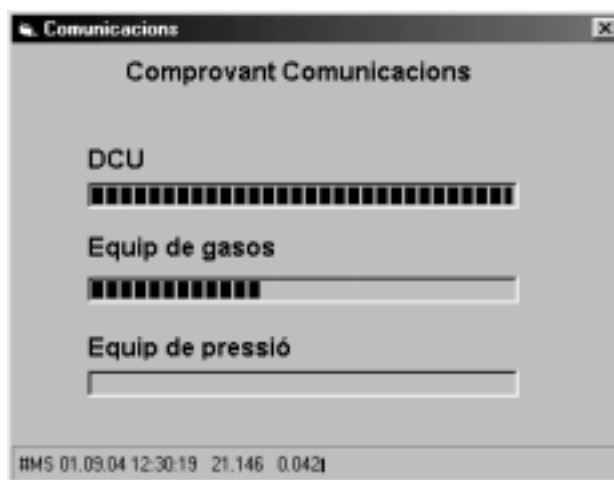


Figura 4.59. Pantalla inicial de comprovació del programari de comunicacions (PC1).

En cas de no establir comunicació amb alguns dels equips, perquè la connexió fos errònia o l'equip estigués apagat, automàticament surt un missatge alertant a l'usuari del problema. Si pel contrari, la comunicació és correcta, aquesta finestra gràfica dona pas a una segona on es mostren i gestionen totes funcions bàsiques del programa (Figura 4.60).

És important assenyalar que aquest programari pot funcionar independentment del de monitorització i control (PC2), així doncs es poden modificar consignes, paràmetres i cabals d'addició des d'aquesta pantalla. Ara bé, quan el programari del PC2 torna a ser operatiu, el control sobre totes aquestes variables passa a ser del programari situat jeràrquicament a un nivell superior.

D'aquesta forma, un mal funcionament o falla de subministrament elèctric al PC2, pot passar in advertit per a la resta d'equips i també pel procés.

A la part superior esquerra de la pantalla es mostren els valors actuals de les variables capturades que s'actualitzen cada 10 segons. A la part central hi ha tots els valors de consignes i paràmetres que es poden variar del fermentador.



Figura 4.60. Pantalla principal del programa de comunicacions (PC1).

A la part inferior es situen els controls sobre les tres microburetes d'addició on s'indica el temps que porten de funcionament, el cabal que han d'addicionar i la freqüència amb què ho fan. Els botons d'omplir, buidar i "stop" actuen puntualment sobre les microburetes realitzant la tasca que apunta el seu nom. El que indica "A.contínua" es refereix a l'addició contínua i en activar-lo s'accionen 11 cicles seguits d'omplir i buidar la xeringa. Aquesta funció és especialment útil a l'hora de netejar i esterilitzar químicament el sistema d'addició.

A la part central dreta, hi ha tres requadres de reduïdes dimensions que indica la comunicació amb l'equip de mesura de metanol, de gasos i el controlador de pressió. En aquest últim es pot variar la consigna i els paràmetres del PID de control. Atès que la mesura de metanol no es necessària durant la fase discontinua del cultiu, es pot activar i desactivar la comunicació mitjançant el petit requadre d'activació/desactivació. També es mostra el valor del voltatge del sensor del metanol per poder realitzar el seguiment i detectar possibles problemes.

A la cantonada inferior dreta de la finestra gràfica es mostren parcialment les cadenes de text utilitzades per comunicar els dos ordinadors via TCP/IP. Seguint el protocol de comunicació dissenyat específicament per al procés que ens ocupa, és el programari del PC2 que realitza les peticions i canvis al programari de comunicacions (PC1), i aquest es limita a respondre les peticions.

Finalment, el requadre de controls situat a la part superior dreta de la pantalla, indica l'estat dels controls, si resten actius o no.

La barra de la part inferior està subdividida en quatre seccions, començant per la dreta, la primera indica el temps transcorregut des de l'inici de la fermentació. Les dues següents mostren el dia i hora actuals, i finalment el quart i últim, s'utilitza per informar a l'usuari d'algunes incidències, com per exemple, errors en la transmissió de dades via TCP/IP o de que s'està realitzant una addició contínua a alguna de les microburetes.

4.3. ESTIMACIÓ, MODELITZACIÓ I CONTROL

Amb l'objectiu d'incrementar la producció de proteïna heteròloga es poden prendre multitud de decisions a diferents nivells. Algunes d'aquestes mesures amb l'única intenció d'aconseguir més informació del sistema i d'altres amb l'ambició d'influir directament en la producció de la proteïna d'interès.

És vital conèixer amb detall, abans d'aventurar-se a modificar alguns dels paràmetres clau del bioprocés, el funcionament de la fermentació amb *Pichia pastoris*. Conèixer les diferents reaccions del microorganisme davant de qualsevol modificació, i saber acotar ràpidament les mesures a prendre quan succeeix algun problema, només s'adquireixen amb l'experiència i disposant de la major informació possible del cultiu.

Un primer pas per a la millora de la producció passa per conèixer en detall els paràmetres clau i la seva evolució al llarg del cultiu. En aquesta direcció, es va decidir provar, per diferents tècniques, la forma més precisa possible de determinar la concentració de biomassa del cultiu. Posteriorment, i amb l'ajuda d'aquesta informació es poden prendre accions més directament focalitzades a la millora de la producció.

4.3.1. MESURA I ESTIMACIÓ DE LA BIOMASSA

La concentració de biomassa és una de les variables d'estat més importants en els processos fermentatius. Aquesta variable és especialment valuosa a l'hora de calcular rendiments, productivitats, etc... caracteritzant així el microorganisme. També es poden calcular i/o estimar a partir d'ella la velocitat específica de creixement, de consum de substrat o de producció, valors que donen una informació important de l'evolució del cultiu al investigador.

En la immensa majoria dels casos, el seguiment d'aquesta variable es fa puntualment a partir de la mesura directe de les mostres extretes durant el cultiu. S'utilitzen tècniques clàssiques com el pes sec, o la lectura de l'absorbància a 600 nm. (tècniques detallades a l'apartat 3.3). No obstant això, ja que la freqüència de mesura no pot ser molt elevada, és impossible identificar de forma precisa canvis de tendència o comportaments en el creixement dels microorganismes amb una velocitat de duplicació elevada.

El seguiment d'aquesta variable en línia pot donar informació molt valuosa del cultiu, com per exemple, el canvi de consum del font de carboni, l'exhauriment d'un micronutrient o l'acumulació d'un subproducte tòxic. El creixement és, potser, la variable més indicada per conèixer l'estat en cada moment del microorganisme.

Amb aquest objectiu, es va pensar en primer terme en l'obtenció de la mesura directe de la concentració cel·lular. Es va plantejar l'opció d'adquirir una sonda comercial capaç d'analitzar en línia aquesta variable en el brou de cultiu.

En el cas dels cultius amb el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* l'equipament de mesura hauria de permetre un rang de mesura des de 0.1 a 100 g·l⁻¹ de concentració de biomassa, esterilitzable per temperatura i que la resta dels components del medi no interfereixin amb la mesura.

Seguint aquestes exigències, es va buscar tant en equips comercials com en publicacions un equip que reunís totes aquestes característiques. D'aquesta recerca

preliminar se'n va deduir que no hi ha un elevat nombre d'equipament d'aquest tipus al mercat i que la majoria d'ells són indicats per aplicacions molt específiques.

Des de sondes que utilitzen l'espectroscopia dielèctrica (Kell, 1997) a altres que utilitzen tècniques de capacitància (Fehrenback et al., 1992), absorptància o terbolesa. Totes elles amb nombroses restriccions i rangs de mesura força limitats.

També existeixen sistemes de mesura basats en sondes de fluorescència, seguint els nivells de NADH (Kwong et al., 1994) o ATP (Gikas et al., 1993) que es correlacionen directament amb els nivells de biomassa. Alguns autors (Pons, 1992) però discuteixen la validesa d'aquesta relació, ja que depèn de múltiples factors com el medi o l'estat metabòlic del microorganisme. En el que coincideixen tots els estudis realitzats sobre aquests tipus de sondes és que les dades recollides cal que siguin interpretades posteriorment perquè la relació d'aquests paràmetres amb la concentració de biomassa en molts casos no és trivial (Hagedorn et al., 2003)

Les últimes tendències en aquest camp, on s'han obtingut els resultats més esperançadors, és en la utilització de la tècnica NIR (Near Infra-Red spectroscopy) on a més de mesurar la biomassa en línia es poden seguir, després d'una etapa de calibratge força complexa, les concentracions dels principals components del cultiu (Macaloney et al., 1997; Blanco et al., 2004).

Tot i així, la característica comuna en pràcticament tots aquests equips de mesura és el seu elevat cost econòmic i en molts casos, les nombroses limitacions que presenten. L'elevat esforç a realitzar, en alguns d'ells sense garanties, per disposar del valor en línia d'aquesta variable seguint alguna d'aquestes tècniques, va fer replantejar el camí a seguir.

És conegut que existeixen altres alternatives a partir de les quals es pot disposar, amb major o menor precisió, de la concentració de biomassa de forma contínua, i en molts d'aquests casos molt més fàcils d'implementar.

Un dels mètodes més emprats és l'estimació de la biomassa mitjançant els balanços de matèria. Tot i que en la majoria dels casos aquests estudis es realitzen de forma posterior a la fermentació, també es possible realitzar-ho en línia (T.Chattaway, 1992; Lyubenova et al., 2003). En ambdós casos, es necessari conèixer la composició elemental de la biomassa, que com a primera aproximació es pot considerar constant al llarg del cultiu. També cal tenir identificats els reactius i productes que intervien a la reacció. L'equació general per fermentacions aeròbies és la següent:



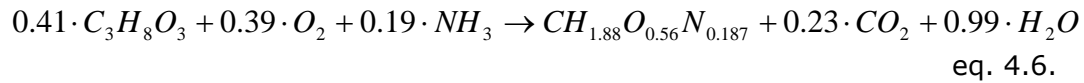
On les constants a-g són els coeficients estequiomètrics que s'han de determinar en funció de la composició de substrats, biomassa i productes.

El principal inconvenient és que s'ha de disposar de la mesura contínua tant de reactius com de productes, tasca igual o més difícil que moltes de les tècniques anteriorment referenciades. A més, és conegut que la intervenció de múltiples mesures incrementa l'error d'estimació, ja que en aquests casos s'acumula progressivament.

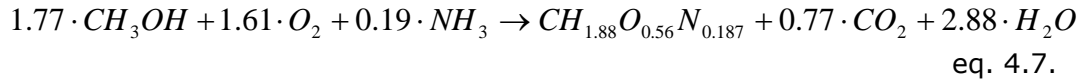
Realitzant aquest balanç en el cultiu de *Pichia pastoris*, utilitzant una composició elemental de biomassa mitjana (calculada a l'apartat 4.1) i igualant el

nombre de mols dels quatre elements majoritaris (C,H,N,O) s'obtenen les següents reaccions en funció de la font de carboni utilitzada.

En el cas del glicerol,



I per al metanol,



Utilitzant l'equació corresponent segons la font de carboni consumida i coneixent la quantitat de substrat addicionat, la seva concentració a l'interior del bioreactor i la concentració del diòxid de carboni en el corrent gasós de sortida, es possible calcular per balanç, la biomassa existent a l'interior del tanc.

Per aplicar aquesta tècnica cal tenir en compte que es requereix un seguiment exhaustiu de les diferents mesures.

En primer lloc però, abans d'estimar en línia la biomassa amb el balanç, cal comprovar que aquest es compleixi. Es comprova en algunes de les fermentacions realitzades, tant en discontinu com en semicontinu, que tot el carboni addicionat en forma de substrat es comptabilitza posteriorment en forma de biomassa i de diòxid de carboni en el corrent gasós de sortida del bioreactor.

Aquest balanç es pot plantejar globalment, tenint en compte tots el mols de carboni de totes les substàncies que contenen aquest element. De forma simplificada es pot expressar com:

$$\text{Substrat} = \text{Biomassa} + CO_2 + \text{Productes}$$

Desenvolupant matemàticament aquesta equació s'obté:

$$(n_{S_0} - n_{S_t}) = (n_{X_t} - n_{X_0}) + (n_{CO_{2t}} - n_{CO_{20}}) + (n_{P_t} - n_{P_0}) \quad \text{eq. 4.8.}$$

On el subíndex "0" i "t" indiquen la concentració inicial i final de cadascun del components, respectivament. S indica que la concentració de substrat (sigui glicerol i/o metanol segons la fase del cultiu), X la concentració de biomassa i P la concentració de producte, totes elles en base molar de carboni.

Arribats a aquest punt, es considera que les quantitats inicials de CO_2 , i producte són nul·les i que la concentració del producte final es poc significativa.

$$(n_{S_0} - n_{S_t}) = (n_{X_t} - n_{X_0}) + (n_{CO_{2t}}) \quad \text{eq. 4.9.}$$

L'error del balanç de carboni es pot calcular com la diferència de mols d'aquest element entre els alimentats al reactor de substrat i els resultants en forma de diòxid de carboni i biomassa. Aquesta operació es realitza al final del cultiu en discontinu i semicontinu, on es comprova que els mols de carboni entrants queden comptabilitzats en forma de biomassa i diòxid de carboni.

Finalment s'ha de dividir aquesta expressió per a la suma de mols de carboni totals adicionats i multiplicat per cent. Aquest valor engloba, entre d'altres, els errors en la mesura de concentració de substrat, biomassa i CO_2 , així com els fenòmens de concentració de producte i/o "stripping", que es consideren pràcticament nuls.

Dins l'expressió de n_{50} s'inclou tota la font de carboni adicionada a l'inici de la fermentació més el que s'hagi afegit durant el cultiu.

Tipus de cultiu	Nom Fermentació	Soca	Mols de Carboni				Error (%)
			Entrada		Sortida		
			Glicerol	Metanol	CO ₂	Biomassa	
Discontínu (Batch)	BMM_01	Mut ⁺ multicopy	-	1.53	1.08	0.55	-5.92
	BMM_03	Mut ⁺ multicopy	-	2.03	1.42	0.62	-0.72
	BMM_02	Mut ⁺ multicopy	-	1.99	1.47	0.60	-3.55
	BMS_01	Mut ⁺ singlecopy	-	1.59	0.97	0.60	1.35
	BMS_02	Mut ⁺ singlecopy	-	1.71	1.17	0.65	-5.92
Semicontínu (Fed-batch)	FMM_02	Mut ⁺ multicopy	6.06	41.89	36.75	9.82	2.88
	FMS_01	Mut ⁺ singlecopy	6.12	34.11	25.30	13.70	3.07
	FMS_03	Mut ⁺ singlecopy	5.70	46.00	35.82	13.79	4.03
	FMS_02	Mut ⁺ singlecopy	5.12	26.27	23.93	9.49	-6.49
	FMS_04	Mut ⁺ singlecopy	5.70	51.74	44.86	14.13	-2.70
	FSM_01	Mut ^s multicopy	3.78	12.04	9.93	5.15	4.67
	FSS_01	Mut ^s singlecopy	4.55	8.74	7.54	5.05	5.27
	FSS_07	Mut ^s singlecopy	4.77	6.21	5.81	4.45	6.58
	FSS_05	Mut ^s singlecopy	5.68	6.45	5.70	5.48	7.79
	FSS_08	Mut ^s singlecopy	5.68	15.92	11.45	8.04	9.79
	FSS_02	Mut ^s singlecopy	6.07	9.22	8.16	6.64	3.22
	FSS_04	Mut ^s singlecopy	5.68	12.12	9.66	6.51	9.14
	FSS_06	Mut ^s singlecopy	4.88	8.80	8.11	5.30	1.98

Taula 4.14. Balanç de matèria per diferents estratègies (discontínu i semicontínu) i tipus de soca.

A la taula 4.14 es mostra de forma detallada el recompte final de mols de carboni per diferents cultius. El mols de carboni provinents del glicerol contempnen la quantitat inicial (aproximadament $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) de la fase batch seguit dels mols addicionats (segons addició preprogramada) durant la fase de transició. Es considera que el seu valor en finalitzar el cultiu és nul, hipòtesi que tot i no comprovar-se en tots els casos és certa, vista l'afinitat del microorganisme cap aquesta font de carboni. Les diferències d'aquest valor entre cultius són degudes a les variacions de volum i concentració inicial.

Els mols de carboni provinents del metanol són la suma de l'addició preprogramada d'aquesta font de carboni durant la fase de transició més l'addició segons el perfil marcat per l'usuari durant l'etapa final de producció. Tot i ser poc important, la quantitat residual de metanol existent al final del cultiu es descomptada.

Els mols de carboni que han anat a formar part de la biomassa es calculen tan fàcilment com la diferència entre la densitat cel·lular inicial i la final del cultiu, tenint en compte la variació de volum en cas que hi sigui.

Finalment, els mols de carboni que surten pel corrent gasós de sortida de CO_2 es mesuren a partir de la CER (Carbon dioxide Evolution Rate) o velocitat de producció de diòxid de carboni. Es considera que no hi ha acumulació de CO_2 a la fase líquida (aproximació correcte si el pH es manté constant, veure apartat 3.7). L'integració numèrica de l'evolució de la CER ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) entre l'inici i la fi del cultiu permet conèixer la quantitat total de carboni que s'elimina en forma de CO_2 .

El programari de control i monitorització del procés de fermentació, dissenyat en aquest treball experimental ha facilitat enormement aquest càlcul, ja que tota la informació necessària (cabals d'alimentació, concentracions de reactius com productes i mesures "off-line") queden enregistrades a la base de dades del cultiu.

Tenint en compte aquests balanços de forma global, es pot observar que l'error varia, com a màxim entre el $\pm 9 \%$, valors raonables i atribuïbles a petits errors de mesura. Els cultius amb un tant per cent d'error més elevat corresponen a les fermentacions amb més durada temporal. És d'esperar que en intervenir l'integració d'algunes variables per realitzar el càlcul del nombre de mols de carboni, els errors de mesura es vagin acumulant al llarg del temps i es faci més explícit quan la durada del cultiu és llarga.

És potser anecdòtic comprovar que en el cas dels cultius en discontinu, l'error és majoritàriament de signe negatiu, indicant que els mols de carboni de sortida mesurats són majors que els d'entrada, afirmació conceptualment impossible. Tot i així, l'error és proper a zero, per tant es pensa que la diferència és causada per l'acumulació de petits errors en la mesura.

Altres dades que contrasten amb la resta són els consums de substrat, producció de CO_2 i biomassa en el cultiu de la soca Mut⁺ (contingui una única o múltiples còpies del gen). Els valors d'aquests són força més elevats que en la resta de cultius fent denotar la diferència de naturalesa de les soques amb velocitats específiques de creixement més elevades.

Comprovat que el balanç de carboni es compleix globalment de forma satisfactòria en la majoria dels casos, es va sospesar la viabilitat d'emprar aquesta tècnica per estimar la biomassa en línia. La seva aplicació és senzilla, ja que consta en realitzar el càlcul del mateix balanç que es fa al final del cultiu però coneixent a partir de la diferència de mols de carboni, la quantitat de biomassa no mesurada.

Aquesta estimació es faria amb un freqüència suficientment elevada per conèixer en qualsevol moment quina és la densitat cel·lular. A més, la mesura puntual de la biomassa permetria reajustar els valors per evitar l'acumulació de l'error.

El requisit indispensable per portar a terme aquesta tècnica és conèixer en detall tant les addicions de font de carboni realitzades com els nivells de concentració d'aquestes a l'interior del bioreactor. També és necessari tenir un registre de la concentració de diòxid de carboni en el corrent gasós de sortida.

És senzill identificar que el problema principal d'aquesta tècnica d'estimació passarà per a la dificultat de disposar de totes les mesures en línia necessàries per al balanç (glicerol, metanol i diòxid de carboni). A més, l'estimació de la densitat cel·lular en dependre directament de diferents mesures, fa que la quantitat d'errors o la suma de tots ells impliqui que aquesta tècnica no sigui del tot aconsellada.

Arribats a aquest punt, tot i que es disposava de la mesura en línia tant de la concentració de metanol com la de composició de gas a la sortida (CO_2 , O_2), no es mesurava en línia la concentració de glicerol, dada indispensable per completar l'estimació de la biomassa mitjançant el balanç de carboni. Davant aquest impediment, es va decidir abandonar aquesta tècnica d'estimació abans de buscar/desenvolupar algun sistema de mesura en línia d'aquest component, ja que aquest esforç no era garantia d'èxit. A més, l'experiència davant de cultius d'aquest tipus apunta que com més variables intervinguin en el càlcul o l'estimació d'algun paràmetre, menys robust es aquest.

Una altra possible solució més senzilla passa per estimar la concentració de biomassa en funció d'algun paràmetre estretament relacionat amb el creixement. Per exemple, es pot establir un lligam entre la densitat cel·lular i la velocitat de consum de base per controlar el pH. És conegut que l'activitat cel·lular modifica la concentració de protons al medi extracel·lular. Segons (Galvanauskas et al., 1998) la relació entre ambdues variables, per un cultiu en semicontinu, pot ser del tipus,

$$BCR = \lambda_1 \cdot \mu \cdot X + \lambda_2 \cdot \frac{F}{V} \quad \text{eq. 4.10}$$

on

BCR: Velocitat de consum de base (Base Consumption rate) ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

λ_1 i λ_2 : Constants.

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

X: Concentració de biomassa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

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

V: Volum de cultiu (l)

Per tant, només amb el valor de la BCR, el cabal addicionat (F), el volum de cultiu (V) i el valor de la biomassa a l'inici del cultiu (X_0) es possible, mitjançant la senzilla resolució d'una equació diferencial, conèixer la densitat cel·lular en qualsevol moment.

Ara bé, l'estimació de la biomassa a partir de la base consumida no està exempta d'importants limitacions i problemes, moltes d'elles per causes mecàniques o en l'error de càlcul del cabal de base addicionat. Per exemple, l'aparició de bombolles en el tub d'addició o l'augment de la pressió dins el tanc alteren el bon funcionament d'aquesta tècnica, ja que no s'estableix la correspondència entre el volum real addicionat i el registrat per a la bomba d'alimentació. També es desaconsella la seva utilització en cultius de llarga durada o quan es treballi sota condicions de limitació d'oxigen. En aquests casos la relació entre el cabal de base i el creixement de biomassa pot alterar-se significativament.

En la mateixa direcció, es troben mètodes basats en l'estimació de la densitat cel·lular en funció del calor produït/consumit del sistema o per cultius aeròbics mitjançant el seguiment de la variació de l'oxigen dissolt a la fase líquida (Luvenova et al., 2003). Aquesta tècnica però està estretament subjecte a les condicions ambientals d'operació.

Finalment, una de les tècniques més emprades per a l'estimació de la biomassa és la utilització de la mesura de la composició dels gasos de sortida. La seva principal virtut és que es tracta d'un sistema fiable, senzill i força sensible.

Estan descrites a la bibliografia (Zeng et al., 1991) les possibles relacions entre l'evolució de la concentració de biomassa amb algunes de les variables deduïdes de la concentració de gasos de sortida (CER, OUR o RQ). Moltes d'elles són però empíriques, sense un fonament teòric, on s'aproximen les relacions amb equacions de tipus potencials, exponencial o logarítmiques.

A l'igual que en el cas de la base, també es pot utilitzar un model teòric de dos paràmetres que relacioni la velocitat de producció de diòxid de carboni (CER) amb la concentració de biomassa. L'interpretació de l'equació 4.11 indica que el CO_2 produït per a la cèl·lula prové de dues vies clarament diferenciades. Un primera, matemàticament expressada pel terme $Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \mu \cdot X$, on s'associa la producció de diòxid de carboni al creixement mitjançant el rendiment $Y_{\text{CO}_2/X}$, que es considera constant al llarg de la fermentació. I una segona part, indicada pel terme $m \cdot X$ indica la producció de CO_2 no associada al creixement, m és anomenat el coeficient de manteniment.

$$CER = Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \mu \cdot X + m \cdot X \quad \text{eq. 4.11}$$

On

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

$Y_{\text{CO}_2/X}$: Rendiment diòxid de carboni – biomassa ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1}$).

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

X : Concentració de biomassa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

m : Coeficient de manteniment ($\text{mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Atès que es disposa de la mesura de la producció de diòxid de carboni en línea, força sensible i fiable, sembla ser que aquesta és la millor alternativa per a l'estimació de la concentració de biomassa.

Es podria pensar que a l'igual que utilitzar la CER es pot provar de fer-ho, seguint el mateix procediment, amb l'OUR (Oxygen Uptake Rate) o velocitat de consum d'oxigen, però no és així. La variació constant de la concentració d'oxigen dissolt al medi de cultiu provoca que la mesura de l'OUR quedi falsejada. També cal assenyalar que la variació en tant per cent de la concentració d'oxigen és menor que en el cas del diòxid de carboni, per tant la mesura de l' O_2 té una menor sensibilitat. En el cas del CO_2 , com s'ha demostrat a l'apartat 3.7, si es manté el pH constant durant la fermentació, els nivells de diòxid de carboni dissolt a la fase líquida es poden considerar constants, i per tant que no afecten a la seva mesura en el corrent gasós de sortida. Per tant, queda justificada l'elecció de la CER principalment per la fiabilitat.

El primer pas per caracteritzar el model de mesura, es trobar el valor del rendiment ($Y_{\text{CO}_2/X}$) i coeficient de manteniment (m) que relaciona la velocitat de producció de diòxid de carboni amb el creixement. Cal esperar d'aquests dos valors que siguin positius, ja que un increment de la CER suposa un augment de biomassa

i/o velocitat específica de creixement (variables directament proporcionals). Per al valor del coeficient de manteniment, m , és coherent pensar que l'activitat del microorganisme no associat al creixement comporti un mínim consum energètic i per tant una petita producció de CO_2 .

Sota unes condicions de cultiu similars es considera que aquests dos paràmetres són o es poden aproximar a valors constants. Com es podrà comprovar més endavant, aquesta aproximació està subjecte a diferents restriccions i depèn fortament d'alguna de les variables del cultiu. Per exemple, el rendiment varia fortament quan es canvia la font de carboni o el fenotip (Mut^+ o Mut^s) de la soca de *Pichia pastoris* utilitzada.

Per tant, el pas previ a la utilització d'aquest sistema d'estimació és el calibratge del sistema, és a dir, trobar per cadascuna de les condicions, una parella de valors que relacioni la velocitat de producció de diòxid de carboni (CER) amb el creixement. Això implica la realització de diferents fermentacions a partir de les quals es puguin establir els valors del rendiment i el coeficient de manteniment que després es validaran amb un altre cultiu no utilitzat per aquest càlcul.

De les diferents formes de cercar les constants es va proposar en primer lloc emprar un sistema de minimització de funcions basat en l'algorisme de Nealder-Mead (Lagarias et al., 1998). La funció a minimitzar era l'error entre l'estimació i els valors reals de la biomassa mesurats en moments puntuals de la fermentació. Es va observar que la solució depenia fortament dels valors inicials de partida de $Y_{\text{CO}_2/X}$ i m del model. Es van trobar nombroses parelles de valors dels paràmetres del model que aconseguien minimitzar l'error de la funció objectiu.

Consultant la bibliografia es va trobar una tècnica molt més senzilla (Beluhan et al., 1995), on a partir de la manipulació matemàtica del model de mesura s'aconseguia obtenir un únic parell de valors del rendiment i el manteniment. El tractament matemàtic difereix segons l'estratègia de cultiu emprada com es detalla a continuació.

Matemàticament, es pot agrupar el model de mesura (eq. 4.11) com:

$$\text{CER} = (Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \mu + m) \cdot X \quad \text{eq. 4.12.}$$

Utilitzant l'equació de balanç de biomassa per un cultiu en discontinu

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{eq. 4.13.}$$

I substituint l'eq.4.13 en l'e. 4.12 $\text{CER} = (Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \mu + m) \cdot X$ eq. 4.12. s'obté:

$$\text{CER} = Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \frac{dX}{dt} + m \cdot X \quad \text{eq. 4.14}$$

Multiplicant pel diferencial de temps (dt),

$$\int \text{CER} dt = Y_{\text{CO}_2/X} \cdot \int dX + m \cdot \int X dt \quad \text{eq. 4.15}$$

I finalment dividint per $\int Xdt$, s'obté l'expressió linealitzada del model de mesura.

$$\frac{\int CERdt}{\int Xdt} = Y_{CO_2/X} \cdot \frac{\int dX}{\int Xdt} + m \quad \text{eq. 4.16}$$

Utilitzant les dades en línia de la CER ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) i les dades "off-line" de concentració de biomassa ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) es pot representar $\frac{\int CERdt}{\int Xdt}$ en funció de $\frac{\int dX}{\int Xdt}$, trobant per mínims quadrats els paràmetres $Y_{CO_2/X}$ i m .

Com es comenta a l'apartat 4.1, només s'han realitzat els cultius en discontinu del fenotip Mut⁺ de *Pichia pastoris*, ja que la velocitat específica de creixement de la soca Mut^s, utilitzant metanol com a única font de carboni, és excessivament baixa.

En aquest cas s'ha comprovat que el nombre de còpies del gen de ROL incloses en la soca no afecten la relació entre la CER i el creixement. Per tant, els valors de $Y_{CO_2/X}$ i m no es veuen afectats en funció del nombre de còpies, tot i que el comportament en el cultiu sigui sensiblement diferent.

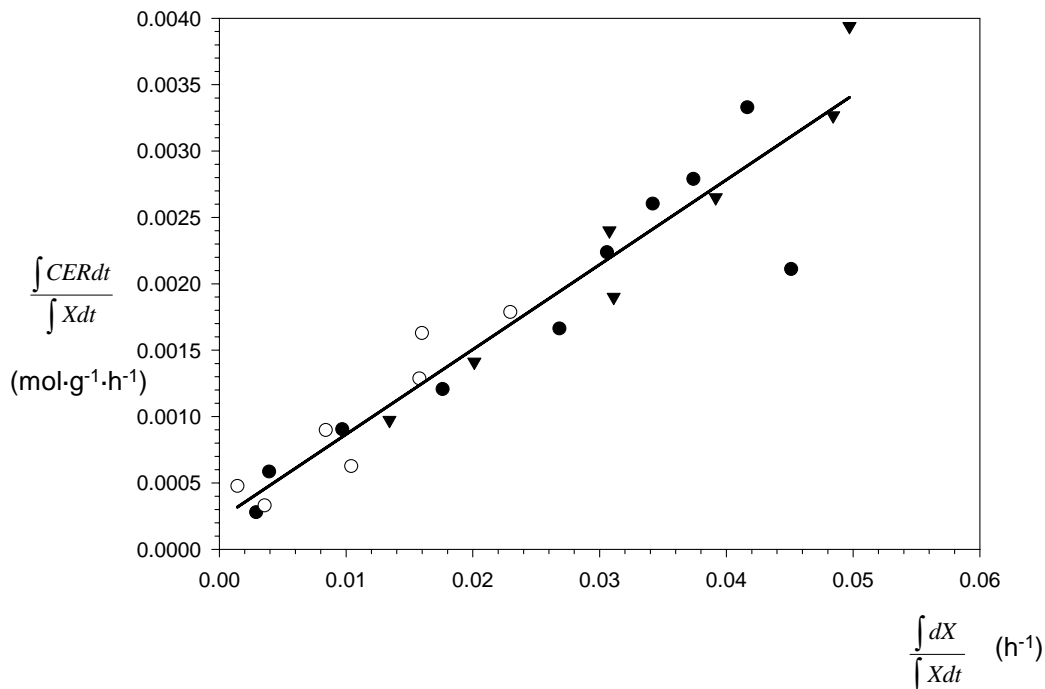


Figura 4.61. Linealització del model de mesura per l'obtenció del rendiment i coeficient de manteniment. Els diferents símbols indiquen els cultius en discontinu utilitzats pel càlcul

Realitzant la regressió lineal per mínims quadrats s'han obtingut els següents valors:

$$Y_{CO_2/X}: 6.39 (\pm 0.42) \cdot 10^{-3} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1}$$

$$m: 2.26 (\pm 1.18) \cdot 10^{-4} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$r^2: 0.9113$$

S'ha comprovat la validesa d'aquestes dos paràmetres a partir del perfil de la CER d'un nou cultiu. La resolució d'una senzilla equació diferencial (eq. 4.17) deduïda a partir del model de mesura (eq. 4.11) i l'equació de creixement cel·lular (eq. 4.13) permet conèixer per cada interval de temps l'evolució de la biomassa.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{CER - m \cdot X}{Y_{CO_2/X}} \quad \text{eq. 4.17}$$

Com a condició inicial només cal saber quina és la concentració de biomassa a l'inici, $X(t=0)$. I tornant a utilitzar l'equació 4.13 es pot calcular directament el valor per cada interval de temps la velocitat específica de creixement.

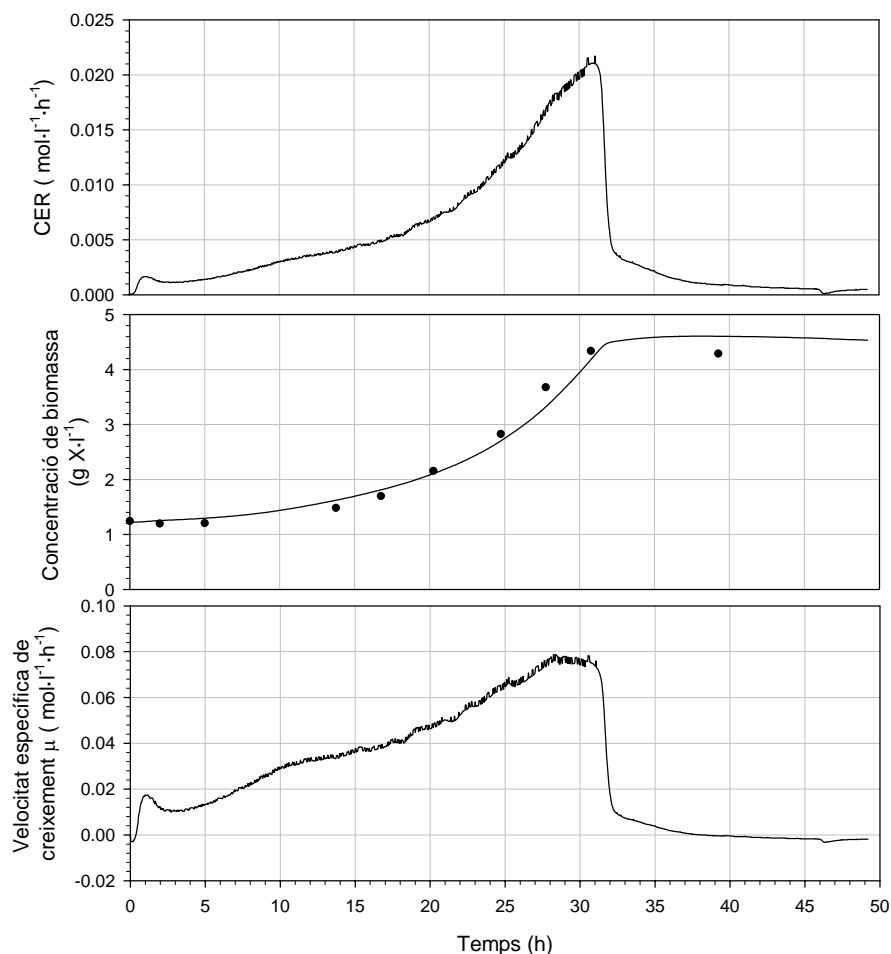


Figura 4.62. Validació del model per un cultiu en discontinu a partir de valors calculats de $Y_{CO_2/X}$ i m .

Com es mostra a la figura 4.62, a partir del perfil de la CER es calcula l'evolució de la biomassa que prediu el model (línia contínua) i es pot comparar amb els valors mesurats a diferents punts de la fermentació (simbolitzat per punts). Situat a la part inferior de la figura s'observa l'evolució de la velocitat específica de creixement deduïda de la concentració de biomassa.

La semblança entre l'evolució del valor estimat pel model i el valor mesurat es prou correcte. Observant l'escala es pot veure que els errors són poc significatius, tot i que a la part final del cultiu la desviació es fa més evident. Aquest fenomen es dona quan s'ha exhaurit completament el metanol en el medi.

Com s'ha exposat repetidament en apartats anteriors, l'altra estratègia de cultiu utilitzada en aquest treball és en semicontinu. També es possible aplicar el model de mesura per aquesta estratègia, tot i que l'estimació difereix una mica del cas anterior, com es veurà a continuació.

A l'inici d'aquest apartat es referència la forta dependència dels paràmetres del model de mesura ($Y_{CO_2/X}$ i m) amb la font de carboni utilitzada pel creixement. Aquesta observació és especialment evident en el cas del cultiu semicontinu, on es pot contrastar aquesta diferència mantenint la resta de condicions idèntiques. I es que, és lògic pensar que el nombre de mols de diòxid de carboni produïts per mol de biomassa generat canvia segons la font de carboni emprada. Les rutes metabòliques seguides per a la síntesi de cadascuna de les fonts són diferents, així com els seus rendiments energètics.

Cal recordar que el cultiu en semicontinu es pot diferenciar clarament en tres etapes; una primera amb un creixement en discontinu amb una elevada concentració de glicerol inicial, seguit d'una etapa de transició amb l'alimentació simultània de glicerol i metanol al medi, i una etapa final on s'indueix la producció addicionant únicament metanol.

D'aquestes tres etapes se n'han pogut deduir dos relacions entre la CER i el creixement, és a dir, que ambdós parelles de valors de constants del model de mesura és possible estimar la biomassa existent al llarg de tot el cultiu.

Atesa la coneguda preferència de *Pichia pastoris* per consumir en primer lloc el glicerol davant l'existència conjunta amb metanol al medi, es va considerar que a l'etapa de transició, el consum de metanol era mínim i consegüentment menyspreable. Per tant, es simplifica el cultiu en dos trams, un primer que és la suma de l'etapa discontinua i de transició on es considera que l'única font de carboni consumida és glicerol i una segona on només es consumeix el metanol. La relació entre la CER i la concentració de biomassa canvia en començar l'etapa d'inducció, on la font de carboni passa a ser només el metanol.

Els paràmetres deduïts per a l'etapa de consum de glicerol són vàlides per qualsevol fenotip de *Pichia pastoris*. Per tant, la parella de constants del model per a l'etapa discontinua i de transició és la mateixa sigui la soca Mut^+ o Mut^s , ja que el seu comportament és exactament el mateix davant la utilització de glicerol com a font de carboni.

Les diferències venen a l'etapa d'inducció on s'evidencia la naturalesa de cadascun dels fenotips davant la utilització de metanol. Per tant, s'haurà de buscar independentment una parella de valors del model per les soques Mut^s i Mut^+ . Com s'ha mostrat en el model de mesura per als cultius en discontinu amb metanol, el nombre de còpies de gen de ROL a la soca no té un efecte directe sobre les constants $Y_{CO_2/X}$ i m .

Amb la mateixa sistemàtica que en el cas que el cultiu discontinu es linealitzava el model de mesura per tal de trobar els paràmetres constants del model. L'única variació és en substituir al model de mesura (eq. 4.11) l'equació de balanç de biomassa, ja que a aquesta per un cultiu en semicontinu cal afegir-li el terme d'acumulació.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F}{V} \cdot X \quad \text{eq. 4.18.}$$

De la substitució de l'equació 4.18 en el model de mesura (eq. 4.11) s'obté la següent expressió:

$$CER = Y_{CO_2/X} \cdot \left(\frac{dX}{dt} + \frac{F \cdot X}{V} \right) + m \cdot X \quad \text{eq. 4.19}$$

Si es multiplica pel diferencial de temps (dt) s'obté:

$$\int CER dt = Y_{CO_2/X} \cdot \left(\int dX + \int \frac{F \cdot X}{V} dt \right) + m \cdot \int X dt \quad \text{eq. 4.20}$$

Si es divideix per $\int X dt$:

$$\frac{\int CER dt}{\int X dt} = Y_{CO_2/X} \cdot \left(\frac{\int dX + \int \frac{F \cdot X}{V} dt}{\int X dt} \right) + m \quad \text{eq. 4.21}$$

Per tant si linealitzo $\frac{\int CER dt}{\int X dt}$ en funció de $\left(\frac{\int dX + \int \frac{F \cdot X}{V} dt}{\int X dt} \right)$ es poden trobar els

paràmetres $Y_{CO_2/X}$ i m , constats del model. D'aquesta forma es pot estimar la biomassa en línia a partir d'una mesura indirecta com és la CER també per un cultiu en semicontinu.

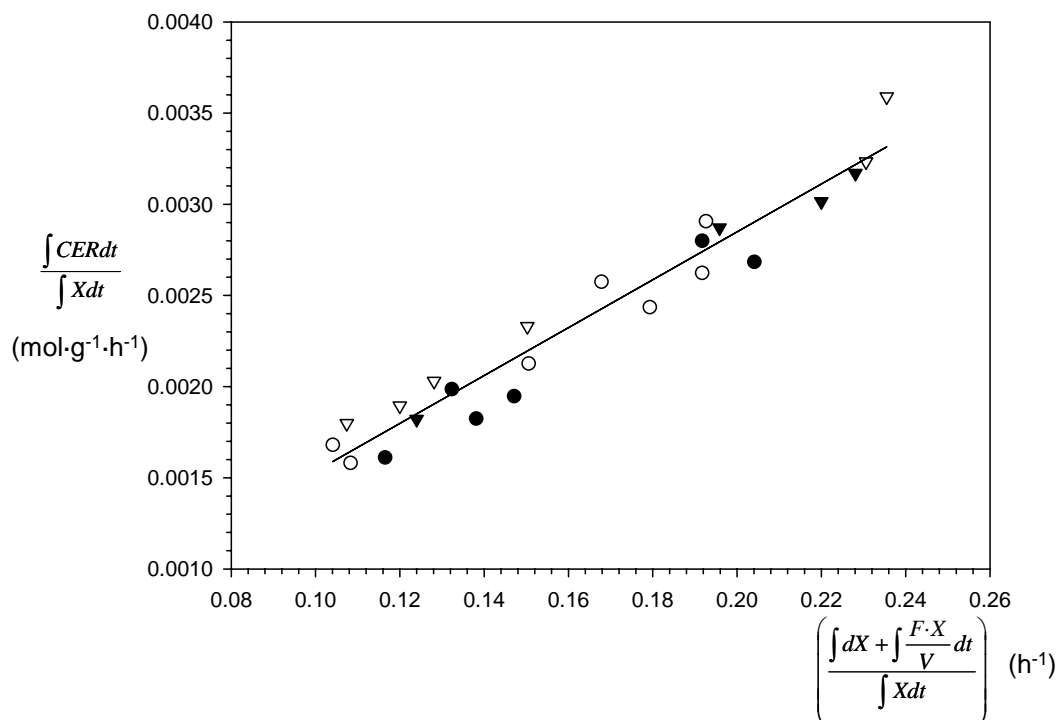


Figura 4.63. Linealització del model de mesura per un cultiu en semicontinu quan s'utilitza el glicerol com a font de carboni. Cada tipus de símbol és característic d'una fermentació diferent.

Per al càlcul dels paràmetres principals del model d'estimació de biomassa per al tram de fermentació on es considera que l'única font de carboni consumida és el glicerol (etapes de discontinu i transició del cultiu), s'han utilitzat cultius realitzats amb soques d'ambdós fenotips (Mut^s i Mut^+). Com es pot observar a la figura 4.63 tot i les petites desviacions, les dades estan clarament alineades com era d'esperar.

