

6.3. OPERACIÓ EN DISCONTINU ALIMENTAT O *FED-BATCH*.

Una de les alternatives al cultiu en discontinu estudiat fins ara és el cultiu en discontinu alimentat o *fed-batch*. En aquest cas s'aprofiten els principals avantatges del procés en discontinu, però es fa l'addició controlada dels nutrients principals en petites addicions per reduir les elevades velocitats de consum observades en el cas anterior, i evitar també l'acumulació de subproductes del metabolisme i disminuir l'augment d'osmolaritat. El resultat que es pot esperar d'aquesta estratègia és el d'allargar la vida del cultiu, ja que les condicions limitants es donaran més tard. Utilitzant diferents aproximacions, els processos de *fed-batch* per a cèl·lules animals han estat desenvolupats per diferents autors (Bibila i col., 1994; Bibila i Robinson, 1995; Xie i Wang, 1994 i 1996; Zhou i col., 1995; Zhou i col., 1997).

La limitació per nutrients en un cultiu es pot evitar si els factors limitants es poden identificar i afegir en el medi de cultiu, o bé, addicionar-los dinàmicament durant el cultiu cel·lular. El que realment és més difícil és perllongar el període de creixement òptim amb el subministrament necessari de nutrients i evitar l'acumulació excessiva de metabolits i un augment massa alt de l'osmolaritat. Una vegada la concentració de metabolits o l'osmolaritat arriben a possibles nivells inhibitoris, la situació desfavorable esdevé irreversible. Per tant, s'han de considerar ambdues premisses per establir una estratègia per als cultius en *fed-batch*: la del subministrament suficient de nutrients al llarg del cultiu i la de minimitzar la producció de metabolits tòxics i l'augment de l'osmolaritat. Per minimitzar la producció de metabolits les cèl·lules s'han de confinar en un estat fisiològic adequat per a tal propòsit. Aquest estat es pot aconseguir amb el control de la composició del medi a través de la manipulació de la velocitat d'addició de l'aliment.

L'objectiu de control en la fase de creixement exponencial és minimitzar la formació de metabolits residuals i l'acumulació excessiva de components del medi d'alimentació en el cultiu, a més de perllongar el període de ràpid creixement per aconseguir altes concentracions cel·lulars i altes viabilitats. Els metabolits claus que poden inhibir el creixement cel·lular són el lactat i l'amoni, encara que s'ha especulat amb l'existència d'altres substàncies inhibitories (Dodge i col., 1987; Sanfeliu, 1995). Per observar un canvi del comportament en el metabolisme cel·lular i una reducció de la producció de metabolits, la concentració de nutrients sovint s'ha de mantenir a nivells baixos. Aquests valors no són fàcils d'assolir sense un sistema automatitzat per a l'addició de nutrients. En aquest treball es planteja aconseguir aquest objectiu mitjançant la utilització de la informació generada en línia pels sistemes posats a punt, la mesura de la concentració de cèl·lules i la OUR, fent-la servir per regular la dosificació d'una solució d'aliment concentrada. Per realitzar aquesta estratègia de control de

nutrients es proposen dues configuracions diferents de simples llaços de control, avaluant per a cadascuna el seu comportament.

6.3.1 Funcionament i posta a punt del cultiu en *fed-batch*.

L'operació en *fed-batch* és bàsicament un cultiu en discontinu en el qual s'hi afegeix dinàmicament una solució concentrada de nutrients. Durant tot el procés no s'extreu cap corrent del bioreactor, exceptuant el volum de les mostres per al seguiment de l'evolució del cultiu. Els detalls sobre la configuració i procediment experimental emprat en aquest treball es presenten a l'apartat 8.8.2. A la Figura 6.14 es mostra l'esquema del muntatge experimental amb els diferents equips connectats a l'ordinador per a l'operació en *fed-batch*. L'única novetat respecte el sistema en discontinu és que ara s'afegeix un circuit d'addició de nutrients. La solució d'aliment s'introdueix dins el bioreactor mitjançant una bomba dosificadora de membrana d'alta precisió. Aquesta està connectada a la DCU de l'equip de cultiu cel·lular per transmissió analògica/digital (A/D). Al mateix temps la DCU, com ja s'ha descrit abans, està comunicada via port sèrie amb l'ordinador, permetent així la gestió remota de la velocitat de la bomba, entre d'altres variables.

