

DISEÑO DE UN SISTEMA DE DOS COMPARTIMENTOS PARA SIMULAR GRADIENTES DE OXÍGENO DISUELTO EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES.

Argel Gastélum, O. Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares.

Instituto de Biotecnología-UNAM. Av. Universidad 2001. Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos.

FAX: 317 2388. correo-e: laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: oxígeno disuelto, gradientes, células animales.

Introducción. Debido a la fragilidad celular, los cultivos de células animales (CA) se realizan con agitación y flujos de gas menores a 200 rpm y 0.07 vvm, respectivamente, lo que genera un mezclado deficiente que provoca la formación de gradientes de oxígeno disuelto (OD) en el biorreactor. Para su estudio se han diseñado simuladores de escala laboratorio, en los que se somete al cultivo a oscilaciones de OD. La simulación en cultivos de CA presenta problemas debido a sus bajos tiempos de respuesta (bajo $k_L a$), mientras que funciona bien para cultivos bacterianos dado que las condiciones de cultivo permiten trabajar con sistemas muy dinámicos (alto $k_L a$) (1). En este trabajo se presenta el diseño de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto, que se utilizará para evaluar el efecto de un ambiente heterogéneo sobre la producción de proteína recombinante en cultivos de CA.

Metodología. El simulador (Figura 1) consiste de dos compartimentos interconectados: un biorreactor tipo tanque agitado (STR, stirred tank reactor) y un biorreactor de flujo tapón (PFR, plug flow reactor). El tiempo de circulación (t_C) es simulado al recircular el cultivo (200 mL) entre ambos compartimentos con una bomba peristáltica. El biorreactor STR ($V_{nominal}=500$ mL) está conectado a un sistema de control y adquisición de datos, mediante el cual se mantiene el OD a 20%. El biorreactor PFR consiste de 21 m de un serpentín de tubo flexible de silicón (Cole Parmer, $D_i=1.6$ mm, $D_e=3.2$ mm, pared=0.8 mm), sumergido en agua a 0% de OD (con burbujeo de N_2), dentro de un biorreactor BioFlo II de 5 L. Esto genera una diferencia de concentración de OD entre el ambiente interno y externo del tubo de silicón, que promueve la desorción del oxígeno en el fluido circulando en el interior del tubo.

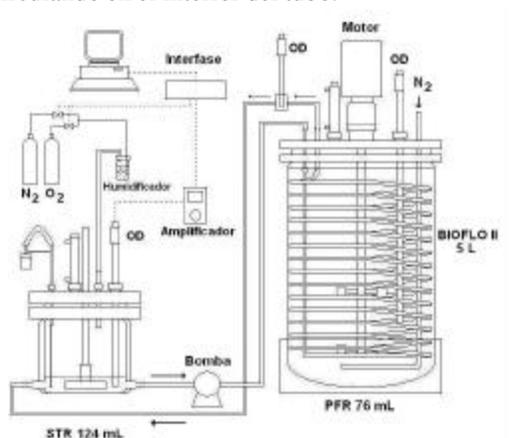


Figura 1. Diagrama del simulador de gradientes de OD.

Resultados y discusión. Con el sistema descrito se obtuvieron en agua gradientes desde 20% hasta 2.0% de OD, con flujos que representan t_C entre 228 y 623 s (Figura 2a). Para diferenciar el efecto del gradiente de OD del provocado por

estrés hidrodinámico, se evaluó la capacidad del simulador para mantener constante el OD a 20% en ambos compartimentos (Figura 2b), bajo condiciones de simulación (excepto que el flujo de gas en el PFR fue una mezcla de aire- N_2). Respecto a la resistencia celular, en la Figura 3 se muestra que células de insecto Tn-4h (*Trichoplusia ni*), cultivadas en las condiciones de la Figura 2b ($t_C=623$ s), crecen con $\mu=0.016$ h^{-1} en medio TnMFH (con 10% de suero fetal bovino) alcanzando una densidad celular ($X_{v,max}$) de 1.4×10^6 células/mL (en STR no recirculado: $\mu=0.024$ h^{-1} y $X_{v,max}=2.2 \times 10^6$ células/mL).

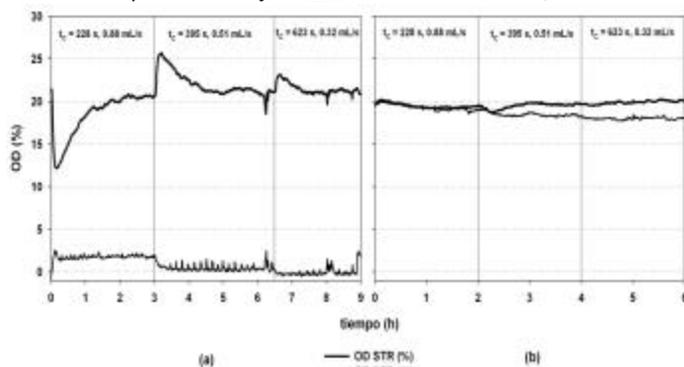


Figura 2. Perfiles en agua de: (a) simulación de gradientes de OD y (b) OD constante en ambos compartimentos.

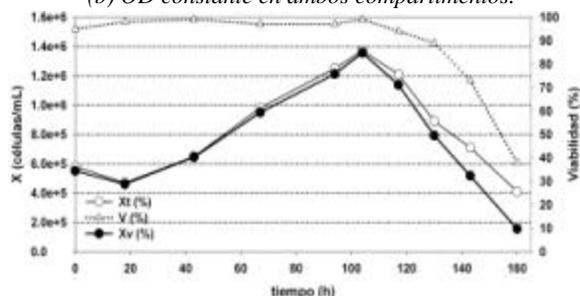


Figura 3. Cultivo de células Tn-4h en el simulador (20% de OD en ambos compartimentos).

Conclusiones. Dado que las células Tn-4h son capaces de crecer en las condiciones de operación del simulador, se podrá evaluar con éste el efecto de gradientes de OD (20% a 0%) a t_C similares a los que se pueden encontrar en biorreactores de escala industrial (donde t_C puede estar entre los 50 y 500 s) (2).

Agradecimientos.

Financiamiento: CONACYT 33348-B y NC230. DGAPA-UNAM IN218202. Becas CONACYT 169916 y complemento DGEF. Apoyo técnico: M.C. Vanessa Hernández, Juan M. Salazar, Javier Dorantes.

Bibliografía.

- Sandoval-Basurto, E. A. (2003). Efecto de gradientes de oxígeno disuelto sobre el metabolismo aerobio-anaerobio y producción de Trp-LE proinsulina por *Escherichia coli* recombinante, en estudios de escalamiento descendente. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Palomares, L.A. y Ramírez, O.T. (2000). Bioreactor scale up. En: *Encyclopedia of Cell Technology*. Spier, R. E. (Ed.). Wiley Biotechnology Encyclopedias. Pp. 183-200.