Els resultats de les constants de la linealització són:

$$Y_{CO_2/X}: 1.31(\pm 0.07) \cdot 10^{-2} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1}$$

$$m: 2.22(\pm 1.18) \cdot 10^{-4} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$r^2: 0.9443$$

Aquests són els paràmetres del model en l'etapa discontinua i de transició d'un cultiu en semicontinu independentment de la soca de *Pichia pastoris* amb la qual es realitzi el cultiu.

Quan el glicerol del cultiu s'exhaureix, llavors cal canviar el model de mesura en funció del fenotip utilitzat, Mut^+ o Mut^s . A continuació s'ha realitzat, utilitzant el mateix procediment matemàtic anterior, el càlcul del model de mesura per la zona d'inducció quan el fenotip és de tipus Mut^s .

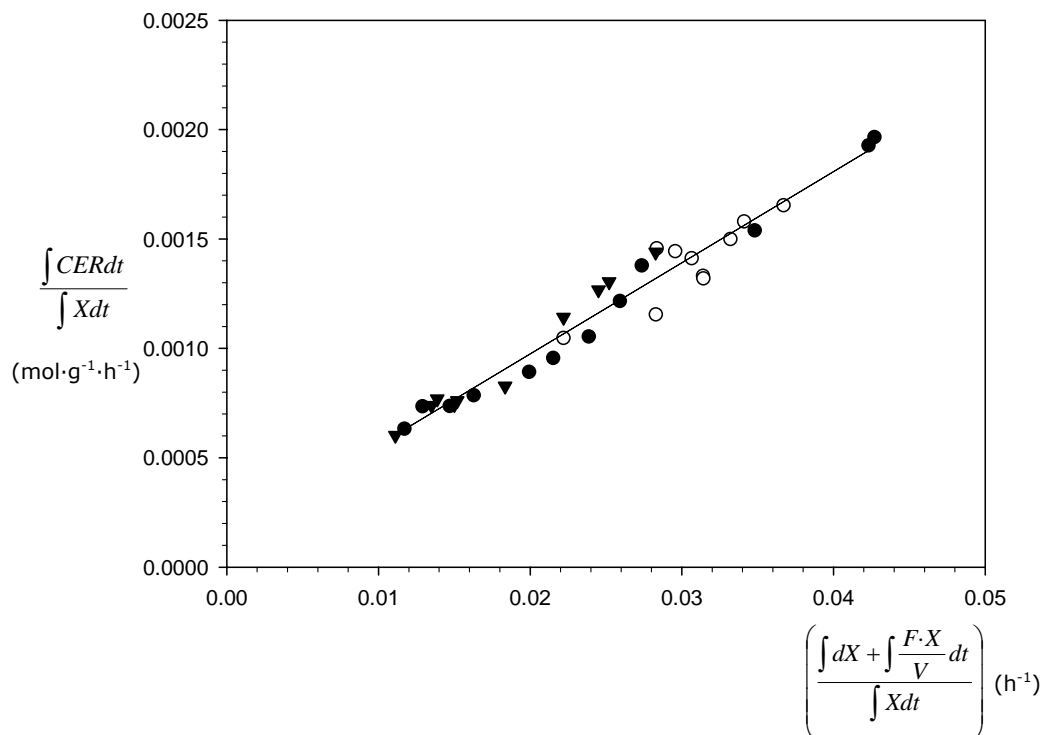


Figura 4.64. Caracterització del model de mesura per un cultiu en semicontinu durant la fase d'inducció amb metanol i pel fenotip Mut^s . Cada tipus de símbol pertany a una fermentació diferent.

Lògicament, les dades emprades són de la fase d'inducció de cultius semicontinus realitzats amb soca de tipus Mut^s , amb independència del nombre de còpies.

El resultat del rendiment i el coeficient de manteniment del model de mesura per una soca del tipus Mut^s utilitzant metanol com a únic substrat, és el següent:

$$Y_{CO_2/X}: 4.17(\pm 0.16) \cdot 10^{-2} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1}$$

$$m: 1.41(\pm 0.41) \cdot 10^{-4} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$r^2: 0.9596$$

Així doncs, aplicant el model per a un cultiu en semicontinu per a una soca de tipus Mut^s, s'utilitzaran dos parelles de paràmetres del model d'estimació, uns per quan hi hagi glicerol al medi, i seguidament per quan únicament hi hagi metanol. A la figura 4.65 es presenta la validació del model amb un cultiu semicontinu d'aquestes característiques.

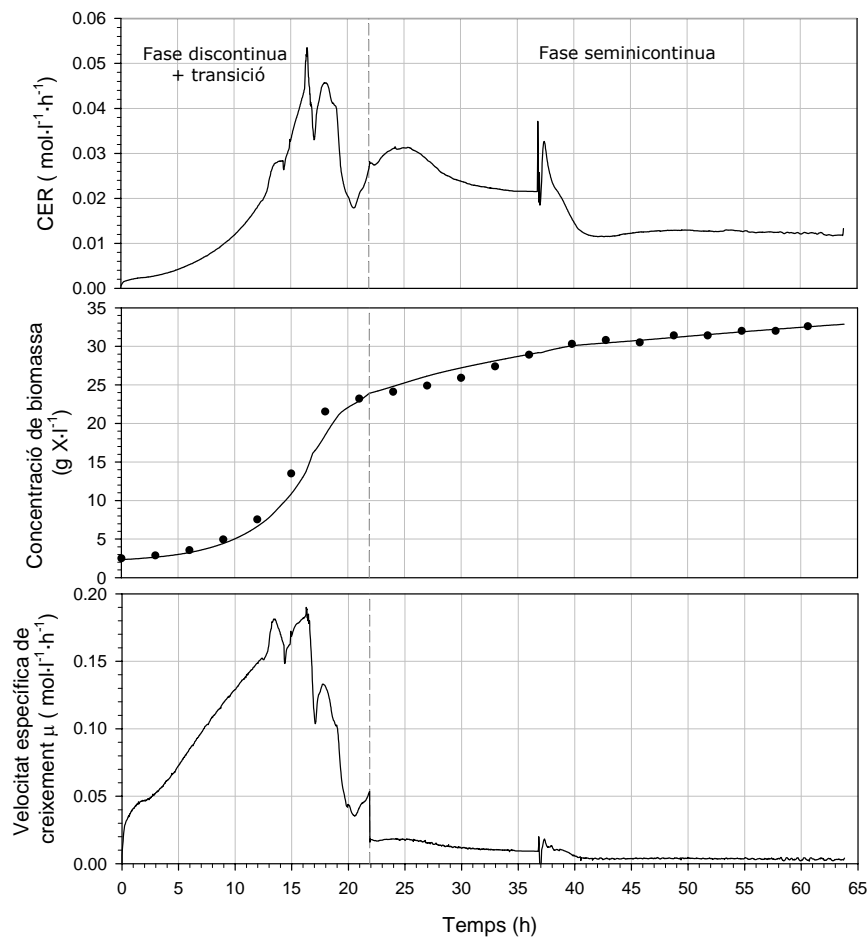


Figura 4.65. Validació del model de mesura per a un cultiu amb una soca Mut^s. De la part superior a la inferior es pot observar la CER, la concentració de biomassa estimada (línia contínua) i real (símbols). A la part final, l'evolució de la velocitat específica de creixement calculada a partir del model.

En observar amb detall l'evolució del model de mesura es fàcil adonar-se que en el període de canvi de font de carboni (etapa de transició i principi d'inducció), entre les 17 i 30 h., és quan l'error en l'estimació és més notable. Tot i això, l'aproximació del model es prou bona i suficientment precisa, complint amb escriure la seva principal funció.

És inevitable però, com es pot comprovar en el perfil de la velocitat específica de creixement, l'aparició d'una discontinuïtat en el moment de canvi de paràmetres (en aquest cas sobre les 22 h.) del model d'estimació. És en el moment que acaba l'etapa de transició quan s'apliquen els nous paràmetres del model, en el moment que hi ha el canvi de font de carboni.

És clar que la velocitat específica de creixement no realitza aquest canvi d'una forma tant brusca, tot i que el que indica és que potser en un interval de temps més llarg hi ha un canvi important d'aquesta variable.

Per intentar suavitzar-ho es poden aplicar vèries solucions com que el canvi d'uns paràmetres del model als següents es faci d'una forma progressiva. No obstant això, el criteri o forma de realitzar-ho no es pot fonamentar en cap base teòrica amb les dades que es disposa. La recollida de més informació en aquest període de temps potser permetria conèixer l'evolució dels paràmetres del model en aquest canvi de font de carboni.

És però incoherent emprar un model de mesura senzill de dos paràmetres i anar variant els paràmetres constantment. Cal tenir clar que la funció principal d'aquest model és l'estimació de la biomassa en línia d'una forma ràpida a partir de la mesura directe de la producció de diòxid de carboni. No es creu prioritari buscar cap mecanisme per suavitzar aquest canvi de paràmetres.

Finalment, la linealització per al fenotip Mut^+ a partir dels valors obtinguts a la fase d'inducció de quatre fermentacions es presenta a la figura 4.66.

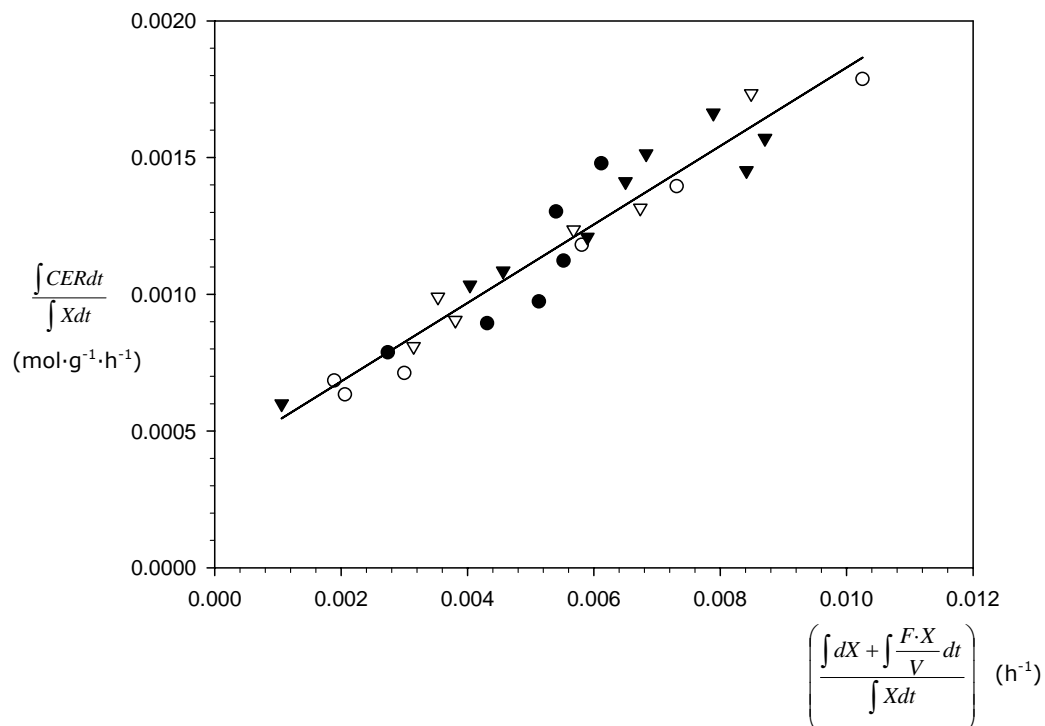


Figura 4.66. Linealització del model de mesura per un cultiu en semicontinu durant la fase d'inducció amb metanol i pel fenotip Mut^+ . Cada símbol pertany a una fermentació diferent.

Els valors obtinguts de la linealització són els següents:

$$Y_{CO_2/X}: 1.41(\pm 0.08) \cdot 10^{-1} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1}$$

$$m: 3.94(\pm 0.48) \cdot 10^{-4} \text{ mol CO}_2 \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$r^2: 0.9231$$

Aplicant aquests valors en un cultiu en semicontinu per a una soca de fenotip Mut⁺, s'obté l'estimació de la concentració biomassa i de la velocitat específica de creixement. A l'igual que per a la soca Mut^s, es realitzarà un canvi de les constants un cop s'hagi exhaurit el glicerol del medi (al final de l'etapa de transició). La figura 4.67 mostra com l'estimació de la densitat cel·lular a partir del model (línia contínua a la gràfica central) s'aproxima a les dades experimentals.

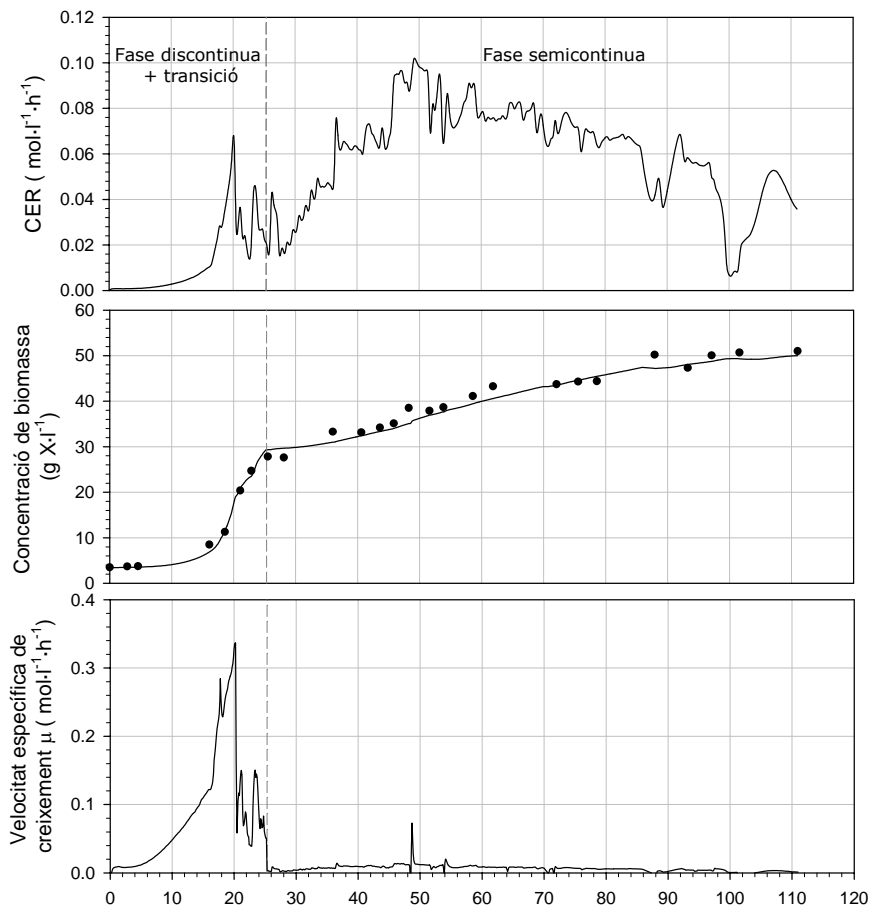


Figura 4.67. Validació del model de mesura per un cultiu amb una soca Mut⁺.
El model de mesura basat amb el valor de la CER estima l'evolució de la biomassa i per , la velocitat específica de creixement.

La fi de l'etapa de transició, moment on es canvien els paràmetres del model està situat sobre les 23 h. de cultiu. La baixada brusca de la μ a nivells molt inferiors és causada en part pel canvi de paràmetres del model. No obstant això, també s'observa proper a aquest punt del cultiu, un evident canvi de tendència en l'evolució de la biomassa.

La comparació dels paràmetres del model en funció de la soca emprada, el tipus d'estratègia de cultiu i el fenotip de la soca seleccionat pot donar informació complementària sobre el comportament del microorganisme.

Font de C	Soca	Estratègia	$Y_{CO_2/X}$	m
Metanol	Mut ^s	Discontinú	--	--
		Semicontinu	$4.17(\pm 0.16) \cdot 10^{-2}$	$1.41(\pm 0.41) \cdot 10^{-4}$
	Mut ⁺	Discontinú	$6.39(\pm 0.4) \cdot 10^{-2}$	$2.26(\pm 1.18) \cdot 10^{-4}$
		Semicontinu	$1.41(\pm 0.08) \cdot 10^{-1}$	$3.94(\pm 0.48) \cdot 10^{-4}$
Glicerol	Ambdues	Disc + Semic.	$1.31(\pm 0.07) \cdot 10^{-2}$	$2.22(\pm 1.18) 10^{-4}$

Taula 4.15. Recull de paràmetres del model d'estimació segons la font de carboni, la soca i l'estratègia de cultiu utilitzada.

El coeficient de manteniment (m) en tots els casos és del mateix ordre i força petit, assenyalant que la producció de CO₂ no associada al creixement no depèn excessivament de la font de carboni, l'estratègia o soca utilitzada. L'interval de confiança calculat per aquest paràmetre apunta que l'error en el seu càlcul és significatiu, sent en algun cas del 50 % del seu valor.

S'han realitzat algunes proves d'estimació de la biomassa amb el model de mesura emprant els valors extrems de l'interval de confiança del coeficient de manteniment tal i com es mostra a la figura 4.68.

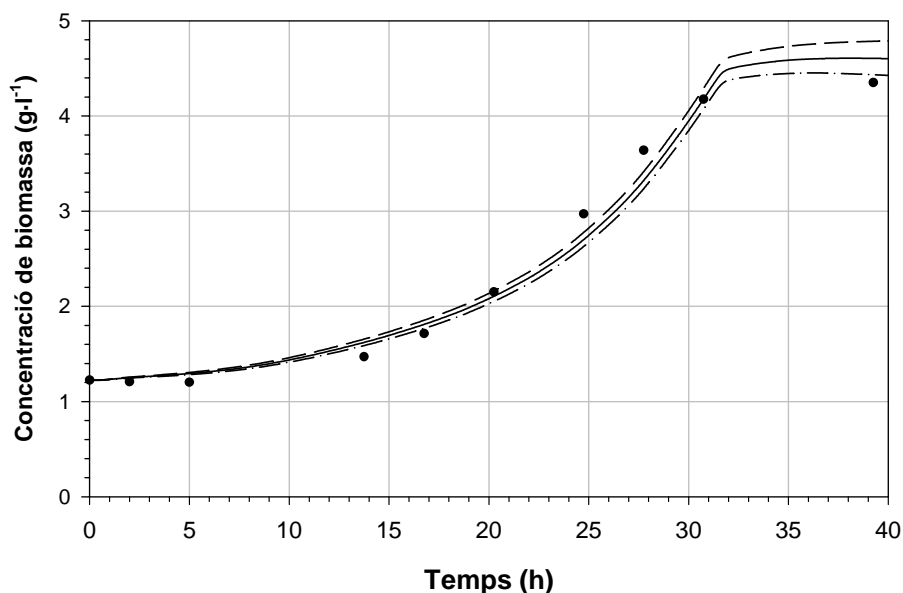


Figura 4.68. Influència del paràmetre de manteniment del model de mesura sobre l'estimació de biomassa per a un cultiu en discontinu.

Mantenint el valor del rendiment ($Y_{CO_2/X}$: $6.39 \cdot 10^{-2}$) constant per als tres casos, s'ha calculat l'estimació del model de mesura per tres valors del coeficient de manteniment, el valor mig i els dos extrems de l'interval de confiança. Com es mostra a la figura 4.68, amb una línia contínua es simbolitza quan el model té un valor de m: $2.26 \cdot 10^{-4}$, amb una línia discontinua m: $1.08 \cdot 10^{-4}$ ($2.26 \cdot 10^{-4} - 1.18 \cdot 10^{-4}$) i simbolitzat amb una tram de línia i punt intercalats quan m: $3.44 \cdot 10^{-4}$ ($2.26 \cdot 10^{-4} + 1.18 \cdot 10^{-4}$).

És clar que durant la fase de creixement la influència del coeficient de manteniment és menor, les diferències entre els tres valors és poca. És quan s'exhaureix el metanol, sobre les 30 h. de cultiu, que en baixar la velocitat de creixement a valors propers a zero el coeficient de manteniment té una especial importància dins el model. És precisament en aquesta part final del cultiu on es

detecten les majors diferències. Veient però l'escala de valors on es mou aquest error es pot afirmar que es poc significatiu.

Així doncs, tot i que el valor del coeficient de manteniment oscil·la entre uns intervals de confiança elevats en comparació amb el valor mig, no afecta significativament l'estimació del model.

Pel que fa el rendiment del diòxid de carboni, el càlcul del seu valor es mou en uns estrets intervals de confiança, on en cap cas es supera un 7% d'error.

Però a diferència del coeficient de manteniment, el valor del rendiment té una forta dependència en funció de l'estratègia, soca i font de carboni utilitzada.

Aquest valor és directament proporcional a la necessitat energètica de la soca per al seu creixement. Si s'analitza el sentit físic dels quatre valors, es fàcil adonar-se que el valor més petit, i amb diferència, és el rendiment quan la font de carboni és el glicerol. Aquest fet indica que per cada gram de biomassa generat s'han produït menys mols de diòxid de carboni, senyal inequívoc que les necessitats energètiques són menors que utilitzant el metanol.

Si es comparen els rendiments utilitzant com a substrat el metanol, hi ha clares diferències del valor del rendiment quan l'estratègia de cultiu es en discontinu o semicontinu. Cal assenyalar abans de treure possibles conclusions, que les condicions d'operació en els dos cultius són força diferents (velocitat d'agitació, cabals d'aire, etc.). A més, la composició del medi i els nivells de biomassa aconseguits són totalment diferents. Per aquests motius no es creu convenient comparar aquests valors, ja que existeixen masses diferències que estan subjectes a nombroses variables.

Ara bé, el que si es creu comparable, ja que les condicions d'operació, estratègia de cultiu i la resta de variables (composició medi de cultiu, etc...) són idèntiques, són els rendiments dels cultius en semicontinu de diferent fenotip. El que sorprèn en comparar aquests dos valors és la seva gran diferència, sent més de tres vegades superior el valor per la soca Mut+. Es podria afirmar que, com s'observa experimentalment, una velocitat específica de consum superior (q_s) està estretament lligada amb un major malbaratament energètic. I és que el comportament de les soques de diferent fenotip (Mut⁺ o Mut^s) davant la mateixa concentració de metanol al medi.

4.3.2. CONTROL DE LA CONCENTRACIÓ DE SUBSTRAT

Com s'ha explicat detalladament a l'apartat 4.1, la producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris* es caracteritza per a la utilització de metanol com a substrat inductor de la producció de la proteïna d'interès. Aquest microorganisme utilitza el gen promotor alcohol oxidasa (AOX) per a l'expressió de gens aliens, i aquest és induït per metanol i reprimit per la presència de glicerol en excés al medi.

Com s'ha demostrat en apartats anteriors, la concentració de metanol al medi de cultiu té un efecte directe sobre el creixement i producció de proteïna per part del microorganisme. Concentracions de metanol superiors als 10 g·l⁻¹ són tòxiques per *Pichia pastoris*, aturen el creixement i la inducció de proteïna.

Un dels grans reptes és aconseguir mantenir durant tota la fase d'inducció els nivells de metanol per sota dels 10 g·l⁻¹. No obstant això, dins el rang de 0 a 10 g·l⁻¹ de substrat inductor en el medi, els efectes sobre la producció de proteïna heteròloga varien. Per a cultius de *Pichia pastoris* està demostrat que els millors

resultats a nivell de producció s'obtenen per a una concentració de metanol entre 0 i $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Cereghino et al., 2001).

Així doncs, davant la necessitat de mantenir constant la concentració de metanol es poden aplicar diferents tècniques d'origen força variat. En els primers estadis d'investigació amb aquest tipus de cultiu, el control es porta a terme de forma manual, extraient amb força freqüència mostres i mesurant la concentració de metanol. A partir d'aquest resultat es varia el cabal d'alimentació del substrat en funció del punt de consigna fixat.

Ràpidament però, es tendeix a buscar una tècnica que permeti mantenir la concentració de metanol constant sense l'excessiva supervisió i manipulació per part de la persona responsable del cultiu. A més, el clar benefici de disposar d'un sistema autònom i que a més permeti la comparació entre cultius per la seva bona reproductibilitat, fan que es tendeixi a utilitzar tècniques amb aquestes característiques. Les més emprades són, segurament per la seva senzilla implementació, la del control d'oxigen dissolt (pO_2) i els models d'addició, dels quals a continuació se'n detallen les principals característiques.

Control de l'oxigen dissolt (pO_2)

Aquesta tècnica es basa en l'aproximació que un consum constant d'oxigen per part del microorganisme implica que la concentració de metanol al medi es mantingui constant. És a dir, s'estableix una relació directa entre concentració de substrat inductor al medi i el consum d'oxigen.

Així doncs, utilitzant aquesta mesura indirecte es va modulant el cabal d'entrada de metanol per tal de mantenir un determinat valor fix de l'oxigen dissolt al medi. Un augment del pO_2 a la fase líquida s'interpreta com un exhauriment del substrat al medi, i en conseqüència s'actua incrementant un petit tant per cent el cabal d'addició (escollit segons l'experiència). Com que no s'espera actuar en la direcció contrària, ja que, en teoria, la demanda de substrat s'ha d'incrementar per l'augment constant de biomassa, en cap moment es baixa el cabal a addicionar.

El principal problema d'aquesta tècnica es que si s'arriba a concentracions suficientment elevades de substrat perquè provoquin un efecte tòxic sobre el microorganisme es manifesta amb una baixada de consum de metanol. Aquest fenomen implica directament un augment de l'oxigen dissolt i segons la llei de control, s'actua incrementant el cabal d'alimentació de substrat inductor. Evidentment, l'augment de cabal puja la concentració de metanol i agreuja el problema de toxicitat.

Un altre inconvenient és el rang d'oscil·lació de la concentració emprant aquesta tècnica, la baixa sensibilitat dels nivells d'oxigen a la fase líquida davant la variació de la concentració de substrat fan que el rang de control sigui massa ampli (aproximadament $\pm 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Com a conseqüència, s'ha comprovat en treballs dins el mateix grup d'investigació que la reproductibilitat dels cultius emprant aquesta tècnica és molt baixa. Tot i mantenir els nivells d'oxigen dissolt constants al mateix valor, en cada cultiu la concentració de metanol era significativament diferent.

Com a conclusió, es pot afirmar que com es tracta d'un mètode de control basat en una mesura indirecte (pO_2), comporta una sèrie de problemes i desviacions que no garanteixen el seu bon funcionament.

Models d'addició

Un altra alternativa per mantenir amb més o menys exactitud la concentració de metanol constant al medi, és utilitzar un model matemàtic que approximi el millor possible el comportament del microorganisme en cada moment. Per tant, sense tenir en compte l'evolució real del cultiu i seguint un perfil teòric preprogramat, s'afegeix un cabal d'alimentació de metanol.

Aquesta tècnica implica en primera instància un complert estudi de la fermentació per aconseguir un model matemàtic que descrigui prou correctament l'evolució temporal del cultiu. Tot i que, depenent del tipus de substrat i estratègia utilitzada aquesta tasca potser més o menys difícil, l'obtenció d'un bon model no és garantia d'uns bons resultats. Evidentment, si no es pot disposar d'un model prou fiable, ja no cal que es prossegueixi en el càlcul de l'equació per a l'addició de metanol.

Alguns autors han aconseguit trobar expressions matemàtiques senzilles que approximen amb força fiabilitat el comportament del microorganismes en unes delimitades condicions de treball (D'Anjou et al., 2001).

A partir de models d'aquest tipus es pot deduir de forma teòrica quin ha de ser el cabal de metanol a addicionar en cada moment per aconseguir mantenir constant aquesta variable a l'interior del bioreactor.

Si s'arriba a disposar d'un model d'addició de metanol, prou correcte a priori, hi ha nombrosos problemes que poden provocar el mal funcionament d'aquesta tècnica:

- ▶ **Dinàmica del sistema.** En utilitzar el cultiu en semicontinu per portar a terme aquestes fermentacions, es conegut que l'evolució temporal de variables com la biomassa, el consum tenen una tendència exponencial. Per tant, petits errors d'estimació o mesura en els valors inicials d'aquests models provocaran una propagació exponencial de l'error al llarg del cultiu.
- ▶ **Problemes durant el cultiu.** Qualsevol problema operacional durant el cultiu com pot ser, baixada de l'oxigen dissolt, pujada o baixada del pH, augment o disminució de la pressió, etc.. pot derivar en una desviació del perfil teòric del cultiu. Tot i que la durada d'aquests petits problemes operacionals pot ser curta, la variació de l'evolució respecte el model pot haver canviat prou perquè la diferència sigui significativa. Així doncs, al deslligar-se la fràgil relació entre el consum del microorganisme i el cabal d'alimentació la concentració de metanol pot arribar a grans desviacions del valor desitjat.

El bon funcionament d'aquesta tècnica està estretament lligada amb la bona sincronització del model amb l'evolució del cultiu, un petit desfase provoca, al cap d'un cert temps, errors irrecuperables.

El principal problema d'aquesta tècnica és que funciona totalment independent de l'evolució del cultiu, és a dir, no utilitza cap informació en línia de la fermentació per poder comprovar i corregir el model. És conegut que el control d'un procés en llaç obert, on no hi ha una retroalimentació d'alguna de les variables clau del sistema, comporta nombrosos problemes com els que s'han comentat anteriorment.

Es podria pensar que combinar un d'aquests models amb la mesura periòdica de la concentració de metanol a partir de l'extracció de mostres, per anar corregint el model constantment, podria ser una bona solució. Però, com s'ha indicat inicialment es busca una tècnica el més autònoma possible que no necessiti la contínua intervenció per part de l'usuari per al seu correcte funcionament.

Una altra possible alternativa es construir un model d'addició, en aquest cas però, que depengui de la mesura en línia d'alguna de les variables del sistema (base addicionada, concentració de gasos a la sortida, etc ..). De la mateixa manera que el control de concentració de metanol mantenint constant l'oxigen dissolt, aquest mètode també tracta de controlar la concentració de substrat mitjançant una mesura indirecte. La relació entre la mesura d'aquesta variable i el consum de metanol per part del microorganisme no és pot simplificar a una expressió matemàtica vàlida per a qualsevol condició d'operació.

Així doncs, l'ús de tècniques basades en una addició de substrat seguint el perfil d'un model matemàtic teòric comporta poques garanties d'èxit.

Control en línia de la concentració de metanol

Davant d'aquestes evidències és lògic pensar que la millor manera de controlar el metanol a l'interior del bioreactor passa prèviament per disposar d'una mesura en línia d'aquesta variable. L'aparició de diferents tipus de sensors de Metanol en línia ha facilitat el control sobre la concentració d'aquest component en el sistema. Com s'ha exposat extensament a l'apartat 4.2, es disposa d'un sistema en línia capaç de mesurar el metanol a la fase gas, relacionada amb la seva concentració a la fase líquida.

Evidentment, davant la possibilitat de disposar de la mesura directa del substrat inductor, altres alternatives basades en relacions indirectes del metanol amb altres paràmetres del sistema, deixen de tenir sentit.

Com s'ha comentat anteriorment, a l'apartat 4.1, mantenir els nivells de metanol constants a concentracions inferiors a $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ té un efecte positiu sobre la producció d'enzim d'interès. Però, per veure quina és la concentració òptima de substrat que maximitza la producció, cal que el sistema sigui capaç de mantenir-lo constant.

Plantejant com a objectiu principal mantenir constant la concentració de metanol cal buscar un algorisme de control capaç de realitzar aquesta tasca de forma autònoma.

El disseny d'un sistema de control, per senzill que sigui, ha de passar indubtablement per les següents etapes:

- ▶ **Definició de l'objectiu de control.** Com s'ha exposat repetidament, la variable a controlar és la concentració de metanol a l'interior del bioreactor.
- ▶ **Identificar les variables que poden ser mesurades i les que poden ser manipulades que estiguin involucrades amb l'objectiu de control.** La variable mesurada relacionada directament amb l'objectiu de control és la concentració de metanol en línia. Per altra banda, tot i que hi ha nombroses variables que poden tenir un efecte indirecte sobre la concentració de metanol (Ex. Cabal d'aire d'entrada o pH), la variable a manipular pel control és el cabal d'alimentació de substrat.

- **Selecció de la configuració del sistema de control.** Dels diferents tipus de configuració del sistema de control (detallats a l'apartat 1.7) s'ha escollit la més comuna, control per retroalimentació. El sistema de control es presenta esquemàticament a la figura 4.69 on es mostren en forma de blocs les diferents parts que conformen el sistema. Com es pot apreciar, el sensor mesura en línia la concentració de metanol enviant aquesta dada a l'ordinador de control. Incorporat en el programari d'aquest i seguint la llei de control desitjada per l'usuari, es calcula el cabal d'alimentació de substrat actuant sobre la microbureta automàtica.

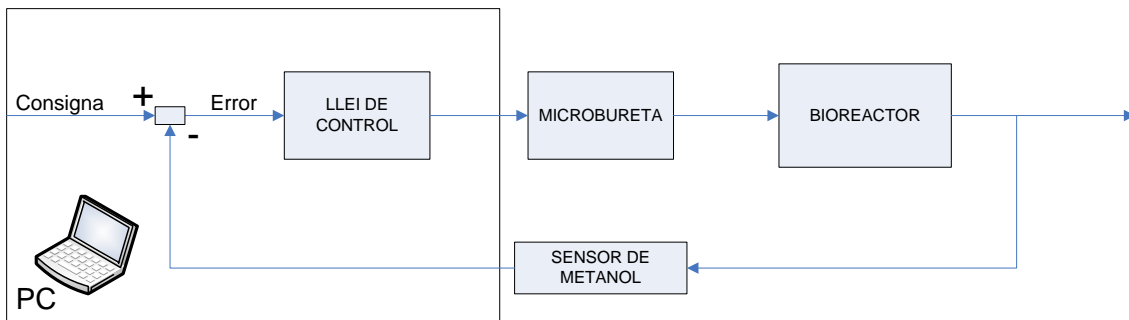


Figura 4.69. Esquema de la configuració del control de la concentració de metanol.

- **Implementació física de la instrumentació de monitorització i control.** Aquest pas es basa en la implementació dels diferents equips de mesura, controladors i dels elements finals del control. La seva elecció ha d'estar en funció de determinades característiques, com poden ser la seva fiabilitat i cost econòmic. A continuació s'especifica l'equipament que conforma el sistema de control.

- **Equip de mesura:** MC-168 (PTI Instruments, , USA).
- **Controlador:** Ordinador (Programari de monitorització i control).
- **Element final:** Microbureta Automàtica MicroBU 2031 (Crison, Alella, Espanya).

- **Disseny dels controladors.** Com a última fase del disseny del sistema de control, es decideix quin tipus de controlador i seguidament es sintonitza per adaptar-lo a les característiques del procés. Per realitzar aquesta etapa és necessari conèixer, almenys a aproximadament, el comportament dinàmic del procés. La sensibilitat de les variables controlades respecte les manipulades i la velocitat amb la qual responen aquestes son dues de les qüestions bàsiques a conèixer per dissenyar els controladors.

És en aquest última etapa de disseny on es realitzaran diferents proves amb l'objectiu de trobar un controlador que satisfaci els següents requisits:

- **Fàcil implementació:** Amb l'objectiu que les tècniques aquí desenvolupades puguin ser ràpidament adaptades a processos industrials, una de les característiques que ha de complir el sistema de

control és que es pugui adaptar ràpid i fàcilment a qualsevol sistema de diferent escala, condicions d'operació o microorganisme.

- ▶ **Fiable i robust:** Es desitja aconseguir un sistema de control que treballi en múltiples condicions. És vital disposar d'un control estable, que treballi en qualsevol condició, sense excepcions. Que en cap moment doni errors ni treballi únicament sota determinades especificacions del sistema. El sistema de control ha de ser capaç d'adaptar-se a qualsevol problema i al mateix temps reconduir el procés a les condicions desitjades.
- ▶ **Fàcil d'utilitzar:** Atesa l'experiència del grup d'investigació amb múltiples col·laboracions amb l'indústria, es coneix de primera mà les intencions i exigències del personal que hi treballa a l'hora d'utilitzar sistemes d'aquest tipus. S'ha detectat en molts casos que la desconeixença va molt lligada amb la desconfiança, per tant, sistemes de control complexos tipus caixa negra no són molt recomanats a l'indústria. Si la persona que ha d'utilitzar amb freqüència aquestes eines, independentment de la seva formació, pot arribar a conèixer el funcionament del controlador l'utilitzarà amb més confiança i seguretat. Un altre avantatge es que després d'un curt període de formació, el mateixos usuaris poden solucionar els possibles problemes que puguin sorgir, estalviant-se la intervenció de tercers i la conseqüent parada de producció.
- ▶ **Exacte i precís:** Tots els requisits esmentats fins ara no necessàriament van en detriment de l'exactitud en el control, es per tant possible, aconseguir un sistema de control senzill però alhora exacte i precís.

Definit el sistema de control, i coneixent les característiques que ha de complir el controlador a implementar, el següent pas passa per provar-los i sintonitzar-los en el procés real. Malgrat això, el cost econòmic, de temps i de personal per realitzar una fermentació aconsella planificar detingudament els experiments a realitzar.

Es va proposar, abans de realitzar aquesta sèrie d'experiments buscar alguna manera de poder seleccionar prèviament quins d'ells podien donar resultats correctes. Una de les formes de fer-ho és la formulació i construcció d'un model dinàmic capaç d'aproximar el comportament real del microorganisme. D'aquesta forma, dins les fases preliminars d'adequació d'un nou controlador, es podria realitzar una simulació de la resposta dinàmica del sistema. D'aquesta forma es podrien detectar prematurament possibles problemes i/o alteracions que estalviarien la realització de fermentacions futures.

Formulació i validació del model matemàtic

La principal funció d'aquest model és reproduir matemàticament el comportament dinàmic dels microorganismes a l'interior del bioreactor. Ha de quedar clar però, que l'objectiu principal d'aquest model és utilitzar-lo com a eina per provar diferents tipus de controladors. Per tant, es tracta de construir un model senzill sense intentar explicar el comportament del microorganisme en un ampli rang de condicions.

Definició.

En primer lloc cal definir exactament fins quin nivell de concreció es vol arribar, aspecte que es defineix a partir de les necessitats requerides.

La funció bàsica d'aquest model és aproximar l'evolució del metanol a la fase líquida de l'interior del bioreactor a partir de la seva addició. Només cal disposar de l'evolució temporal d'aquestes dues variables per realitzar les simulacions amb els diferents tipus de controladors (Figura 4.70).

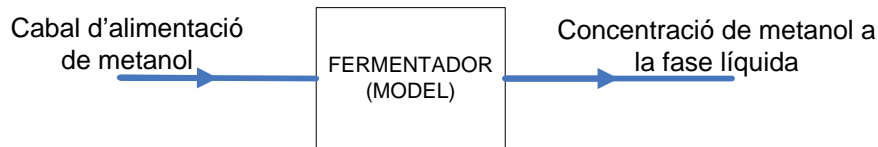


Figura 4.70. Esquema simplificat del model.

Encara que les diferents proves de control només es realitzen a l'última etapa del cultiu, on s'utilitza el metanol com a única font de carboni, es va decidir que el model aproximés també les altres fases del cultiu. Per tant, el model ha d'incloure l'evolució del cultiu en l'etapa discontinua i seguidament la de transició, on ja hi comença a intervenir el metanol com a substrat.

Formulació del model.

Com s'ha apuntat anteriorment, l'ús d'aquest model està destinat a una aplicació molt concreta. Així doncs, una aproximació del comportament real pot ser suficient per aquestes necessitats. No es vol destinar a aquesta part del treball massa esforç ni temps, ja que es tracta d'una eina per assolir un objectiu.

Vistes les intencions, clarament es tendeix a utilitzar un model de tipus no estructurat (Apartat 1.4). Un model d'aquest tipus comporta, com s'enumeren a continuació, una sèrie d'aproximacions que simplifiquen considerablement la complexitat del model.

- ▶ Es considera la biomassa com una sola espècie sense tenir en compte les reaccions intracel·lulars. Així doncs, el microorganisme és aproximat a una caixa negra on hi ha una sèrie d'entrades (Ex. Substrats, etc..) i una sèrie de sortides (Ex. Increment de la biomassa, etc..).
- ▶ Es considera que el microorganisme no consumeix més d'un substrat al mateix temps. Tot i semblar una aproximació força simplista, en el cas de combinar glicerol i metanol en cultius amb *Pichia pastoris* és certa, ja que la presència de glicerol al medi inhibeix el consum de metanol. Només quan el glicerol està a concentracions limitants (menor d' $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) es pot donar el consum del dos substrats conjuntament.
- ▶ Es considera que l'activitat del microorganisme només es veurà limitada per la falta de font de carboni. La resta de nutrients, com poden ser l'oxigen i el nitrogen, es consideren en excés durant tot el cultiu.
- ▶ No es contempla l'existència d'una fase de latència a l'inici del cultiu.

El models no estructurats es basen normalment en els balanços de matèria a escala macroscòpica de les principals variables del cultiu.

Si es realitza el balanç de substrat per a un cultiu en semicontinu, s'obté l'equació 4.22, deduïda directament de l'equació 3.52 (apartat 3.7).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X - \frac{F \cdot (S - S_0)}{V} \quad \text{eq. 4.22.}$$

on:

$Y_{x/s}$: Rendiment biomassa-substrat ($\text{g X} \cdot \text{g S}^{-1}$).

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

X : Concentració de biomassa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

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

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

S_0 : Concentració de substrat a l'aliment ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

V : Volum de líquid al reactor (l)

La variació de substrat a l'interior del bioreactor, $\frac{dS}{dt}$, depèn principalment de dos termes. El primer representa el consum de metanol per part del microorganisme i es proporcional a la quantitat de biomassa existent. El segon contempla l'increment de concentració a la fase líquida per l'alimentació d'un cabal de substrat. L'evolució de biomassa al llarg d'un cultiu semicontinu es pot expressar matemàticament a partir de l'equació 4.23 (la seva deducció està detallada a l'apartat 3.7).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F \cdot X}{V} \quad \text{eq. 4.23}$$

L'alimentació de diferents substrats a l'interior del reactor comporta un continu increment del volum de medi. Aquest es pot expressar senzillament amb l'equació 4.24. En un cultiu semicontinu, només es contempla que hi ha el terme d'entrada de cabal (F).

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{eq. 4.24}$$

La relació existent entre la concentració de substrat i la velocitat de creixement és l'última part del model que relaciona estretament les equacions 4.22 i 4.23 entre sí. La caracterització del model passa indubtablement per calcular la relació entre aquestes dues variables.

Efecte de la concentració de substrat sobre la velocitat específica de creixement.

Els principals factors que afecten la velocitat específica de creixement en un cultiu són la concentració de substrat, la temperatura i el pH.

En aquest cas, el pH i la temperatura resten fixes al llarg del cultiu. Els valors d'aquestes variables han estat optimitzats en treballs anteriors (Minning et al., 2000) per maximitzar la producció d'enzim expressat en *P.pastoris*.

