

Proceso continuo con reciclo: cultivos de alta densidad celular

María Cristina Rubio* y Antonieta Gordillo

Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
Universidad Nacional de Tucumán. 4000. Tucumán. Argentina.

m1rubio25@hotmail.com; maria.rubio@fbqf.unt.edu.ar

Resumen

Una de las áreas de investigación más importantes de la biotecnología es la ingeniería genética y productos de valor agregado. Para que un producto sea competitivo económicamente es necesario desarrollar procesos que permitan altas concentraciones celulares; evitar la inhibición por sustrato y reducir aquellas debida al producto. El diseño de sistemas de fermentación que permiten una elevada productividad y alta concentración celular es utilizando un proceso continuo con reciclo o recirculación celular. El objetivo de este trabajo es efectuar una revisión de los cultivos de alta densidad celular, el funcionamiento del proceso continuo con reciclo y las investigaciones en las diferentes áreas de la biotecnología, a fin de concientizar su aplicación a nivel industrial.

Palabras clave: Alta densidad celular; proceso fermentativo; reciclo; recirculación de células.

Abstract

One of the most important areas of biotechnology research is genetic engineering and high-speed production processes, in order to obtain high volumetric productivity in value-added products. For a product to be economically competitive it is necessary to develop processes that allow high cellular concentrations; avoid substrate inhibition and reduce those due to the product. The design of fermentation systems that allow high productivity and high cellular concentration is using a continuous process with cell recycle or recirculation. The objective of this work is to carry out a review of high cell density crops, the functioning of the continuous process with recycling and research in the different areas of biotechnology, in order to raise awareness of their application at the industrial level.

Key words: High cellular density; fermentation process; recycle; cell recirculation.

Introducción

Los procesos fermentativos se realizan en bioreactores que pueden operar en forma discontinua; semicontinua o continua, los cuales utilizan diferentes sistemas de cultivos, sea en superficie o sumergidos. Dentro de estos procesos se pueden utilizar células libres o inmovilizadas para las reacciones de transformación química, la cual es un área de gran interés debido a sus grandes posibilidades industriales (Moreno García et al., 2018; Hutchinson et al., 2019). Los bioreactores pueden ser columnas de relleno, provistos de sistemas de agitación, de lecho fijo o reactores de lecho fluidizado. Los criterios que se toman

en cuenta para la selección y formas de operación se basan en las siguientes dificultades: • Retener a los microorganismos en el interior del reactor. • Reutilizar las células. • Mantener la actividad de los microorganismos durante largos periodos de operación. • Evitar la formación de espumas • Controlar el proceso global mediante los fenómenos de transferencia. • Disminuir los efectos electrostáticos.

En un reactor que opera en discontinuo, la productividad volumétrica (masa de producto/vol. x tiempo) del sistema es mucho menor respecto a los reactores de procesos continuos. Las ventajas que tienen los procesos convencionales, es que la inversión y la complejidad del sistema es

menor (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Nieto Taype et al., 2020). Una de las áreas más importantes de la biotecnología por sus potenciales descubrimientos son la ingeniería genética y reactores con elevada velocidad de producción. Por ello, a fin de obtener condiciones de trabajo óptimas para los microorganismos se han estudiado e investigado nuevos sistemas de fermentación, con los cuales se pueda obtener altas productividades. Debido que este parámetro es directamente proporcional a la concentración de células, es sustancial trabajar con cultivos de alta densidad celular (Westman & Franzén, 2015; Santos et al., 2016; Moreno García et al., 2018; Véliz Valenzuela, 2020; Malairvang et al., 2020).

La necesidad de obtener procesos competitivos a nivel económico y productivo llevó, en primer lugar, a utilizar sustratos económicos, provenientes del descarte de las industrias. Así, Los estudios realizados por Santos et al. (2016) alcanzaron altas productividades usando procesos con reciclo y alta densidad celular, en el cual *S. stipitis* pudo adaptarse a medios ricos en xilosa (residuos agroindustriales) para la producción de etanol. A su vez, Matana et al. (2013), Kang et al. (2015) y Silva et al. (2016) reportaron el uso de sustratos celulósicos y lignocelulósicos para la producción de etanol. En segundo lugar, operar con procesos de alta densidad celular. Cabe resaltar, que estos sistemas presentan complicaciones adicionales como: acumulación de productos y residuos que pueden inhibir la producción, elevadas demandas de oxígeno y sustratos, aumentos en la densidad y viscosidad del medio, por ser altamente concentrados (Tao, 2011; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020). Durante los últimos 30 años se han desarrollado numerosos algoritmos de estimación y control para bioprocesos, siendo una referencia los aportes realizados por Bastin & Douchain (1990). Sin embargo, el desarrollo de algoritmos específicos para procesos de alta densidad, con las restricciones que estos implican, es aún poco explorado. Es de interés el desarrollo de este tipo de controles para su aplicación en la producción de bioplásticos, biogases y otros procesos similares donde los puntos de operación óptimos no son conocidos con exactitud debido a la incertidumbre existente respecto a la biota del proceso y la impureza