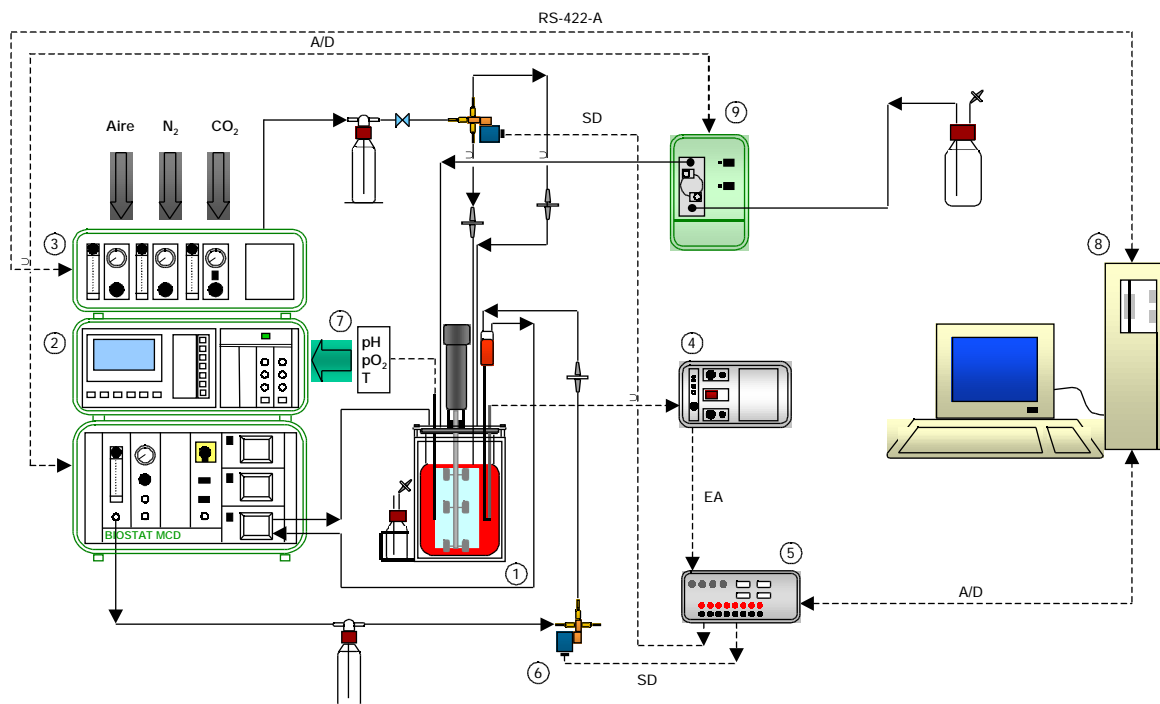


Figura 6.14. Esquema de l'adquisició de dades i control de l'operació en *fed-batch*. 1) Bioreactor Braun Biostat MCD, 2) Unitat de control digital (DCU), 3) Estació de mescla de gasos pO_2 Gas-Mix, 4) Sonda Aquasant AF44 i transmissor AS82, 5) Caixa de comunicacions, 6) Electrovàlvula Sirai, 7) Sondes de temperatura, pH, i pO_2 , 8) Ordinador de gestió i control, 9) Bomba dosificadora de Braun FE-211. A/D = Sortides i Entrades Analògiques/Digitals, EA = Entrada Analògica, SD = Sortida Digital, RS-422-A = port sèrie.