La relació entre la velocitat específica de creixement i la concentració de substrat té, en la majoria dels casos, forma d'hipèrbola, una corba de saturació similar a la que descriu la cinètica enzimàtica tipus Michaelis-Menten. Monod va proposar la següent expressió,

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} \cdot S}{K_S + S} \quad \text{eq. 4.25}$$

on:

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

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

S: Concentració de substrat ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

K_S : Constant d'utilització de substrat ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Numèricament, K_S és igual a la concentració de substrat quan la velocitat específica de creixement és la meitat de la màxima. Valors baixos de K_S indiquen que el microorganisme té força afinitat per al substrat, ja que la μ no baixa a valors propers a zero fins que el substrat és a punt d'exhaurir-se.

La parella de constants, μ_{MAX} i K_S , són funció de multitud de variables i de la combinació d'aquestes. Depenen principalment del tipus de microorganisme, substrat i també de les condicions d'operació com la temperatura i el pH. Així doncs, existeixen una parella de constants per cadascuna de les combinacions de condicions.

D'altra banda, s'han descrit a la bibliografia multitud de models que descriuen d'una forma més específica els diferents casos particulars. Per exemple, models que relacionen aquestes dues variables quan hi ha una inhibició per substrat (Andrews, 1968; Webb, 1963; Aiba et al., 1966; Han i Levenspiel 1988).

La utilització de models més complexos també implica un increment del nombre de constants i en conseqüència, la dificultat d'utilitzar estimadors estadístics, com pot ser l'algoritme de Levenberg-Marquart (Davis, 1993). Alguns d'aquests models presenten importants discontinuïtats, pel que fa que siguin poc aconsellables d'utilitzar.

Tot i que és conegut que tots els substrats inhibeixen el creixement, encara que sigui per problemes d'osmosi a altes concentracions ($>300 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), els models han de descriure únicament el rang de treball emprat. Per tant, no és d'estranyar que pel mateix microorganisme, substrat i condicions de treball es puguin utilitzar diferents models en funció del rang de concentracions emprat.

La utilització d'un o altre model vindrà regit per l'exactitud del seu ajust a les dades experimentals i per la seva senzillesa. Moltes vegades però, la principal dificultat no es trobar un model que aproximi correctament les dades sinó aconseguir unes dades experimentals correctes.

La forma més exacte d'obtenir la parella de dades de concentració de substrat i velocitat específica de creixement relacionades és el cultiu en continu. Treballar en estat estacionari garanteix que la relació entre ambdues variables es mantingui constant.

No obstant això, l'obtenció d'aquesta informació implica la realització de múltiples estats estacionaris en un o diferents cultius en continu. I si es vol realitzar per a velocitats específiques de creixement baixes, ja que és la zona on es pot extreure més informació, es poden necessitar més de 40 dies de cultiu (per exemple, $\mu : 0.005 \text{ h}^{-1}$) per a una sola parella de dades.

Des d'un bon principi, i sense perdre de vista quina era la finalitat del model, es va desestimar la possibilitat de realitzar una bateria d'experiments en continu per determinar aquests paràmetres. A més, com que el model varia segons el microorganisme i els substrats, el nombre d'experiments a realitzar es disparava.

Arribats a aquest punt, es va decidir utilitzar les dades dels cultius en semicontinu realitzats fins el moment per extreure'n aquesta informació. La contínua variació de la concentració de substrat i de la velocitat específica de creixement en aquesta estratègia de cultiu incrementa l'error en el seu càlcul. Es considera en els punts on s'estableix la relació entre aquestes dues variables que s'està treballant en un pseudo-estat estacionari. Perquè aquesta aproximació sigui prou vàlida cal extreure un elevat nombre de mostres, disposant així de més informació en curts períodes de temps.

Cal recordar també que la velocitat específica de creixement es calcula a partir dels valors puntuals de concentració de biomassa mesurats de les mostres extretes durant el cultiu. Així doncs, com més curt sigui el període entre mostres més correcte serà el càlcul de μ .

Tenint en compte tots aquests condicionants, es van realitzar els càlculs per establir els valors de les constants de l'equació de Monod (eq. 4.25) per tres casos diferents.

Atès que el comportament de les soques de *P.pastoris* utilitzades en aquest treball és el mateix davant el glicerol, independentment del fenotip, l'equació de Monod davant aquest substrat és comuna per a soques Mut⁺ o Mut^s.

Pel contrari, quan la font de carboni és el metanol hi ha clares diferències entre les soques Mut⁺ i Mut^s. Per tant, s'ha establert per cadascun dels fenotips una equació de Monod diferent.

Cal assenyalar que no s'han emprat dades de fermentacions amb soques multicòpia, ja que no es disposava de suficients rèpliques de les mateixes per establir amb prou exactitud la relació entre les dues variables de l'equació de Monod.

Una vegada s'han obtingut, per un conjunt de fermentacions realitzades sota les mateixes condicions, les dades de la concentració de substrat i velocitat específica de creixement el càlcul de les constants de l'equació de Monod (eq. 4.25) és senzilla. Només cal linealitzar l'equació realitzant l'inversa a tots el termes com es mostra a l'equació 4.26.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{MAX}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{MAX}} \quad \text{eq. 4.26}$$

Per tant, realitzant una regressió lineal de $1/\mu$ vs. $1/S$, s'obté a partir del pendent i l'ordenada a l'origen el valor de les constants K_S i μ_{MAX} .

Glicerol

Quan l'única font de carboni és el glicerol, durant la fase discontinua inicial, es pot determinar per diferents valors de concentració d'aquest substrat quina és la velocitat específica de creixement. La concentració de glicerol és mesurada a partir de mostres extretes durant el cultiu. En canvi, la μ és calculada a partir de la

derivada de l'aproximació per "splines" de les mesures puntuals de biomassa de les mateixes mostres extretes.

A continuació es presenta la linealització de l'equació de Monod (Figura 4.71), a partir de la qual es determinen les constants K_s i μ_{MAX} .

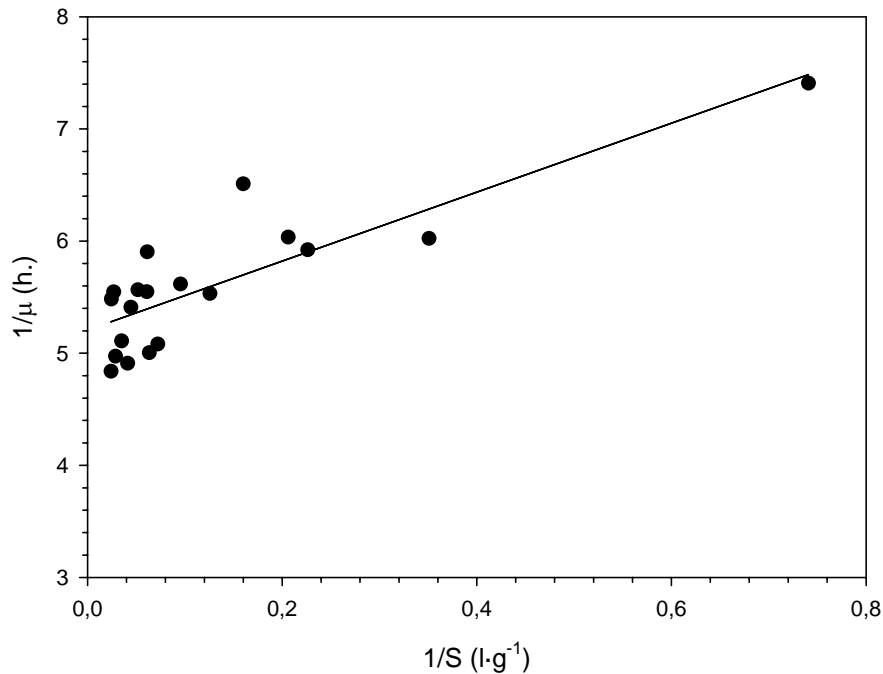


Figura 4.71. Linealització de l'equació de Monod utilitzant el glicerol com a substrat.

Els resultats de la linealització són

Pendent: 3.07 ± 0.47

Ordenada a l'origen: 5.2 ± 0.1

r^2 : 0.712

A la figura 4.71 es pot apreciar que la tendència lineal de les dades ve molt marcat per un o dos valors distanciat la resta. Principalment el pendent de la recta té una forta dependència d'aquests valors més llunyans. Estadísticament també es pot observar aquest fenomen en l'interval de confiança del pendent. Si a partir d'aquests valors es calculen les constants de l'equació de Monod,

μ_{MAX} : 0.192 ± 0.004 (2% d'error).

K_s : 0.591 ± 0.1 (17% d'error).

De l'anàlisi d'aquestes equacions se'n deriva que el paràmetre K_s té un interval de confiança molt ampli, ja que té una dependència directe del valor del pendent de la linealització. Aquest error és degut a la dificultat d'aconseguir una parella de valors de S i μ a la fase final de la fase en discontinu del cultiu. És en aquest moment quan la biomassa és aproximadament d'uns 20 a 25 g·l⁻¹, suficient per consumir en un curt període de temps els últims grams de glicerol del medi.

Apuntar que el valor de K_s és prou petit per afirmar que *P.pastoris* té una bona afinitat cap el glicerol, ja que a baixes concentracions ja s'assoleixen velocitats específiques de creixement properes a la màxima.

Finalment, l'equació queda com:

$$\mu = \frac{0.192 \cdot S}{0.591 + S} \quad \text{eq. 4.27}$$

Si es representa la velocitat específica de creixement en funció de la concentració de substrat es pot observar la clara tendència a la saturació de la corba, tot i la dispersió de les dades experimentals (Figura 4.72). El model, representat en forma d'una línia contínua, aproxima la tendència d'aquestes dades.

Vista la dispersió de les dades, es va considerar que no era necessari intentar aproximar altres tipus de models més complexes.

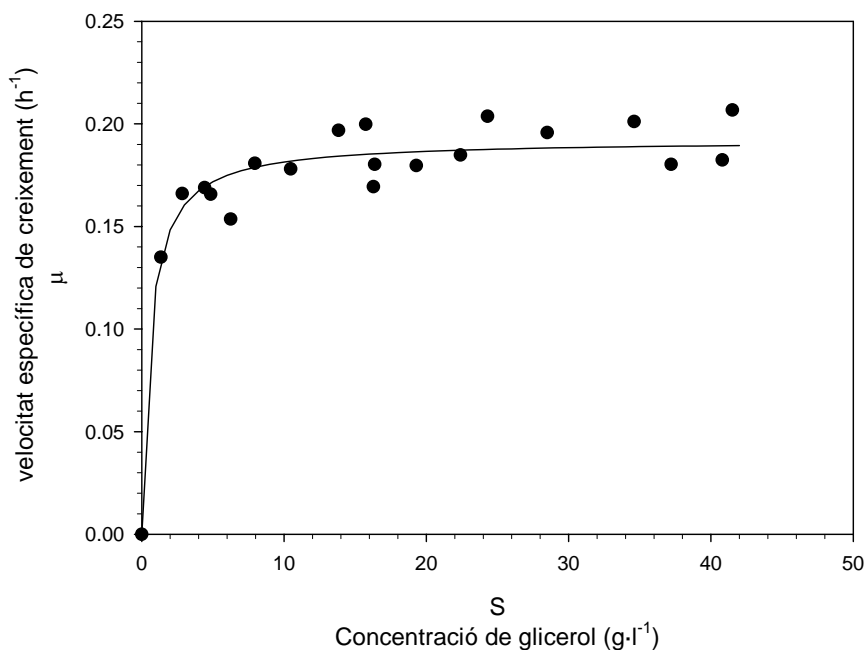


Figura 4.72. Relació entre la concentració de glicerol i la velocitat específica de creixement.

Metanol

En utilitzar el metanol com a substrat, hi ha clares diferències entre la utilització del fenotip Mut⁺ i Mut^s, com es pot observar a l'apartat 4.1. Aquestes diferències queden clarament paleses si s'observa la relació entre la velocitat específica de creixement i el substrat per a cadascuna de les soques.

FENOTIP MUT⁺

Les dades de S i μ recollides en fermentacions Mut⁺ "singlecopy" són totes elles extretes de l'última fase del cultiu, la d'inducció, on es treballa amb el metanol com a única font de carboni.

A l'igual que en el cas del glicerol, s'utilitza l'equació de Monod linealitzada (eq. 4.26) per poder determinar els valors de les constants del model, K_s i μ_{MAX} (Figura 4.73).

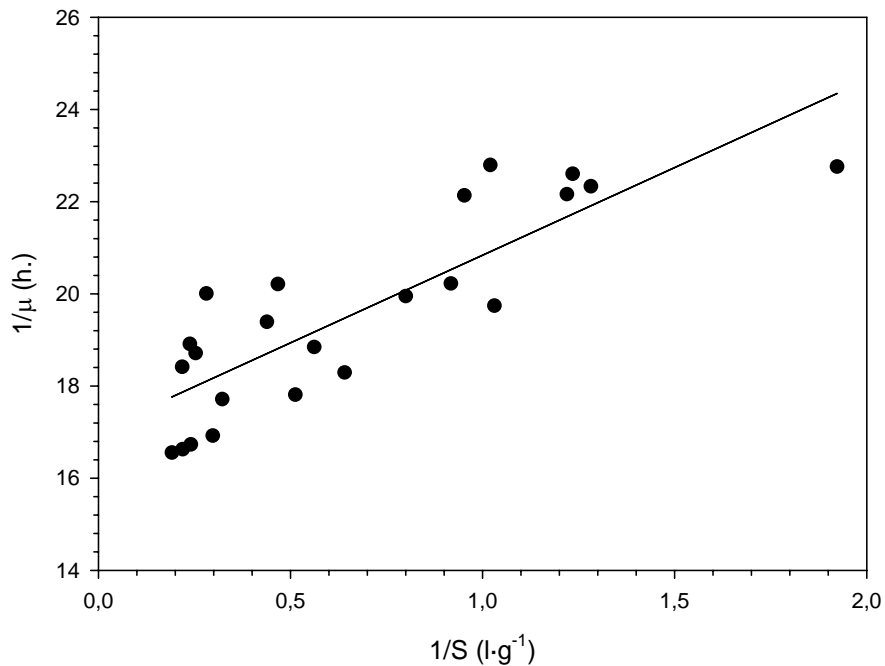


Figura 4.73. Linealització de l'equació de Monod utilitzant el metanol i la soca Mut⁺ "singlecopy".

De la regressió lineal dels valors experimentals se'n extreuen els següents resultats:

Pendent: 3.8 ± 0.533
Ordenada a l'origen: 17.04 ± 0.428
r²: 0.708

Tot i que pot semblar que la tendència lineal es més accentuada en aquest cas que quan s'empra glicerol com a substrat, la dispersió de les dades provoca que l'interval de confiança del pendent sigui força ampli, del mateix ordre que l'anterior. Al calcular les constants del model a partir del pendent i l'ordenada a l'origen s'observa, com era d'esperar pel valor del pendent, que la K_s té un ampli interval de confiança. A l'igual que en el cas del glicerol, això es degut a la dificultat d'aconseguir dades en valors de concentració de substrat pròximes a zero.

μ_{MAX} : 0.0587 ± 0.0015 (3 % d'error).
 K_s: 0.223 ± 0.037 (17 % d'error).

Per tant el model de Monod per a la soca Mut⁺ quan s'utilitza metanol és:

$$\mu = \frac{0.0587 \cdot S}{0.223 + S} \quad \text{eq. 4.28}$$

No obstant això, tot i la dispersió de les dades, la relació entre ambdues variables queda aproximada pel model de Monod (eq. 4.28).

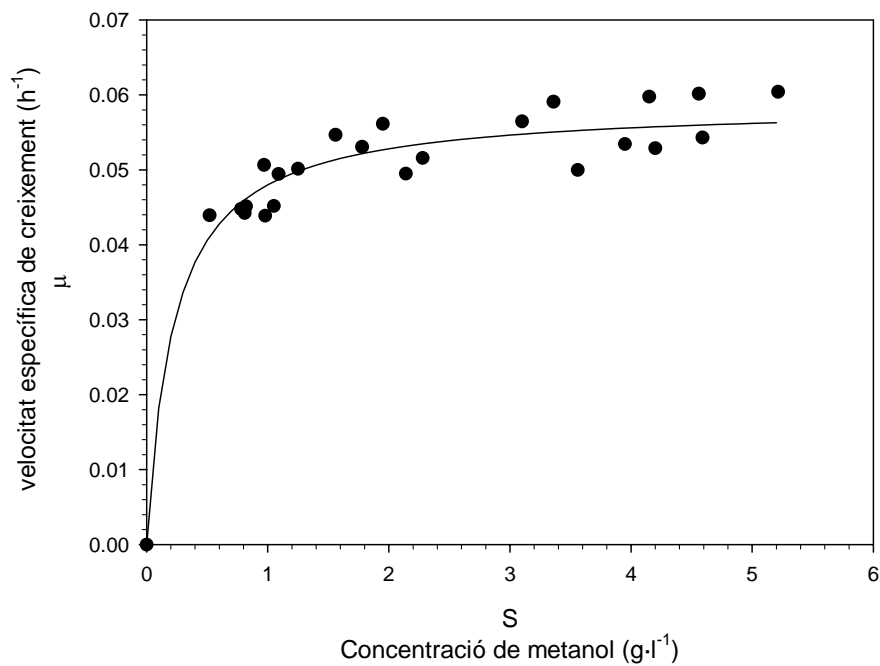


Figura 4.74. Relació entre la concentració de metanol i la velocitat específica de creixement per una soca *Mut*⁺.

Pot semblar estrany, tot i afirmar en repetides ocasions que el metanol a determinades concentracions té un clar efecte tòxic, que la forma d'aquesta relació sigui de saturació a un valor màxim. Seria d'esperar que a les concentracions més altes l'efecte de la toxicitat es veiés reflectit amb una disminució progressiva de la velocitat específica de creixement, com expliquen els models d'inhibició per substrat. I és que com es demostra a la bibliografia (Cereghino et al., 2001) això és realment així, però per concentracions més elevades (a partir de 10 g·l⁻¹). És important doncs remarcar que aquests models només són vàlids pel rang de concentracions estudiat i fora d'aquests no es poden utilitzar.

FENOTIP MUT^S

Repetint el mateix procediment per a la soca de *P.pastoris* Mut^S "singlecopy", i a l'igual que en el cas de la soca Mut⁺ les dades han estat recollides en l'última fase del cultiu semicontinu, la d'inducció, on s'utilitza únicament el metanol com a font de carboni.

La figura 4.75 mostra com les dades experimentals queden distribuïdes en forma de línia.

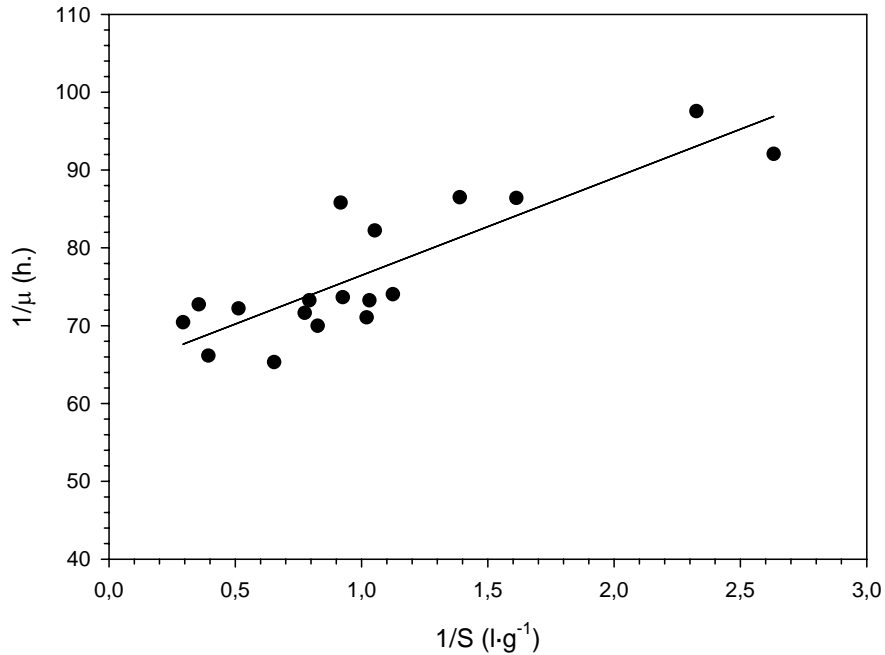


Figura 4.75. Linealització de l'equació de Monod utilitzant el metanol com a substrat i la soca *Mut^s*.

De la regressió lineal de les dades (línia contínua) se'n extreuen els següents valors:

Pendent: 12.52 ± 1.88
Ordenada a l'origen: 63.95 ± 2.26
r²: 0.734

Com els dos casos anteriors, també en aquest l'interval de confiança del pendent és força gran. El motiu; el mateix que en els casos anteriors, la dificultat d'obtenir parelles de valors de S i μ quan la concentració de metanol es propera a zero.

En aquest cas, els valors de les constants del model, extrets a partir de linealització, són:

μ_{MAX}: 0.0156 ± 0.0005 (3 % d'error)
K_s: 0.196 ± 0.04 (18 % d'error).

Així doncs, es pot escriure el model de Monod com :

$$\mu = \frac{0.0156 \cdot S}{0.196 + S} \quad \text{eq. 4.29.}$$

Representant en un mateix gràfic els punts experiments (cercles negres) i el model de Monod obtingut (eq. 4.29) de la seva linealització (línia contínua) es pot clarament la seva tendència a la saturació (Figura 4.76).

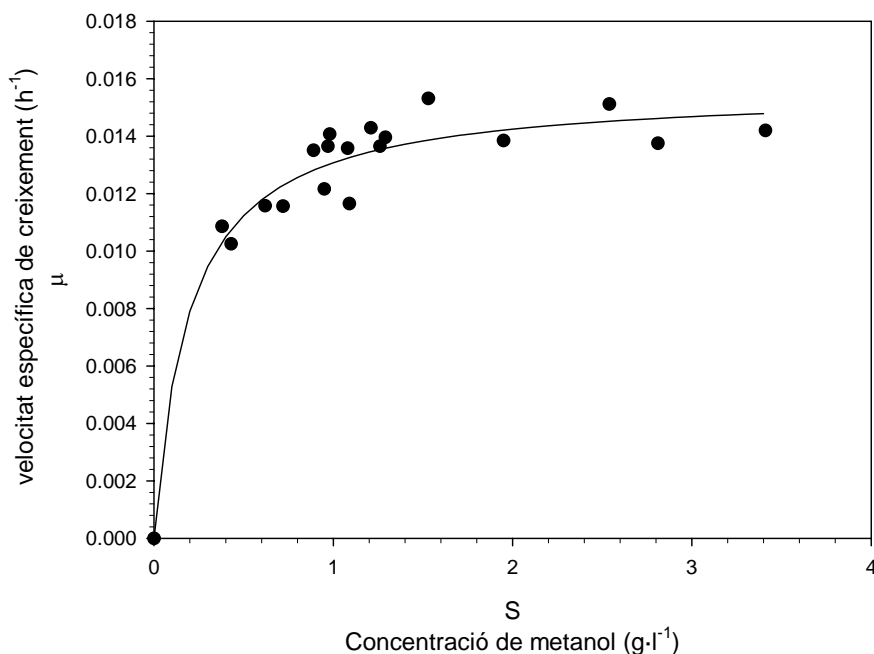


Figura 4.76. Relació entre la concentració de metanol i la velocitat específica de creixement per la soca Mut^s.

Aquest model és vàlid dins el rang de concentracions entre 0 i 3.5 g·l⁻¹. A concentracions de metanol més elevades es començaria a notar una certa baixada de la velocitat específica de creixement provocada per la toxicitat que exerceix aquest substrat sobre la soca en qüestió.

Si es comparen els valors de les constants pels tres casos estudiats, com s'observa a la taula 4.16, es poden identificar les diferències més importants entre ells.

Substrat	Soca	μ_{MAX}	Ks	r^2
Glicerol	Mut ⁺ o Mut ^s	0.192±0.004 (2 % d'error)	0.591±0.1 (17 % d'error)	0.712
Metanol	Mut ⁺ singlecopy	0.0587±0.0015 (3 % d'error)	0.223±0.037 (17 % d'error)	0.708
	Mut ^s singlecopy	0.0156±0.0005 (3 % d'error)	0.196±0.04 (18 % d'error)	0.734

Taula 4.16. Valors de μ_{MAX} i Ks de l'equació de Monod obtinguts per a les diferents soques i substrats utilitzats.

En els tres casos el valor de Ks és prou petita per poder afirmar la bona afinitat que té *P.pastoris* (sigui quin sigui el fenotip) per al glicerol i metanol. Aquest valor indica que la velocitat específica de creixement (μ) és propera a la màxima a concentracions de substrat baixes.

Pel que fa al valor de μ_{MAX} que indica el màxim de velocitat específica de creixement que es pot assolir, el valor és aproximadament el descrit en altres estudis (Valdez, 2004). En el cas del glicerol, els valors de μ_{MAX} són inferiors als referenciats per la soca salvatge (D'anjou et al., 2001), mostrant la influència directe que té la producció de ROL heteròloga sobre el creixement del microrganisme.

Recollit d'una forma més visual a la figura 4.77, s'observen les clares diferències entre utilitzar diferent substrat i fenotip de la soca de *P.pastoris*.

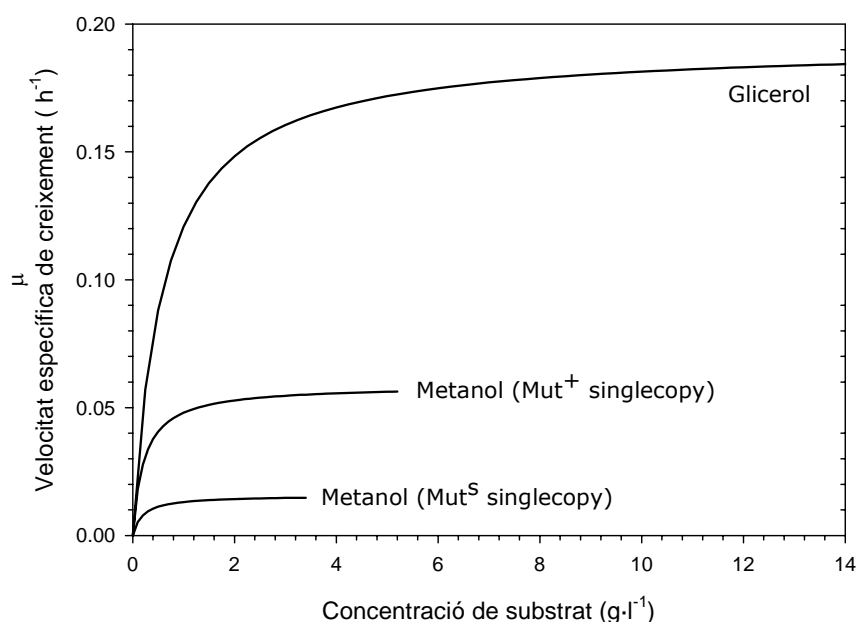


Figura 4.77. Representació dels tres models de Monod obtinguts.

És necessari assenyalar que aquests models només poden ser tractats com a aproximacions del comportament real entre la velocitat específica de creixement i la concentració de substrat, atès l'origen de les dades experimentals. Com s'ha comentat anteriorment, extreure aquesta informació de cultius en semicontinu on les concentracions (tant de biomassa com de substrat) varien contínuament, implica un cert error a vegades prou significatiu.

Aquests errors es poden apreciar a les diferents linealitzacions per trobar les constants del model de Monod, on la dispersió de les dades experimentals es significativa.

Tot i així, es creu que aquests models són suficientment correctes per l'ús final que han de tenir, aproximar el comportament del microorganisme per veure en simulacions quin és el seu efecte davant de diferents sistemes de control.

Mètode d'optimització no-lineal

Si es realitza la mateixa tasca de buscar els paràmetres de l'equació de Monod (μ_{\max} i K_s) amb un mètode d'optimització no lineal com el de Levenberg-Marquart (Curve Fitting Toolbox, MATLAB), s'obtenen els resultats de la taula 4.17.

Les diferències dels valors trobats amb aquesta metodologia comparat amb el mètode de la linealització són en la majoria dels casos menyspreables. El valor estimat de K_s , és en el dos mètodes el que conté més error, sent en algun dels casos proper al 50 %. Aquesta diferència es deu a que segons el criteri d'optimització es poden trobar parelles de valors diferents que aproximen correctament les dades experimentals.

En apartats posteriors però, s'utilitzaran els valors de la taula 4.16, deduïts a partir de la linealització de l'equació de Monod (eq. 4.26).

Substrat	Soca	μ_{MAX}	Ks	r^2
Glicerol	Mut ⁺ o Mut ^s	0.194±0.008 (4 % d'error)	0.65±0.3 (47 % d'error)	0.942
Metanol	Mut ⁺ singlecopy	0.0595±0.003 (5 % d'error)	0.243±0.09 (35 % d'error)	0.938
	Mut ^s singlecopy	0.0156±0.001 (7 % d'error)	0.19±0.08 (45 % d'error)	0.945

Taula 4.17. Valors de μ_{MAX} i Ks de l'equació de Monod obtinguts pel mètode de Levenberg-Marquart.

Determinació del rendiment Biomassa-Substrat

El valor d'aquest paràmetre és força important ja que representa l'eficàcia de conversió del substrat en biomassa. A l'apartat 3.7 es detalla la metodologia de càlcul per a un determinat període de cultiu.

Tot i que és conegut que el valor del rendiment pot anar variant al llarg de la fermentació (Pirt, 1975), es pot aproximar a un valor promig si les condicions del cultiu no varien bruscament.

El valor teòric d'aquests rendiments es pot calcular independentment per a cadascun dels substrats a partir de la reacció estequiomètrica. En el cas del glicerol i metanol, i partint de les equacions 4.6 i 4.7, es calcula de forma teòrica, el valor dels seus rendiments. En el cas del glicerol, aquest és de 0.67 g X· g GliOH⁻¹ i per al metanol de 0.45 g X·g MetOH⁻¹.

Ara bé, quan aquests valors es calculen en un cultiu real, es veuen clares diferències amb el valor teòric. I és que el substrat que és consumit i va a formar part de la biomassa és menor que l'estimat segons l'equació teòrica.

Fermentació	Soca	$Y_{X/S}$ Metanol (g X·g MetOH ⁻¹)	$Y_{X/S}$ Glicerol (g X·g GliOH ⁻¹)
FMM_SC_01	Mut ⁺ "multi"	0.11	0.44
FMM_SC_02	Mut ⁺ "multi"	0.09	0.44
FMS_SC_01	Mut ⁺ "single"	0.21	0.45
FMS_SC_02	Mut ⁺ "single"	0.14	0.49
FMS_SC_03	Mut ⁺ "single"	0.14	0.47
FMS_SC_04	Mut ⁺ "single"	0.14	0.50
FSM_SC_01	Mut ^s "multi"	0.16	0.47
FSS_SC_01	Mut ^s "single"	0.14	0.43
FSS_SC_02	Mut ^s "single"	0.14	0.44
FSS_SC_04	Mut ^s "single"	0.10	0.52
FSS_SC_05	Mut ^s "single"	0.12	0.51
FSS_SC_06	Mut ^s "single"	0.18	0.44
FSS_SC_07	Mut ^s "single"	0.19	0.48
FSS_SC_08	Mut ^s "single"	0.13	0.45
Valor mitjà		0.142 ±0.02	0.466 ±0.017

Taula 4.18. Rendiments biomassa/substrat mitjans per diferents cultius semicontinuos amb Pichia pastoris de diferent fenotip.

A continuació es presenten els valors calculats a partir de múltiples cultius semicontinus. Els rendiments estan calculats en períodes on s'utilitza únicament una de les dues fonts de carboni.

Simulació

Un cop caracteritzades les diferents equacions i determinades les principals equacions que aproximen el comportament del cultiu semicontinu al llarg del temps, només restava establir les connexions oportunes en un entorn de simulació de processos dinàmics.

Existeixen nombrosos paquets de programari de simulació vàlids per realitzar aquesta tasca, de característiques i funcionament similars. A continuació se'n apunten alguns:

- Simulink (www.mathworks.com)
- ACSL (www.acslsim.com)
- Berkeley Madonna 6.0 (www.berkeleymadonna.com)
- Buildsim (www.tritera.com)
- Mathmodelica simulation software (www.mathcore.com)

Tots ells són capaços de resoldre nombroses equacions diferencials simultàniament, encara que la forma d'organitzar la informació del model al seu interior varia significativament.

Atès el coneixement previ de l'entorn de treball de MATLAB® i sabent que Simulink® és un annex d'aquesta plataforma, l'elecció va ser fàcil.

Simulink® és una eina per modelitzar, analitzar i simular una gran varietat de sistemes lineals i no lineals, continus i discrets. Els sistemes o models es representen gràficament mitjançant diagrames de blocs, amb tots els avantatges que això suposa per l'usuari, ja que és visualment més atractiu i entenedor.

El model queda plasmat al programari mitjançant la interrelació dels diferents blocs ja definits que es troben en una "finestra biblioteca" anomenada *Block Diagram Window*. Aquests blocs estan agrupats en diferents grups (*Sinks, Sources, Discrete, Linear, Nonlinear, Connections i Extras*) i contenen gran part dels blocs necessaris per realitzar qualsevol càlcul desitjat.

L'equació de la variació de glicerol al llarg del cultiu, descrita per l'eq. 4.30, es pot resoldre de forma senzilla utilitzant el Simulink®.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X - \frac{F \cdot (S - S_0)}{V} \quad \text{eq. 4.30}$$

Es desitja que a partir dels valors de les diferents variables i constants de les que depèn l'equació s'obtingui, per integració, el valor de la concentració de glicerol a l'interior del reactor.

Així doncs, com es simbolitza a la figura 4.78 en forma d'un únic bloc, es desitja que a partir dels diferents paràmetres que poden variar amb el temps es calculi per cada interval el valor de la concentració de glicerol.

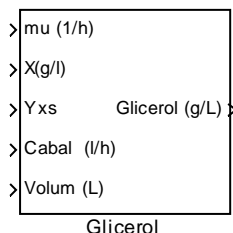


Figura 4.78. Bloc que agrupa l'equació de variació de glicerol amb el temps.

A l'interior d'aquest bloc, i també simbolitzat en forma de blocs a la figura 4.79, es realitzen les operacions necessàries per al càlcul de l'equació 4.30.

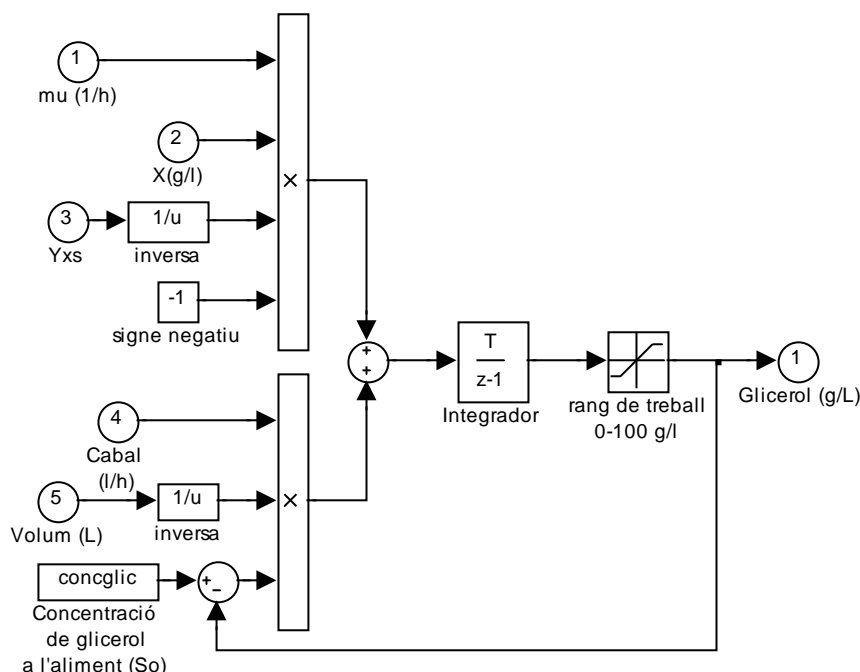


Figura 4.79. Representació gràfica dels blocs per al càlcul de la variació del glicerol mitjançant l'equació 4.30.

A primer cop d'ull pot semblar que la utilització dels blocs és confusa, però, un cop coneguda la dinàmica del funcionament, és fàcil d'interpretar. Per exemple, el càlcul del primer terme de l'equació diferencial, $-\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X$, està simbolitzat

pels blocs situats a la part superior esquerra de la figura 4.79. El valor de μ , X , $Y_{X/S}$ són les entrades al sistema (simbolitzat amb uns cercles numerats del 1 al 3) que provenen de l'exterior, ja que varien o poden variar amb el temps. Cadascun d'aquests valors s'enllacen a un bloc allargat (que conté una "x" en el seu interior) que multiplica els diferents valors. Atès que el valor del rendiment, $Y_{X/S}$, està dividint a l'equació, cal abans de multiplicar-lo, calcular el valor de la seva inversa. D'això se n'encarrega el bloc "1/u", on la seva entrada és el valor del rendiment i en surt el valor de la seva inversa. Finalment, es realitza el canvi de signe d'aquesta primera part incloent en la multiplicació el valor de -1 (bloc anomenat "signe negatiu").

El segon terme de l'equació $-\frac{F \cdot (S - S_0)}{V}$ està situat a la part inferior esquerra de la figura 4.79. on s'utilitzen les mateixes tècniques que en el terme 1. Ara però, la variable "S" (concentració de substrat a l'interior del bioreactor) que no es més que el resultat de la integració d'aquesta equació diferencial també s'utilitza en aquest terme. Com es veu doncs gràficament per la línia que recircula de la part dreta cap a l'inici, s'utilitza el valor de "S" calculat en el passat interval de temps per calcular-ne el nou valor.

Els dos termes es sumen i s'integren amb el bloc de Simulink® destinat a aquesta tasca. Les principals característiques del bloc es detallen a la figura 4.80 on s'indica el mètode d'integració utilitzat (Euler), les condició inicial i el temps de mostreig. En el cas del glicerol, com s'ha indicat anteriorment, es parteix d'una concentració inicial de $40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ per començar la fase discontinua del cultiu. El temps de mostreig, comuna per tots els blocs de la simulació, es va fixar des d'un bon principi a 1 minut ja que és el període d'actuació del controlador utilitzat en el muntatge real.

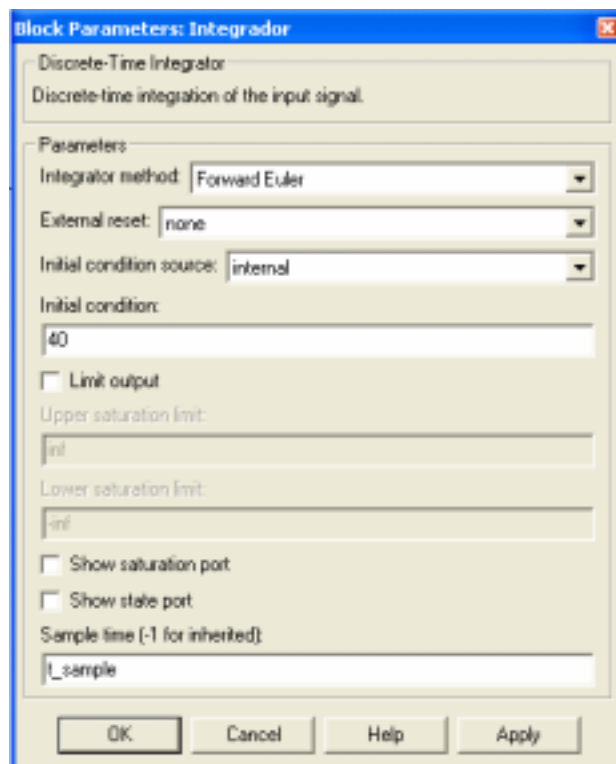


Figura 4.80. Paràmetres de configuració del bloc d'integració.

Després de la integració, un bloc de saturació garanteix que el valor està dins el rang entre 0 i $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Aquesta funció és especialment efectiva quan s'arriba a valors de concentració nuls, ja que si no fos per aquest bloc s'obtidrien valors negatius, totalment il·lògics.

Utilitzant la mateixa equació que en el cas del glicerol (eq. 4.30) també es defineix de la mateixa manera la variació de metanol a l'interior del bioreactor.

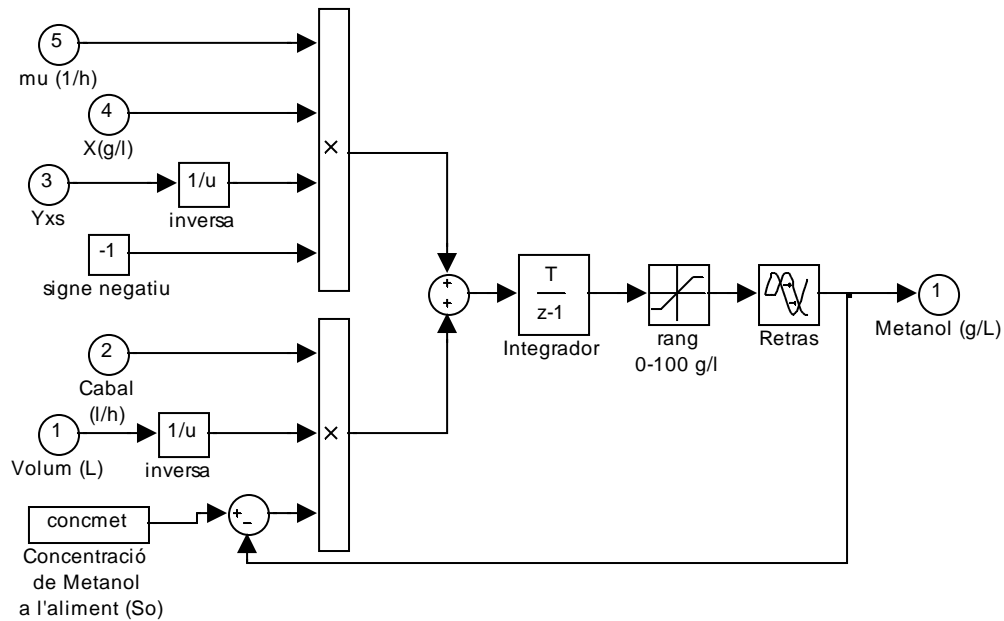


Figura 4.81. Relació entre el blocs que conformen l'equació diferencial pel càlcul de la concentració de metanol en el medi.

Aquest esquema té únicament dues diferències respecte el de càlcul del glicerol. La primera és la condició inicial d'integració, que pel metanol és zero donat que inicialment no hi ha aquest substrat al medi. La segona, correspon al bloc situat exactament abans de la sortida del valor de la concentració, anomenat "Retras", que com indica el seu nom provoca que el sistema tardi un cert temps a respondre a algun canvi en els valors d'entrada. Aquesta mesura ha estat aplicada per aproximar el retràs existent en el sistema real des del moment que s'alimenta metanol fins que es detecta el seu consum. Proves realitzades a diferents moments de la fermentació i per diferents soques estimen aquest temps al voltant dels 2 minuts.

Agrupant els blocs de la figura 4.82 en un únic bloc se'n obté un de nou amb cinc entrades i una sortida.

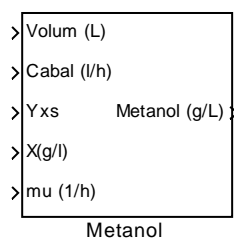


Figura 4.82. Bloc de càlcul de la concentració de metanol.