de los sustratos (Wright et al., 2014; Jamilis, 2016; Lindskog, 2017).

El objetivo de este trabajo es efectuar una revisión de los cultivos de alta densidad celular, el funcionamiento del proceso continuo con reciclo y las investigaciones en las diferentes áreas de la biotecnología, a fin de concientizar su aplicación a nivel industrial.

Reactores continuos de tanque agitado con recirculación celular

El desarrollo creciente y acelerado de la economía moderna, impone nuevos retos a los países solicitando competitividad e implementación de tecnologías de alta eficiencia que permitan reducir costos e incrementar la productividad de los procesos. Dentro de los métodos empleados frecuentemente, el reciclo o recirculación de células es seleccionado con respecto al proceso fed batch o lote alimentado y al uso de células inmovilizadas, debido que ambos presentan elevado costo para el control del proceso y dificultades para mantener las condiciones de operación, especialmente en la inmovilización, se plantean problemas de transferencia de oxígeno adecuadas para la actividad celular (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Hutchinson et al., 2019).

Las industrias de bioprocesos que operan en continuo son: la producción de etanol, levadura de panificación y algunas reacciones de conversión de sustrato a producto mediante sistemas enzimáticos (Westman & Franzén, 2015; Lindskog et al., 2017; Malairvang et al., 2020). En un reactor homogéneo y agitado, la corriente de medio o flujo de salida tiene la misma composición que el medio que se encuentra en el reactor. Estos se conocen como reactores de mezcla perfecta mediante las siglas CSTR (continuous stirred-tank reactor), es decir reactor de tanque agitado continuo (Barba & Clausell Terol, 2014; Kang et al., 2015; Jamilis, 2016; Lindskog et al., 2017; Nieto Taype, 2020).

En un proceso continuo, donde la velocidad del flujo de alimentación (FS_0) y la de salida del reactor son iguales ($FSrX$), continuos y constantes, la productividad del sistema se calcula como se indica en la ecuación 1:

$$Pv = [P] D \quad (1)$$

Donde P , es la concentración de producto (g/L) y D (h^{-1}), la velocidad de dilución, que se ajusta variando el caudal y se calcula midiendo el flujo (L/h) por unidad de volumen de trabajo (V) del reactor (L). Cuando el sistema continuo llega al estado estacionario, en el cual las variables son independientes del tiempo, la velocidad específica de crecimiento (μ) es igual a velocidad de dilución ($\mu=D$). Esto significa que si aumenta D , incrementa μ y por lo tanto la productividad, de acuerdo a la ecuación 1. La limitación del proceso continuo convencional, es que la velocidad de dilución (D) no se puede aumentar indefinidamente, ya que la velocidad específica de crecimiento máxima no logra alcanzar al valor de D y se produce el lavado del reactor, es decir en el flujo de salida se incrementa el número de microorganismos y la concentración de sustrato limitante llega a tener el mismo valor que el sustrato de entrada (S_0) (Martos, 2011; Kang et al., 2015; Nieto Taype et al., 2020).

Los procesos de alta densidad celular son aquellos en los cuales la concentración de microorganismos supera los 50 a 100 g/L. Los bioprocesos de baja densidad celular utilizan concentraciones menores, siendo muy usados para los estudios de investigación (Jamilis et al., 2014; Salar García, 2017; Herrera et al., 2019). En general se emplean para el modelado de procesos microbianos, formulación de medios de cultivo, estudio de factores externos sobre el desarrollo de procesos celulares, etc. (Jamilis, 2016; Ortega Quintana et al., 2017, Nieto Taype et al., 2020). La desventaja de estos procesos es la baja productividad, y los grandes volúmenes de medio que se deben procesar luego de la fermentación. Las condiciones de alta densidad celular sirven para incrementar la productividad volumétrica, es decir, para obtener mayor cantidad de biomasa o producto en un determinado volumen y tiempo (Matana et al., 2013; Tapia et al., 2013; Malairvang et al., 2020). Además, las elevadas concentraciones de biomasa que se pretende alcanzar se corresponden con una gran cantidad de sustrato que se debe consumir a lo largo del proceso.