Tradicionalment, la definició de les solucions d'addició per a l'operació *fed-batch* s'ha realitzat amb el propòsit de subministrar al cultiu les quantitats necessàries dels dos substrats més ràpidament metabolitzables, la glucosa i la glutamina. No obstant, si no es considera l'addició de la resta de nutrients, lentament metabolitzables, bàsics per al creixement cel·lular, es pot arribar al seu exhauriment i a una entrada ràpida en la fase de mort. Per tant, la definició del medi d'addició ha de tenir en compte aquest fet per evitar possibles aturades del creixement cel·lular abans d'hora. Per altra banda, els nutrients en una solució d'addició s'han per concentrar tant com sigui possible, ja que d'aquesta forma el volum del cultiu es podrà mantenir a un nivell pràcticament constant, tot i les contínues addicions al bioreactor. El coll d'ampolla de concentrar aquest tipus de solucions rau en la poca solubilitat amb l'aigua d'alguns aminoàcids i vitamines essencials al medi de cultiu. Les quantitats d'aquests nutrients lentament metabolitzables s'han establert de forma que no es doni la seva acumulació excessiva, ni l'exhauriment prematur d'un o varis d'ells. Per altra banda, els metabolits ràpidament metabolitzables tenen un tractament diferent a la resta. Aquests estan en relació estequiomètrica ($Y_{Gln/Glc} = 0.25$) per tal d'assegurar un control de nutrients eficient a baixes concentracions, sense perill que s'esgotin cap dels dos. Les concentracions de glutamina i glucosa finals al medi d'alimentació del *fed-batch* són 75 mM i 300 mM respectivament (al voltant de 12 vegades més concentrades que en el medi basal DMEM). La definició complerta de la solució d'addició es presenta a l'apartat 8.6.2. Aquesta solució és la que s'ha utilitzat en tots els cultius en *fed-batch* que es mostraran al llarg d'aquest apartat. La quantitat de volum que s'ha d'addicionar es calcula considerant la glucosa com el component bàsic. Això es deu primordialment a dues raons: primera, és un dels metabolits que es consumeixen en més quantitat i a més velocitat i, segona, és un component que s'analitza fora de línia fàcil i ràpidament mitjançant un equip comercial (YSI-2700), permetent realitzar comprovacions de com s'està comportant el sistema de control de nutrients.

Un altre aspecte pràctic a definir és la forma com s'ha d'alimentar el volum estimat d'addició. La bomba dosificadora de Braun FE-211 utilitzada en el treball ha estat seleccionada per la seva fiabilitat, efectivitat, esterilització i estabilitat. No obstant, presenta l'inconvenient que el cabal mínim d'addició és de 6.0 ml/h fet que, combinat amb la concentració desitjada de la solució d'addició, fa que en condicions normals el cabal necessari sigui inferior al mínim que pot oferir la bomba. Per resoldre aquest punt, les addicions es fan en períodes discrets, i la bomba només està en marxa una part del període en qüestió.

L'estratègia per al control dels cultius en *fed-batch* s'ha dissenyat amb l'objectiu de mantenir la concentració de glucosa (variable controlada) en un valor de consigna molt baix al llarg del cultiu, mitjançant l'addició de volums variables de solució concentrada de nutrients. A grans trets, el que fa aquest sistema de control és anticipar-se al consum de nutrients en funció de la resposta actual del sistema i d'un model de predicció, al mateix temps que es

torna a alimentar el sistema amb el valor estimat actual de la variable controlada, per així poder corregir la possible desviació del punt de consigna (Glc_{sp}), deguda a una previsió anterior no gaire ajustada (al que ha passat en realitat). Aquest sistema de control presenta certes similituds amb el control clàssic anticipat amb retroalimentació, denominat *feedforward-feedback control* (Stephanopoulos, 1984). En general, el sistema de control que s'esquematitza a la Figura 6.15 presenta dos llaços ben diferenciats que es detallen a continuació.