La variació de la concentració a l'interior del bioreactor té un efecte directe sobre la velocitat específica de creixement del microorganisme. Com s'ha detallat anteriorment, mitjançant l'equació de Monod (eq. 4.31) s'aproxima la relació entre aquestes dues variables en funció del substrat i les característiques fenotípiques de *Pichia pastoris* utilitzada. Els valors de les constants μ_{MAX} i K_s han estat determinats anteriorment per totes les condicions que es volen estudiar.

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} \cdot S}{K_S + S} \quad \text{eq. 4.31}$$

La representació gràfica d'aquesta equació per ambdós substrats es mostra a continuació. En tractar-se d'una equació algebraica només cal relacionar les diferents variables i constants amb operacions matemàtiques com la suma, multiplicació o divisió.

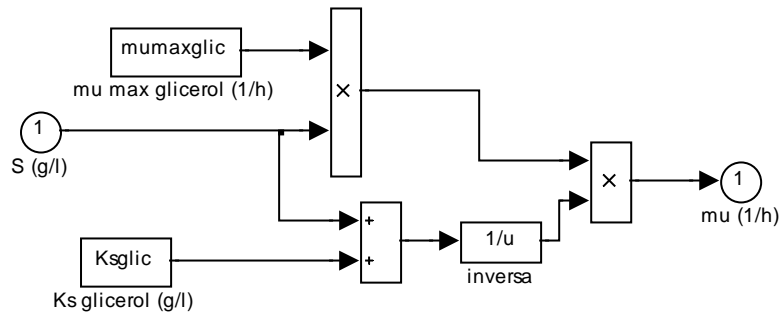


Figura 4.83. Representació en forma de blocs de l'equació de Monod, utilitzant el glicerol com a font de carboni.

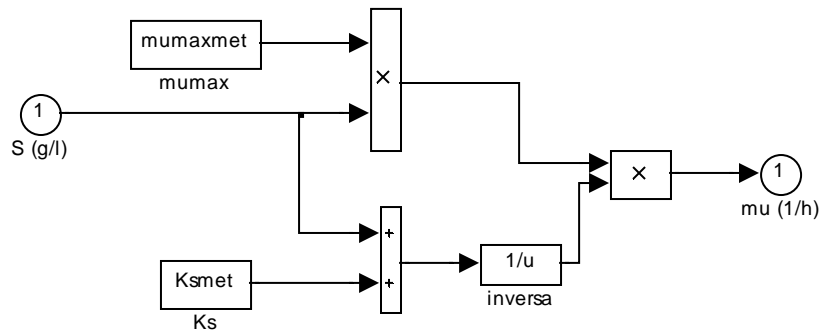


Figura 4.84. Representació en forma de blocs de l'equació de Monod, utilitzant el metanol com a font de carboni.

Aquests blocs es poden agrupar en un de sol (un per cada substrat) amb una entrada, el substrat i una sortida, que és el valor de la velocitat específica de creixement, valor requerit en altres equacions del model.

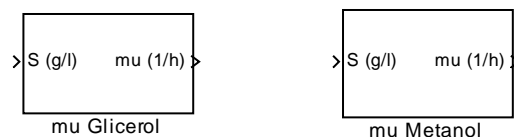


Figura 4.85. Les equacions de Monod són integrades en un bloc per cadascun dels substrats utilitzats en el cultiu.

Un altra equació del model és la variació de biomassa al llarg del temps, per un cultiu en semicontinu. L'equació diferencial, deduïda del balanç al reactor, que

permet calcular la densitat cel·lular en cada interval de temps, es expressada matemàticament per l'equació 4.32.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F \cdot X}{V} \quad \text{eq. 4.32}$$

La representació en forma de blocs d'aquesta equació diferencial es mostra a la figura 4.86.

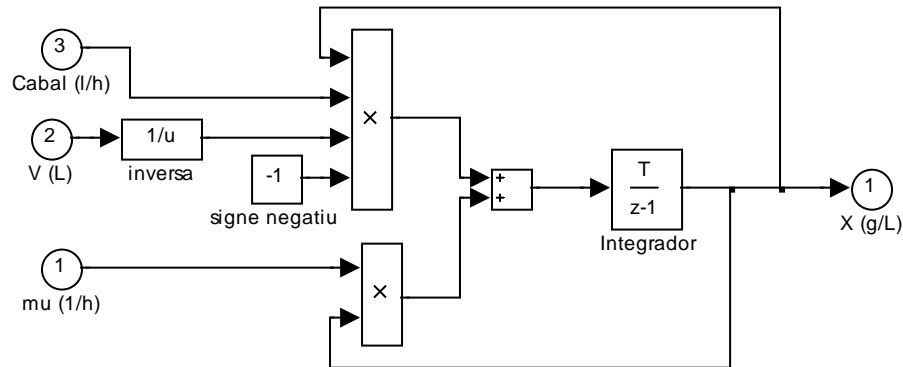


Figura 4.86. Representació en forma de blocs de la integració de l'equació 4.32, pel càlcul de la concentració de biomassa.

L'única particularitat d'aquesta representació és assenyalar que el valor inicial del bloc integrador no pot ser zero, ja que no té sentit físic. El valor inicial de la biomassa en les diferents cultius reals oscil·la entre 1 i 2 g·l⁻¹. S'ha estipulat doncs, que en totes les simulacions, el valor inicial de la biomassa serà de 1 g·l⁻¹.

Agrupant aquests blocs (figura 4.86) en un de sol per simplificar visualment l'espai de treball de Simulink®, s'obté el bloc representat a la figura 4.87 amb tres entrades i una sortida.

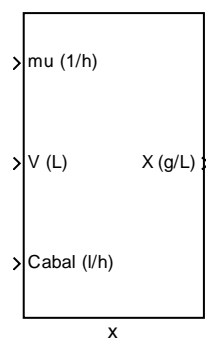


Figura 4.87. Bloc d'integració de la concentració de biomassa per un cultiu en semicontinu.

El funcionament de l'interior del reactor pot ser aproximat mitjançant la relació de totes aquestes equacions descrites fins el moment. La seva interrelació ha de complir totes les especificacions i aproximacions exposades a la part inicial d'aquest apartat.

Així doncs, el bloc del reactor ha d'incloure totes les equacions diferencials necessàries on a partir de les dues possibles entrades (cabals d'alimentació de glicerol i metanol) es calculi l'evolució de les concentracions dels substrats, de biomassa, la velocitat específica de creixement i el volum de cultiu.

Com es mostra a la figura 4.88 la interrelació entre els diferents blocs que representen el model es pot diferenciar en tres zones. Si la figura es divideix en tres parts longitudinals, es pot observar que a la part superior hi ha les equacions específiques a resoldre quan hi ha glicerol al medi. A la part inferior, hi ha les equacions del metanol que només s'activen quan el nivell de glicerol al medi és nul. Aquesta activació i desactivació del qual es podria dir el mecanisme d'assimilació de metanol es realitza mitjançant un "switch" o interruptor lògic, que canvia el valor del senyal en funció d'un tercer valor. En aquest cas, ubicat abans de l'entrada de l'equació de Monod del metanol, l'interruptor només deixa passar el valor real de la concentració de metanol quan la de glicerol és igual a zero. Per a la resta d'ocasions, el valor de la concentració de metanol que s'entra a l'equació de Monod és zero, fent que en conseqüència el valor de la velocitat específica de creixement per a l'assimilació del metanol sigui també nul·la.

D'aquesta forma s'aconsegueix que no hi hagi simultaneïtat de consum de substrats, ni que existeixen dues velocitats específiques de creixement acumulades per la coexistència d'aquestes dues fonts de carboni.

La part central, vista de forma longitudinal, de la figura 4.88 mostra les equacions que són independents de la font de carboni emprada. Aquí es troben l'equació del càlcul de la concentració de biomassa i del volum. Aquesta última consta simplement en la contínua integració del cabal d'alimentació introduït al reactor (sigui de metanol o glicerol). El valor inicial del volum, que cal introduir com a valor inicial al integrador corresponent, és en tots els casos de 3.5 litres.

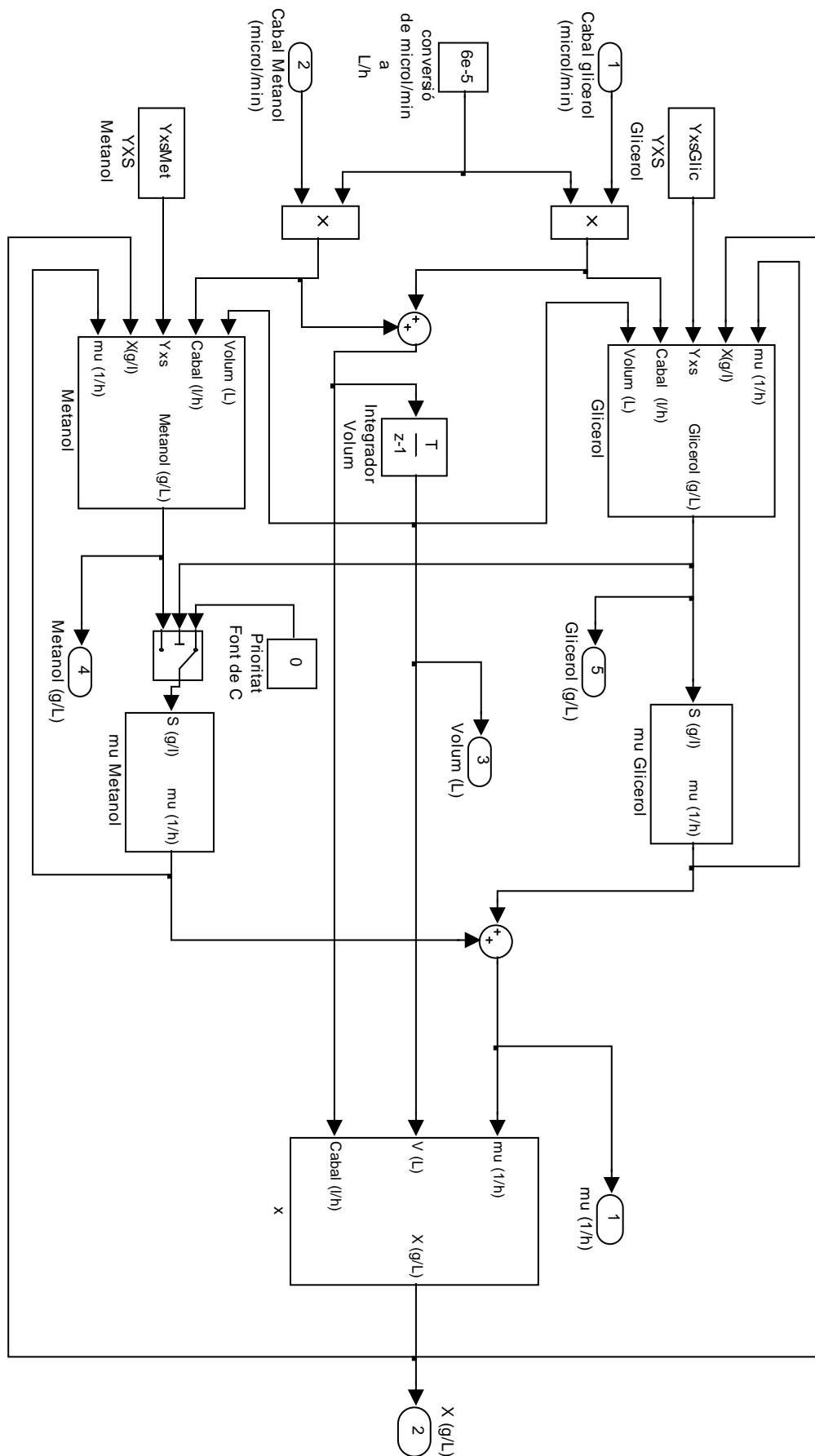


Figura 4.88. Interrelació de les diferents equacions que formen el model del reactor per un cultiu semicontinu.

Agrupant tots aquests termes en un únic bloc de dues entrades i cinc sortides, s'obté tal com es desitjava, el model de simulació del reactor.

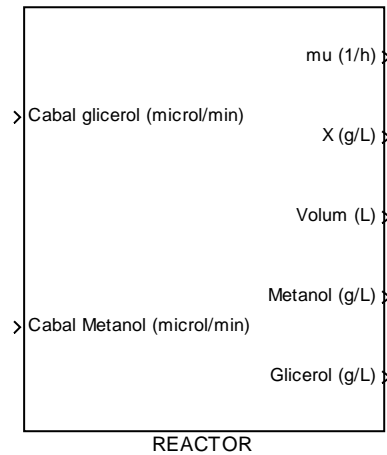


Figura 4.89. Bloc del model de simulació del bioreactor.

Per millorar la comoditat en l'ús del model, s'ha inclòs el que en terminologia del Simulink® s'anomena un màscara. La funció d'aquesta és simplificar la tasca de modificació de paràmetres i constants. D'aquesta manera sense haver d'accedir als blocs interiors, es poden canviar tots els valors susceptibles de ser modificats per l'usuari. La màscara no és res més que una finestra amb múltiples camps de text on es poden introduir els diferents valors de configuració del model.

Com es pot apreciar a la figura 4.90., els paràmetres de configuració són:

- Glicerol
 - μ_{MAX} (h^{-1})
 - K_s ($g \cdot l^{-1}$)
 - Y_{XS} ($g \cdot g^{-1}$)
 - Concentració a l'aliment ($g \cdot l^{-1}$)
- Metanol
 - μ_{MAX} (h^{-1})
 - K_s ($g \cdot l^{-1}$)
 - Y_{XS} ($g \cdot g^{-1}$)
 - Concentració a l'aliment ($g \cdot l^{-1}$)
 - Temps de retràs a l'assimilació (h)
- General
 - Volum inicial del cultiu (l)
 - Concentració inicial de biomassa ($g \cdot l^{-1}$)
 - Temps de mostreig (h)

Block Parameters: REACTOR

Subsystem (mask)

Parameters

mu max Glicerol (1/h)
0.193

Ks Glicerol (g/l)
0.591

Yxs Glicerol (Rendiment Biomassa-glicerol) (g/g)
0.466

Concentració de Glicerol a l'aliment (g/l)
624

mu max Metanol (1/h)
0.0156

Ks Metanol (g/l)
0.196

Yxs Metanol (Rendiment Biomassa-Metanol) (g/g)
0.145

temps retras assimilacio metanol (h)
0.0333

Concentració de Metanol a l'aliment (g/L)
778

Volum inicial al reactor (l)
3.5

Concentració de biomassa inicial (g/L)
1

temps de mostreig (h)
0.0167

OK Cancel Help Apply

Figura 4.90. Finestra de configuració del model del sistema (Màscara).

Finalitzada la modelització del reactor, el següent pas consisteix en buscar la manera de reproduir a nivell de simulació les tres etapes del cultiu en semicontinu, la discontinua, la de transició i per últim la d'inducció. És només en aquesta última etapa, la d'inducció, on el controlador actuarà sobre el cabal d'alimentació de metanol, per tant, no és fins el final de l'etapa de transició que s'han d'activar els blocs corresponents al control.

La fase discontinua ja és inherent al sistema perquè s'ha fixat com a condició inicial del bloc integrador de l'equació 4.30 corresponent al glicerol (Figura 4.80).

Per aconseguir identificar el final d'aquesta primera etapa del cultiu, s'ha utilitzat un bloc de tipus interruptor que canvia el seu valor de 0 al 1 en detectar per primera vegada que la concentració de glicerol és zero. A partir d'aquest moment es manté sempre al valor 1, indicant que ja pot començar l'etapa de transició.

Com s'ha descrit a l'apartat 4.1, l'etapa de transició consta d'un període fixa de cinc hores, on es simultanieja l'addició de glicerol i metanol amb la intenció

d'escurçar el temps d'adaptació del microorganisme a la nova font de carboni. El cabal de glicerol comença amb un valor de $300 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durant les dues primeres hores, i baixa a 160, 100 i $65 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ les darreres tres hores. Pel contrari, no s'addiciona metanol fins la tercera hora amb un cabal de $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, constant fins a la cinquena hora.

Per plasmar aquesta sèrie de variacions de cabal a la simulació, s'ha utilitzat un conjunt de blocs que s'activen mitjançant el bloc interruptor de final de la fase discontinua. En aquest precís moment, s'activa un rellotge que mitjançant una combinació de blocs interruptor permet canviar el cabal cada hora segons la seqüència.

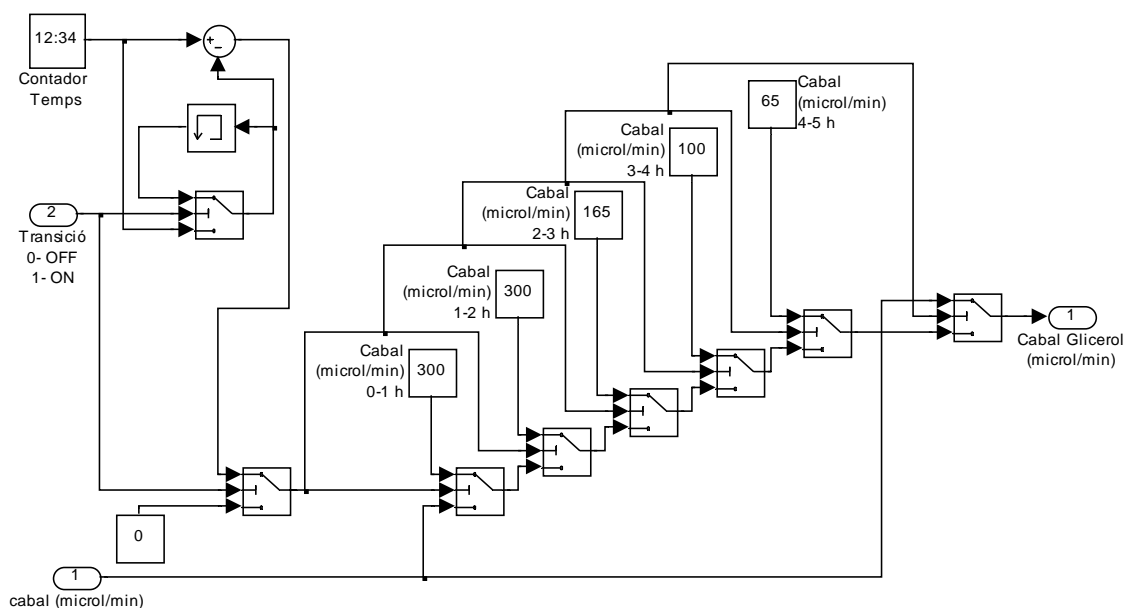


Figura 4.91. Conjunt de blocs per aconseguir la seqüència d'addició de glicerol durant la fase de transició.

El bloc interruptor col·locat més a la dreta de la figura 4.91 és el responsable d'enviar cap al bloc reactor les consignes fixades de cabal durant la fase de transició, i un cop acabada aquesta deixar passar el cabal segons el desig de l'usuari o fixat pel controlador. En el cas del glicerol, aquest cabal sempre és zero, però el sistema està preparat per alimentar glicerol durant la fase d'inducció.

De la mateixa forma que el glicerol, l'esquema de blocs necessari per l'addició de metanol durant la transició es realitza amb un conjunt de blocs interruptors i rellotge. L'únic canvi respecte el muntatge del glicerol, és el valor dels cabals durant les cinc hores de duració de l'etapa.

El motiu de treballar, en el cas dels cabals d'alimentació, amb les unitats de microlitres $\cdot\text{min}^{-1}$ és simplement per comoditat, ja que el sistema real d'addició són unes microburetetes automàtiques amb un volum màxim de dispensació de $1000 \mu\text{l}$ cada minut. Com es pot apreciar a la figura 4.88, el primer pas que es realitza quan s'entren aquests valors de cabals al bloc del reactor és convertir les unitats a $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$.

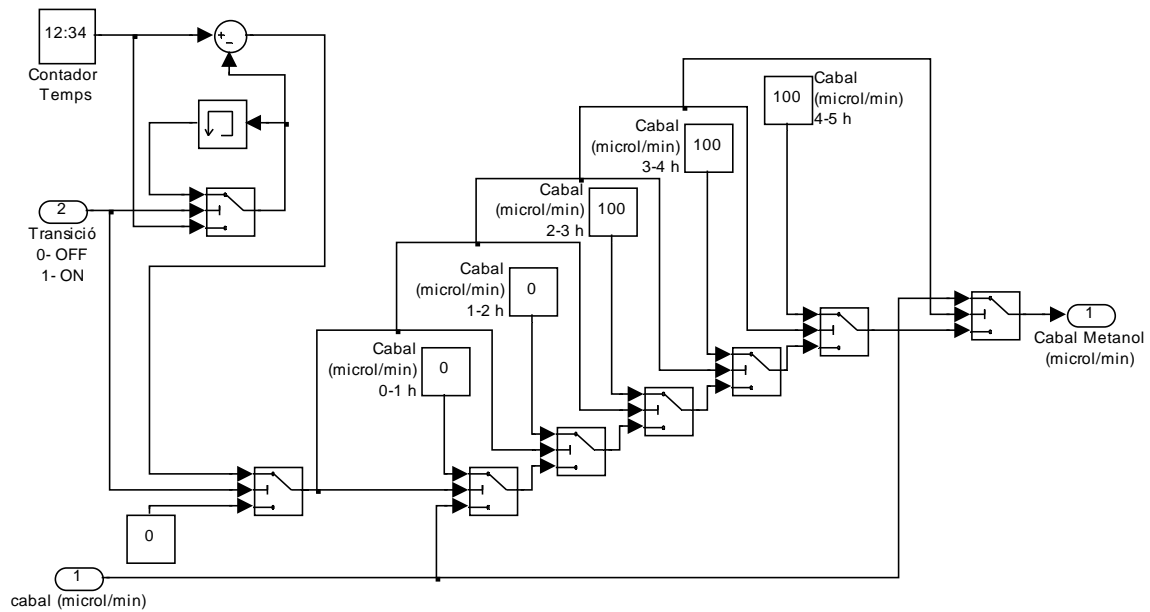


Figura 4.92. Conjunt de blocs per l'addició preprogramada de metanol durant la fase de transició.

Agrupant aquests dos conjunts de blocs de l'etapa de transició per al glicerol i metanol (Figures 4.91 i 4.92) i relacionant-los amb el reactor s'obté la figura 4.93.

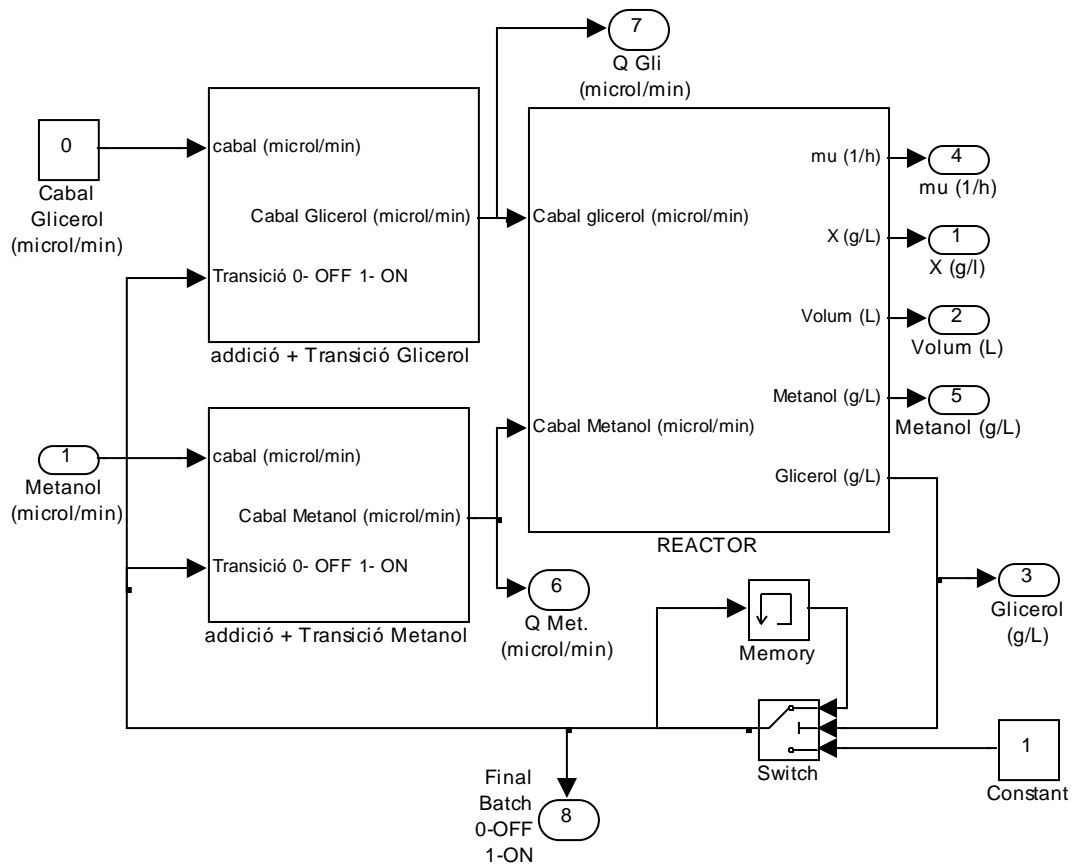


Figura 4.93. Conjunt de blocs del reactor amb els blocs per l'addició preprogramada de la fase de transició.

Finalment, es poden unir tots aquest blocs en un de sol (Figura 4.94) corresponent al sistema global, que incorpora, simulant el reactor real, les tres etapes del cultiu. Sobre aquest bloc es basaran totes les simulacions, on es podrà observar l'efecte del tipus de controlador de metanol sobre les diferents variables del sistema.

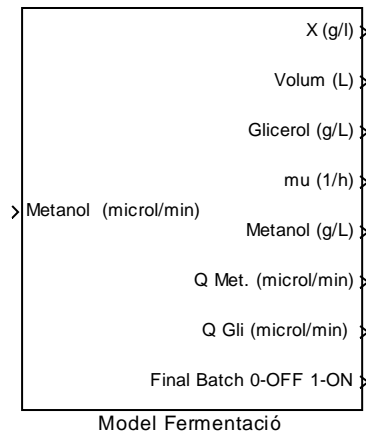


Figura 4.94. Bloc final del procés que simula la fermentació.

Comprovació del sistema

Acabada l'etapa de disseny del model dinàmic del sistema, la primera tasca a realitzar es veure si el comportament del model és lògic. Amb aquest objectiu, es va portar a terme una simulació, esquemàticament representada per la figura 4.95, on s'addiciona cada minut $150 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ durant tota l'etapa d'inducció. Els valors dels paràmetres són els característics d'una soca Mut^s.

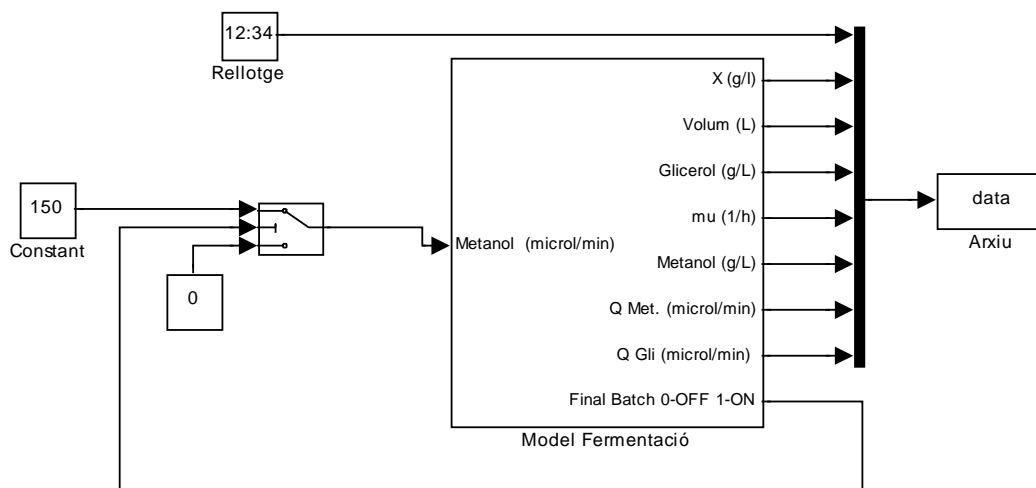


Figura 4.95. Simulació d'una fermentació a cabal constant durant la fase d'inducció.

L'evolució de les diferents variables al llarg de les cent hores de cultiu simulades, es mostren a les gràfiques de la figura 4.96.

Com es pot observar, el perfil de la concentració de biomassa és el característic en aquest tipus de cultiu, format per una primera part on en unes vint hores s'assoleix una biomassa d'aproximadament uns $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Aquest període inclou les fases discontinua i de transició on es consumeix com a principal font de carboni el glicerol. Seguidament, el començament de la fase d'inducció està clarament marcat per una disminució del pendent en la variació de la densitat cel·lular amb el temps. Aquest fenomen és indicatiu del canvi de font de carboni de glicerol a metanol.

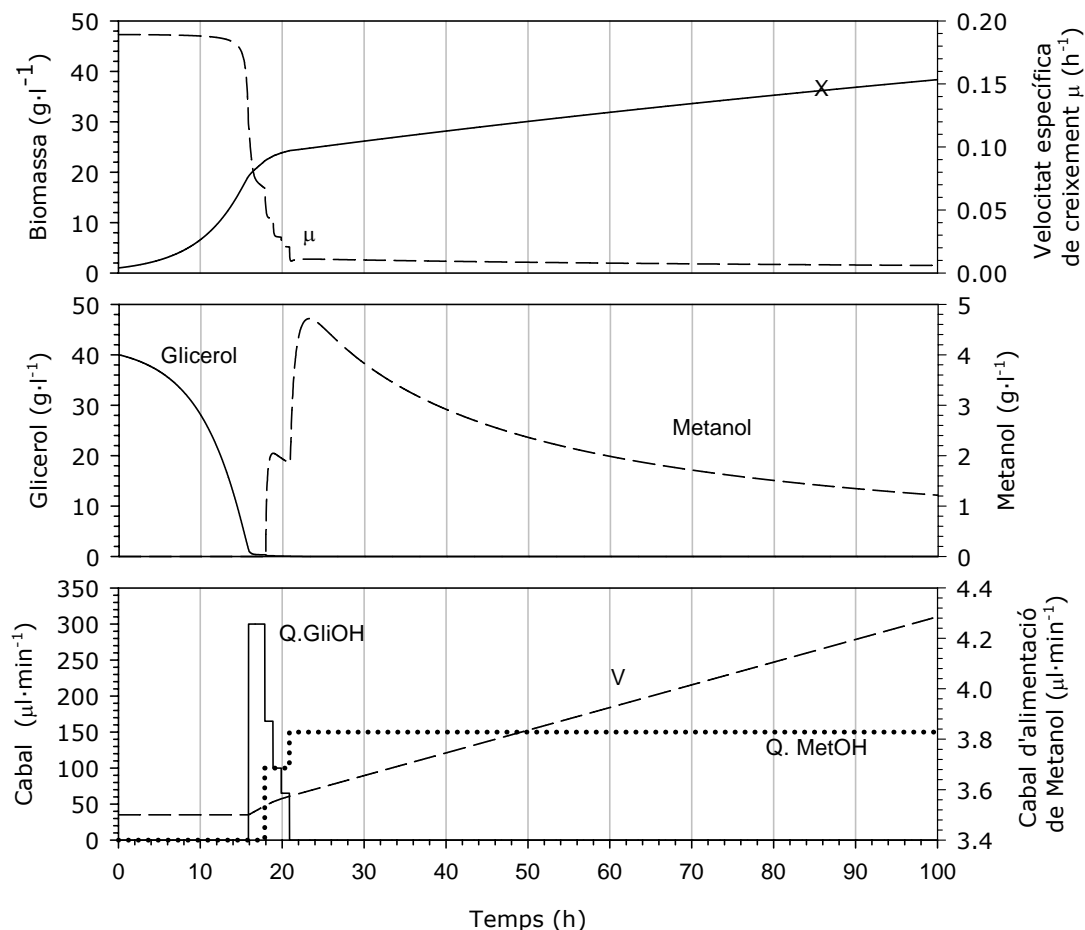


Figura 4.96. (Simulació) Evolució de les principals variables del cultiu en simulació per a una alimentació constant de $150 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Quan s'observa amb el perfil de la velocitat específica de creixement pot sobtar el veure que aquesta des d'un bon inici té el valor màxim. Evidentment, això no és cert en un cultiu real, ja que existeix l'anomenada fase de latència on el microorganisme s'acostuma progressivament a les noves condicions, al medi i al substrat. En el model però, no s'ha tingut en compte perquè no afecta numèricament de forma significativa. El canvi bruscat de μ al final de l'etapa discontinua fins arribar a la velocitat de creixement amb metanol fa evident el canvi de font de carboni.

Pel que fa les tendències de les concentracions de metanol i glicerol a l'interior del bioreactor són les esperades. El glicerol s'escorça al llarg de la fase discontinua arribant a exhaurir-se, i resta així durant la fase de transició, on la quantitat addicionada és inferior a la capacitat de consum del microorganisme.

Respecte el perfil de la concentració metanol, s'aprecia que aquest es comença a acumular a la fase final de l'etapa de transició. Acabada aquesta, es segueix acumulant el metanol fins arribar al punt on el consum és major que la quantitat alimentada i en conseqüència, hi ha una progressiva davallada de la seva concentració. Els cabals de glicerol i metanol corresponen als perfils anteriorment preprogramats.

Les tendències, valors i perfils de la simulació semblen ser del tot lògics, encara que com era d'esperar, molt ideals. Per conèixer fins a quin punt el model aproxima el sistema real, s'hauria de sotmetre a un procés de validació.

Temps mort i soroll en la mesura

Un dels elements importants en el llaç tancat de control és l'analitzador. L'ús d'aquest instrument per conèixer la concentració de metanol a l'interior del reactor comporta la modificació de la dinàmica del sistema.

El temps mort del sistema oscil·la al voltant dels 2 o 3 minuts, determinat a partir d'una entrada en esglaó a l'alimentació. Aquest valor és aproximat ja que canvia en funció del cabal d'aire a l'entrada.

Pel que fa el soroll en la mesura, com indica el manual de l'equip (MC-168, PTI Instruments), per un rang inferior als $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de metanol oscil·la al voltant del 8 % de la mesura.

Aquests dos paràmetres modifiquen el senyal de sortida del reactor provocant-li, teòricament, un soroll blanc i un retràs que cal tenir en compte a l'hora de simular el procés.

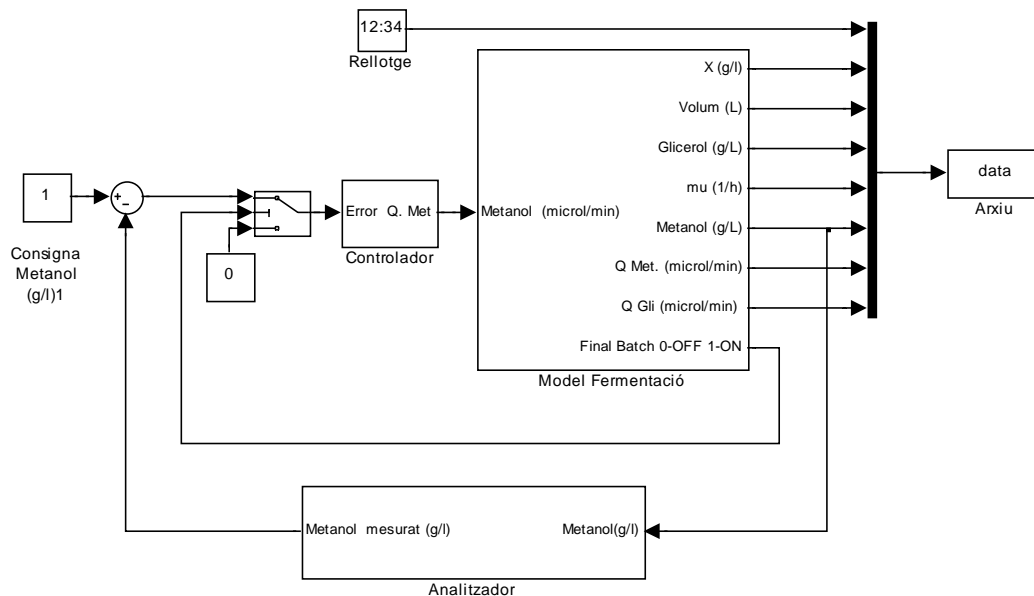


Figura 4.97. Incorporació del bloc de l'analitzador al sistema .

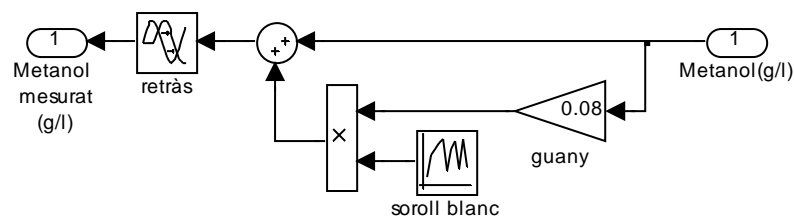


Figura 4.98. El senyal de metanol és manipulat per intentar simular el retràs i soroll incorporat per l'analitzador.

Validació del sistema

En la definició del model del sistema s'han realitzat moltes suposicions i aproximacions per simplificar la complexitat d'un procés d'aquest tipus. Per comprovar l'efecte que tenen, cal comparar el model amb la realitat i veure les diferències entre ambdós. D'aquest procés de validació se'n deduirà l'exactitud del model.

Amb aquest objectiu, es procedeix a comparar les principals variables del model amb els resultats d'una fermentació real. Utilitzant el perfil real de cabal d'alimentació d'un fermentació de 60 hores amb la soca Mut^s "singlecopy" (Figura 4.99) es poden contrastar les diferències entre model i realitat.

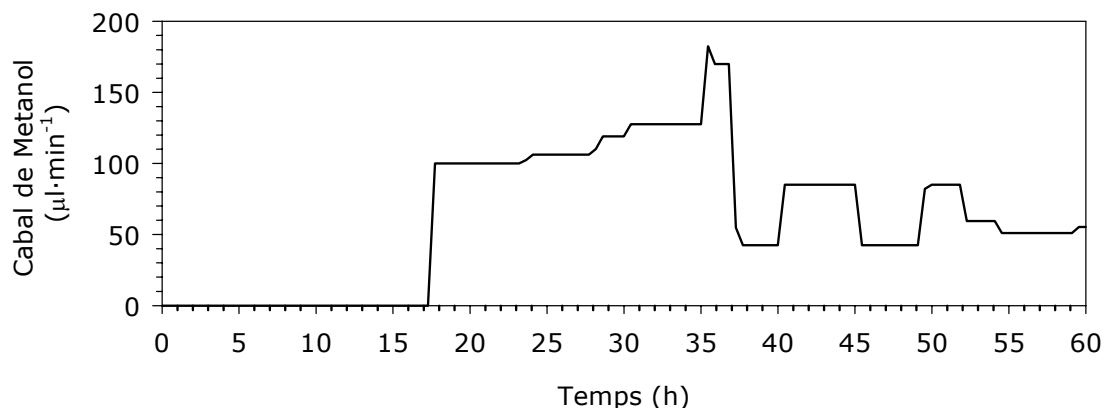


Figura 4.99. Perfil d'addició de metanol utilitzat per a la validació del model matemàtic.

Portant a terme la simulació corresponent, amb els paràmetres calculats en apartats anteriors per una soca de *Pichia pastoris* Mut^s "singlecopy", es van obtenir els resultats indicats a la figura 4.100. La línia contínua indica l'evolució de les variables del model i els punts en discontinu són els valors reals de la fermentació.

De l'observació del perfil de biomassa se'n pot deduir que el model aproxima de forma més que acceptable la tendència real del cultiu. Com és d'esperar doncs, el mateix passa amb la velocitat específica de creixement real (calculada a partir de les mesures concretes de biomassa). En el cas de la concentració de metanol a l'interior del bioreactor, hi ha diferències prou importants entre el perfil del model i els valors mesurats. Les causes d'aquestes diferències poden ser múltiples passant en primer lloc per la inexactitud del model al predir l'evolució d'aquesta variable. Només pel fet de considerar, per exemple, els rendiments biomassa-substrat (Y_{XS}) constants ja pot implicar desviacions d'aquesta magnitud.

També es pot atribuir aquesta divergència entre la simulació i la realitat l'error inherent a l'extracció i posterior mesura del metanol, tot i que a aquest últim, com es pot comprovar a l'apèndix, és mínim. Tot i això, encara que el model no approximi amb precisió l'evolució d'aquesta variable, segueix una tendència similar i per tant pot ser utilitzat com a referència.

Atès l'ús final que es vol donar a aquesta eina matemàtica, es creu prou vàlida per considerar-la adient per realitzar les proves de simulació. Els resultats són prou similars per extreure'n una valuosa informació sense haver de realitzar el cultiu per comprovar-ho.

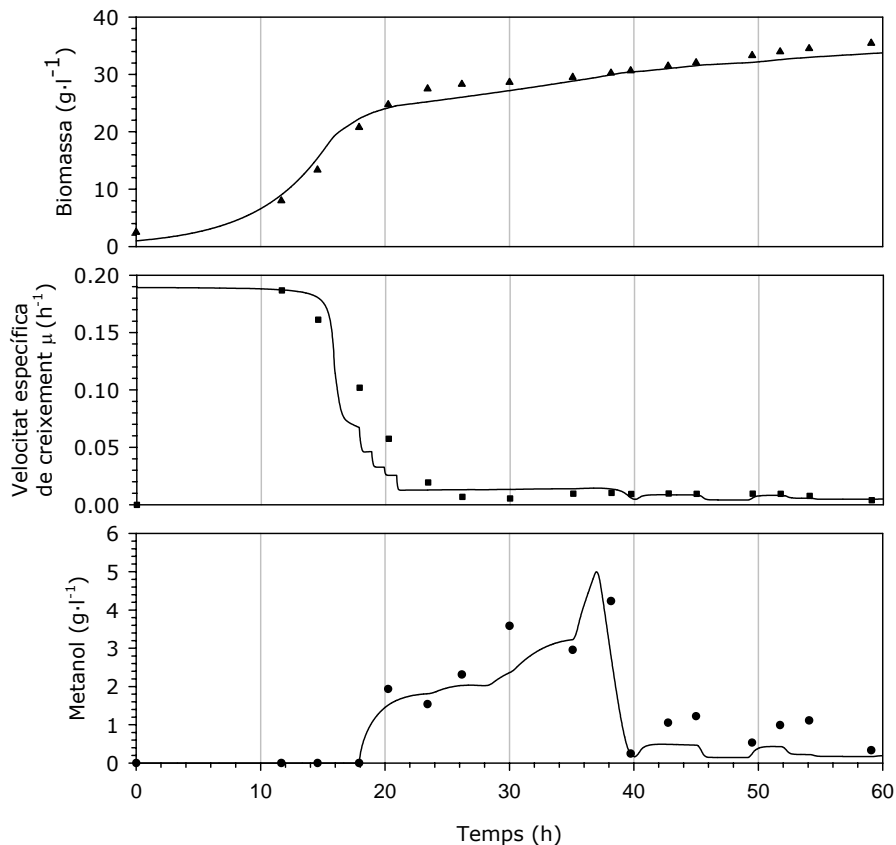


Figura 4.100. (Simulació) Comparació de les principals variables entre la fermentació real i la simulada amb el model.