El uso de un sistema de reciclo de microorganismos en un fermentador permite incrementar la concentración de células. De esta manera, con un aumento del catalizador biológico en el reactor se obtiene mayor

velocidad de conversión de sustrato a producto y con la recirculación o reciclo celular se trabaja con altas velocidades de dilución, lo que permite mayor flexibilidad de operación (Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020).

En 1961, Herbert fue el primero que reportó el diseño del proceso continuo con reciclo. Posteriormente se estudiaron varias formas de recircular células en los procesos de fermentación, ellas son: recirculación externa de la biomasa y recirculación interna de células, también llamado cultivo de perfusión (Pérez et al., 2004; Wright et al., 2014; Bohorquéz rincón & Sarmiento Higuera, 2017; Véliz Valenzuela, 2020). Pérez et al. (2004) reportaron que el equipo de separación se encuentra en el interior del reactor, las células están físicamente retenidas mediante un dispositivo mecánico, por ejemplo un filtro, por lo cual el medio libre de células se obtiene desde el interior del filtro. De esta forma, se alcanza eficiencia en el proceso sin que se elimine continuamente o se produzca la dilución de células. En este caso se pueden lograr concentraciones superiores a 107 células/mL. Debido que en este sistema el filtro se encuentra inmerso en el medio y no tiene movimiento, el inconveniente que se genera en el bioreactor es el bloqueo o taponamiento del filtro por las células que rodean al equipo. Las investigaciones de Hernández et al. (2010) reportaron que en el cultivo de perfusión de células de mamíferos, en tanque agitado, el dispositivo de retención celular es un filtro rotatorio o spinfilter. Con este sistema se logró alcanzar altas densidades de células en el seno del fermentador, trabajar a velocidades de dilución elevadas, utilizar instalaciones de pequeña capacidad y obtener altas concentraciones de producto en menor tiempo, sin que se produzcan obstrucciones en el filtro. En ambos casos de recirculación se requiere de un equipo de separación sólido-líquido por un proceso de sedimentación, centrifugación o filtración (Barba & Clausell Terol, 2014; Westman & Franzén, 2015; Lindskog, 2017).

En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso continuo con reciclo externo de células. Este sistema consta de un recipiente que contiene al sustrato (S_0), un reactor y un separador externo de células (S_e). Es un

sistema agitado que mantiene la homogeneidad en el interior del reactor. El medio de cultivo que tiene el sustrato (S_0) ingresa al fermentador por medio de una bomba a una velocidad de flujo (F), expresado en volumen/ tiempo (L/h) y sale del bioreactor, a la misma velocidad, con un flujo de $F(1+\alpha)X_1$.

Donde S_0 , concentración de sustrato inicial; F , flujo volumétrico de alimentación; X_1 , concentración de células en un volumen (V) del reactor; μ , velocidad específica de crecimiento; X_2 , concentración de células a la salida del separador (Se).

Si se realiza un Balance de flujo del sistema (Fig. 1) y se expresa en forma matemática se obtienen las ecuaciones 2 y 3.

$$\text{Flujo que ingresa al reactor} = \text{flujo que sale del reactor} \quad (2)$$

$$F + \alpha F = F(1 + \alpha) \quad (3)$$

Reordenando la ecuación 3, se demuestra que:

$$F(1 + \alpha) = F(1 + \alpha)$$

Dónde: F , es velocidad de flujo de entrada al bioreactor; $F(1+\alpha)$, velocidad de flujo de salida; αF , velocidad de flujo de recirculación desde el separador al reactor y α , es la relación de reciclo, llamado también razón volumétrica de recirculación, que tiene valores entre $0 < \alpha < 1$.