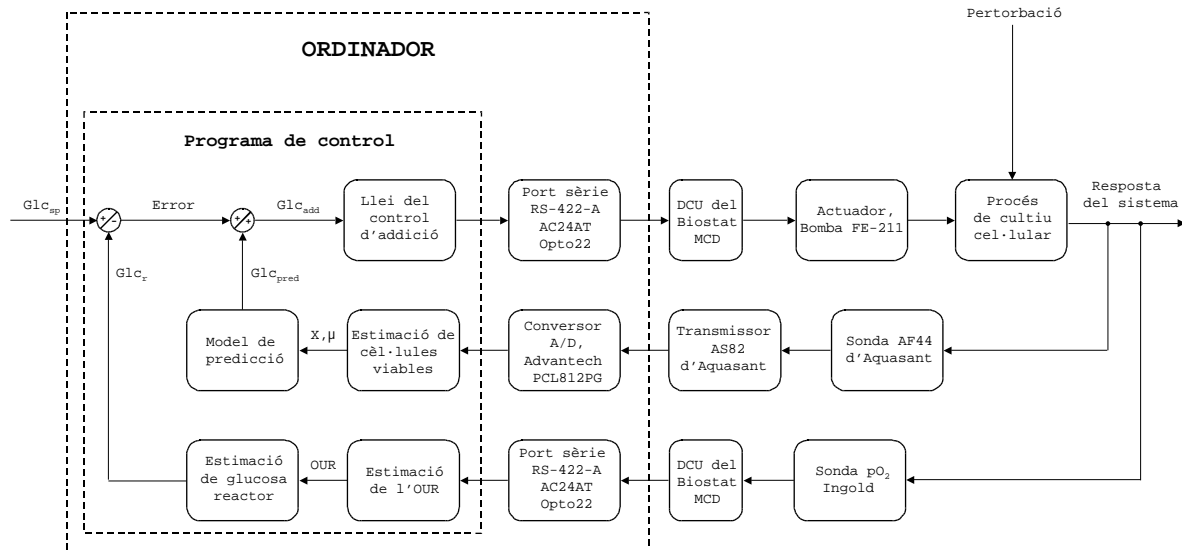


Figura 6.15. Esquema de la configuració del sistema de control utilitzat per mantenir la glucosa a un nivell baix de concentració als cultius en *fed-batch*, FB01 i FB02.

En el llaç de control exterior de la Figura 6.15, s'estima la concentració actual de glucosa en el bioreactor ($Glc_{r,i}$) a partir del balanç màssic de glucosa de l'operació en *fed-batch* (Eq. 6.9), ja que no es disposen de mesures directes en línia d'aquesta variable. Aquesta estimació necessita disposar dels valors de la concentració de glucosa al reactor en el temps anterior ($Glc_{r,i-1}$), la glucosa addicionada pel sistema de control en l'anterior actuació ($Glc_{add,i-1}$), i la glucosa consumida en l'interval de temps ($Glc_{cons,i}$), que ve donada a l'equació 6.10. Aquest valor de la glucosa consumida s'estima amb les mesures de OUR actual (OUR_i) i anterior (OUR_{i-1}), calculades a partir de l'expressió descrita a l'apartat 4.3.2 o, més concretament, amb el consum d'oxigen acumulat (OC_i) en l'interval de temps ($t_i - t_{i-1}$), i la relació estequiomètrica entre l'oxigen i la glucosa ($Y_{O_2/Glc}$) determinat a partir de cultius previs.

$$Glc_{r,i} = Glc_{r,i-1} + Glc_{add,i-1} - Glc_{cons,i} \quad (\text{Eq. 6.9})$$

Totes les concentracions de glucosa anteriors s'expressen en unitats de mM. La $Glc_{cons,i}$ s'expressa amb la següent expressió:

$$Glc_{cons,i} = \frac{OC_i}{Y_{O_2/Glc}} = \frac{(OUR_i + OUR_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2Y_{O_2/Glc}} \quad (\text{Eq. 6.10})$$

on el OC_i s'expressa en unitats de mmolO_2/l , el $Y_{O_2/Glc}$ en $\text{mmolO}_2/\text{mmolGlc}$, la OUR_i i OUR_{i-1} en $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ i el temps t_{i-1} i t_i en h.