Cal apuntar que el model està subjecte a nombroses limitacions i és important conèixer els seus punts febles. Aquest és únicament vàlid per unes condicions de cultiu molt específiques, fora d'aquestes, les divergències amb el sistema real són molt importants. Per tant, un canvi de condicions, com el pH, temperatura o el mateix medi de cultiu invalida totalment el model com a sistema de referència en l'evolució del cultiu.

La millora de model passa per conèixer amb detall una quantitat important de relacions entre el microorganisme i el seu entorn, i tot i així, és possible que aquest sigui una primera aproximació per a un determinat rang de condicions.

Experiments amb control

Disposant del model matemàtic del procés, per predir a grans trets l'evolució del cultiu, es procedeix a provar, a nivell de simulació, diferents algorismes de control per mantenir constant la concentració de metanol.

La seqüència que es seguirà en la major part dels casos és la realització d'un primer estudi a nivell de simulació i posteriorment, si aquestes han estat satisfactòries, portar a terme el cultiu.

Tots els experiments, tant en simulació com els cultius portats a terme han estat realitzats amb la soca de *Pichia pastoris* Mut^s "singlecopy", ja que ha estat seleccionada com la més apropiada per a la producció de ROL.

És important assenyalar que aquest procés de control té un particularitat que cal tenir en compte a l'hora del disseny. És comú que en molts sistemes de control es pugui actuar sobre la variable controlada en les dues direccions. Per exemple, en el cas del control de temperatura en un tanc, es pot escalfar i refredar per tal de mantenir el valor de consigna desitjat. Per al metanol això no és així, només es pot actuar en una direcció, alimentant-ne al medi, no es pot extreure.

Aquesta característica del control, fa que s'aconselli utilitzar els controladors en les condicions més conservadores ja que no es pot actuar quan la concentració de metanol està per sobre del valor de consigna, s'ha d'esperar que el microorganisme consumeixi aquest excés.

Control "ON-OFF"

Dels controladors basats en l'error, aquest és sens dubte el més senzill. L'acció del control no utilitza la magnitud de l'error sinó només el signe d'aquest. L'actuació sobre l'element final de control (microbureta) només té dues posicions ("ON-OFF"), sempre les mateixes, independentment de l'evolució del sistema.

En aquest cas, quan l'error és de signe negatiu (Valor mesurat > valor consigna), simplement no s'alimenta metanol (Cabal:0 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Ara bé, quan l'error és positiu, la concentració de metanol està per sota de la desitjada, s'addiciona un cabal prefixat de metanol. La selecció d'aquest valor del cabal determinarà el possible bon funcionament en el control.

Valors molt grans en el cabal d'actuació fan que el sistema de control respongui ràpid però provoca una important oscil·lació. Si el valor es prou petit es redueix aquesta oscil·lació però amb una resposta més lenta.

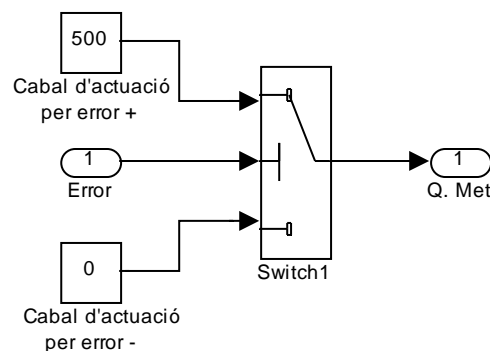


Figura 4.101. Diagrama de blocs del controlador "ON-OFF".

El funcionament del controlador és molt senzill i fàcil d'incorporar a l'entorn de simulació. Com es mostra a la figura 4.101, el cabal a addicionar pot ser 0 o 500 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ en funció de si l'error és positiu o negatiu. El cabal de metanol màxim a addicionar es va fixar a 500 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, valor suficient per mantenir el consum del microorganisme.

Utilitzant aquest controlador, a nivell de simulació, el resultat dona una valuosa informació sobre quin seria aproximadament el comportament real en el cultiu. L'evolució del cabal d'alimentació i la concentració de metanol sota aquestes condicions es representa a la figura 4.102. El valor de consigna es va fixar a 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de metanol a l'interior del fermentador.

La forta oscil·lació en la concentració de substrat a l'interior del bioreactor demostra les limitacions d'aquest tipus de controlador. Es constata que el cabal d'actuació seleccionat en aquest cas és massa elevat provocant que la concentració oscil·li en un inacceptable rang entre 0.5 i 2.5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

La contínua oscil·lació de la variable mesurada és, però, principalment deguda al temps mort del sistema d'anàlisi de metanol. Quan es detecta que a l'interior del bioreactor la concentració està per sota el valor de consigna, es comença a addicionar un cabal constant de metanol fins aconseguir remuntar la mesura per sobre el valor de consigna. Com hi ha un retràs, es provoquen acumulacions de metanol a l'interior que no es detecten fins minuts després. Aquesta descompensació entre el valor real i el mesurat és la culpable de la constant oscil·lació del procés.

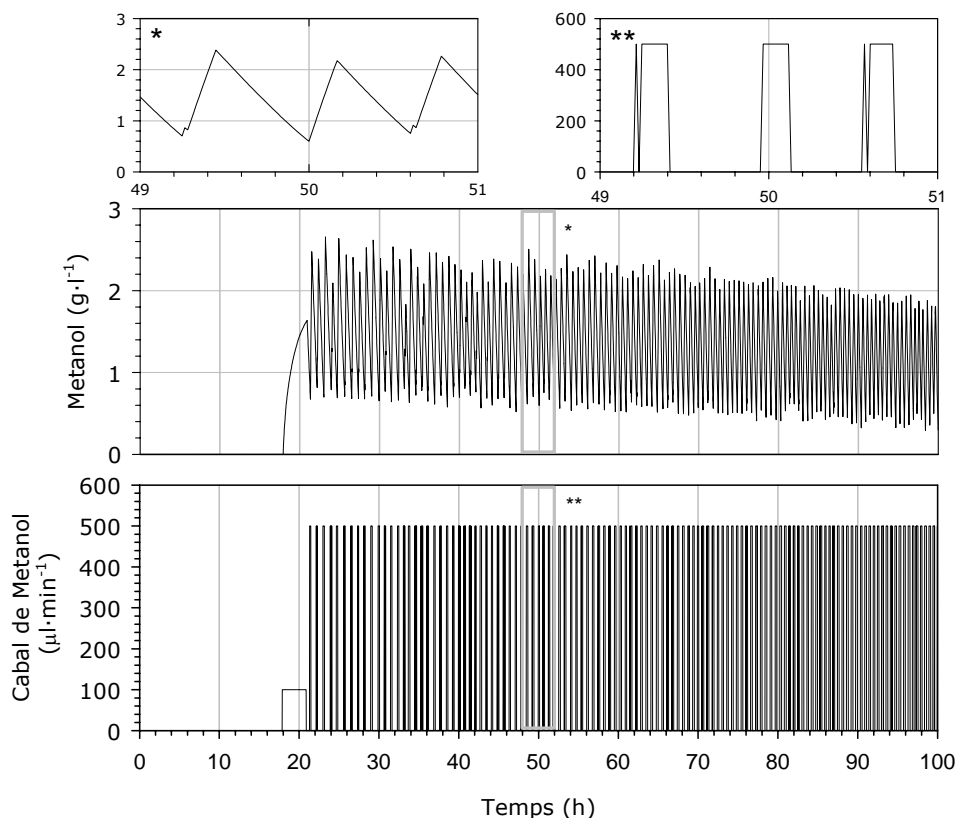


Figura 4.102. (Simulació) Evolució de les variables controlada i manipulada per un controlador "ON-OFF" (Cabal posició "ON": 500 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, "OFF": 0 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

Si es disposa de més informació del sistema i es coneix que el consum d'aquesta soca (*Mut^s "singlecopy"*) pot estar al voltant d'un cabal constant entre 50 i 175 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ (Veure figura 4.99), es pot seleccionar un cabal mig d'actuació de 125 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

A la figura 4.103 es presenten els resultats de la simulació amb aquest nou cabal d'actuació, més ajustat a les necessitats del microorganisme. Es pot apreciar que durant la primera fase de l'etapa d'inducció el rang d'oscil·lació de la concentració de metanol es redueix considerablement respecte el cas anterior. No obstant això, arriba un moment, cap a les 60 h. de cultiu, en el qual el consum és superior a l'addició constant del cabal d'actuació. A partir d'aquest moment, tot i que el controlador passa a estar en posició ON (alimentació contínua de 125 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) no és capaç de mantenir el valor de consigna.

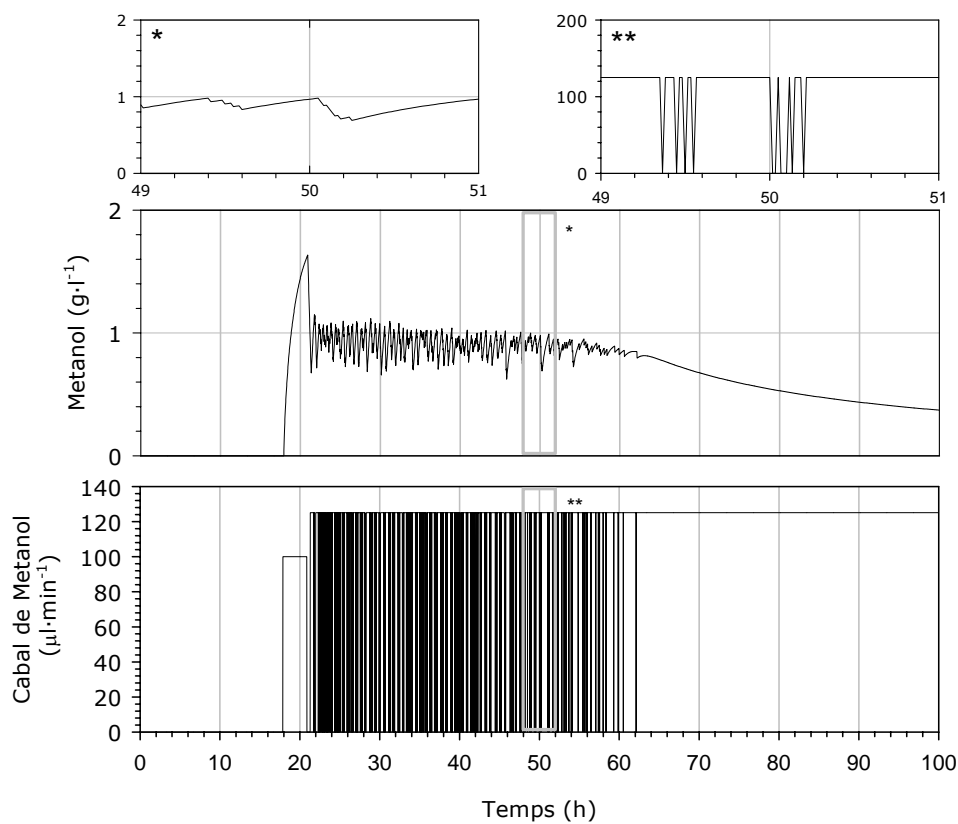


Figura 4.103. (Simulació) Evolució de les variables controlada i manipulada per un controlador "ON/OFF" (Cabal posició "ON": 125 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, "OFF": 0 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

Analitzats els perfils per diferents configuracions del controlador "ON/OFF" es pot concloure que la seva utilització té poques garanties d'èxit. La fortes oscil·lacions de la variable controlada a nivell de simulació desaconsellen la seva utilització per a un cultiu real.

El control "ON/OFF" no és aconsellable per sistemes amb temps mort o sistemes amb dinàmiques constantment canviants. En aquest casos, hi ha múltiples alternatives de controladors que poden ser usats, com es mostra a continuació.

Control Proporcional (P)

El proper pas en la millora de l'algorisme de control consisteix en actuar proporcionalment en funció de la magnitud de l'error. Així doncs, la magnitud de l'actuació depèn linealment de l'error.

Per aquest propòsit, s'ha utilitzat un controlador P de velocitat, on es calcula el valor de la variable manipulada a partir de l'anterior actuació (eq 4.33).

$$F_t = F_{t-1} + Kc \cdot (\varepsilon_{t-1} - \varepsilon_t) \quad \text{eq. 4.33}$$

On

F: Cabal d'alimentació de metanol (valor de la variable manipulada)

Kc: Guany del controlador

ε : Error del sistema (valor de consigna- valor de la variable mesurada).

El valor de Kc (guany del controlador) és el factor de proporcionalitat entre l'entrada i la sortida del controlador, és a dir, entre l'error i la variable manipulada. Per tant, valors grans del guany provoquen que un petit error a l'entrada tingui una resposta important sobre el valor de la variable manipulada.

La implementació del blocs per la simulació del controlador proporcional de velocitat es força senzill (Figura 4.104).

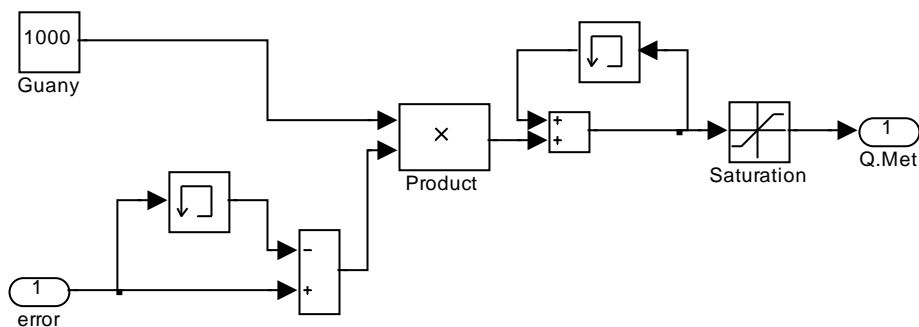


Figura 4.104. Diagrama de blocs del controlador proporcional de velocitat.

El principal problema d'aquest tipus de controlador és l'anomenat error en estat estacionari ("off-set"). Per definició, aquest tipus de control comporta que mai es pugui mantenir de forma estable la variable mesurada sobre el valor de consigna. Aquesta diferència entre l'error en estat estacionari i el valor desitjat es pot minimitzar per valors grans de guany, però la resposta també és més oscil·latòria. Si el valor del guany és extremadament alt, el funcionament del controlador serà exactament el mateix que un controlador "ON/OFF". Un clar exemple d'aquestes condicions és la simulació del procés quan Kc: 1000 ($\mu\text{l}\cdot\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) com es mostra a la figura 4.105.

El comportament del model del sistema amb un guany igual a 1000 és molt similar al del controlador "ON/OFF". Tot i reduir el rang d'oscil·lació, l'amplitud de l'oscil·lació és del mateix ordre. Aquí també queda patent que l'acció del temps mort afecta molt al comportament del controlador fent-lo oscil·lar fortament.

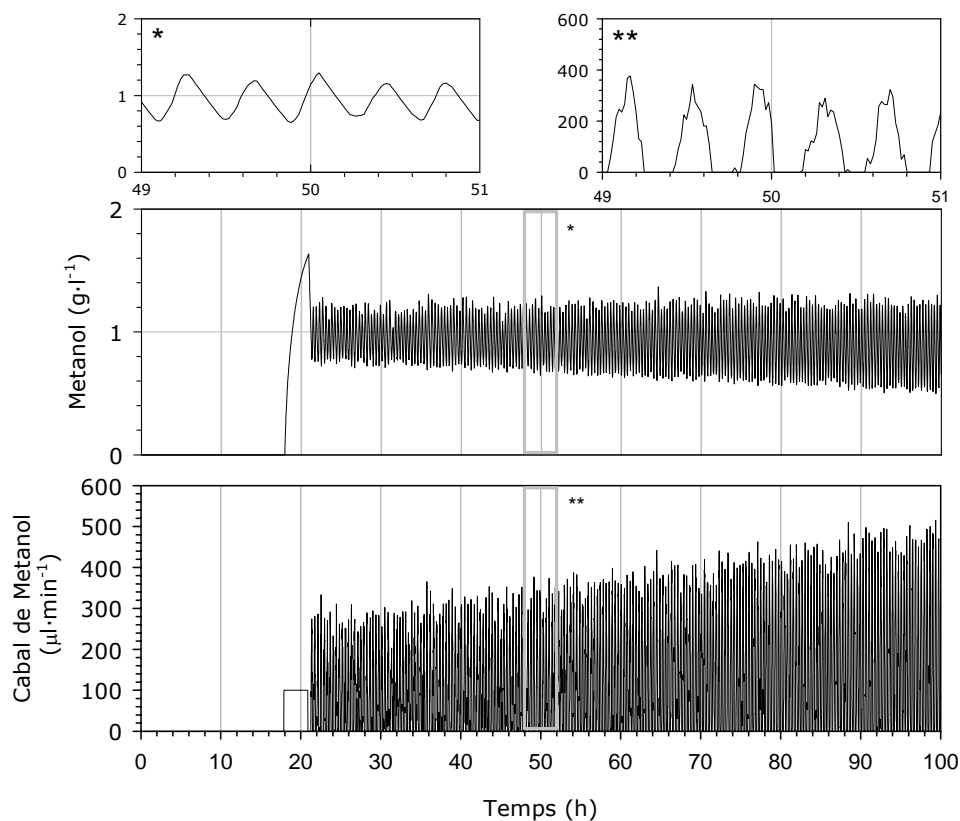


Figura 4.105. (Simulació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional ($K_c:1000$)

Si pel contrari, el valor de K_c és més petit ($K_c:350$), apareix l'efecte de l'error en estat estacionari anteriorment referència. La variable controlada no oscil·la però no es capaç de mantenir el seu valor al voltant del punt de consigna fixat.

S'aprecia també com les necessitats de metanol van augmentant amb el temps, aquest fet apunta que la relació entre el rang d'entrada i sortida del controlador (definició de K_c) ha d'anar augmentant amb el mateix temps. És a dir, el valor de l'actuació per la mateixa magnitud d'error ha de ser diferent segons en el punt de cultiu on s'està. No obstant això, l'actuació depèn de la rapidesa amb la qual varia la dinàmica del sistema.

Davant dels resultats obtinguts en simulació, s'ha decidit no portar a terme cap cultiu que utilitzi aquesta llei de control. L'elevada oscil·lació i els problemes de l'error en estat estacionari són motius suficients per desestimar aquest algorisme. Per solucionar alguns d'aquests problemes es pot introduir millores a l'estructura del controlador proporcional, com s'indica a continuació.

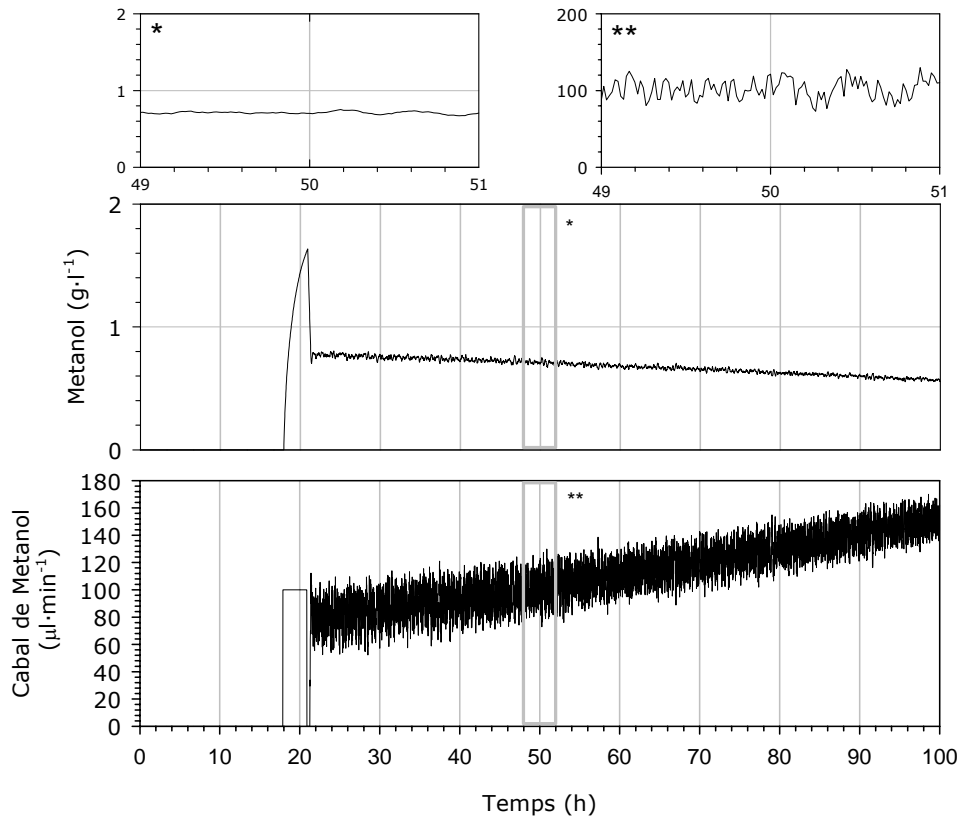


Figura 4.106. (Simulació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional ($K_c:350$).

Control PI

El principal avantatge del controlador proporcional integral rau en que sempre que hi hagi un cert error, el controlador actuarà sobre la variable manipulada. Per tant, amb aquest tipus de controlador no presentarà l'error en estat estacionari. Però, la incorporació de l'acció integral a un controlador proporcional afecta el comportament dinàmic en llaç tancat, fent la resposta més oscil·latòria.

L'equació del controlador proporcional integral (PI) de velocitat ve descrita per l'equació 4.34.

$$F_t = F_{t-1} + K_c \cdot \left((\varepsilon_{t-1} - \varepsilon_t) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \cdot \varepsilon_t \right) \quad \text{eq. 4.34}$$

L'interval de temps (Δt) és constant i igual a un minut, corresponent al temps entre dues actuacions del controlador. La constant integral, τ_i , com està situada al denominador té un efecte inversament proporcional sobre l'acció integral. Valors grans de la constant disminueixen la importància de la part integral del controlador. Quan menor és el seu valor, més ràpidament es tendeix a corregir l'error, però amb majors oscil·lacions.

Per portar a terme les simulacions, s'ha construït en diagrama de blocs l'equació 4.34., com es mostra a la figura 4.107.

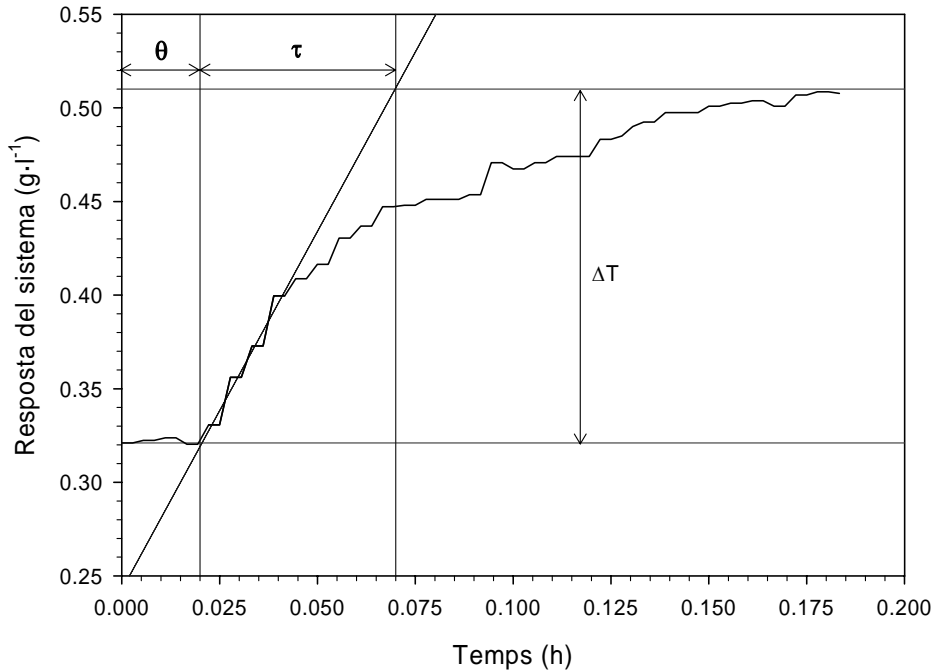


Figura 4.108. Resposta del sistema en provocar un esglaó de $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a l'entrada.

De l'anàlisi de la corba de resposta se'n obtenen els valors dels paràmetres característics de la corba de reacció del sistema ($\Delta T, \tau, \theta$).

- Δu : Increment a l'entrada (esglaó) = $0.006 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ ($100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).
- Δy : Alçada de la resposta final = $0.19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- $\theta = 0.02 \text{ h}$.
- $\tau = 0.05 \text{ h}$.
- $K = \Delta y / \Delta u = 31.66 \text{ l}^2\cdot\text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Cohen-Coon proposen que per a un control de tipus PI (Coon, 1952; Coon, 1956), el valor de K_p i τ_i depenen del valor de θ, τ, K de la següent manera:

$$K_c = \frac{1}{K} \frac{\tau}{\theta} \left[0.9 + \frac{\theta}{12\tau} \right] \quad \text{eq. 4.35.} \quad \tau_i = \frac{\theta [30 + 3(\theta/\tau)]}{9 + 20(\theta/\tau)} \quad \text{eq. 4.36}$$

Realitzant aquest càlcul s'obtenen els valors de $K_c: 7.4 \cdot 10^{-3} \text{ l}^2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ i $\tau_i: 0.036 \text{ h}$. Convertint aquestes constants a les unitats de treball de la variable manipulada utilitzada ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) el valor de paràmetres queda $K_c: 123.3 \mu\text{l}\cdot\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i $\tau_i: 2.16 \text{ min}$.

Cal assenyalar, que una de les aproximacions d'aquest mètode de sintonia es considerar que el sistema és de primer ordre. Tot i conèixer que no és així, pot ser que aquesta aproximació sigui vàlida per a un interval curt de temps, on les condicions no varien gaire.

Abans però de realitzar la fermentació, s'ha realitzat la prova en simulació amb resultats prou bons, com es mostra a la figura 4.109.

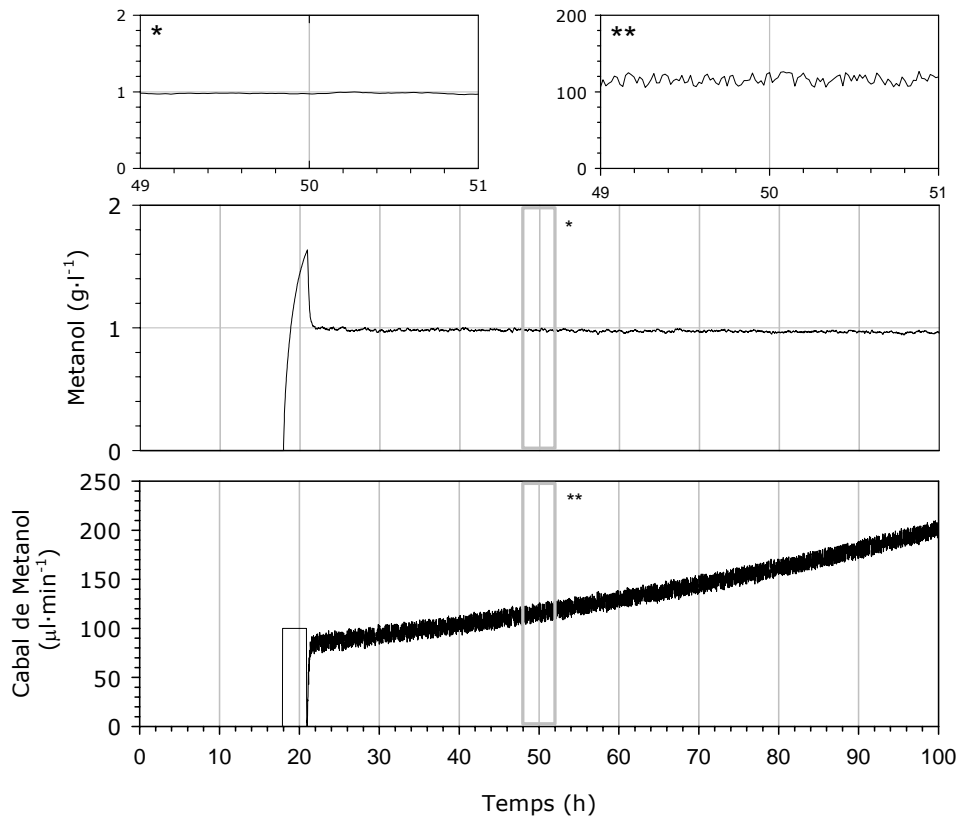


Figura 4.109. (Simulació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional Integral ($K_c: 123.3$ i $\tau_i: 2.16$).

La predicció de la simulació és que l'algorisme de control PI amb aquests paràmetres serà capaç de mantenir, de forma més que acceptable, el valor de la concentració de metanol al voltant de la consigna ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Davant d'aquestes bones perspectives, es va realitzar un experiment real amb el mateix algorisme de control i valors anteriorment provats a nivell de simulació. Els resultats es mostren a la figura 4.110.

Si s'observa l'evolució de la concentració de metanol en el fermentador (Figura 4.110), s'aprecia que no es compleixen les expectatives predites per la simulació. Si s'observa la seva evolució per trams, es poden diferenciar clarament 3 etapes. En el tram que va de les 20 a les 35 h, on hi ha un progressiu estretament de l'oscil·lació. De les 35 a les 80 h la mesura oscil·la dins un rang similar, i és a partir del final d'aquesta etapa que el control es va desestabilitzant progressivament. Sembla ser doncs que el paràmetres són més o menys vàlids només per un curt interval de temps de fermentació.

El primer que sorprèn és la tendència del cabal de metanol addicionat, que al contrari de l'esperat o estimat en simulació, va disminuint al llarg del temps. S'hauria d'esperar que el consum de la font de C, generés més biomassa i per tant més consum. Com es comentarà amb profunditat al capítol següent, s'identifica un canvi en el comportament fisiològic de la soca Mut^s, després d'un llarg període creixent en metanol com a única font de carboni. Sembla ser que passades les primeres hores de la fase d'inducció, el microorganisme va perdent de forma progressiva la capacitat d'assimilar metanol. Aquest fenomen pot ser causat per l'aparició d'algun subproducte tòxic o per un efecte d'envelliment de la soca.

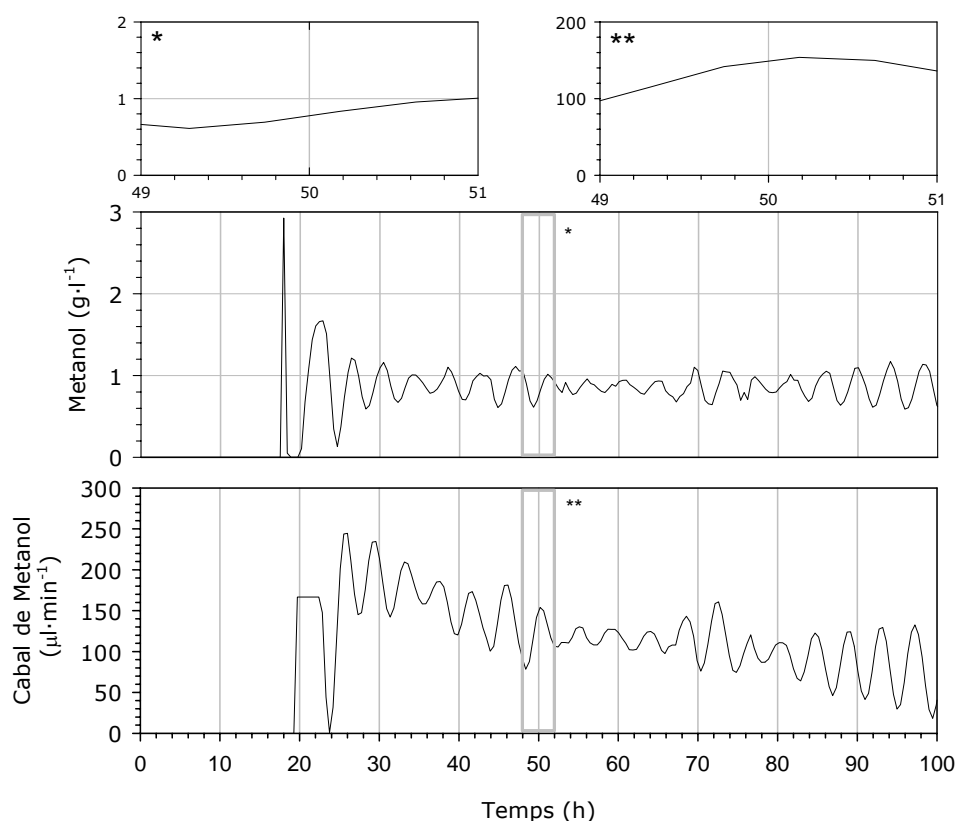


Figura 4.110. (Fermentació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional Integral ($K_c: 123.3$ i $\tau_i: 2.16$).

Tot i així, atesa la naturalesa del controlador PI, basada únicament en l'error, aquest hauria de funcionar correctament independentment de l'evolució del cultiu. En ser un sistema dinàmic canviant amb el temps, s'aprecia que la resposta del controlador, com s'ha descrit anteriorment, també es diferent segons a quina etapa del cultiu s'estigui. Així doncs, es fàcil deduir que tot i que es trobin un/s paràmetre/s del controlador que siguin vàlids per a les primeres hores de la fase d'inducció, aquests no ho seran per unes hores més endavant.

Si s'analitza amb detall detalladament l'evolució del cabal de metanol (variable manipulada) i la concentració de metanol (variable controlada) se'n poden extreure les següents conclusions:

- ▶ Les constants del controlador no són les més adients. També però, aquestes constants no han de ser iguals durant tota la fermentació, ja que a diferents moments de la fermentació l'acció de control ha de variar, a causa de la diferència de consum per part del microorganisme.
- ▶ El mètode de sintonia de paràmetres de control que s'ha utilitzat no és vàlida per aquest tipus de sistemes, ja que no es comporten com un sistema de primer ordre, i a més, tampoc tenen un comportament constant al llarg del temps.
- ▶ La constant oscil·lació també es deu en gran part a l'elevat temps mort que es té en la mesura. Pel que sembla, el valor de 3 minuts de retràs en l'anàlisi, tot i haver estat calculat de forma real, no és correcte.

Sembla ser, que el valor real és molt més elevat i variable al llarg de la fermentació, fent-se més evident a la fase final del cultiu.

Identificats els principals problemes que han provocat el mal funcionament del control, les possibles solucions podrien ser:

- ▶ Adaptació dels paràmetres de control en funció de les condicions del sistema. Buscar doncs una dependència en funció d'algun paràmetre biològic que indiqui l'estat fisiològic del microorganisme.
- ▶ Intentar reduir el temps mort del sistema de mesura de la concentració de metanol. A la bibliografia (Seborg, 1989) es descriuen els grans problemes d'estabilitat que suposa controlar un sistema amb temps mort quan s'utilitza un controlador PI. Les solucions a aquest problema passen per utilitzar algun tipus de compensador (Ex. Predictor d'Smith; Smith, 1959). Però, per utilitzar-les es necessita conèixer la funció de transferència del sistema, cosa que en un sistema biològic es pràcticament inviable a causa de la seva gran complexitat. Una altra alternativa per disminuir el temps mort, és la modificació de l'esquema experimental.

Tanmateix, disposar d'un controlador capaç de mantenir la concentració de metanol en un interval de $\pm 0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ és en molts casos suficient. Les exigències de la majoria d'investigadors/empreses que necessiten un sistema de control d'aquest tipus són menors a les aconseguides per aquest controlador.

Consegüentment, el següent controlador que es va provar en el sistema va ser un PID, Proporcional Integral Derivatiu, on a diferència de l'anterior s'inclou una part derivativa. Aquesta part del controlador té un caràcter anticipatiu que ajuda a esmoreir les oscil·lacions del senyal. No obstant això, no és aconsellable la seva implementació en sistemes amb un elevat temps mort, ja que la seva aportació a la millora del control és pràcticament nul·la. Per altra banda, quan el senyal de la variable controlada té soroll (de baixa amplitud i elevada freqüència que es sobreposen a la tendència general del senyal) no s'ha d'emprar mai l'acció derivativa. El seu ús provoca una ràpida desestabilització inacceptable del procés. Davant d'aquestes evidències es desaconsella el seu ús, ja que com s'ha observat anteriorment, el sistema té temps mort i soroll en el senyal.

Durant la realització d'aquest treball experimental, l'empresa BIOKIT S.A. que col·labora normalment amb el departament d'enginyeria química de la UAB, es va interessar pel treball que s'estava realitzant. Una de les seves línies d'investigació era per la producció de proteïnes heteròlogues per inducció amb metanol de *Pichia pastoris*. Per tant, també requerien un sistema de control de la concentració de metanol igual que el desenvolupat.

Es va establir un conveni de col·laboració per a la implementació d'un sistema de control, amb un controlador de tipus PI, al seu sistema de fermentació. Es va realitzar un programari, versió reduïda del comentat a l'apartat 4.3, capaç de gestionar les comunicacions amb els equips i realitzar les tasques de control per mantenir constant la concentració de metanol. Els resultats de la col·laboració han estat més que satisfactoris, pel que es va optar per incriure'l oficialment al registre de la propietat intel·lectual amb número B-428-04.

CONTROLADOR PI ADAPTATIU

Atesos el problemes detectats en la utilització d'un controlador PI digital de velocitat, es va optar per millorar-ho intentant modificar els paràmetres del controlador en funció de les necessitats biològiques del microorganisme.

En funció de la demanda de metanol per part del microorganisme, també calia modificar la magnitud de la resposta d'actuació del controlador. El continu canvi en la dinàmica del sistema requeria l'adaptació contínua dels paràmetres a les noves condicions.

La primera proposta passava per buscar una relació senzilla entre el valor de la K_p i el consum de metanol. Aquests dos valors havien de ser directament proporcionals, ja que a major consum es necessita una major resposta del controlador. El valor de la constant integral es mantenia invariable.

Com no es disposava de cap mesura en línia del consum de metanol, es va decidir buscar una altra variable del sistema estretament relacionada amb aquesta. La variable en línia escollida per indicar en cada moment les necessitats de substrat del microorganisme era l'OUR (variable que indica el consum d'oxigen). Com l'oxigen és un dels nutrients bàsics, el seu consum es directament proporcional a la quantitat consumida de metanol en cada moment.

Bibliogràficament, s'ha descrit la utilització de controladors de tipus PID per controlar variables com la temperatura, el pH o l'oxigen dissolt, on el guany depèn de l'OUR de forma lineal o potencial (Cardello and Ka-Yiu-San, 1988).

La relació a establir entre l'OUR i la K_p no és trivial ni senzilla. L'estudi per determinar-la suposa la realització de nombrosos experiments. L'estabilitat del control en tots aquests experiments no està garantida, ja que com s'ha vist anteriorment hi ha altres factors que afecten el sistema.

Tot i així, es va realitzar una fermentació, utilitzant una relació d'aquest tipus per veure les tendències, sense voler entrar en profunditat a la demostració que aquest tipus de control fos adient.

Com a relació entre el guany i la velocitat de producció d'oxigen (OUR) es va proposar l'equació 4.37.

$$K_p = k' \cdot OUR^n \quad \text{eq. 4.37}$$

on k' : 520 i n : 0.5 per una k_p en $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i l'OUR en $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Aquesta proporció es va pensar que podia funcionar, ja que per valors típics de la OUR baixos el valor del guany era al voltant de 70, pel contrari, quan el consum és més elevat pot arribar a ser entre 100 i 110. En tots els casos però, el guany és una mica inferior al proposat per la tècnica de sintonia de Cohen-Coon. D'aquesta manera, es pensà que almenys les oscil·lacions de la variable controlada al voltant de la consigna podrien ser d'amplitud constant.

A l'experiment es va la mateixa soca que en el cas anterior, Mut^s "singlecopy" i els resultats es mostren a la figura 4.111.

Els resultats obtinguts de la fermentació no són satisfactoris, però si que serveixen per treure'n algunes conclusions. En una primera anàlisi detallada es pot dividir l'evolució de la concentració en quatre períodes clarament definits. En una primera etapa (de les 20 a les 35 h) el control oscil·la en un interval més o menys raonable al voltant de la consigna. És en un segon tram (35-55 h) on hi ha una

progressiva desestabilització del procés, fet que denota la no adequació del control en aquest tipus de sistema. De les 55 a les 80 h varen sorgir una sèrie de problemes de naturalesa mecànica a la microbureta que van provocar aquestes alteracions. És a partir de les 80 h es que es va decidir retocar el tipus de control, utilitzant un valor de $n=1$ (relació lineal entre el guany i l'OUR) i un valor de k^* de 2600, rebaixant d'aquesta manera la magnitud de l'actuació. Igualment però, en aquesta etapa s'obté una oscil·lació amb una amplitud cada vegada major, remarcant que el control utilitzat no és acceptable.

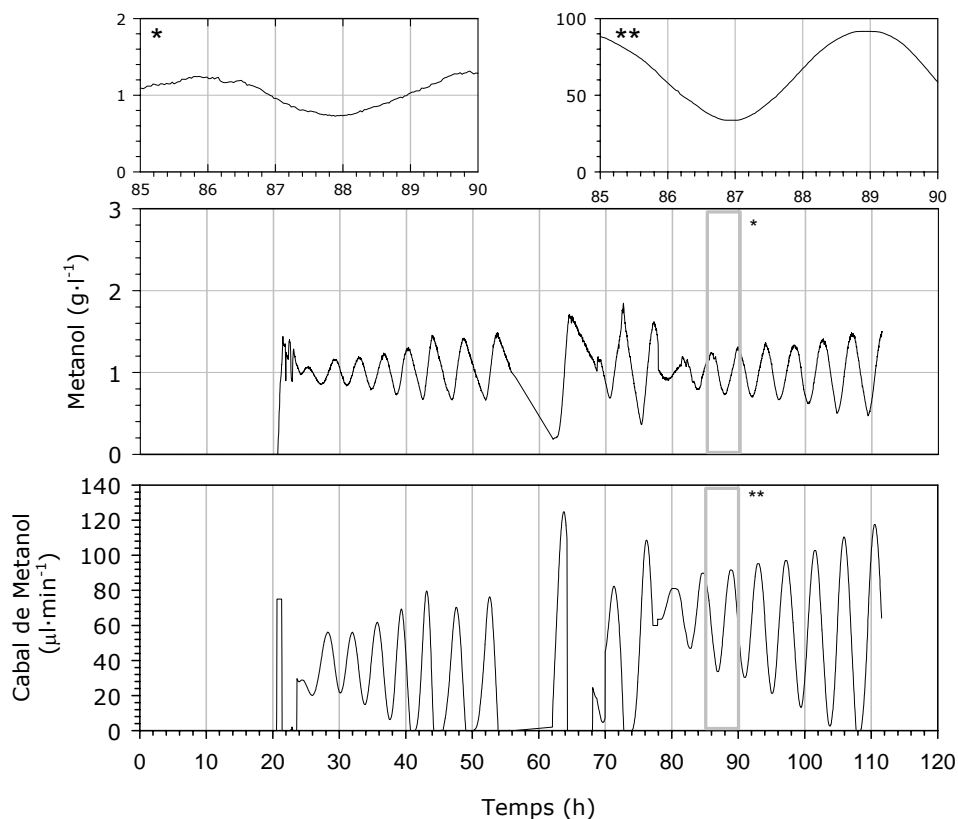


Figura 4.111. (Fermentació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional Integral Adaptatiu ($Kc:520 \cdot OUR^{0.5}$ i $\tau_i: 2.16$).