Si se realiza el balance de células del reactor (Fig.1) y se expresa en forma matemática, se tienen las ecuaciones 4 y 5.

$$\text{velocidad de formación de células} + \text{células que regresan} - \text{células que salen} = \text{acumulación de células} \quad (4)$$

$$\mu X_1 V + \alpha F C X_1 - F(1 + \alpha) X_1 = V \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Donde intervienen los términos, velocidad específica de crecimiento (μ); masa celular (X); factor de concentración de células (C), cuyo valor debe ser mayor a 1 ($C > 1$), acumulación o variación de células un intervalo de tiempo (dX/dt) y volumen (V) de líquido en el reactor. En la ecuación 5, no se incluyeron los términos, $F X_0$, debido que el medio de cultivo es estéril, y la velocidad de muerte de células ($\alpha X_1 V$) se desprecia al tener un valor menor frente a la masa celular activa del sistema.

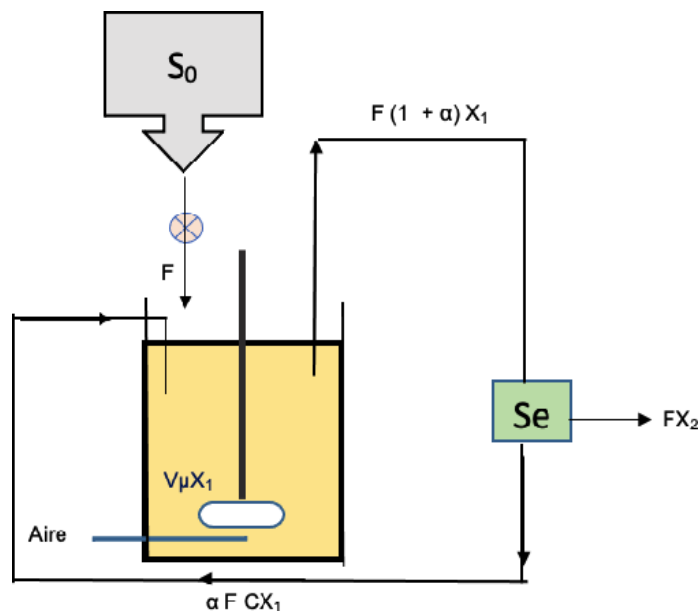


Figura 1: Esquema de un proceso continuo con recirculación de células.

Si se asume las mismas consideraciones que para un balance del proceso continuo convencional, en el estado estacionario, la variación de $dX/dt=0$. Este valor se reemplaza en la ecuación 5, se divide por V , se reordenan los términos y la ecuación queda:

$$\frac{\mu X_1 V}{V} = \frac{F(1+\alpha)X_1}{V} - \frac{\alpha FCX_1}{V}$$

Donde la relación $F/V= D$, siendo D , velocidad de dilución cuya unidad es h^{-1} . Se reemplaza D , se simplifican los términos, X y D y se obtiene la ecuación 6:

$$\mu = D(1 + \alpha - \alpha C) \quad (6)$$

$$\mu = (1 + \alpha - \alpha C) D \quad (6)$$

De esta ecuación se concluye que $\mu < D$ a diferencia del continuo convencional donde $\mu=D$. El valor de D está incrementado por la relación de reciclo y el factor de concentración celular.

Con la ecuación 6 se puede demostrar el resultado del sistema cuando $\alpha=1$ y $C=1$ o al variar el valor de ellos. A modo de ejemplo se tiene:

1. Si $\alpha=1$ y $C= 2$, se tiene que $\mu= 0$, lo que indica que no hay crecimiento celular.
2. Si $\alpha=0.5$ y $C=1$, se obtiene que $\mu= D$, no es un proceso con recirculación o reciclo celular.
3. Si $\alpha= 0.5$ y $C=2.5$, por lo tanto $\mu= D(0.25)$ indica que hay reciclo celular.

A nivel del separador (Se), también se puede realizar un balance de las células que ingresan y salen del equipo como se muestra en las ecuaciones 7 y 8:

$$\text{células que salen del separador} = \text{células que ingresan al separador} \quad (7)$$

$$\alpha FCX_1 + FX_2 = F(1 + \alpha) X_1 \quad (8)$$

Se reordenan los términos comunes de los miembros y se obtiene la ecuación 9

$$X_2 = X_1(1 + \alpha - \alpha C) \quad \text{ó} \quad \frac{X_2}{X_1} = (1 + \alpha - \alpha C) \quad (9)$$

Esta ecuación demuestra que $X_2 < X_1$, ya que el valor de X_1 está multiplicado por la relación de reciclo y el factor de concentración.

