



CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN MATRACES AGITADOS POR UN SISTEMA DE RESONANCIA ACÚSTICA EN COMPARACIÓN A LA AGITACIÓN ORBITAL

Greta I. Reynoso-Cereceda, Ramses I. García-Cabrera, Norma A. Valdez-Cruz, Mauricio A. Trujillo-Roldán*
Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

* Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 5 6223369. Email: maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: Agitación por resonancia acústica, Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, *E. coli*

Introducción. Los matraces agitados se usan ampliamente en el desarrollo de bioprocesos, se ha estimado que cerca del 90% de todos los cultivos con aplicaciones biotecnológicas se realiza en matraces agitados (1). La transferencia de oxígeno puede convertirse en una limitante en el desarrollo de cultivos aerobios, cuando la demanda excede la capacidad de transferencia a través de la interface gas-líquido y/o a través del tapón del matraz (2). La tecnología de agitación con resonancia acústica (RAM: Resonant Acoustic® Mixing) representa una alternativa reciente para cultivos en matraces agitados que busca contrarrestar la limitación de oxígeno.

En este trabajo se caracterizó la agitación de matraces por resonancia acústica en términos del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) y se evaluaron el crecimiento, el consumo de glucosa y el perfil de oxígeno disuelto durante el cultivo de una cepa recombinante de *E. coli* en matraces con agitación acústica y orbital, a valores equivalentes k_La .

Metodología. Se determinó el k_La en matraces con agua, agitados bajo diferentes condiciones de velocidad de agitación (3-20 g para la agitación acústica y 200-350 rpm con agitación orbital), volumen de matraz (250-1000 mL) y volúmenes de llenado (10-40%) a 37°C. Las determinaciones se hicieron por el método de gassing-out, usando Na_2SO_3 y midiendo TOD en línea con un sensor óptico PSt3 (Fibox3, PreSens).

Las cinéticas de *E. coli* BL21 (DE3 gold) rSMD-garrapata se realizaron en medio mínimo, modificado de Lara *et al.* (3), con 10 g/L de glucosa, a 37°C con agitación acústica y orbital a 2 valores equivalentes de k_La . Se determinó la biomasa por densidad óptica (600 nm), concentración de glucosa con un analizador bioquímico YSI 2900 (Yellow Springs Instruments), y se monitoreó el perfil de TOD con el sensor óptico PSt3 (Fibox3, PreSens).

Resultados. Se obtuvieron valores del k_La en matraces con agitación acústica y orbital bajo diferentes condiciones de operación, y se proponen modelos empíricos de tres parámetros para determinar este coeficiente en función de la velocidad de agitación (n) y la relación inicial área interfacial-volumen de llenado (A/V). La validación de los modelos propuestos muestra un ajuste adecuado con un margen de error del $\pm 30\%$.

Los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa evaluada de *E. coli*, en matraces a un valor de k_La

equivalente de $46 h^{-1}$ no muestran diferencias significativas, mientras que en los cultivos evaluados a un k_La equivalente de $93 h^{-1}$ se tienen valores superiores de μ y de q_s con agitación orbital en comparación a la agitación acústica (Tabla 1). En los perfiles de TOD de los cultivos con agitación orbital bajo ambas condiciones de k_La , la TOD se mantuvo en 0% durante varias horas (Tabla 1), este comportamiento sugiere un periodo de limitación de oxígeno en los cultivos (4). Los cultivos con agitación acústica a un valor de k_La de $46 h^{-1}$ mostraron un periodo reducido en el que la TOD se mantuvo en 0%; por otro lado, el perfil de TOD para el cultivo con un valor de k_La de $93 h^{-1}$ se mantuvo siempre sobre el 60%. Los diferentes perfiles de oxígeno disuelto revelan posibles diferencias en el metabolismo de la bacteria crecida en ambos sistemas de agitación, para lo cual se sugiere cuantificar la producción de ácidos orgánicos durante las cinéticas bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 1. Resultados cinéticos de los cultivos de *E. coli* rSMD en matraces agitados por RAM u orbital, a dos valores equivalentes de k_La . Se muestran media y desviación estándar de 2 a 3 repeticiones.

Agitación	RAM	Orbital	RAM	Orbital
n	5 g	200 rpm	10 g	350 rpm
k_La (h^{-1})	45.7 \pm 0.8	46.2 \pm 1.9	93.8 \pm 4.6	91.1 \pm 4.7
μ (h^{-1})	0.44 \pm 0.0	0.44 \pm 0.0	0.35 \pm 0.01	0.44 \pm 0.01
DO _{600nm} 24-25 h	4.3 \pm 0.2	4.1 \pm 0.4	5.2 \pm 0.2	4.6 \pm 0.3
q_s (g _{glu} /g _{DWC} ·h)*	1.7 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
T (h) TOD→0%	5.0 \pm 0.2	15.0 \pm 1.7	0	4.4 \pm 0.5

*Calculado a las 12 h de cultivo.

Conclusiones. Se propusieron modelos empíricos para estimar el k_La en matraces con agitación acústica y orbital en función de las variables operacionales n y A/V . Los cultivos de *E. coli* crecidos a valores equivalentes de k_La sugieren diferencias metabólicas al ser cultivados con agitación acústica en comparación a la agitación orbital.

Agradecimiento. CONACYT 178528, 214404 y 220795; PAPIIT-UNAM IN-210013 y IN-209113.

Bibliografía.

- Büchs J. (2001) *Biochem Eng J.* 7:91–98.
- van Suijdam JC, Kossen NWF, Joha AC. (1978) *Biotechnol Bioeng.* 20:1695–1709.
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT. (2006) *Biotechnol Bioeng.* 94:1164-1175.
- Glöckner W, Büchs J. (2012) *Trends Biotechnol.* 30(6):307:314.