Tot i que es creu que la relació entre el guany i l'OUR no és la més adient, el problema de la desestabilització del senyal és causat majoritàriament per l'elevat temps mort del sistema. El seu efecte es pot notar clarament en el període entre les 85 i 90 h de cultiu on el desfase de l'oscil·lació entre la variable controlada i la manipulada és al voltant dels 40 -50 minuts.

Aquest temps mort tant elevat fa que el controlador PI provoqui una contínua oscil·lació en el senyal. Com més gran sigui el guany del controlador més gran serà l'amplitud de l'oscil·lació. Si el guany es disminueix, s'estreny el rang d'oscil·lació del senyal però la velocitat de resposta es menor. En ambdós casos però, és inevitable la desestabilització del senyal. Per tant, la utilització d'un controlador de tipus PI o PI adaptatiu no són suficients per aconseguir un control raonable al voltant del senyal.

Si es comparen els resultats d'aquesta fermentació amb l'anterior (Figura 4.110), es pot apreciar que el perfil de cabals de metanol alimentats varien significativament. Per tant, com es veu, a part de necessitar un controlador que

s'adapti a les diferents fases d'un mateix cultiu, aquestes necessitats també poden variar a cada cultiu.

Les possibles solucions a aquests problemes passaven per una profunda caracterització del sistema i aplicar posteriorment algorismes com el predictor d'Smith (Smith, 1959) o similars per compensar el temps mort. Altres alternatives com el control Fuzzy (Jantzen et al., 1998) o d'identificació de sistemes (RLS) (Sing et al., 1998) també podrien arribar a controlar el sistema. Aquestes alternatives però, s'allunyen de l'objectiu marcat del treball, ja que es busca un controlador senzill i versàtil que s'adapti a multitud de condicions de treball, independentment de la soca de treball.

Una de les possibles alternatives que compleix aquests requisits pot ser buscar un altre sistema que tingui més en compte l'estat fisiològic del microorganisme, en comptes de basar-se únicament en l'error entre la consigna i el valor real.

CONTROLADOR PI PREDICTIU (BASAT EN MODEL)

Si es disposa de la mesura en línia de la concentració de metanol i dels cabals d'alimentació es possible calcular en cada moment quin és el consum de substrat per part del microorganisme. Si a partir d'aquest càlcul, s'addiciona en cada moment la quantitat de metanol consumida, s'arribarà a mantenir constant la seva concentració a l'interior del bioreactor. En funció del valor inicial de la concentració quan es comenci a calcular el consum el valor estable de la concentració serà major o menor. Si es vol mantenir el senyal en un determinat valor es pot afegir a aquest càlcul l'acció d'un controlador PI que modifiqui lleugerament el cabal per tendir cap a un valor desitjat.

Així doncs, es proposa un nou controlador on la variable manipulada es calculi a partir de la combinació entre un controlador PI i el càlcul en línia del consum de Metanol. D'aquesta forma s'aconsegueix que l'acció de control sigui la suma de l'estimació del metanol que s'està consumint més la contribució d'un PI de paràmetres constants per acabar d'ajustar la concentració de substrat al valor de la consigna. Esquemàticament es presenta el nou tipus de controlador a la figura 4.112.

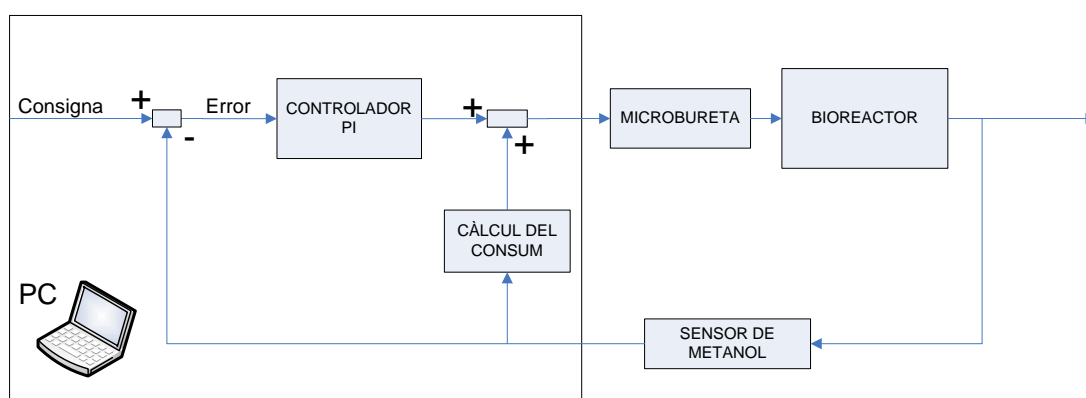


Figura 4.112. Esquema del control de tipus PI predictiu.

La construcció d'aquest nou controlador passa en primera instància per trobar un mètode de càlcul en línia del consum de metanol.

L'opció a priori més senzilla passa per realitzar el balanços de matèria del substrat en qüestió per a un cultiu en semicontinu.

$$F \cdot M_0 - r_M = \frac{d(M \cdot V)}{dt} \quad \text{eq. 4.38}$$

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).

El terme d'entrada més el terme de generació (valor negatiu ja que és un consum) són iguals a l'acumulació. En tractar-se d'un cultiu en semicontinu, no hi ha terme de sortida.

Desenvolupant l'equació 4.38 s'obté,

$$F \cdot M_0 - r_M \cdot V = V \cdot \frac{dM}{dt} + M \cdot \frac{dV}{dt} \quad \text{eq. 4.39}$$

On, per definició, es pot substituir la variació del volum amb el temps com el cabal (F).

$$\frac{dV}{dt} = F \quad \text{eq. 4.40}$$

Introduint aquest canvi a l'equació 4.39, s'obté l'equació 4.41.

$$F \cdot M_0 - r_M \cdot V = V \cdot \frac{dM}{dt} + M \cdot F \quad \text{eq. 4.41}$$

Així doncs, la variació de la concentració de metanol amb el temps, es pot calcular com el consum (r_M) més la quantitat de metanol alimentada, com mostra l'equació 4.42

$$\frac{dM}{dt} = r_M + \frac{F(M_0 - M)}{V} \quad \text{eq. 4.42}$$

Si per un increment de temps prou petit $t + \Delta t$, es considera que la variació de concentració de metanol en el medi respecte al temps t és nul·la ($\frac{dM}{dt} = 0$), el consum de metanol es pot calcular amb l'equació 4.43.

$$r_M = -\frac{F_{t+\Delta t}(M_0 - M)}{V} \quad \text{eq. 4.43}$$

Substituint aquesta expressió de nou a l'equació 4.42, s'obté l'equació 4.44.

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{F_{t+\Delta t}(M_0 - M)}{V} + \frac{F_t(M_0 - M)}{V} \quad \text{eq. 4.44}$$

Deixant el cabal del temps $t + \Delta t$ en funció de la resta de termes (eq 4.45) es podrà calcular successivament el cabal d'alimentació consumit pel microorganisme.

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt} \quad \text{eq. 4.45}$$

Per tant, s'ha deduït a partir del balanç quin és el cabal consumit per l'interval $t + \Delta t$. Si s'addiciona una quantitat de metanol igual al cabal consumit calculat per l'equació, la concentració de l'interior del reactor romandrà constant.

El principal repte per calcular numèricament el valor de l'equació 4.45 és obtenir el valor de la derivada de la concentració de metanol en el temps. És conegut, que la diferenciació numèrica a partir de valors experimentals utilitzant mètodes numèrics com les diferències finites tenen molt d'error i són poc fiables. A més, en tractar-se d'un senyal que té soroll, el seu càlcul per diferències finites seria del tot desaconsellable.

Un cop analitzades les diferents alternatives i el seu grau de complexitat, es va optar per suavitzar la concentració de metanol per "splines" d'aproximació a una corba i calcular posteriorment la seva derivada a l'últim punt. D'aquesta forma s'obté una aproximació "suau" del valor de la derivada. Aquest càlcul es pot entendre fàcilment si s'observa la figura 4.113.

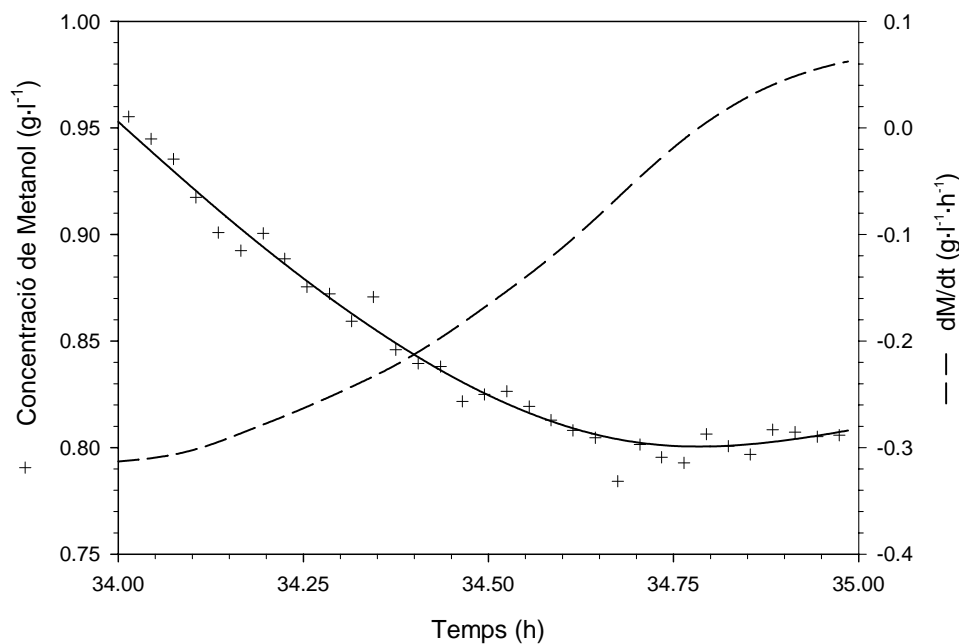


Figura 4.113. Càlcul de l'aproximació per "splines" (línia contínua) de la concentració de Metanol i de la seva derivada (línia discontinua).

L'aproximació per "splines" suavitza la tendència dels valors reals del sistema, i a partir d'aquesta aproximació es pot estimar el valor final de la derivada, necessari al càlcul de la velocitat de consum de metanol.

Aquests càlculs es poden determinar en una finestra de temps que es pot configurar, segons les necessitats, entre 3 i 100 minuts. Es desaconsella la

utilització de finestres de temps petites (menors a 10 minuts) ja que el soroll de la mesura pot provocar la contínua oscil·lació del valor de la derivada.

Per realitzar aquest càlcul en línia de la derivada de la concentració de metanol s'ha utilitzat el programari de càlcul numèric MATLAB v 6.5 i més concretament el seu paquet integrat de Curve Fitting Toolbox versió 1.1.

Com s'ha referenciat anteriorment, la utilització en solitari de l'equació 4.45 per addicionar el cabal de metanol no és capaç de mantenir constant la concentració de substrat desitjada, si el punt inicial de la concentració de metanol no és ja el de consigna. És per aquest motiu que cal incloure un nou terme que en funció de l'error que modifiqui el valor del cabal per acabar aconseguint ajustant el valor real al de consigna. Per realitzar aquesta tasca es va seleccionar l'estructura del controlador PI digital de velocitat. I com es mostra a l'equació 4.46, s'aconsegueix completar l'algorisme de control on es calcula per cada interval de temps el cabal d'alimentació, funció del consum i de l'error amb la consigna.

$$F_{t+\Delta t} = F_t - \underbrace{\frac{V}{(M_0 - M)} \cdot \frac{dM}{dt}}_{\text{consum}} + K_p \underbrace{\left((\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_i} \varepsilon_t \right)}_{PI} \quad \text{eq. 4.46}$$

La implementació d'aquest nou algorisme de control al programari de control no era tant trivial com la resta de controladors provats en anterioritat. Ara, no tant sols s'han de realitzar operacions algebraïques sinó que cal realitzar càlculs més elaborats com és l'aproximació de la derivada. Davant d'aquest problema es podia optar per dues opcions.

La primera consisteix en programar en Visual Basic® els mètodes numèrics necessaris per realitzar els càlculs. L'altre solució passava per integrar dins el sistema un programari de càlcul numèric, com és el MATLAB® 6.5, on es poden dur a terme de forma ràpida i senzilla els càlculs requerits.

Finalment, es va optar per la segona opció motivat en part per augmentar substancialment la potència de càlcul del programari. La integració d'aquest sistema dins no és complexa, els dos programaris estan preparats per intercanviar informació de forma ràpida i senzilla. És important optimitzar les subrutines de càlcul al MATLAB, per estalviar recursos de l'ordinador com són la memòria i temps de processador.

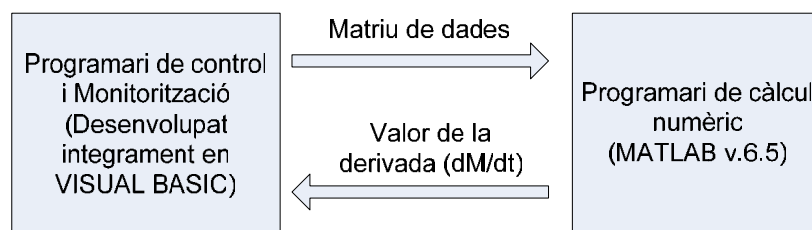


Figura 4.114. Esquema de l'intercanvi d'informació entre el programari de control i el de càlcul numèric.

Mitjançant la configuració a la pantalla de CONTROL METANOL del programari de control i monitorització es pot activar aquest algorisme. A partir d'aquest moment, el programari obre una sessió de MATLAB on hi descarrega cada minut una matriu de dues columnes de dades on hi ha els valors ordenats del temps i la seva corresponent mesura de la concentració de metanol a l'interior del

bioreactor. Després d'haver rebut aquesta informació s'executa un fitxer programat amb MATLAB, que calcula mitjançant la metodologia comentada anteriorment el valor de la derivada de la concentració de metanol amb el temps. El programari de gestió de la fermentació captura el valor de la derivada que s'utilitza seguidament per establir el nou cabal a alimentar al bioreactor.

La sintonia dels paràmetres del controlador PI no es poden calcular mitjançant els mètodes tradicionals de Ziegler-Nichols o Cohen-Coon. La configuració d'aquest nou algorisme depèn de dos termes, el de consum i el PI, per tant no es tracta d'un controlador basat únicament en l'error.

Després d'una fermentació preliminar, on es van realitzar diferents proves, es va determinar que uns valors acceptables del controlador PI, eren d'una $K_p: 8 \mu\text{l}\cdot\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i $\tau_I: 30$ min. No obstant això, es va poder apreciar que el rang de valors vàlids d'aquests paràmetres es ampli, ja que és el terme de consum el responsable de la major part de l'acció. Es va observar que si s'aconsegueix arribar amb més o menys facilitat al punt de consigna, la contribució de la part del PI és, lògicament, mínima.

També es va determinar que la finestra de temps per realitzar l'aproximació per "splines" i calcular la derivada fos major de 50 minuts, valor amb el qual s'obtenien bones aproximacions del consum del microorganisme, sense grans oscil·lacions.

Una segona fermentació (figura 4.115) va demostrar que el control es capaç de mantenir la concentració de metanol sobre el valor de la consigna ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) de forma més satisfactòria ($\pm 0.08 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

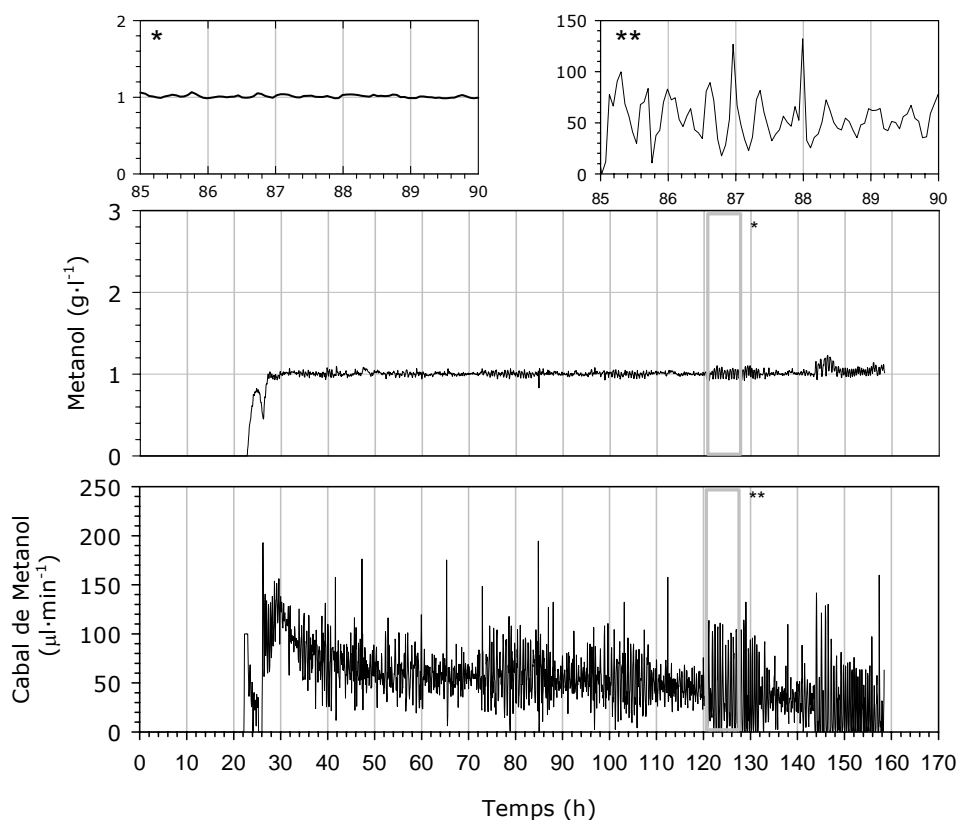


Figura 4.115. (Fermentació) Variables controlada i manipulada utilitzant un controlador proporcional Integral basat en model ($K_c: 8$ i $\tau_I: 30$).

El control basat en model del balanç és capaç de mantenir la concentració en un rang força estret. Els problemes del temps mort han estat minimitzats gràcies a l'incorporació del càlcul en línia del consum. El procés és altament estable durant més de 135 hores de fase d'inducció.

A més, aquest tipus de controlador ha estat posteriorment provat en soques de *Pichia pastoris* tipus Mut⁺ "singlecopy" que es caracteritza per una dinàmica i velocitat de consum de substrat força més elevada (aproximadament d'un ordre de magnitud respecte la soca Mut^s "singlecopy"). Després d'un primer experiment per sintonitzar manualment els paràmetres del controlador PI, el controlador ha estat capaç de mantenir ($\pm 0.17 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) la concentració estable en l'interior del bioreactor.

El que potser pot sobtar és el constant oscil·lacions en l'evolució del cabal addicionat, encara que l'escala sigui petita hi ha una constant variació entre un valor i el següent. Es creu que rebaixant l'acció del controlador (k_p més petita i τ_I més gran) pot disminuir aquesta elevada oscil·lació en detriment però d'un rang d'oscil·lació més gran en la variable controlada.

Finalment i com a conclusió, es pot afirmar que s'ha desenvolupat i aplicat un algorisme de control capaç de mantenir la concentració de metanol al nivell desitjat durant tota la fase d'inducció. El controlador compleix els principals requisits proposats al principi del seu desenvolupament com la seva senzillesa, versatilitat i fàcil sintonia.

És possible trobar altres algorismes de control anticipatiu, predictiu, difús o mitjançant la identificació de sistemes a partir dels quals s'obtinguin uns resultats similars o inclús millors. I és evident que futures investigacions aniran en aquesta direcció, però, fins el moment l'algorisme proposat resol satisfactòriament el problema de control plantejat. Així doncs, s'ha desenvolupat una alternativa de fàcil ús i implementació, que pot tenir una bona acceptació a nivell industrial.

4.4. EXPERIMENTS FINALS

En aquest apartat del treball és on s'integren totes les eines desenvolupades amb l'objectiu de millorar de la producció de ROL (figura 4.116). Pot semblar que algunes d'aquestes millores, com l'estimació en línia de la biomassa o l'extracció automàtica de mostres, no tenen una relació directe amb l'augment de producció. Però, tot el que signifiqui una nova aportació en el coneixement del comportament fisiològic del microorganisme o en un increment en la robustesa i reproductibilitat del cultiu, és indubtablement una ajuda suplementària.

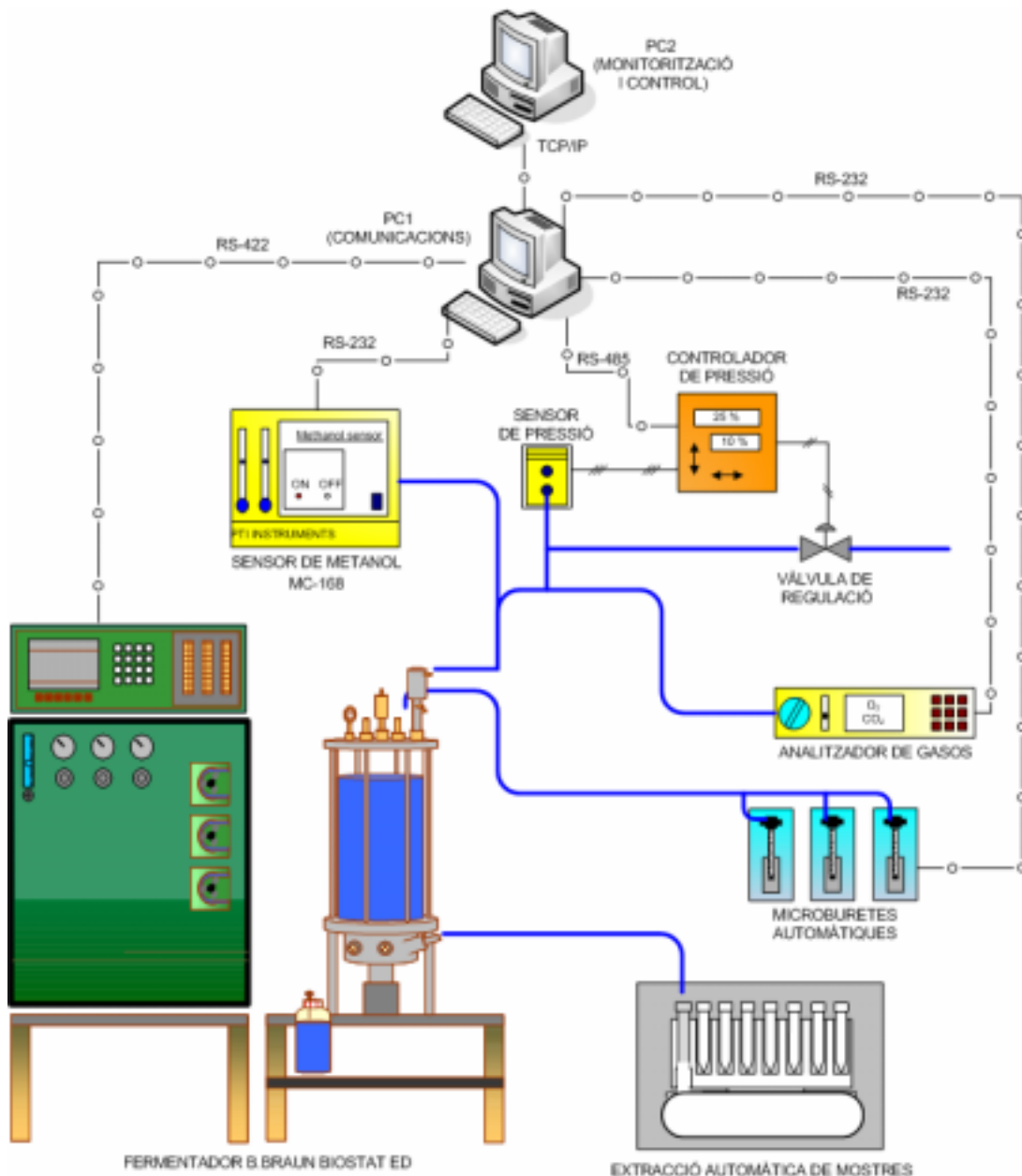


Figura 4.116. Esquema del muntatge emprat després d'introduir-hi les diferents millores.

Les principals millores que s'han realitzat són:

- ▶ Control de la pressió a la sortida de gasos.
- ▶ Anàlisi en línia de la concentració de CO₂ i O₂. (Estimació biomassa i velocitat específica de creixement).
- ▶ Mesura i control en línia de la concentració de metanol.
- ▶ Sistema automàtic d'addició de glicerol, metanol i font de nitrogen.
- ▶ Sistema autònom de mostreig.
- ▶ Programari de comunicacions.
- ▶ Programari de monitorització i control del bioprocés.

En aquest apartat es comprovarà el funcionament en comú de tota la nova instrumentació integrada, intentant identificar si existeixen conflictes entre elles. De totes les millores, és el programari de monitorització i control el que ha de passar un examen més exigent, ja que ha d'establir comunicació simultàniament amb diferents equips, ha de monitoritzar, controlar i gestionar diferents variables i estimar-ne en línia algunes d'altres, i tot això durant un llarg període de temps.

Tots els experiments exposats a continuació s'han realitzat amb la soca seleccionada de *Pichia pastoris* Mut^s "singlecopy" (KM_100). Els bons resultats a nivell de productivitat en combinació amb la seva dinàmica lenta de creixement, facilitant d'aquesta forma el control del cultiu, fa d'aquesta soca la candidata més adient per portar a terme la producció de ROL en cultiu semicontinu.

L'estratègia de la fermentació és la ja preestablerta anteriorment, començant per un primera etapa discontinua amb 40 g·l⁻¹ de glicerol. Exhaustida la totalitat d'aquesta font de carboni, es comença la fase de transició on es combina l'addició, durant un període total de 5 hores, d'un cabal decreixent de glicerol i constant de metanol durant les 3 últimes hores. Es completa el cultiu amb una tercera etapa, addicionant únicament el substrat inductor, el metanol, intentant mantenir la seva concentració constant o almenys per sota el llindar considerat tòxic (>8-10 g·l⁻¹). És en aquesta última on es produeix la inducció de l'expressió de la ROL.

Mitjançant l'estudi d'una sèrie de cultius, s'intentarà esbrinar quines són les condicions de treball que afavoreixen la producció de ROL. Cal ser conscient que es tracta d'un procés biològic, del qual no es coneix amb detall el seu funcionament a causa de la seva elevada complexitat. Per tant, la recerca de les millors condicions de treball es realitzarà de forma totalment empírica, observant amb detall la reacció del microorganisme davant de diferents canvis en les condicions de treball.

Són múltiples les variables que poden tenir una influència sobre la producció, des del pH o la temperatura passant a variables d'estat com la velocitat específica de creixement. A més, en tractar-se d'un microorganisme no es pot veure la influència aïllada de la variació d'alguna d'aquestes variables, ja que la seva alteració pot afectar amb major o menor grau a la resta.

No obstant això, i després d'observar els resultats d'altres estudis on també es desitja augmentar la producció, s'apunta la velocitat específica de creixement com la variable més lligada a la producció de la proteïna desitjada (Brieley et. Al, 1990; D'Anjou et al., 2001). En cap cas però, es pot afirmar, sense passar prèviament per l'experimentació, quin és el valor òptim de μ per maximitzar la producció. Aquest valor està influenciat per les característiques del tipus de soca emprada i per la naturalesa de la proteïna hoste.

Centrant-se en la soca de treball, la KM_100 (Mut^s "singlecopy") té una velocitat específica de creixement màxima ($\mu_{m\grave{a}x}$) molt baixa (menor de 0.02 h⁻¹),

fent que sigui difícil establir i apreciar quin efecte té la variació de la μ sobre la producció en un rang tan estret, entre 0 i 0.02 h^{-1} . És clar però, i com s'observa a la fermentació FSS_01 (figura 4.15,16 i 17), que per una soca Mut^s quan el creixement és nul no hi ha producció de la proteïna heteròloga.

Tot i així, mantenint constant la concentració de metanol al interior del bioreactor es possible fixar la velocitat de creixement del microorganisme, encara que el rang de variació sigui molt estret. La relació entre ambdues variables, la μ i la concentració de substrat inductor descrita per l'equació de Monod (figura 4.76), confirma que a $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ja s'arriba pràcticament a la velocitat específica màxima de creixement (μ_{MAX}). Per tant, és d'esperar que si la producció està vinculada al creixement, la realització de cultius a diferents concentracions de metanol, variable més fàcil de controlar, entre 0 i $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ desvetllarà les millors condicions d'operació per tal d'aconseguir alts nivells de productivitat de ROL.

S'han planificat un seguit de cultius amb l'objectiu de veure com varia la producció si es treballa a concentració constant en un rang entre 0 i $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Aquests experiments han estat realitzats paral·lelament amb el desenvolupament del controlador de la concentració de metanol (apartat 4.3). Això significa que en alguns cultius no s'ha utilitzat l'última versió del controlador sinó el que s'estava provant en aquell moment. En tots casos però, el manteniment de la concentració del substrat inductor al voltant del valor de consigna és raonable, no superant en cap cas un valor superior a $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en el rang d'oscil·lació.

Per cada cultiu es presenta gràficament l'evolució amb el temps de les principals variables com són la concentració de biomassa i metanol, l'activitat lipolítica, el cabal d'alimentació de metanol i les velocitats específiques de creixement (μ), consum de metanol ($-q_s$) i producció de lipasa (q_p).

La durada de cadascuna de les etapes del cultiu es poden diferenciar per les línies discontinues situades verticalment en el gràfic. Indicar finalment, que s'ha intentat utilitzar el mateix interval de valors en les escales gràfiques, encara que en alguns casos s'ha modificat per millorar la comprensió visual de la mateixa.

4.4.1. EXPERIMENT 1

Nom Fermentació	FSS_04
Soca	Mut ^s "singlecopy" (KM100_1)
Estratègia de cultiu	Semicontinu
Medi	MFBD_1
Algorisme de control	Control enllaç obert, amb seguiment en línia de la concentració de metanol. Modificació manual del cabal d'addició.
Consigna de la concentració de Metanol	1 g·l ⁻¹

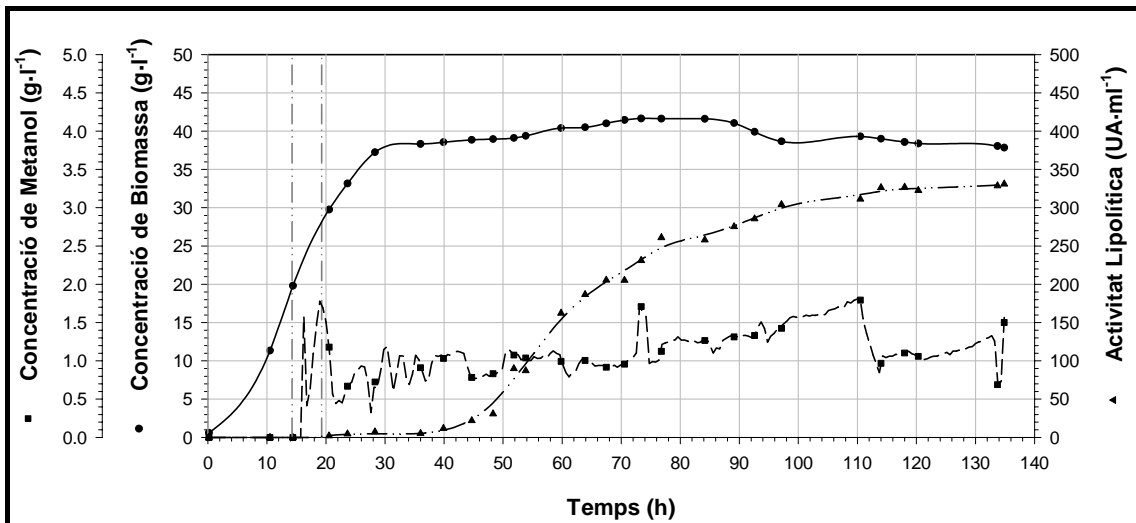


Figura 4.117. Fermentació FSS_04. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

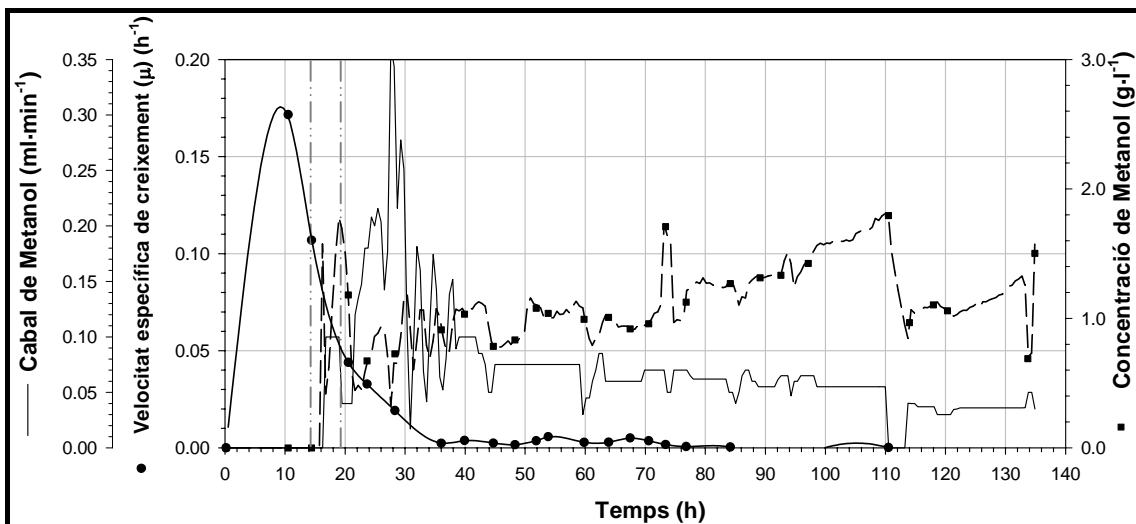


Figura 4.118. Fermentació FSS_04. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

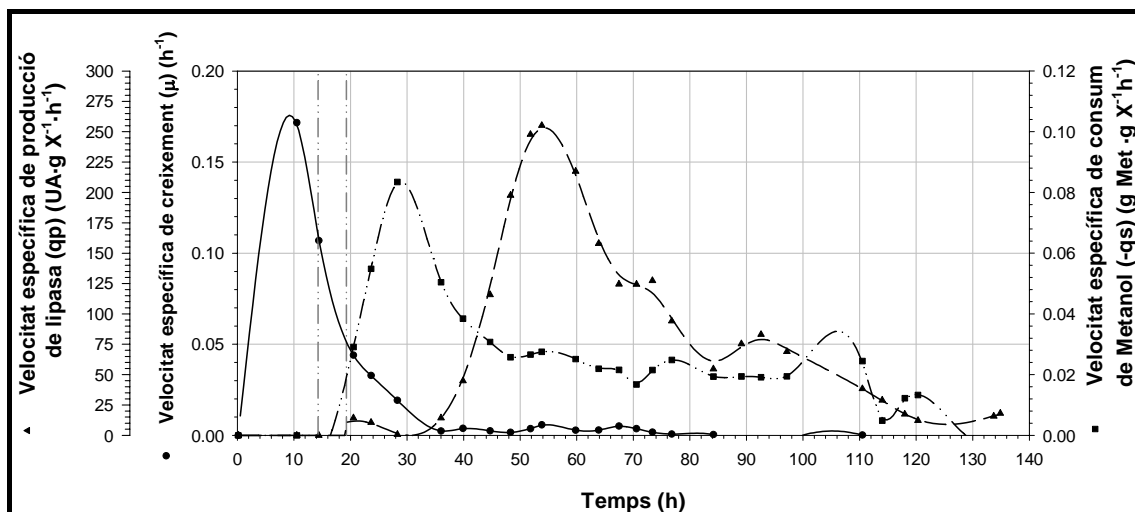


Figura 4.119. Fermentació FSS_04. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

DADES CULTIU	
Durada (h.)	134.9
Activitat màx. ($\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$)	331
Rendiment Producte/biomassa * $Y_{P/X}$ ($\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}$)	8744.6
Productivitat * ($\text{UA}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	2453.4
Productivitat específica * ($\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	64.84
FASE DISCONTÍNUA	
Durada (h.)	14.3
Rendiment biomassa/glicerol $Y_{X/G}$ ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.50
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)	
μ mitjana (h^{-1})	0.003
-qs màxima ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.084
-qs mitjana ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.026
qp màxima ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	255.1
qp mitjana ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	78.1
Rendiment Biomassa/Metanol $Y_{X/M}$ ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.10

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.19. Fermentació FSS_04. Valors de rendiments, productivitats i velocitats específiques del cultiu.

En aquesta primera fermentació que es presenta, no es va utilitzar un control enllaç tancat per mantenir constant la concentració de metanol. El cabal d'addició del substrat durant la fase d'inducció s'anava modificant manualment en funció de la mesura en línia rebuda de l'equip MC-168. No obstant això, es va aconseguir mantenir el valor de la variable controlada al voltant de $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ durant la major part del cultiu tret de la fase final, on la desviació respecte la consigna és més evident.

S'observa també a la figura 4.117 l'evolució característica de la concentració de biomassa dels cultius amb soques de *P. pastoris* amb fenotip Mut⁵. És durant les primeres 30 h de fermentació on es centra la major part del creixement. Aquest període engloba les dues primeres etapes del cultiu, on predomina l'existència de

glicerol com a font de carboni i finalment les primeres hores de la fase d'inducció on encara es detecta un increment de biomassa quan ja es consumeix el metanol. Transcorregut aquest període no es noten aparentment canvis significatius de densitat cel·lular.

L'evolució de la velocitat específica de creixement (figura 4.118) dona informació rellevant sobre el microorganisme. L'afinitat d'aquest llevat per les dues fonts de carboni emprades queda plasmada en el valors aconseguits de μ en cadascuna de les etapes.

Al contrari del que s'espera d'un cultiu d'aquestes característiques, el cabal subministrat de metanol va disminuint al llarg del temps. Aquesta davallada tant en la velocitat específica de creixement també es manifesta, com era d'esperar, en la velocitat específica de consum de substrat inductor ($-q_s$). És durant les primeres hores de la fase d'inducció on s'aprecia un màxim de consum que cau progressivament fins establitzar-se sobre $0.02 \text{ g Metanol} \cdot \text{g X}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (figura 4.119).

El perfil de l'activitat té forma sigmoïdal amb una clara tendència final a la saturació. A partir de les 35 hores del cultiu, coincidint amb la caiguda de la velocitat específica de creixement, és just en el moment on es comença a produir la ROL. La velocitat específica de producció comença a incrementar en aquest moment fins arribar a un màxim a les 60 h.

La relació existent entre la μ i $-q_s$ és directament proporcional, el màxim de consum coincideix més o menys amb valors elevats de la velocitat de creixement i a l'inrevés. En canvi, en el cas de la μ i la velocitat de producció (q_p) la relació no sembla tant simple. Es pot apreciar que quan la velocitat específica de creixement passa a estar per sota de 0.01 h^{-1} , la producció augmenta fins arribar a un valor màxim.

De l'anàlisi dels valors de la taula 4.19 es pot destacar el valor final de l'activitat ($331 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$), sent pràcticament el doble del valor aconseguït fins el moment utilitzant la mateixa soca (FSS_01: $182 \text{ UA} \cdot \text{ml}^{-1}$). En conseqüència, tant el rendiment com les productivitats són força altes. Remarcant també el valor mitjà de la velocitat específica de creixement durant la fase d'inducció és extremadament baixa. Cal indicar però, que aquest valor queda falsejat per la fase final del cultiu on s'assoleixen valors negatius d'aquesta variable. No obstant això, queda palès que la μ durant aquesta última fase de la fermentació és pràcticament nul·la, informació que dona idea de la soca utilitzada (Mut^s) i els efectes negatius que té la producció de ROL sobre el creixement de la cèl·lula.

La comparació d'aquest cultiu amb els següents completarà l'estudi de la seva evolució.