Considerando, que la relación de la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de dilución también es igual a los factores (ecuación 6), se pueden relacionar las variables (μ , X y D) por la ecuación 10.

$$\frac{X_2}{X_1} = \frac{\mu}{D} \quad (10)$$

Por medio de esta ecuación se determina el valor de cualquiera de las variables conociendo el valor de las otras.

En el proceso continuo con reciclo, las células vuelven al reactor como se muestra en la figura 1. Debido a esto, la concentración celular del reactor se puede controlar a través del caudal de purga de salida del equipo de separación. Previamente, la corriente de salida del flujo pasa por un equipo de separación, por ejemplo una centrífuga, sedimentador o filtro. La centrifugación es un proceso óptimo para separar organismos unicelulares pero tiene la desventaja de facilitar la contaminación de las células que regresan al bioreactor y un elevado gasto energético (Pérez et al., 2004; Lindskog, 2017). Los sedimentadores son económicos pero requieren mucho tiempo para la separación y decantación de las células. La filtración tangencial es uno de los métodos más prometedores. En este filtro, la dirección del flujo es paralela a la superficie del medio filtrante. Por lo cual, la velocidad del medio que ingresa impulsa a las células hacia la salida. Mientras que el medio líquido (filtrado)

Artículos

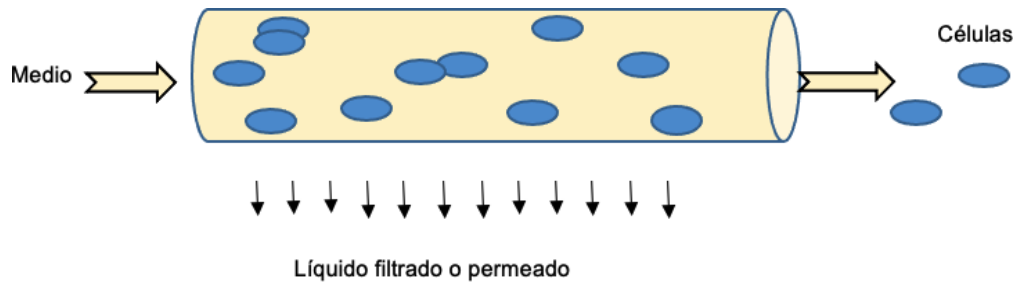


Figura 2: Mecanismo de filtración tangencial. Esquema de un tubo de membrana del filtro.

sale en forma perpendicular a través de la membrana del filtro debido a la presión del fluido (Figura 2), obteniéndose un flujo del filtrado que sale del filtro tangencial. El filtrado se recoge por conductos diferentes a las células, las cuales van acompañadas por una fracción de medio de cultivo agotado (Shen, 2014; Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Los filtros tangenciales permiten tiempos prolongados de operación, facilitan el retorno de los microorganismos al reactor en condiciones de asepsia y permiten la limpieza in situ.

Los filtros pueden tener diferentes tipos de membranas como las de microfiltración (con poros de 1 a 10 μm); de ultrafiltración (poros entre 0.001 a 0.05 μm) y membranas de osmosis reversa de 0.5 a 1nm. Estas últimas son usadas para retener sales para la purificación de aguas (Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Para este fin, existen dos tipos de membranas: anisotrópicas e isotrópicas. Esta última tiene poros uniformes por lo cual pueden retener partículas o células en el seno de su estructura que llegan a deteriorarse por contaminación microbiana. Las membranas anisotrópicas poseen dos estructuras diferentes, una muy delgada (menos de 1 μm) de alta selectividad y otra de un grosor de 20 μm a 1mm, siendo una estructura más abierta. Estas membranas no permiten el pasaje de ninguna partícula ni célula al interior de estas, por lo cual son fáciles de remover de la superficie (Bohorquéz Rincón & Sarmiento Higuera, 2017).

Las membranas pueden ser fabricadas con distintos materiales como, celulosa; nylon; polietileno; metal y cerámica.

Las exigencias para el uso de las membranas filtrantes son: 1- eficacia de separación mediante una porosidad regular y conocida; 2-elevado rendimiento de permeación y 3- elevada resistencia térmica, química y mecánica.

Actualmente se utiliza mucho la filtración tangencial con membranas de cerámica para el filtrado de vinos (Pérez de Alarcón, 2018).