4.4.2. EXPERIMENT 2

Nom Fermentació	FSS_02
Soca	Mut ^s "singlecopy"
Estratègia de cultiu	Semicontinu
Medi	MFBD_1
Algorisme de control	PI
Consigna concentració de Metanol	1 g·l ⁻¹

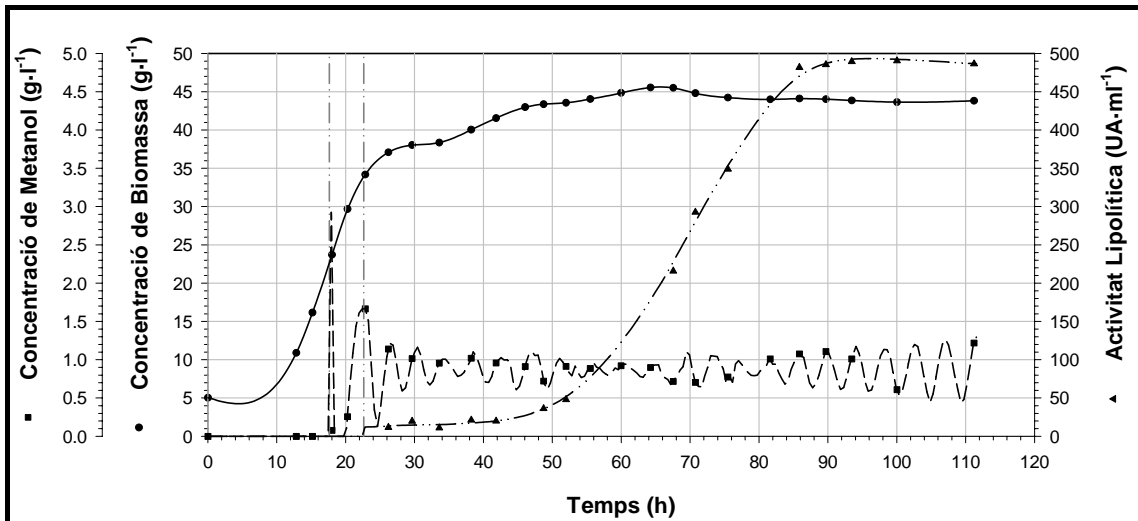


Figura 4.120. Fermentació FSS_02. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

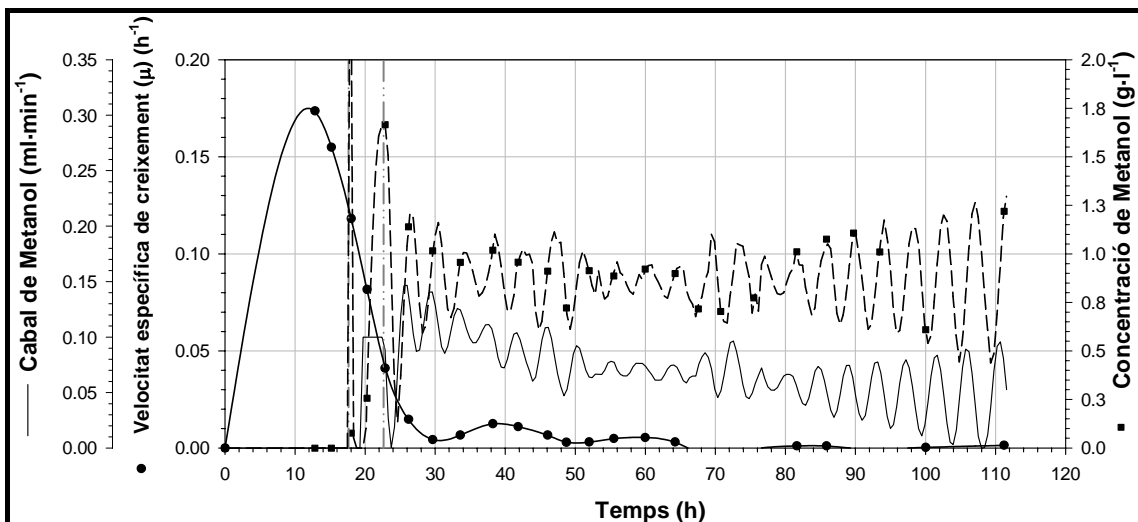


Figura 4.121. Fermentació FSS_02. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

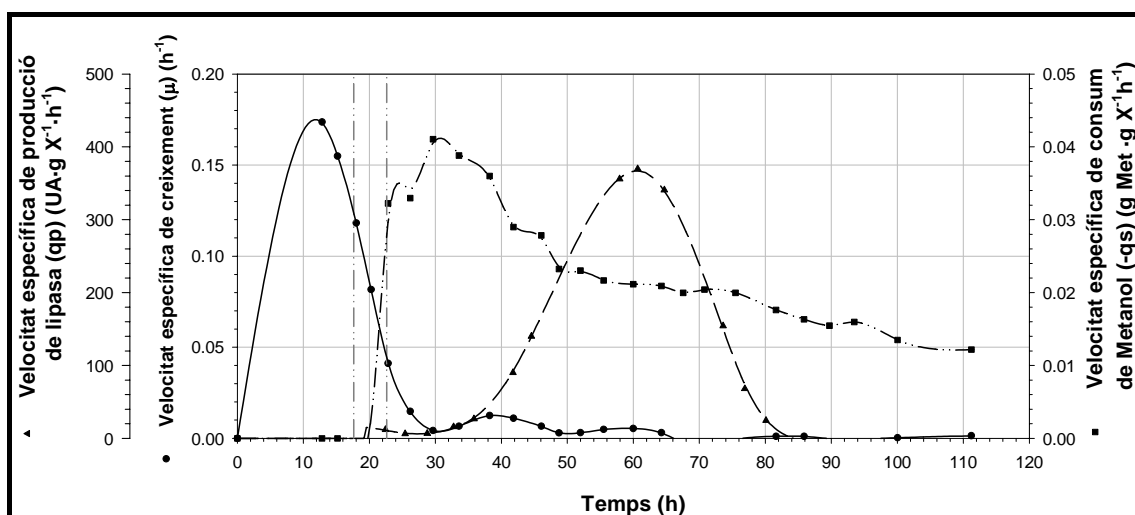


Figura 4.122. Fermentació FSS_02. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

DADES CULTIU	
Durada (h.)	111.2
Activitat màx. ($\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$)	490
Rendiment Producte/biomassa * $Y_{P/X}$ ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}$)	11236
Productivitat * ($\text{UA}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	4901
Productivitat específica * ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	112.3
FASE DISCONTÍNUA	
Durada (h.)	17.6
Rendiment biomassa/glicerol Y_{XG} ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.44
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)	
μ mitjana (h^{-1})	0.004
-qs màxima ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.041
-qs mitjana ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.024
qp màxima ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	369.8
qp mitjana ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	147.7
Rendiment Biomassa/Metanol $Y_{X/M}$ ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.143

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.20. Fermentació FSS_02. Valors de rendiments, productivitats i velocitats específiques del cultiu.

El fet més destacable d'aquest cultiu és l'elevada producció d'enzim aconseguida, al voltant de $500 \text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$. Aquesta dada també va recolzada per uns molt bons resultats a nivell de productivitat, ja que el temps de cultiu és del mateix ordre que la resta de fermentacions anteriors. La corba d'activitat lipolítica, a l'igual que el cultiu FSS_04, té una forma sigmoïdal, podent diferenciar la producció en tres fases. Una primera, que va de les 30 a les 50 h., on tot i tenir el microorganisme consumint el substrat inductor, no s'aprecia una aparició significativa de lipasa extracel·lular. A partir de les 50 h de cultiu i durant les següents 40 hores hi ha un increment pràcticament lineal de la concentració d'enzim. Acabada aquesta segona etapa i fins al final de la fermentació la producció de ROL resta totalment aturada.

La utilització de l'algorisme de control Proporcional Integral (PI) permet mantenir la concentració de metanol al voltant de la consigna d' $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en un rang d'oscil·lació prou estret per considerar-lo més que satisfactori.

Si es comparen amb detall la fermentació FSS_04 i FSS_02, s'observa que l'evolució dels diferents paràmetres durant les primeres 50 h de cultiu és pràcticament idèntica. Cal destacar doncs, que les millores realitzades en el muntatge han donat el seu fruit pel que fa a la reproductibilitat. A l'etapa d'inducció durant aquest període s'observa que en ambdós cultius es manté la concentració de metanol al voltant de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

En els perfils de la velocitats específiques de consum de metanol ($-q_s$) i de producció de ROL (q_p) s'observa que en ambdues fermentacions (FSS_04 i FSS_02) tenen aproximadament la mateixa forma i temporalment també tenen una evolució molt similar. Per la q_s , el seu valor màxim esdevé poques hores després d'haver començat l'etapa de transició, posteriorment decau de forma progressiva indicant una disminució de l'activitat del microorganisme. Aquesta caiguda coincideix temporalment amb la baixada de la velocitat de creixement fins a valors propers a 0 h^{-1} . És clar doncs, que en tots dos casos la relació entre q_p i μ està estretament lligada.

Per altra banda, l'evolució de la l'activitat lipolítica es centra, en ambdós casos, únicament entre les 40 i 80 h de cultiu. I justament en el punt mig d'aquest interval, a les 60 h, s'arriba al valor màxim de velocitat. Per tant existeix un clar desfasament en les dues fermentacions, entre el consum de metanol i la velocitat màxima producció de ROL. No és que s'intenti relacionar directament els dos pics entre ells, però no és il·lògic pensar que la velocitat màxima d'expressió de proteïna vingui lligada a un elevat consum de substrat inductor. En una primera instància es va plantejar d'hipòtesi de que aquest desfasament entre pics era causat per un problema d'excreció de la ROL a nivell extracel·lular. D'aquesta forma es donava força a la possibilitat de relació entre q_p i q_s , i també s'explicava la divergència entre els màxims per problemes de transport.

La distància de temps entre els màxims de q_p i q_s , unes 30 h, es creu massa elevada per poder afirmar que existeix una relació directament proporcional entre creixement-consum-producció.

La diferència a nivell de producció entre els dos cultius es pot relacionar amb la precisió del control al voltant de la consigna de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. La fermentació FSS_02, on la concentració de metanol és manté durant un període més llarg de temps proper al valor desitjat, és la que obté uns millors resultats. Pel contrari, la concentració de substrat inductor a la fermentació FSS_04 es desvia lleugerament del valor desitjat fins arribar a distanciar-se un màxim de $0.8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Així doncs, sembla ser que mantenir la concentració de metanol al voltant de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ té uns efectes positius a nivell de producció (FSS_02). Encara però, falta ratificar aquesta afirmació realitzant altres cultius a consignes de concentració de substrat inductor a valors inferiors i superiors dins el rang d'estudi ($0\text{-}2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

4.4.3. EXPERIMENT 3

Nom Fermentació	FSS_06
Soca	Mut ^s "singlecopy"
Estratègia de cultiu	Semicontinu
Medi	MFBD_1
Algorisme de control	PI+ Control predictiu (Càlcul del consum basat en model)
Consigna concentració de Metanol	0.5 g·l ⁻¹

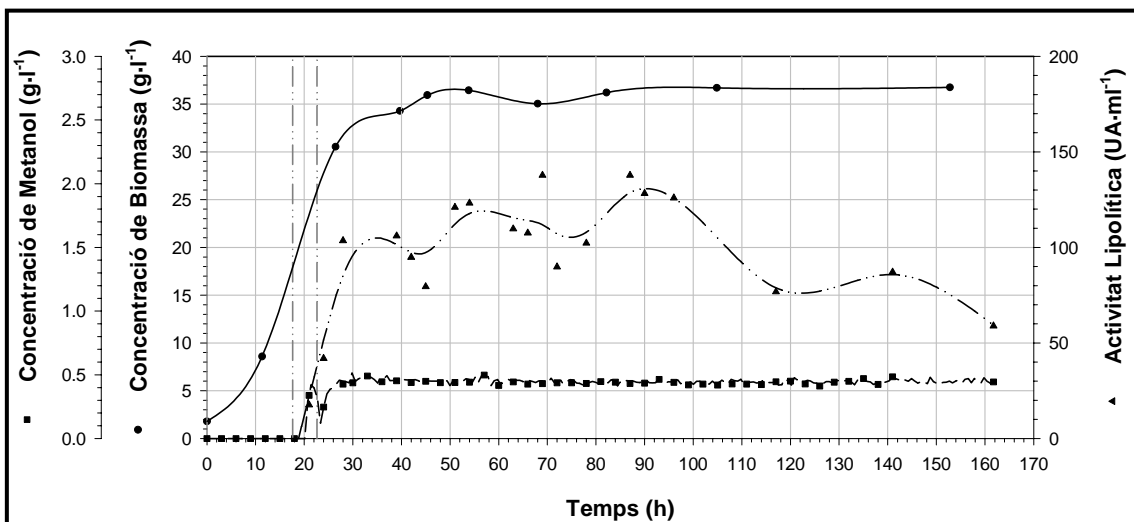


Figura 4.123. Fermentació FSS_06. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

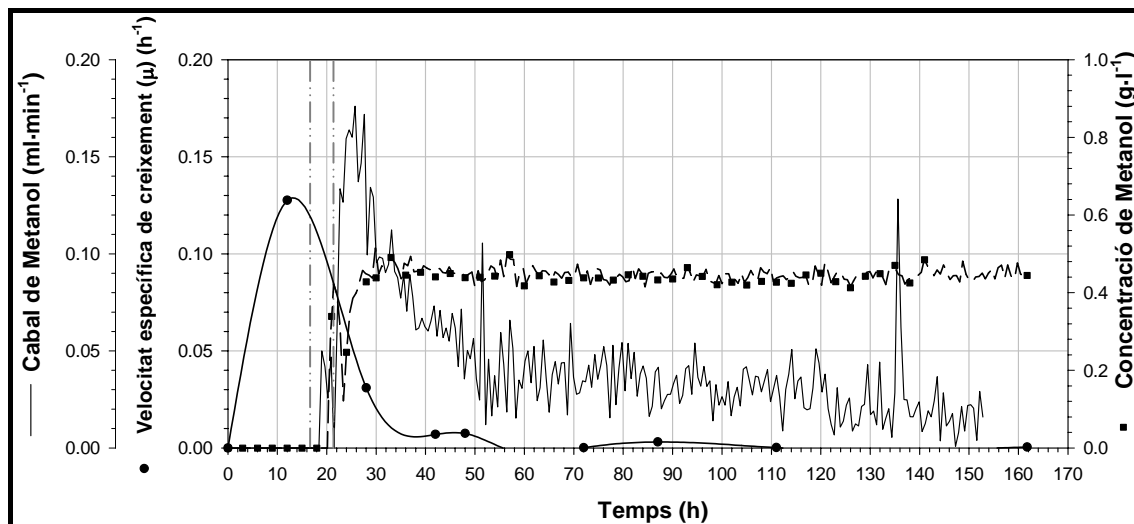


Figura 4.124. Fermentació FSS_06. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

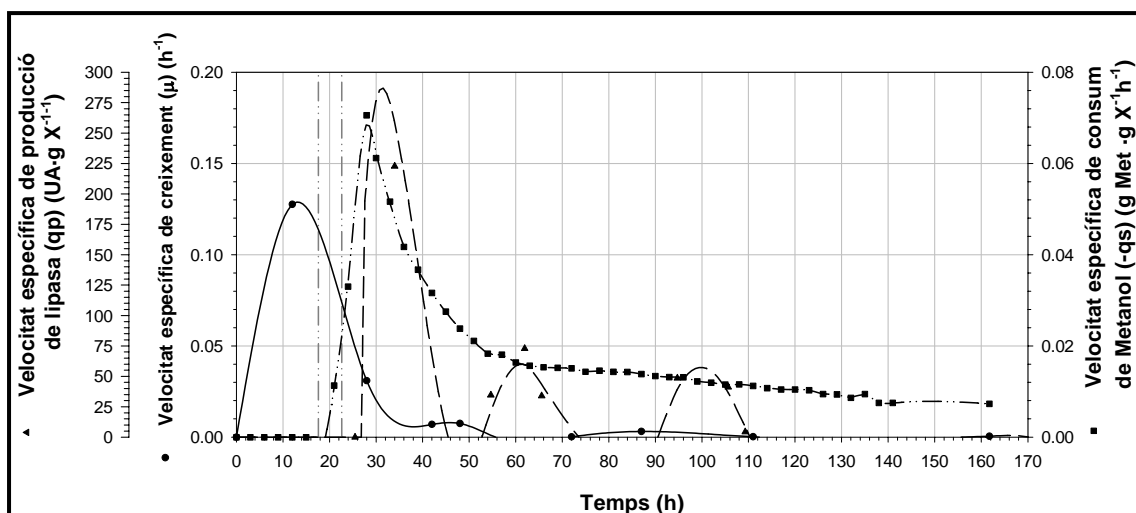


Figura 4.125. Fermentació FSS_06. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

DADES CULTIU	
Durada (h.)	161.8
Activitat màx. (UA·ml ⁻¹)	137.76
Rendiment Producte/biomassa * $Y_{P/X}$ (UA·g X ⁻¹)	3917
Productivitat * (UA·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	1996
Productivitat específica * (UA·gX ⁻¹ ·h ⁻¹)	56.7
FASE DISCONTÍNUA	
Durada (h.)	17.6
Rendiment biomassa/glicerol Y_{XG} (g X·g S ⁻¹)	0.44
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)	
μ mitjana (h ⁻¹)	0.003
-qs màxima (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.071
-qs mitjana (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.031
qp màxima (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	376.3
qp mitjana (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	57.8
Rendiment Biomassa/Metanol $Y_{X/M}$ (g X·g S ⁻¹)	0.18

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.21. Fermentació FSS_06. Valors de rendiments, productivitats i velocitats específiques del cultiu.

El principal objectiu d'aquest cultiu es comprovar si establir la consigna de la concentració de substrat inductor per sota de 1 g·l⁻¹ aporta algun benefici a la producció.

Utilitzant el controlador basat en model al mateix valor de consigna que l'experiment anterior, es pot veure que en aquest cultiu s'ha mantingut al llarg de tota la fase d'inducció una concentració de substrat de 0.5 g·l⁻¹ (Figura 4.123). Veient el perfil de la concentració queda demostrada la validesa del sistema de control, capaç de mantenir en un rang molt estret la concentració desitjada.

En nombrosos cultius realitzats durant la fase experimental d'aquest treball, s'ha identificat que la falta de metanol en el medi en períodes superiors a 30 min

provoca l'aturada total de la producció de la proteïna d'interès. En cap cas, després d'haver mantingut el microorganisme sense font de carboni durant aquest període s'ha aconseguit restablir la seva activitat als mateixos nivells (creixement, consum i producció) que en anterioritat. La utilització de sistemes de control manual o amb grans fluctuacions provoquen l'arribada a aquest tipus de situacions no desitjades. Aquest és un motiu més pel qual l'algorisme de control predictiu (basat amb model) presenta una especial utilitat, ja que permet mantenir la concentració a valors molt propers a zero, garantint però que no s'arribarà en cap moment a exhaurir el substrat.

L'estabilització de la concentració de biomassa es pot observar fàcilment en l'evolució de la velocitat específica de creixement, podent comparar els seu valor durant les dues primeres fases del cultiu i finalment el seu ràpid descens un cop començada la inducció (figura 4.124). És durant l'última fase del cultiu que és pràcticament nul·la, sent molt baixa ja des de les 50 h. del cultiu.

Es confirma de nou, com la resta de fermentacions anteriors de Mut^s, que la velocitat de consum de metanol assoleix un valor màxim a les primeres hores de l'etapa d'inducció i decau de forma exponencial (figura 4.125). És evident doncs, que per algun fenomen (aparició de producte tòxic, etc..) hi ha una progressiva davallada del creixement cel·lular, que per concentracions baixes de metanol són encara més evidents. Així doncs, quan baixa la velocitat de creixement fins valors propers a 0 h⁻¹, la velocitat de producció s'atura pràcticament per complert.

El perfil de la velocitat específica de producció de ROL (qp) és especialment oscil·lant i canviant amb el temps. Aquest fet assenyala l'aleatorietat en la producció i consegüentment el poc control existent en aquesta variable.

Si es compara el cultiu FSS_06 (figures 4.123, 124 i 125) amb les fermentacions FSS_04 (figures 4.117, 118 i 119) i FSS_02 (figura 4.120, 121 i 122) s'observen algunes diferències que és interessant comentar. En primer lloc, la producció de ROL del cultiu FSS_06 (140 UA·ml⁻¹ en 160 h) tant per la quantitat de producte com a nivell de productivitats és força inferior al obtingut en les fermentacions anteriors. Es confirma doncs, que mantenint la concentració de metanol constant a valors propers a 0.5 g·l⁻¹ s'aconsegueixen produccions de ROL inferiors a establir la consigna a 1 g·l⁻¹.

També s'observa que la densitat cel·lular màxima aconseguida és entre 5 i 10 g·l⁻¹ menor, fruit de l'efecte que té la concentració de substrat sobre la velocitat específica de creixement.

Un altre aspecte important a subratllar, és que al cultiu FSS_06 no s'observa cap tipus de desfasatge entre la qs i qp, i la producció es centra principalment en les 10 primeres hores de l'etapa d'inducció. Vista l'evolució d'aquestes dues variables, qs i qp, queda desmentida la hipòtesi que es plantejava sobre la limitació en el transport extracel·lular de la ROL, ja que en aquest cultiu coincideix el màxim de consum amb la màxim de producció de proteïna, sense cap tipus de desfasatge entre elles.

En resum, el control de la concentració de metanol a valors propers a 0.5 g·l⁻¹ disminueix la producció de ROL respecte a treballar amb una consigna fixada al voltant de 1 g·l⁻¹. Ara però, falta veure com es comporta el cultiu quan es treballa a concentracions superiors a aquest últim.

4.4.4. EXPERIMENT 4

Nom Fermentació	FSS_08
Soca	Mut ⁵ "singlecopy"
Estratègia de cultiu	Semicontinu
Medi	MFBD_1
Algorisme de control	PI+ control predictiu
Consigna concentració de Metanol	Càlcul de consum basta en model 1.75 g·l ⁻¹

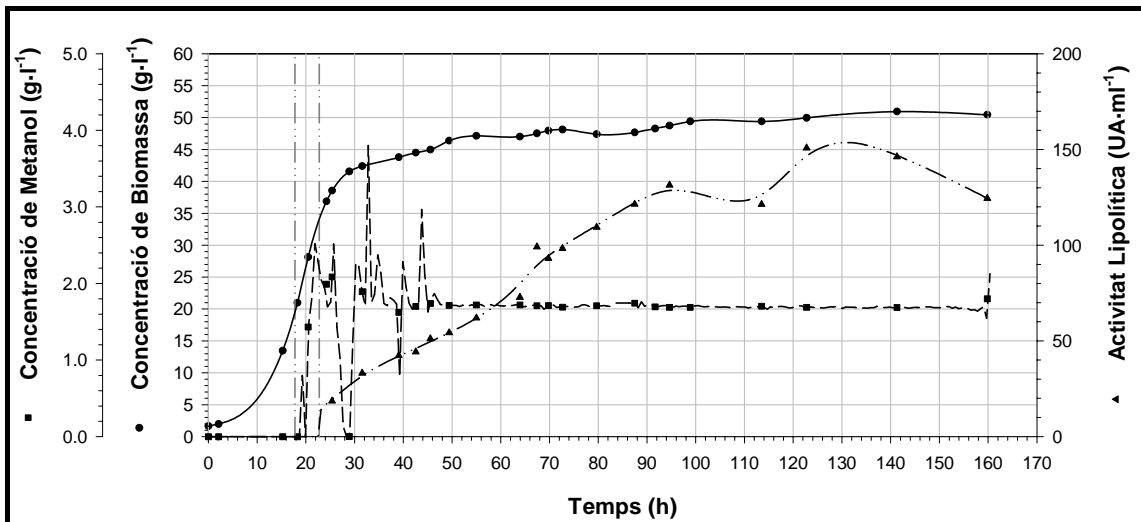


Figura 4.126. Fermentació FSS_08. Evolució de la biomassa, concentració de metanol i l'activitat lipolítica.

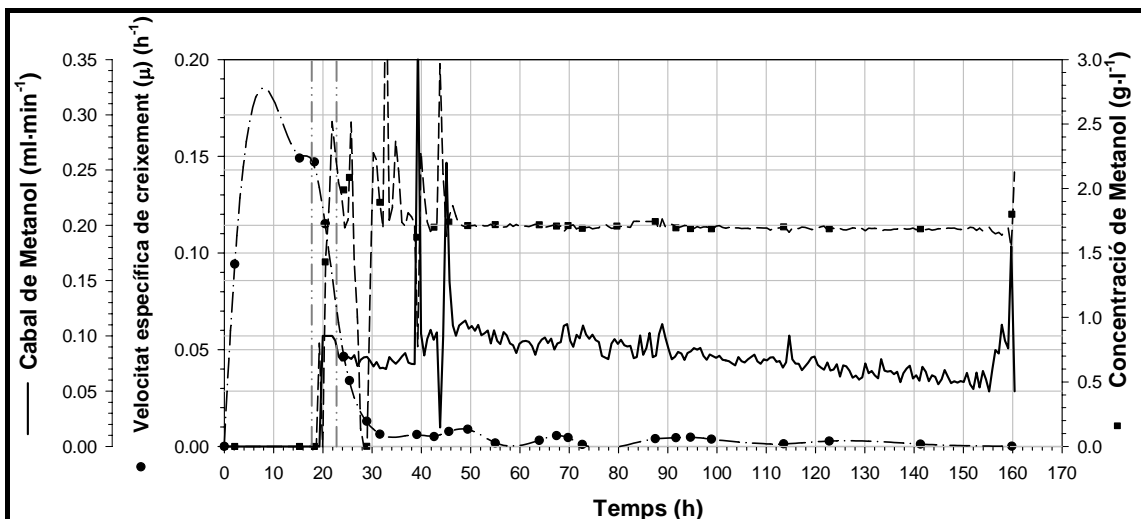


Figura 4.127. Fermentació FSS_08. Evolució de la velocitat específica de creixement (μ), concentració de metanol i cabal de metanol addicionat.

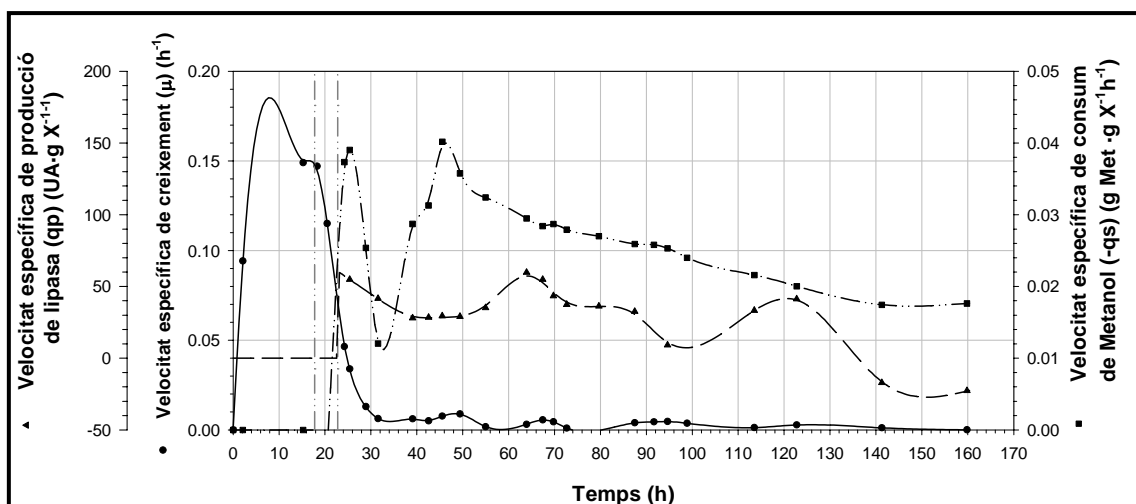


Figura 4.128. Fermentació FSS_08. Evolució de la velocitat específica de creixement, de consum de metanol i de producció de lipasa.

DADES CULTIU	
Durada (h.)	159.8
Activitat màx. ($\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$)	150
Rendiment Producte/biomassa * $Y_{P/X}$ ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}$)	3017
Productivitat * ($\text{UA}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	1228
Productivitat específica * ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	24.6
FASE DISCONTÍNUA	
Durada (h.)	17.7
Rendiment biomassa/glicerol $Y_{X/G}$ ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.45
FASE SEMICONTÍNUA (INDUCCIÓ)	
μ mitjana (h^{-1})	0.004
-qs màxima ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.040
-qs mitjana ($\text{g S}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.027
qp màxima ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	59.7
qp mitjana ($\text{UA}\cdot\text{g X}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	34.0
Rendiment Biomassa/Metanol $Y_{X/M}$ ($\text{g X}\cdot\text{g S}^{-1}$)	0.131

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.22. Fermentació FSS_08. Valors de rendiments, productivitats i velocitats específiques del cultiu.

Com a últim experiment, es va decidir treballar a valors proper a la μ_{MAX} , mantenint la consigna propera a $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, concretament a $1.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. El control de la concentració de metanol a aquest valor mitjançant el controlador basat en model desenvolupat, és força correcte. Només a les primeres hores de l'etapa d'inducció i per problemes en l'equip de mesura de metanol (MC-168), hi ha una sèrie de fluctuacions que no són reals.

Tot i que el cultiu FSS_08 es comporta, en línies generals, de forma molt similar a la resta de cultius anteriors, hi ha una sèrie de diferències que són interessants d'assenyalar. Una d'elles és la densitat cel·lular final (figura 4.126), sent propera als $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, el valor més elevat dels quatre cultius estudiats en aquest apartat. Es nota doncs, l'efecte que té mantenir la concentració de metanol a valors

més alts sobre la velocitat específica de creixement (figura 4.127), tot i que les diferències entre cultius no són gaire notables.

Si s'analitza el perfil de la velocitat específica de producció de proteïna heteròloga i es compara, principalment amb les fermentacions on es porta un control de la concentració de substrat inductor al voltant de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, s'observen diferències. En primer lloc, a la fermentació FSS_08, no existeixen importants oscil·lacions en la q_p durant el cultiu, no s'aprecien d'una forma significativa màxims ni mínims. No obstant això, els valors d'aquesta velocitat són inferiors als aconseguits a les fermentacions FSS_02 i FSS_04. La producció de ROL no s'atura a les 60 h sinó que es manté, encara que a velocitats inferiors, el doble de temps que en les fermentacions anteriors. Aquesta és força constant des del principi de la fase d'inducció fins a les 120 h de cultiu.

L'evolució de la velocitat específica de consum de metanol és un clar exemple de la disminució progressiva d'activitat del microorganisme durant la fase d'inducció. El consum de substrat va caient paulatinament fins arribar a la meitat del valor màxim aconseguït durant les primeres hores de la fase semicontínua.

Es pot afirmar doncs, que en treballar a una concentració de metanol propera als $1.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ s'aconsegueix una velocitat de producció més constant però a nivells inferior als valors aconseguïts a $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.4.5. COMPARACIÓ I DISCUSSIÓ

A la taula 4.23 s'han recollit tots els valors obtinguts dels 4 experiments finals per poder analitzar i comparar-los amb més facilitat. També s'han inclòs els valors de la primera fermentació realitzada amb la soca Mut^s "singlecopy" (FSS_01) per poder observar en quins aspectes s'ha millorat.

Dades cultiu					
Nom Fermentació	FSS_01	FSS_04	FSS_02	FSS_06	FSS_08
Consigna Metanol (g·l ⁻¹)	--	1	1	0.5	1.75
Durada (h.)	90.8	134.9	111.2	161.8	159.8
Activitat màx. (UA·ml ⁻¹)	182.9	331	490	137	150
Rendiment Producte/Biomassa * Y _{P/X} (UA·g X ⁻¹)	5221	8745	11236	3917	3017
Productivitat * (UA·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	2004	2453	4901	1996	1228
Productivitat específica * (UA·gX ⁻¹ ·h ⁻¹)	57.2	64.8	112.3	56.7	24.6
Fase discontinua					
Durada (h.)	20.1	14.3	17.6	17.6	17.7
Rendiment biomassa/glicerol Y _{XG} (g X·g S ⁻¹)	0.51	0.50	0.44	0.44	0.45
Fase semicontinua					
μ mitjana (h ⁻¹)	0.005	0.003	0.004	0.003	0.004
-qs màxima (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.046	0.084	0.041	0.071	0.040
-qs mitjana (g S·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.027	0.026	0.024	0.031	0.027
qp màxima (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	143.06	255.1	369.8	376.3	59.7
qp mitjana (UA·g X ⁻¹ ·h ⁻¹)	84.48	78.1	147.7	57.8	34.0
Rendiment Biomassa/Metanol Y _{X/M} (g X·g S ⁻¹)	0.12	0.10	0.14	0.18	0.13

* Càlculs realitzats fins el valor màxim d'activitat lipolítica

Taula 4.23. Taula resum de les fermentacions finals. Valors de rendiments, productivitats i velocitats específiques del cultiu.

S'han classificat els valors en tres grans blocs, un primer on es contempla tot el que es relatiu a la producció de ROL. En un segon apartat s'indica el rendiment glicerol/biomassa i durada de la fase discontinua. I finalment un tercer bloc on es presenten tots el valors de paràmetres d'interès calculats a l'interval de l'etapa discontinua.

Si es comencen a analitzar els resultats pel rendiment biomassa/substrat de l'etapa discontinua, és a dir pel glicerol, es pot veure que aquests oscil·len entre 0.44 i 0.51. Aquests valors no s'allunyen en excés del valor teòric, 0.53, deduït de l'equació estequiomètrica que relaciona aquest substrat amb una composició aproximada de la biomassa.

En canvi, el rendiment de metanol/biomassa a la fase semicontinua és notablement diferent al valor teòric per un rendiment 1.0, 0.45 g X·g MetOH⁻¹ (equació 4.7). Aquest oscil·la entre 0.1 i 0.2 pels cultius semicontinus. Quan es van

analitzar aquests valors, es va pensar en primera instància, en la possibilitat de que una part important del metanol es perdés per algun fenomen físic d'arrossegament de líquid ("stripping"), reduint la quantia del rendiment. Malgrat això, una vegada estudiats els resultats del balanç de carboni realitzats a l'apartat 4.3 (taula 4.14), es demostra que la diferència entre el carboni alimentat i el que va a formar part de la biomassa i s'expulsa en forma de diòxid (CO₂) no és major del 10 %. Per tant, es confirma que el metanol és assimilat per la biomassa, però gran part s'utilitza únicament per produir energia. Només un 10-20% d'aquest substrat es destina a la generació de nou material cel·lular.

La velocitat específica de creixement dóna una idea de l'estat fisiològic del microorganisme, la seva adaptació al medi i/o substrat. Si s'observa l'evolució d'aquesta al llarg dels cultius, és fàcil adonar-se que durant l'última fase té una progressiva caiguda fins arribar a valors pràcticament nuls. Es pot afirmar que aquesta davallada no és causada per l'exhauriment d'algun dels nutrients, confirmat per l'anàlisi de la composició química del medi. També es constata que en la utilització del mateix medi per la soca de *Pichia pastoris* de fenotip Mut⁺ no es detecten problemes de falta de nutrients fins arribar als 50-60 g·l⁻¹ de biomassa, nivells no superats en les fermentacions amb fenotip Mut^s. S'ha comprovat que en aquest estadi, si es retorna a l'alimentació de glicerol al medi, el microorganisme respon ràpidament assenyalant com si estigués en una suposada fase de latència a l'espera d'alguna font de carboni d'assimilació ràpida. Aquesta dada també indica que aquesta progressiva baixada en la velocitat específica de creixement està estretament lligada amb el substrat inductor emprat, en aquest cas el metanol o els efectes secundaris que té aquest en l'activitat cel·lular (producció de ROL).

Aquest comportament difereix del de la soca salvatge (Mut^s) que creix a una velocitat superior (μ_{\max} : 0.04 h⁻¹) i de forma constant quan consumeix metanol (Brierley et al., 1990). Per tant, es descarta que el metanol, a concentracions menors a 8 g·l⁻¹, tingui aquest efecte negatiu sobre la velocitat específica de creixement. Tot indica doncs, que la progressiva baixada de la μ a la fase d'inducció està estretament lligada amb la transcripció, síntesi o transport de la proteïna hoste.

Aquests fenòmens també han estat observats en soques Mut^s de *Pichia pastoris* amb altres proteïnes heteròlogues (Beer et al., 1998) i relacionen aquesta progressiva aturada de la velocitat específica de creixement amb l'acumulació intracel·lular de l'enzim hoste produït. Però, segons l'experiència en la realització d'un elevat nombre de cultius d'aquestes característiques, no s'estableix una relació directe entre la concentració de ROL i una disminució de la μ . Cultius amb la soca Mut⁺ demostren que la velocitat de creixement pot ser elevada, fins i tot quan la concentració de ROL al medi és important.

Malgrat això, es creu que la producció de ROL té un efecte negatiu en el creixement del microorganisme, però no perquè l'enzim tingui un efecte tòxic sinó perquè la contínua transcripció del mateix provoca un elevat estrès al llevat. Segons l'estudi de Hohenblum et al. (2004), el coll d'ampolla que provoca la disminució de la μ , és la formació dels ponts disulfur de la proteïna a expressar (tres en el cas de cada molècula de ROL). El nivell d'estrès es pot correlacionar amb la inducció de la xaperona BiP (proteïna d'enllaç) lligada amb la formació dels ponts disulfur.

Experiments preliminars realitzats amb la soca de treball KM_100 (Mut^s "singlecopy") dins el mateix grup d'investigació, han demostrat que els nivells de xaperona BiP són significatius, confirmant l'evidència de l'estrès que suposa la producció d'una proteïna hoste i més concretament de la ROL en *P.pastoris*. Tot i aquest és el motiu que sembla més probable, cal anar en compte atesa la

complexitat d'aquestes reaccions a l'interior del llevat. Aquí s'obren noves i interessants línies d'investigació, on un estudi acurat de les diferents reaccions i relacions al interior del microorganismes poden ajudar a comprendre aquests comportaments.

La velocitat específica de consum de metanol ($-q_s$) segueix en tots els casos, com era d'esperar per l'evolució de μ , un perfil en forma de funció exponencial negativa. El seu punt àlgid de consum es concentra a les primeres hores després de l'etapa de transició. A partir d'aquest valor màxim, disminueix progressivament fins arribar a un valor constant unes quatre vegades inferior a aquest. I es que en tots els casos s'observa una relació proporcional entre la μ i la q_s .

És interessant apreciar que el valors de la q_s mitjana, en quasi tots els cultius i durant l'etapa semicontínua, es situen entre 0.024-0.031 g S · g X⁻¹·h⁻¹, un rang força estret. Cal però anar en compte en l'anàlisi d'aquesta dada, ja que si no es coneix el comportament de la soca KM_100 se'n poden extreure conclusions errònies. Com s'ha descrit anteriorment, la parada en el creixement durant l'última etapa del cultiu provoca que la relació entre creixement i consum canviï completament. Normalment a la fase final del cultiu, encara que s'augmenti de forma significativa la concentració de metanol, la velocitat específica de creixement no s'altera. És principalment per aquest motiu, que es poden trobar coincidències en la velocitat de consum entre els diferents cultius a consignes de concentració de substrat diferents.

L'activitat màxima aconseguida en cadascun dels cultius varia en un ampli rang, entre 137 i 490 UA·ml⁻¹. Però aquesta dada s'ha d'analitzar amb certa precaució, el valor final de la producció no és l'únic a considerar, ja que és important també conèixer el temps que es tarda en assolir-lo i la concentració de biomassa productora. Per aquest motiu, la comparació dels nivells de ROL produïts pels diferents cultius és més objectiva si s'utilitzen variables com el rendiment o les productivitats. Cal assenyalar que tots els valors referents a la producció s'han calculat fins el punt màxim d'activitat, ignorant si existeix una baixada posterior de l'activitat lipolítica durant les hores finals. D'aquesta forma es pot comparar de forma més objectiva la capacitat de produir de la soca en cada cultiu.

La velocitats màximes i mitjanes de producció de ROL són un clar reflex dels nivells de producció aconseguits per cadascun dels cultius. La diferència entre el valor de q_p màxim i mitjà indica com s'ha produït l'enzim, és a dir, si la producció ha estat durant unes poques hores i la resta no hi ha hagut producció o l'excreció de proteïna ha estat als mateixos nivells durant un llarg període de temps.

A tall d'exemple, la fermentació FSS_06 té un màxim de producció sobre 375 UA·g X⁻¹·h⁻¹ sent 6.5 vegades superior a la producció mitjana calculada durant el cultiu. D'aquí es pot deduir que la producció de ROL ha estat centrada en un o alguns moments puntuals. El cas contrari es pot identificar en la fermentació FSS_07, on el valor màxim i mitjà de la q_p són molt similars i per tant assenyalant que la producció ha estat constant i sense grans oscil·lacions durant tota l'etapa d'inducció.

Si es compara el valor màxim d'activitat assolit en totes les fermentacions s'aprecia que el valor mínim pertany al cultiu on s'ha treballat amb una concentració de 0.5 g·l⁻¹. El valor màxim, de 490 UA·ml⁻¹, aconseguït al cultiu FSS_02 és tres vegades superior, indicant la rellevància que té la consigna de la concentració de metanol sobre la producció final.

No obstant això, les diferències entre les activitats dels diferents cultius no es poden centrar únicament amb el valor màxim. Com es pot observar a la figura

4.129, l'evolució de producció de ROL canvia segons la consigna de substrat inductor mantinguda durant el cultiu. Si es compara cadascuna de les fermentacions més representatives per cada concentració s'observa que per les consignes de $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ i $1.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ l'activitat final assolida és similar, tot i que l'evolució és molt diferent. Per la fermentació FSS_08 la producció de ROL augmenta progressivament fins aconseguir el valor màxim a les últimes hores de cultiu, sembla ser que la producció, en aquest cas, està associada al creixement cel·lular.

L'evolució de l'activitat de ROL pel cultiu FSS_06 és totalment diferent, la producció es centra a les 10 primeres hores de l'etapa d'inducció i posteriorment augmenta discretament. A partir de les 90 h cau de forma important fins a valors iguals a la meitat del valor màxim aconseguït. Pot semblar doncs, que en treballar a concentracions de substrat baixes s'afavoreix la ràpida producció enzimàtica en un curt període de temps. La posterior baixada d'activitat és causada bàsicament per la lisis cel·lular i l'aparició de proteases.

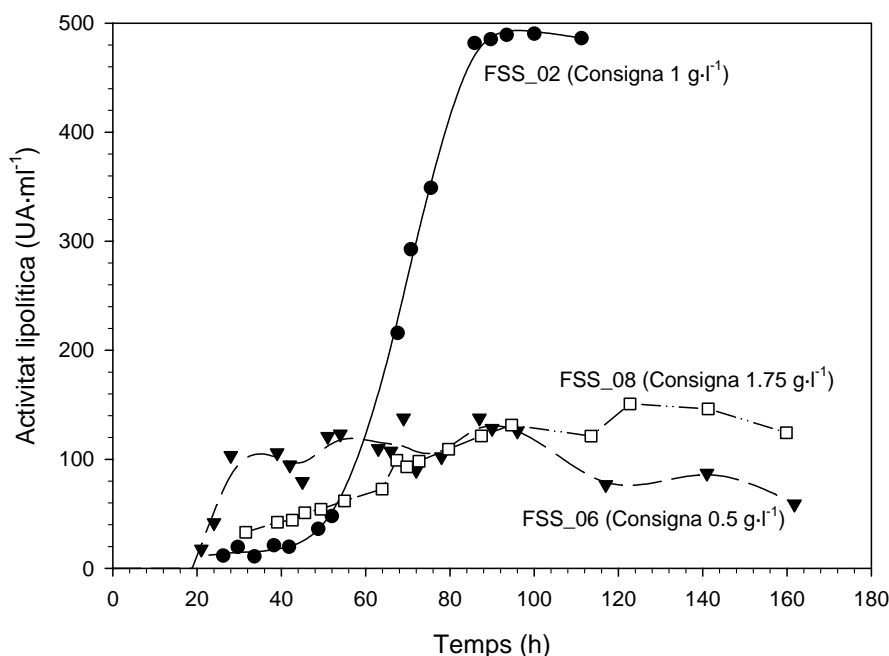


Figura 4.129. Evolució de l'activitat lipolítica extracel·lular per les fermentacions FSS_02, FSS_06 i FSS_08.

Per últim, observant el perfil de l'activitat lipolítica extracel·lular de la fermentació FSS_02 el comportament és totalment contrari al del cultiu FSS_06. La producció de ROL durant les 30 primeres hores de la fase d'inducció és força baixa i posteriorment entre les 50 i 80 h augmenta de forma espectacular fins aconseguir valors propers a les $500 \text{ UA}\cdot\text{ml}^{-1}$, mantenint-se constant fins el final del cultiu.

Prescindint del valor final d'activitat lipolítica aconseguït, els tres perfils són molt diferents en els tres casos. La producció a la fermentació FSS_08 és constant, en canvi, als cultius FSS_06 i FSS_02 és dona de forma puntual en un període de temps relativament curt. La diferència entre aquests dos últims cultius a consignes de metanol de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ i $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, és el període del cultiu en que es dona la producció.

Donar una explicació a les diferències en el perfil de producció de ROL no és una tasca senzilla, entre d'altres perquè falta informació a nivell intracel·lular.

Mitjançant un estudi amb més profunditat, serà possible associar cadascun dels comportaments de la producció a motius de transcripció, síntesi o transport de la proteïna de ROL, o una combinació d'ells. La complexitat en l'estudi de l'interior de la cèl·lula obre també en aquest apartat un nou ventall de possibilitats d'estudi, per intentar comprendre millor el mecanisme d'inducció de proteïnes heteròlogues de *Pichia pastoris*. Lògicament, aquest objectiu queda fora de l'abast d'aquest treball experimental atesa la vessant més pràctica del mateix, quedant-se amb les reaccions del microorganisme a nivell extracel·lular.

Malgrat aquestes diferències del valor de l'activitat final, és més raonable i interessant comparar la productivitat ($\text{UA}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), ja que és té en compte el temps de cultiu necessari per assolir-lo. Si es volgués realitzar una posterior explotació comercial del procés, l'elecció de la soca i l'estratègia de cultiu es faria tenint en compte la productivitat.