Aplicaciones

Una aplicación importante es en el área industrial, donde el reciclaje de los organismos permiten la adaptación y la degradación de sustratos celulósicos para la producción de un metabolito de alto valor agregado como el etanol (Matana et al., 2013; Kang et al., 2015; Silva et al., 2016). También este sistema disminuye el efecto Crabtree, importante en la producción de biomasa para el área alimentaria (Malairvang et al., 2020). El inconveniente del uso de sustratos agroindustriales es que contienen partículas en suspensión, siendo una posible solución realizar un prefiltrado para eliminar en condiciones aerobias o anaerobias, el cual permite aumentar la velocidad de degradación del contaminante y la estabilidad del sistema. Así, en el área de medioambiente, se ha reportado el aislamiento de *Dehalococcide mccartyi*, capaz de reducir el percloroetano y

tricloroetano a eteno, el cual fue considerado como un organismo clave para biorremediar sitios contaminados con estos compuestos (Wright et al, 2014). Una desventaja que se presenta en este sistema es que con el producción de otros productos de interés. Es

decir que se puede trabajar con células mutantes o recombinantes, ya que dentro del reactor, al aumentar el número de células se restringe el espacio organismos desarrollarán más lentamente y mayor será el tiempo en el cual se pierde la información genética. En base a esto, en el área de ingeniería genética, se reportaron investigaciones para obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes y en el desarrollo de virus para producir vacunas en el área de veterinaria (García et al., 2013; Tapia et al., 2016; Salar García, 2017; Ravasi, 2016; Véliz Valenzuela, 2020). Otra desventaja del reciclo, es que al incrementar el número de células, dificulta la transferencia de oxígeno en el medio cuando se realizan fermentaciones aerobias. Aprovechando este inconveniente, el sistema puede ser aplicado a células vegetales o animales debido al menor consumo de oxígeno por las células (Smelko et al., 2011).

Los estudios en investigación aplicada no solamente se recirculan las células sino también fuentes de nitrógeno, fósforo o algún nutriente indispensable para el desarrollo celular o producción de un metabolito (Pérez et al., 2004; Matana et al., 2013; Santos et al., 2016; Lindskog, 2017). Si el sustrato en un gas (CO₂; CH₄) se recicla y se usa como fuente de carbono (Martos, 2011; Barba & Clausell Terol, 2014; Lindskog, 2017; Malairvang et al., 2020).

Conclusiones

Los sistemas continuos con reciclo son una alternativa para ser aplicados en la industria a fin de mejorar la velocidad de producción de un metabolito de valor agregado, disminuir el tiempo de formación del mismo; trabajar con velocidades de dilución mayores a la velocidad específica de crecimiento máxima del organismo y aumentar la productividad del sistema. Las desventajas del sistema pueden ser utilizadas para la obtención de productos de células animales y vegetales y en la producción de virus para la elaboración de vacunas, tan requeridas actualmente.

Referencias

Bastin G & Dochain D (1990) On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Edt, Elsevier Science, Amsterdam.

Barba A & Clausell Terol C (2014) Reactores Químicos y Bioquímicos. Edt. Universitat Jaume

Bohorquez Rincón C & Sarmiento Higuera D (2017) Análisis del uso de bioreactores de membrana para el tratamiento de aguas residuales y posible implementación en Colombia. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad Católica de Colombia.

García J, Santaio Z, Zomalocarregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Cruz D (2013) Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vacci Monito* 22: 30-39.

Herbert D (1961) Continuous culture of microorganisms. Edt. Soc. Chem. Ind. Monog. 12 London, pp. 21.

Hernández M, González A, Bouza J, Mayo O, Kulich E, Riera G (2010) Modelación preliminar de cultivo en perfusión de células de mamíferos en tanque agitado con spinfilter como dispositivo de retención. *Biotecnol. Apl.* 27: 36-41.

Herrera J, Leon L, Torres Y, Canon N, Herrera A, Cuenca M (2019) Evaluación y selección de 23-29.

Hutchinson U, Seneto K, Boredi S, Ngongang M, du Plessis H, Booyse M, Jolly N (2019) Reusability of immobilized cells for subsequent balsamic – styled vinegar fermentations. *Ferment.* 6: 1-3 (doi: 10.3390/fermentation6040103).

Jamilis M, Garelli F, Salatul M, Mozumder I, Castañeda T, De Battista H (2014). Modeling and estimation of production rate for the production phase of non-growth-associated high cell density processes. *Biopr.. Biosy. Eng.* 38:1903-1914.

Jamilis M (2016) Modelización, monitoreo y control en Procesos para producción de bioplásticos.

Tesis doctoral en Ingeniería. Universidad nacional de La Plata. Argentina. Pp1-129. Kang K, Chung D, Kim Y, Chung B, Choi G (2015) High titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system. *Fuel* 145: 18-24.

Artículos

- Lindskog E (2017) the upstream process: Principal modes of operation. In: Biopharmaceutical Processing. Eds. Jagschies G, Lindskog E, Lacki K, Galliner P, Edt. Elsevier Ltd, USA.
- Malairvang K, Krahang M, Sukna J, Rathanapradit K, Chansart S (2020) High cell density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with intensive multiple sequential batches together with a novel technique of Fed batch at cell level (FCB). *Process* 8: 1321.
- Martos M A (2011) Modo de operación de bioreactores. Edt. Universitaria. Universidad nacional de Misiones. Argentina. pp, 1-58.
- Matana Y, Hasunuma T, Kondo A (2013) Cell recycle batch fermentation of high solid lignocellulose using a recombinant cellulase displaying yeast strains for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. *Biores. Technol.* 135: 403-409.
- Moreno García J, García Martínez T, Mauricio J, Moreno J (2018) Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual Tren. Future Persp. *Front. Microbiol.* 9: 241.
- Nieto Taype M, Garcia Ortega X, Albiol J, Montesinos J, Valero F (2020) Continuous cultivation as a tool toward the rational bioprocess development with *Pichia pastoris* cell factory. *Front Bioeng. Biotechnol.* 8: 632.
- Ortega Quintana F, Álvarez H, Botero Castro H (2017) Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de la metodología de modelado. *ION* 3: 73-90.
- Pérez B, Ospina S, Godoy R (2004) Cultivos de alta densidad celular por retención interna: aplicación a la fermentación continua de etanol. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6: 25-30.
- Pérez de Alarcón L (2018) Elaboración de vinos. Edt. Síntesis S.A. pp, 1-203.
- Ravasi P (2016) Desarrollo de levaduras para la producción de proteínas recombinantes en *Corynebacterium glutamicum*. Tesis Doctoral. Fac.de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- Santos S, Silva de Sousa A, Rodrigues S, Tramontana R, Rulle R, Squina F, Vazrossel C, Carvalho da Costa A, Lutz Lenczak J (2016) Bioethanol production by recupered *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentation with high cell density using xylose and glucose mixture. *Biores. Technol.* 219: 319-329.
- Salar García J (2017) Desarrollo de procesos de producción de ectoínas en cultivos de alta densidad de *Chromohalobacter salexigons* DSM-3043. Tesis de Master en Química fina y molecular. Universidad de Murcia.
- Shen F (2011) Separación de biomasa y productos (ácido láctico y ácido lactobiónico) por microfiltración. Master en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. España.
- Silva V, Nakanishi S, Dionisio S, Rossell C, Kenezak Gonsalves A, Rocha G (2016) Using cell recycling batch fermentation to valide a setup for cellulosic ethanol production. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 91: 1853-1859.
- Smelko J (2011) Performance of high intensity fed batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems. *Biotechnol prog.* 27: 1358-134.
- Tao Y (2011) Development and implementation of a perfusión based high cell density banking process. *Biotechnol Prog.* 27: 824-829.
- Tapia F, Vazqu ez Ramirez D, Genzel Y, Rechl U (2016) Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivation: options for process intensification in cell culture based viral vaccine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:2121-2132.
- Véliz Valenzuela F (2020) Estudio del cultivo en perfusión de células PK15 para la producción de vacunas veterinarias y análisis de puntos críticos para su escalamiento. Tesis de grado. Facultad Ingeniería Civil. U de Chile.
- Westman J & Franzén C (2015) Current progress in high cell density yeast bioprocess for bioethanol production. *Biotechnol. J.* 10:1185-1195.
- Wright B, Bruninghaus M, Urabel M; Walther J, Shah N, Bae S, Jhonsont T, Yin J; Zhou W, Konstantinov K. (2014) A novel seed-train process using high density cell banking, a disposable bioreactor and perfusión technologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2729-2737.