Sens dubte, es pot apreciar clarament a la taula 4.23 que les millors productivitats s'han obtingut en els cultius FSS_02 i FSS_04, on la concentració de metanol s'ha intentat mantenir constant a $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. És interessant assenyalar que la productivitat de la fermentació de referència FSS_01 és la mateixa que en la del cultiu amb una consigna del substrat inductor de $0.5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Atès que la durada de la resta de cultius per arribar al màxim d'activitat de la ROL és força similar i els nivells de concentració cel·lular assolits també són semblants, els valors del rendiment producte/biomassa ($\text{UA}\cdot\text{gX}^{-1}$) i la productivitat específica ($\text{UA}\cdot\text{gX}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) segueixen la mateixa tendència que la productivitat.

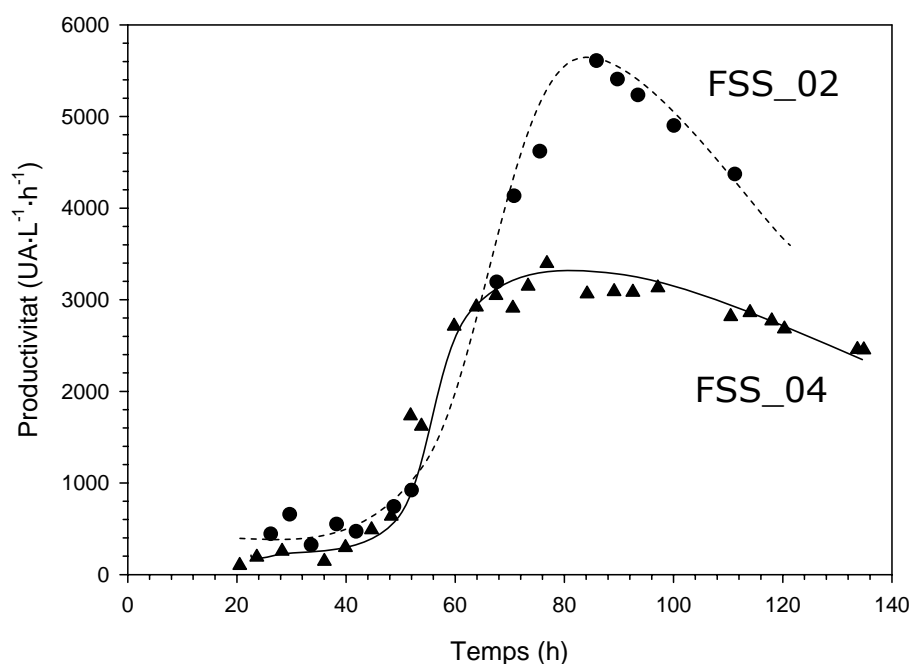


Figura 4.130. Evolució del valor de la productivitat al llarg del temps per les fermentacions FSS_02 i FSS_04.

Per altra banda, sense entrar en un balanç econòmic de la producció d'enzim és interessant conèixer quina ha de ser la durada òptima del cultiu per treure'n el màxim rendiment. Aquesta dada és especialment interessant a nivell industrial, ja que la caracterització d'aquest òptim es pot traduir en importants guanys econòmics. Per conèixer aquesta informació cal calcular la productivitat a diferents punts del cultiu i representar-ho en funció del temps per identificar el punt màxim. Si es realitza aquesta operació per les dues fermentacions de major producció,

FSS_02 i FSS_04 (Figura 4.132), es localitza en els dos casos un valor màxim, entre les 80 i 90 h. El màxim de productivitat no coincideix necessàriament amb el punt on s'assoleix la concentració de ROL més elevada, sinó que és un balanç entre el valor de l'activitat lipolítica i el temps emprat per assolir-lo.

Per tant, d'aquest estudi se'n pot extreure que les millors condicions de producció de ROL per la soca Mut^s "singlecopy" de *Pichia Pastoris* són mantenir la concentració de metanol constant al medi al voltant de 1 g·l⁻¹ amb una durada de cultiu d'unes 90 h.

Finalment, si s'observa el perfil de l'evolució dels cultius queda manifest el bon funcionament i la robustesa de les millores instal·lades. Tant la instrumentació com el programari de gestió han realitzat la seva tasca ininterrompudament durant més de 160 hores, sense cap alteració important. La versatilitat i fiabilitat del muntatge el ratifiquen com una important eina per facilitar l'estudi de cultius biològics.

5. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

De l'estudi de la producció de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) en *Pichia Pastoris* en cultiu discontinu i semicontinu se'n dedueixen les següents conclusions:

- ▶ La utilització de soques amb múltiples còpies de ROL al genoma, tant per Mut⁺ com Mut^s, no representen una millora respecte les d'una sola còpia. En ambdós fenotips, tot que les soques amb una sola còpia del gen han produït una quantitat final inferior, com que ho han fet amb un període més curt de temps, la productivitat en tots dos casos és superior. En el cas de les soques Mut⁺, l'augment del nombre de còpies també afecta en la reducció de la velocitat específica de creixement.
- ▶ Els cultius estan limitats estequiomètricament per font de nitrogen, utilitzant el medi MFB1_1, quan es sobrepassa una densitat cel·lular entre 50 i 55 g·l⁻¹. La manca de font de nitrogen provoca l'aparició de lisi cel·lular i proteases que degraden les proteïnes extracel·lulars, entre elles la ROL.
- ▶ Com era d'esperar, per la naturalesa fenotípica de cadascuna de les soques, les Mut⁺ tenen una dinàmica de creixement més ràpida, per tant són fermentacions amb una durada menor, on la velocitat específica de creixement i consum de metanol són un ordre de magnitud superior a les soques Mut^s. No obstant això, es demostra que la producció enzimàtica no va lligada al creixement cel·lular, ja que són les soques Mut^s amb les quals s'arriba a valors més alts de rendiment producte/biomassa, $Y_{p/x}$ (UA·gX⁻¹).
- ▶ Segons criteris de productivitat i dinàmica del creixement s'ha seleccionat la soca KM100_1 (Mut^s "singlecopy") com la millor opció per a la producció extracel·lular de ROL.
- ▶ La instal·lació d'instrumentació com l'anàlisi de gasos en línia o el sistema d'extracció automàtica de mostres, permeten realitzar un seguiment més acurat del cultiu i reporten importants beneficis en la reproductibilitat dels cultius.
- ▶ El seguiment de la concentració de metanol es realitza de forma satisfactòria amb l'equip MC-168, capaç de monitoritzar en línia amb prou freqüència per poder-ne realitzar un control posterior.
- ▶ S'ha construït un model de mesura capaç d'estimar en línia la densitat cel·lular del cultiu a partir de la mesura de la velocitat de producció de diòxid de carboni (CER). El seguiment en línia de la biomassa i la seva velocitat específica de creixement són especialment interessants per conèixer l'estat fisiològic del microorganisme.
- ▶ S'ha desenvolupat un programari de gestió i control que permet recopilar i gestionar tota la informació generada al procés. També s'ha incorporat la capacitat de controlar i estimar algunes de les variables de més interès.
- ▶ Mitjançant la simulació del procés aplicant un model matemàtic no estructurat i posteriorment la seva aplicació en el sistema real, s'ha facilitat l'estudi i identificació d'una llei de control per aconseguir

mantenir constant la concentració de metanol. Dels resultats obtinguts es pot concloure que:

- Es desaconsella totalment la utilització dels controladors basats únicament en l'error com "ON-OFF" i el Proporcional-Integral (PI) ja que no s'adapten als constants canvis de dinàmiques d'un bioprocés d'aquestes característiques.
 - La utilització d'un controlador de tipus predictiu basat en model, es presenta com una de les solucions més eficaces per mantenir la concentració de metanol estable durant el cultiu.
- De l'estudi de la producció de ROL en *Pichia Pastoris* (KM_100) en cultiu semicontinu utilitzant les nombroses millores en el seguiment i control de la concentració de substrat inductor, se'n dedueixen els següents punts:
- Els millors resultats de producció de proteïna heteròloga s'obtenen quan la concentració de metanol a la fase líquida resta al voltant de 1 g·l⁻¹.
 - Per a l'obtenció dels millors resultats de productivitat, la durada del cultiu ha de ser entre 80 i 90 h.
- Finalment, es pot afirmar que la instal·lació d'instrumentació juntament amb l'estimació, modelització i control d'algunes de les variables principals del cultiu, són mesures que permeten millorar la producció extracel·lular en *Pichia Pastoris*.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1. BIBLIOGRAFIA CITADA

A

Abdou, A.M. 2003. Purification and Partial Characterization of Psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. J. Dairy Sci. 86: 127-132

Abiodun A., Ogunjimi J.M.C., Gooding C.M., Recinos A., Choudary P.V. 1999. High-level secretory expression of immunological active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. Biotech. Let. 21: 561-567.

Almuzara C., Cos O., Baeza M., Gabriel D., Valero F. 2002 .Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. Biotech. Let. Vol 24: 413-417.

Ansorena D., Astiasarán I., Bello J. 2000. Influence of the simultaneous addition of the Protease Flavourzyme and the Lipase Novozym 677BG on the dry fermented sausages compounds extracted by SDE and analyzed by GC-MS. J. Agricult. Food Chem. 48: 2395-2400.

Antonian, E. 1988. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. Lipids 23(12): 1101-1106.

Arnold A., Harvey L., McNeil B., Hall J. 2002. Employing Near-Infrared Spectroscopic Methods of Analysis for Fermentation and Control, Part 1: Method Development, BioPharm Int. 13(11): 26-34.

B

Baer J.W., Gerhartz B., Hoffmann T., Rosche F., Demuth H-U. 2003. Characterization of human dp iv produced by a *Pichia pastoris* expression system. Diped. Amin. in Health and Disease 103-108.

Bailey J.E. (1998). Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: Past accomplishments and future opportunities. Biotechnol. Prog 14: 8-20.

Balashev K, Jensen TR, Kjaer K. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. BIOCHIMIE 83 (5): 387-397.

Beer H.D. Wohlfahrt G., Schmid R.D., E.G. McCarthy. 1996. The folding and activity of extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulates by a prosequence. Biochem. Journal. 319: 351-359.

Beer H.D., McCarthy J.E., Bornscheuer U.T., Schmid R.D. 1998. Cloning expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*, Biochim. Biophys. Acta 1399: 173-180.

Ben Salah A., Fendri K., Gargoury Y. 1999. The lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et caractéristiques biochimiques, Rev. Fr. Corps. Gras. 41: 133-137.

Biemans R., Gregoire D., Haumont M., Bosseloir A., Garcia L., Jacquet A., Dubeaux C., Bollen, A. 1998. The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *J. Biotechnol.* 66: 137-146.

Blanco M., Peinado A.C., Mas. 2004. Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy. *Biotech. Bioeng.* 88(4): 536-542.

Boel E., Hüge-Jensen B., Wöldike H., Gormsen E., Chistensen M., Andreasen F., Thin L. 1991. Cloning and expression of important fungal lipases. *Engineering, GBF Monograph* 16,:207-219.

Bornscheuer, U. T. 1995. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 578-586.

Borzani W, Perego Jr, L. 1976. The mash volume decrease during the ethanol fermentation of backstrap molasses. *J. Ferment. Technol.* 545: 902-906.

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. *Biotech. Let.* 25:1953-1956.

Boyle. S., Popp, M, Smith, W, Greenberg, R., James, M. 1998. *Marine Environ. Res.* 46(1-5): 25-28.

Boze H., Laborde C., Chemardin P., Fabien R. Venturin C., Combarrous Y., G. Moulin. 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia Pastoris*. *Process Biochemistry.* 36: 907-913.

Brierley A., Bussineau C., Kosson R., Melton A., Siegel R.S. 1990. Fermentation development of recombinant *P. pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme, *Ann. NY. Acad. Sci.* 589: 350-362.

Brocca S., Schmidt-Dannert C., Lotti M., Alberghina L., Schmid R.D. 1998. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* 7, 1415-1422.

C

Camacho E.F., Bordons C.. 1999., *Model Predictive Control*. Ed. Springer, London.

Cardello R., Yiu k.1988. The Design of controllers for Batch Bioreactors. *Biotech. Bioeng.* 32: 519-526.

Chang C., Hsu, C. 2003. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of (S)-naproxen hydroxyalkyl ester in organic media. *Biotech. Let.* 25(5): 413-416.

Chirovolu Y., Cregg J.M., Meagher M.M. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 277-283.

Choi B.-K., Jimenez-Flores, R. 1996. Study of putative glycosylation site in bovine beta-casein introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.* 44: 358-364.

Clare J. J., Romanos M. A., Rayment F. B., Rowedder J. E., Smith M. A., Payne M. M., Sreekrishna K., Henwood, C. A. 1991a. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: High-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205-212.

Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Sreekrishna K., Romanos, M.A. 1991b. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotech.* 9: 455-460.

Clemens K., Dubbeld M., Van Der Wel A., Pronk J., Waters a., Langermans J., Thomas A.. 1999. High-Level Expression of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: Strong Immunogenicity in *Macaca mulatta* Immunized with *P. vivax* AMA-1 and Adjuvant SBAS2. *Infection and Immunity* 67(1): 43-49.

Cohen, Coon. 1952. Theoretical consideration of retarded control. *Trans. ASME* 75: 827-834.

Coon C. 1956. How to set three term controller. *Control Engineering* 3: 71-76.

Coon. 1956. How to find controller settings from process characteristics. *Control Engineering* 3: 66-76.

Cos O., Montesinos J.L., Lafuente J., Solà C., Valero F. 2000. On-line monitoring of lipolytic activity by sequential injection analysis. *Biotech. Let.* 22: 1783-1788.

Cos O., Resina D., Ferrer P., Montesinos J.L., Valero F. 2005. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochem. Engin. J.* (Accepted).

Cos O., Serrano A., Montesinos J.L., Ferrer P., Cregg J.M., Valero F. 2005. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J. Biotech.* 116: 321-335.

Cregg J.M., Shen S., Johnson M., and Waterham H.R. 1998. Classical genetic manipulation. *Pichia Protocols. Methods in Molecular Biology*. Higgins, D. R. and Cregg, J. M. (eds), Chapt. 2. Humana Press, Totowa, NJ, 17-26.

Cregg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig w.S., Buckholz R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., Davis G.R., Smiley B.L., Cruze J., Torregossa R., Veliçelebi G., G.P. Thill. 1987. High level expression and efficient assembly of the Hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 5:479-48.

Cregg J.M., Vedvick T.S., and WC. Rasehke. 1993. Recent advantages in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11:905-910.

Curvers S., Brixius P., Klauser T., Thommes J., Weuster-Botz D., Takors R., Wandrey C. 2003. Human chymotrypsinogen B production with *P. pastoris* by integrated development of fermentation and down-stream processing. Part 1. Fermentation. *Biotechnol. Progr.* 17: 495-502.

D

D'Anjou M.C., Daugulis A.J. 2001. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotech. Bioengin.* 72(1):1-11.

Danty E., Briand L., Michard-Vanhee C., Perez V., Arnold G., Gaudemer O., Huet D., Huet J.C., Ouali C., Masson C., Pernollet J.C. 1999. Cloning and expression of a queen pheromone-binding protein in the honeybee: an olfactory-specific, developmentally regulated protein. *J. Neurosci.* 19(17):7468-75.

Davis, P. 1993. *Levenberg-Marquart Methods and Nonlinear Estimation.* SIAM News 26 (6).

Digan M.E., Lair S.V., Brierley R.A., Siegel R.S., Williams M.E., Ellis S.B., Kellaris P.A., Provow S.A., Craig W.S., Velicebeli G., Harpold, G.P. Thill. 1989. Continuous production of a lysozyme via secretion from the yeast *Pichia Pastoris*. *Bio/Technology.* 7:160-164.

E

Ecamilla-Treviño s., D.Hannelore. 1997. Expression and functional characterization of the mammalian intestinal peptide transporter PepT1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotech. Let.* 22: 109-114.

Eggeling L. And H.Sahm. 1980. Regulation of alcohol oxidase synthesis in *Hansenula polymorpha*: oversynthesis during growth on mixed substrate and induction by methanol. *Arch Microbiol. Sep,* 127-2: 119-124.

Egli T., Käppeli O., A.Fiechter. 1982. Mixed substrate growth of methylotrophic yeasts in chemostat culture: influence of dilution rate on the utilisation of a mixture of glucose and methanol. *Arch.Microbiol.* 131: 8-13.

F

Fahnestock, S.R., Bedzyk, L.A. 1997. Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 33-39.

G

Gellissen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741-750.

Gil N., Bosch M.P., Guerrero A. 1997. Chemoenzymatic Synthesis of (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4(2-pyrimidinyl)-1-piperazinebutanol and (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4-methyl-1-piperazinebutanol as Potential Antipsychotic Agents. *Tetrahedron* 53(44): 15115-15122.

Goodman J.M. 1985. Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J.Biol Chem.* 260(11):7108-13.

Gordillo M.A., Sanz A., Sánchez A., Valero F., Montesinos J.L., Lafuente J., Solà C. 1998. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotechnol. Bioeng.* 60 (2): 156-168.

Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Cygler M. 1994. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science* 3: 82-91.

H

Hagedorn A., Legge R.L., Budmn H. 2003. Evaluation of spectrofluorometry as a tool for estimation in fed-batch fermentations. *Biotech. Bioeng.* 83(1): 104-111.

Harder W., Veenhuis M. 1989. Metabolism of one-carbon compounds., in: A.H. Rose, J.S. Harrison (Eds.), *The Yeasts* 3: 289-316.

Hasslacher M., Schall M., Hayn M., Bona R., Rumbold K., Luckl J., Griengl H., Kohlwein S.D., Schwab H. 1997. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.* 11: 61-71.

Higgins D.R., Cregg, J.M. 1998. *Pichia* Protocols: Introduction to *Pichia pastoris*. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Hilario E., Lataro R.C., Alegria M.C., Lavarda S.C.S., Ferro J.A., Bertolini, M.C. 2001. High-level production of functional muscle α -tropomyosin in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 284: 955-960.

Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L., L.C. Comeau. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *FEBS Letters* 440: 356-360.

Hochstrasser U., Lücher M., de Virgilio C., Boller T., Wiemken. 1998. Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-frucosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters.* 440:356-360.

Hohenblum H., Gasser B., Mauer M., Borth N., Mattanovich, D. 2004. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 367-375.

Huang W.C., Wang Ai-Yu., Wang Li-T., Sung, H.Y. 2003. Expression and characterization of sweet potato invertase in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1494-1499.

Hwang S., Ahn J., Lee S., Lee T.G., Haam S., Lee K., Ahn I., Jung J. 2004. Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. *Biotech. Let.* 26(7): 603-605.

J

Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W, Colson C., van Heuvel M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbio. Reviews* 15: 29-63.

Jantzen J. 1998. *Design Of Fuzzy Controllers*. Technical University of Denmark: Dept. of Automation, Technical report no 98: 864-927.

Jones G.J., E. Bellion. 1991. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. An analysis by ¹³C n.m.r. in vivo. *Biochemical Journal.* 280: 475-481.

K

Kaieda M., Samukawa T., Matsumoto T., Ban K., Kondo A., Shimada Y., Noda H., Nomoto F., Ohtsuka K., Izumoto E., Fukuda H. 1999. Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Lipase in a Water-Containing System without an Organic Solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 88(6): 627-631.

Kakugawa K., Shobayashi M., Suzuki O., Miyakawa T. 2002. Cloning, characterization, and expression of cDNA encoding a lipase from *kurtzmanomyces* sp. I-11. *Bisci. Biotechnol. Biochem.* 66(6): 1328-1336.

Katakura Y., Zhang W., Zhuang G., Omasa T., Kishimoto M., Goto Y., Suga K. 1998. Effect of methanol concentration on the production of human f32-glycoprotein 1 domain V by recombinant *Pichia pastoris*. A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferm. Bioeng.* 86: 482-487.

Khachatourians G. G., Hui Y. H. 1995. Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*: versatile catalyst in nature and the laboratory. *F. Biotech. Microorg.* 549-588.

Kiong S. Dong X. 1998. Recursive Least Squares Scheme for Operating a Class of Continuous Fermentation Processes at the Optimal Steady State Productivity. *J. Chem. Tech. Biotech.* 227-232.

Kobayashi K., Kuwae S., Ohya T., Ohda T., Ohyama M., Ohi H., Tomomitsu K., Ohmura T. 2000. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with Minimal protease production and activation. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 55-61.

Korpan Y., Gonchar M., Sibirny A., Martelet C., El'skaya A., Gibson T., Soldatkin A. 2000. Development of highly selective and stable potentiometric sensors for formaldehyde determination. *Biosen. Bioelect.* 15(1-2): 77-87.

L

Levandoski M., Caffery P., Rogowski R., Lin Y., Shi Q-L., Hawrot E. 2000. Recombinant expression of α -bungarotoxin in *Pichia pastoris* facilitates identification of mutant toxins engineered to recognize neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 74(3): 1279-1289.

Lin Cereghino G.P., Lin Cereghino J., Ilgen C., Cregg J.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in Biotech.* 13:329-332.

Lin Cereghino J., J.M, Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol REv.* Jan: 24(1):45-66.

Loewen M.C., Liu X., Daugulis A.J. 1997. Biosynthetic production of type II fish antiprotein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 480-486.

Lübbert A., Jorgensen S.B. 2001. Bioreactor performance: a more scientific approach for practice. *J. Biotech.* 85: 187-212.

Lübbert A., Simutis R. 1994. Using measurement data in bioprocess modelling and control. *Tibtech* 12: 304-311.

Lubenova V., Rocha I., Ferreira E. C. 2003. Estimation of multiple biomass growth rates and biomass concentration in a class of bioprocesses. *Bioproc. Biosyst. Engin.* 25(6) :395–406.

Lubenova V., Rocha I., Ferreira. E.C. 2003. Estimation of Biomass Concentration and Multiple Specific Growth Rates of Fed-Batch Fermentation of Recombinant *E. coli*. *Proceedings of International Conference Automatics and Informatics'03*, 1: 211-214.

M

Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., López-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., van Loon A.P.G.M. 1999. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 63 373–381.

McGrew J.T., Leiske D., Dell B., Klinke R., Krasts D., Wee S., Abbot N., Armitage R., Harrington K. 1997. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene* 187: 193-200.

Mertens J., Shiraishi N., Campbell, W. 2000. Recombinant expression of molybdenum reductase fragments of plant nitrate reductase at high levels in *Pichia pastoris*. *Plant Physiol.* 123(2): 743-56.

Minning S., Schmidt-dannert C., R.D. Schmid. 1998. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnology.* 66:147-156.

Minning S., Serrano A., Ferrer P., Solà C., Schmid R.D., Valero F. 2001. Optimization of the high level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia Pastoris*. *J. Biothechnol.* 66:147-156.

Miyako E., Maruyama T., Kamiya N., Goto M.,. 2003. Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane. *Biotech. Let.* 25(10): 805-808.

Mokelainen M., Tu H., Vuorela A., Notbohm H., Kivirkko K.I., Myllyharju J. 2001. High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*. *Yeast.* 18: 797-806.

Montesino R., Garcia R., Quintero O., Cremata J.A. 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 14: 197-207.

Montesinos J.L., Dalmau E., Casas C. 2003. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78.753–761.

Morgan W.D., Kragt A., Feeney J. 2000. Expression of deuterium-isotope labelled protein in the yeast *Pichia pastoris* for NMR studies. *J. Biomol. NMR* 17: 337–347.

Müller R.H., Sysoev DV., W. Babei. 1986. Use of formate gradients for improving biomass yield of *Pichia pinus* growing continuously on methanol. *A. Microb. Biotech.* 25: 238-244.

O

Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. 1969. A yeast capable of utilising methanol. *Agr. Biol.Chem.* 33: 1519-1520.

Oka C., Tanaka M., Muraki M., Harata K., Suzuki K., Jigami Y. 1999. Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(11): 1977-1983.

Okumura S.A., Yamanoi R. Tsugawa T., Nakae T. 1970. UK Patent specif 1,210,770.

P

Pandey A., Benjamin S., Carlos R., Nigam P., Krieger N., Soccol V. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.

Pirt S.J. 1985. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. ISBN: 0632081503.

Potter K.J., Zhang W., Smith L.A., M.M. Meagher. 2000. Production and purification of the heavy chain fragment C of Butulium neurotoxin, serotype A, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *Protein Expression and Purification.* 19:393-402.

R

Rai,M., Padh, H. 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science* 801121-1128.

Ramón R., Feliu J.X., Cos O., Montesinos J.L., Berthet F.X., Valero, F. 2004. Improving the monitoring of metanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotech. Let.* 26: 1447-1452.

Ree R., Van Leeuwen A., Bulder I., Bonc J., Aalberse R. 1999. Purified natujral and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in vitro diagnostics for cat allergy. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 104(6): 1223-1229.

Resina D., Cos O., Ferrer P., 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. *Biotechnol. Bioeng.* (accepted).

Rodriguez E., Han Y., Lei, X.G. 1999. Cloning, sequencing, and expression of an Escherichia coli acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 117-123.

Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., Rayment F.B., Ballantine S.P., Makoff A.J., Dougan G., Fairweather N.F., Charles I.G. 1991. Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* 9: 901-906.

Rose, A.H., Harrison, J.S. 1989. *The yeast*. Academic Press, New York.

Rossanese O.W., Soderholm J., Bevis B.J., Sears I.B., O'Connor J., Williamson E.K., Glick B.S. 1999. Golgi structure correlates with transitional endoplasmatic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*, 145: 69-81.

Royce, Patrick N. 2004. Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations *Biotech. Bioeng.* 40(10): 1129 - 1138.

S

Salgado A.M., Folly R.O.M., Valdman V., Cos O., Valero F. 2000. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotech. Let.* 22: 327-330.

Santaniello E., Ferraboschi P. 1993. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 367-381.

Sauer P.W., Burky J.E., Wesson M.C., Sternard H.D., Qu L. 2000. A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* 67(5):585-97.

Schürgel K. 2001. Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during last 20 years. *J. Biotech.* 85: 149-173.

Scorer C.A., Buckholz R.G., Clare J.J., Romanos M.A. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111-119.

Seborg D.E., Edgar T.F., Mellichamp D.A. 1989. *Process Dynamics and Control*. Wiley Series in chemical engineering.

Serrano A. 2002. Estudio de la producción heteróloga de una lipasa de hongo *Rhizophus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Tesis doctoral. Universita Autònoma de Barcelona.

Shen S., Sulter G., Jeffries T., 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.

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

Sinha J., Plantz B.A., Zhang W., Gouthro M., Schlehel V., Liu C.P., Meagher M.M. 2003. Improved production of recombinant ovine interferon by Mut+ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile, *Biotechnol. Prog.* 19: 794-802.

Smith, O. J. 1959. A Controller to Overcome Dead Time. *ISA J.*, 6(2): 28-33.

Sreekrishna K., Brankamp R.G., Kroop K.E., Blnakenship D.T., Tsay J.M., smith P.L., Wierschke J.D. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 190: 55-62.

Sreekrishna K., Nelles L., Potenz R., Cruze J., Mazzaferro P., Fish W., Fuke M., Holden K., Phelps D., Wood P., Parker, K. 1989. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28: 4117-4125.

Stratton J., Chiruvolu V., Meagher M. 1998. High cell-density fermentation. In: Higgins DR, Cregg Jr, editors. *Pichia Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. P 107-121.

Subramani S. 1998. Components Involved in Peroxisome Import, Biogenesis, Proliferation, Turnover, and Movement. *Physiological reviews* 78(1):171-188.

Surribas A., Cos O., Montesinos J.L., Valero, F. 2003. On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotech. Let.* 25: 1795-1800.

Swartz J., Cooney C.L. 1981. Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Environ. Microb.* 1206-1213.

T

Takahashi S., Uieda M., Harayuki A., Beer H.D., Bornscheuer U.T., Schmid R.D., Tanaka A. 1998. Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioengin.* 6(2):164-168.

Tani Y., Kato N., H.Yamada. 1978. Utilization of methanol by yeasts. *Adv. Appl Microbiol.* 24:165-186

Thill G.P., Davis G.R., Stillman C., Holtz G., Brierley R., Engel M., Buckholtz R., Kinney J., Provow S., Vedvick T., Siegel R.S. 1990. Positive and negative effects of "multicopy" expression integrated vectors on Protein expression in *Pichia pastoris* in "Proceedings of the 6th international symposium on genetics of microorganisms". 2:477:490.

Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., Grinna L. 1987. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 1305-1308.

U

Unilever. 1987. Process of preparing a catalasa-free oxidase and a catalasa-free oxidase containing yeast, and the use thereof. *Europ. Pat. Appl.* 2420007.

V

Van Dijcken J.P., Otto R., Harder W. 1976. Growth of *Hansenula polymorpha* in the methanol-limited chemostat. *Arch.Microbiol* III:137-144.

Van-Dijken J.P., Oostra-Demkes G.J., Otto R., Harder W. 1976. S-formylgluthatione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. *Arch. Microbiol.* 111(1-2):77-83.

Vassileva A., Chugh D.A., Swaminathan S., Khanna N. 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 21: 71-80.

Verger, R. 1997. Interfacial activation of lipase: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*. 15: 32-38.

Vicente A., Castrillo J. I., Teixeira J.A., Ugalde U. 1998. On-line estimation of biomass through pH control analysis in aerobic yeast fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 445-450.

Vulfson, E.N. 1994. Industrial applications of lipases. A: P. Woolley i S. Petersen (eds), *Lipases: their structure, biochemistry and application*, 271-288, *University Press, Cambridge*.

W

Wang HY. 1979. Volume changes during aerobic fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 21:525-532.

Wang Y., Liang Z-H., Zhang Y. S., Yao, S.Y., Hu Y.G., Tang, Y.H., Zhu S.Q., Cui, D.F., Feng Y.M. 2001. Human insulin from a precursor overexpression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotech. Bioengin.* 73(1): 74-79.

Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V., 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.

Werten M., Van Den Bosch T., Wind R., Mooibroek H., Wolf F. 1999. High-yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* 15: 1087-1096.

Wood M.J., Komives E.A. 1999. Production of large quantities of isotopically labeled protein in *Pichia pastoris* by fermentation, *J. Biomol. NMR* 13: 149-159.

Y

Yang Y., Lowe M.E. 1998. Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 13: 36-40.

Yoshimasu M.A., Ahn J.K., Tanaka T., Yada R.Y. 2002. Soluble expression and purification of porcine pepsinogen form in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* 25: 229-236.

Yuan W., Stromhaug P.E., Dun W.A. 1999. Glucosa-induced autophagy of peroxisomes in *Pichia pastoris* requires a unique E1-like protein. *Mol. Biol. Cell.* 10: 1353-1366.

Z

Zalacain I., Zapelena M.J., Astiasarán I., Bello, J. 1995. Dry fermented sausages elaborated with lipase from *Candida cylindracea*. Comparison with traditional formulations. *Meat Science*. 40: 55-61.

Zhou X.S., Zhang Y.X. 2002. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. *Biotechnol. Lett.* 24: 1449-1453.

Zhou Xiang-Shan; Lu Jian; Fan Wei-Min; Zhang Yuan-Xing. 2002. Development of a responsive methanol sensor and its application in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotech. Lett.*, 24(8); 643-646.

Zwart K.B., Harder W. 1983. Regulation of the metabolism of some alkylated amines in the yeasts *Candida utilis* and *Hansenula polymorpha*. J. Gen. Microbiol. 129: 3157–3169.

6.2. PUBLICACIONES PERSONALS

Cos O., Montesinos J.L., Lafuente J., Solà C., Valero F. 2000. On-line monitoring of lipolytic activity by sequential injection analysis. *Biotech. Let.* 22: 1783-1788.

Salgado A.M., Folly R.O.M., Valdman V., Cos O. and Valero F. 2000. Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotech. Let.* 22: 327-330.

Almuzara C., Cos O., Baeza M., Gabriel D., Valero F. 2002 .Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotech. Let.* 24: 413-417.

Surribas A., Cos O., Montesinos J.L., Valero F. 2003. On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotech. Let.* 25: 1795-1800.

Ramón R., Feliu J.X., Cos O., Montesinos J.L., Berthet F.X., Valero, F. 2004. Improving the monitoring of metanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotech. Let.* 26: 1447-1452.

Cos O., Serrano A., Montesinos J.L., Ferrer P., Cregg J.M., Valero F. 2005. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. *J. Biotech.* 116: 321-335.

Cos O., Resina, D., Ferrer, P., Montesinos, J.L., Valero F. 2005. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochem. Engin. J.* (accepted).

Resina D., Cos O., Ferrer P., 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. *Biotechnol. Bioeng.* (accepted).

7. APÉNDIX

7.1. NOMENCLATURA

μ	Velocitat específica de creixement (h^{-1})
CER	Velocitat de producció de diòxid de carboni per part dels microorganismes ($mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
CO_2	Concentració de diòxid de carboni ($mol \cdot l^{-1}$).
F	Cabal d'alimentació al reactor ($l \cdot h^{-1}$)
F	Cabal d'alimentació ($l \cdot h^{-1}$).
F_{ent}	Cabal d'aire d'entrada ($l \cdot h^{-1}$).
k_{LA}	Coefficient global de transferència d'oxigen referit a la fase líquida (h^{-1}).
m_{CO_2}	Coefficient de manteniment associat al CO_2 ($mol \ CO_2 \cdot g \ X^{-1} \cdot h^{-1}$).
m_{O_2}	Coefficient de manteniment associat a l'oxigen ($mol \ O_2 \cdot g \ X^{-1} \cdot h^{-1}$).
O_2	Concentració d'oxigen a la fase líquida ($mol \cdot l^{-1}$).
O_2^{sat}	Concentració de saturació d'oxigen dissolt ($mol \cdot l^{-1}$).
OTR	Velocitat de transferència d'oxigen de la fase gasosa a la fase líquida ($mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
OUR	Velocitat de consum d'oxigen per part del microorganismes ($mol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
P	Concentració de producte ($UA \cdot ml^{-1}$).
q_P	Velocitat específica de producció ($UA \cdot g \ X^{-1} \cdot h^{-1}$).
q_S	Velocitat específica de consum de substrat ($g \ S \cdot g \ X^{-1} \cdot h^{-1}$).
r_P	Velocitat de producció de producte ($g \ P \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
RQ	Quocient respiratori.
r_S	Velocitat de consum de substrat ($g \ S \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
r_X	Velocitat de producció de biomassa ($g \ X \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$).
S	Concentració de substrat ($g \cdot l^{-1}$).
S_0	Concentració inicial de substrat/ concnetració de substrat a l'aliment ($g \cdot l^{-1}$).
t	Temps (h).
V	Volum del cultiu (l)
X	Concentració total de biomassa ($g \cdot l^{-1}$).
X_{ent,CO_2}	Fracció molar de CO_2 del corrent de gas d'entrada.
X_{ent,O_2}	Fracció molar d' O_2 del corrent de gas d'entrada.
X_{sort,CO_2}	Fracció molar de CO_2 del corrent de gas de sortida.
X_{sort,O_2}	Fracció molar d' O_2 del corrent de gas de sortida.
$Y_{P/X}$	Rendiment producte-biomassa ($g \ P \cdot g \ X^{-1}$)
Y_{X/CO_2}	Rendiment biomassa-diòxid de carboni ($g \ X \cdot mol \ CO_2^{-1}$).
$Y_{X/S}$	Rendiment biomassa-substrat ($g \ X \cdot g \ S^{-1}$).
c(t)	Valor de la variable manipulada.
Kc	Guany del controlador proporcional.
e(t)	Diferència entre el valor real del sistema i el de consigna.
τ_I	Paràmetre de l'efecte integral.
τ_D	Paràmetre de l'efecte derivatiu.

7.2. CALIBRATGES

7.2.1. CALIBRATGE DE LA BIOMASSA TOTAL

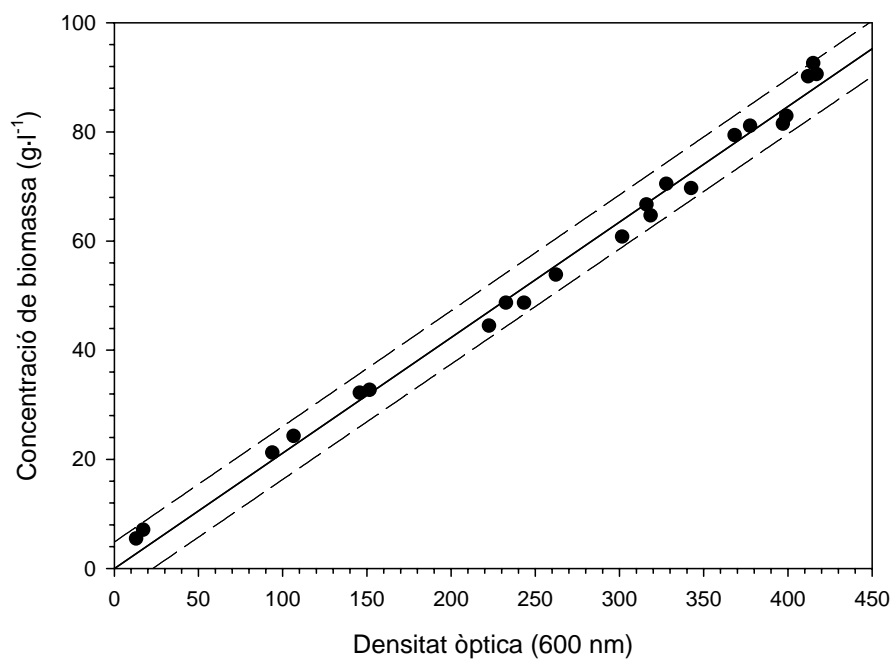


Figura 7.1. Recta de calibratge de la concentració de biomassa amb densitat òptica.

$$\text{Concentració de biomassa (g·l}^{-1}\text{)} = 0.212 (\pm 0.0041) \cdot \text{OD}_{600}$$

$$r^2 = 0.992$$

Interval de confiança: 95 %

7.2.2. CALIBRATGE DE L'ACTIVITAT LIPOLÍTICA

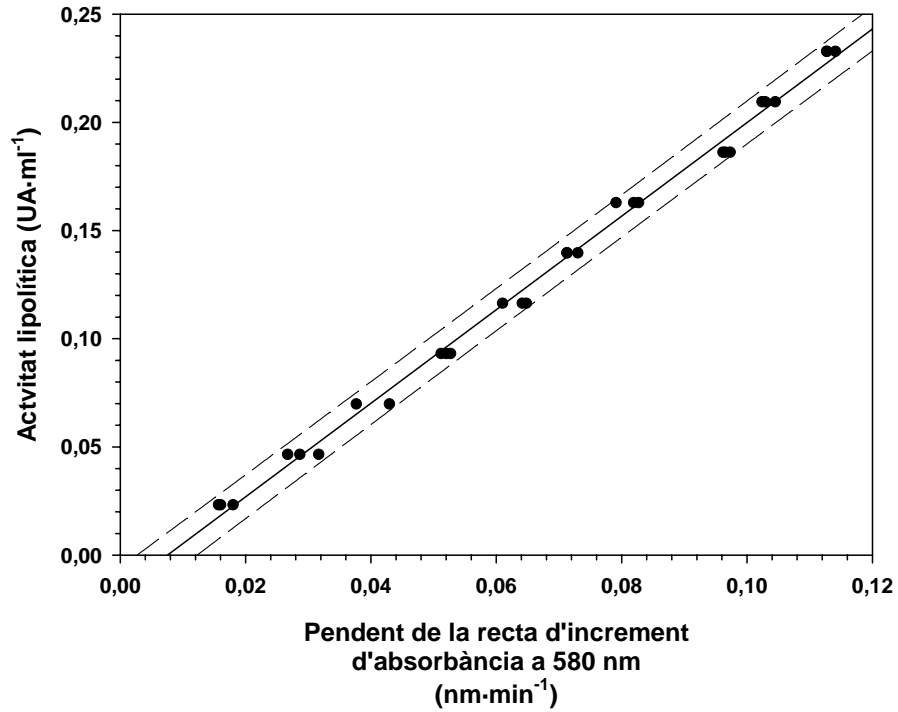


Figura 7.2. Recta de calibratge de l'activitat lipolítica.

Activitat lipolítica (UA·ml⁻¹):

$2.162(\pm 0.0285) \cdot \text{pendent} (\text{min}^{-1}) - 0.0162(\pm 0.0021)$

r^2 : 0.995.

Rang de mesura: Pendent entre 0.016 i 0.113 (min⁻¹).

Interval de confiança: 95 %

7.2.3. CALIBRATGE DE LA CONCENTRACIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL

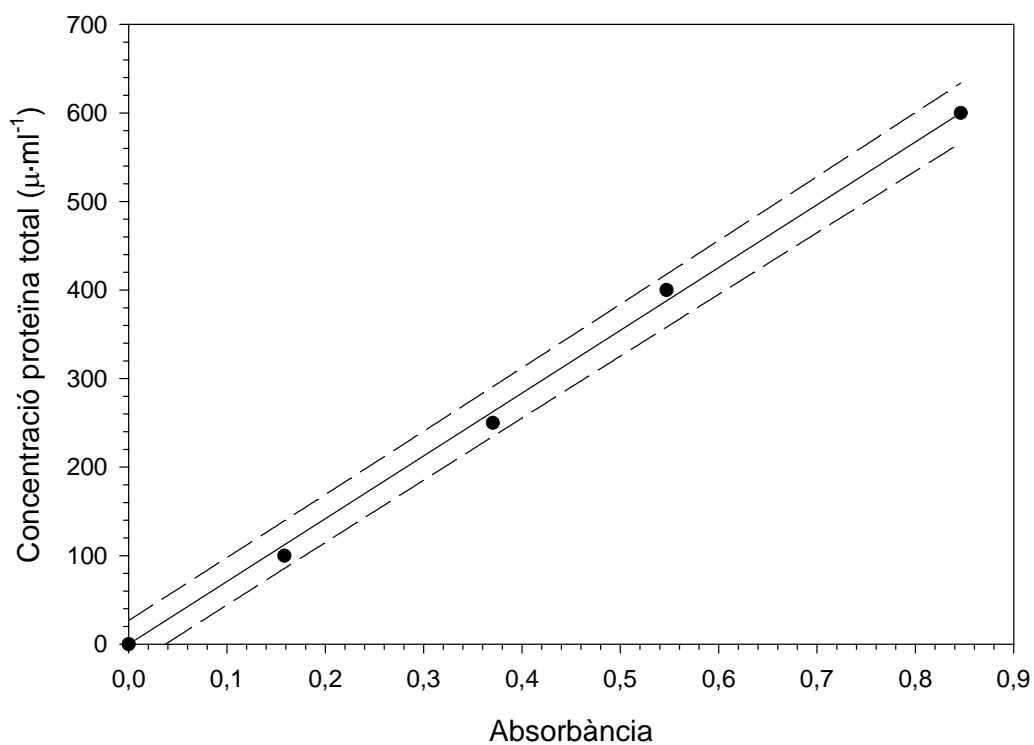


Figura 7.3. Recta de calibratge del mètode Bradford per la detecció de la proteïna total.

Concentració de proteïna total: $720.5 (\pm 21.5) \cdot \text{Abs}$

r^2 : 0.997

Interval de confiança: 95 %