El valor de $Glc_{r,i}$ obtingut anteriorment es compara amb el valor de glucosa consignat – *set-point* (Glc_{sp}) i l'*Error* resultant se li afegeix al valor de glucosa determinat a l'altre llaç de control ($Glc_{pred,i}$). En el llaç de control interior de la Figura 6.15, es realitza una predicció de la quantitat de substrat que es consumirà ($Glc_{pred,i}$) en un interval de temps determinat; una hora més el temps que triga en confeccionar-se la seqüència d'anàlisi de la OUR_i ($\Delta t_{i+1} = 1.0 + t_{OUR_i}$). Per tant, el valor estimat estarà en funció d'una evolució prevista del procés. El model de predicció (Eq. 6.11) és vàlid només en la zona de creixement exponencial, i es basa en el càlcul de la integral de cèl·lules viables, projectada des del temps actual (t_i) fins a un temps futur (t_{i+1}), ICV_{i+1} , i la velocitat específica del consum de glucosa (q_{Glc}), que s'assumeix constant al llarg de la fase exponencial (Zhou i col., 1997). Aquesta velocitat s'estima, prèviament a la posta en marxa, a partir de cultius anteriors.

$$Glc_{pred,i} = q_{Glc} ICV_{i+1} \quad (\text{Eq. 6.11})$$

Sabent que $ICV_{i+1} = (X_{i+1} + X_i)(t_{i+1} - t_i)/2$ i a partir de la relació entre X_{i+1} i X_i amb l'expressió de la cinètica del creixement cel·lular (Eq. 6.5) per al temps projectat (t_{i+1}) i l'actual (t_i), s'obté l'expressió $X_{i+1} = X_i \exp(\mu \Delta t_{i+1})$, on Δt_{i+1} és la diferència entre el temps projectat i l'actual. Substituint aquesta expressió a la primera, i el resultat d'aquesta operació a l'expressió 6.11, si s'agrupen termes s'obté la següent fórmula:

$$Glc_{pred,i} = \frac{q_{Glc} 10^3 X_i [1 + \exp(\mu_i \Delta t_{i+1})] \Delta t_{i+1}}{2} \quad (\text{Eq. 6.12})$$

on l'interval de temps Δt_{i+1} es defineix com $\Delta t_{i+1} = t_{i+1} - t_i$ i s'expressa en unitats d'hores (h), q_{Glc} en $\text{mmol}/(10^6 \text{cèl}\cdot\text{lules}\cdot\text{h})$, X_i en 10^6 cèl·lules/ml, μ_i en h^{-1} i $Glc_{pred,i}$ en mM. Com es pot observar a l'equació 6.12 es necessita conèixer la velocitat específica de creixement pel temps actual (μ_i), que es determina a partir del pendent de la recta que relaciona el logaritme neperià de tres punts de concentració de cèl·lules viables amb el temps, l'actual (X_i) i les dues anteriors a la present mesura (X_{i-1} i X_{i-2}). La mesura de la terbolesa del brou de cultiu relacionada amb la seva recta de calibratge proporciona la concentració cel·lular de viables (X_i) en línia per a la fase exponencial, com ja s'ha detallat a l'apartat 4.4.2. Una vegada es prediu la concentració requerida de glucosa ($Glc_{pred,i}$) per al pròxim interval de temps, el seu

valor se suma a l'*Error* que prové del primer llaç de control, obtenint-se el valor de glucosa que cal addicionar al cultiu ($Glc_{add,i}$), expressant-se com:

$$Glc_{add,i} = Glc_{pred,i} + Error = Glc_{pred,i} + (Glc_{sp} - Glc_{r,i}) \quad (\text{Eq. 6.13})$$

totes les variables en unitats de mM.

Una vegada s'obté el valor de la glucosa a addicionar ($Glc_{add,i}$), aquest flux d'informació arriba cap al controlador pròpiament dit, en què s'aplica una llei de control simple que s'expressa en la forma de l'equació 6.14. Amb aquesta llei es converteix la concentració de glucosa necessària per a les cèl·lules en el pròxim interval de temps, $Glc_{add,i}$, en un volum de solució d'aliment ($V_{add,i}$) que s'addiciona en forma de pols en un temps prefixat, t_{pols} , donant com a resultat un valor de cabal per a la bomba FE-211, $Q_{add,i}$. Aquí és on el cabal a consignar es tradueix al llenguatge propi de la DCU, és a dir, es converteix el cabal (ml/min) en un senyal digital: la DCU consigna la bomba FE-211 a la velocitat calculada - a la sintaxi de Sequen és la variable \$DCU_CS_SUBS - durant un minut de temps, transcorregut aquest temps la bomba s'atura. Per tant, encara que la variable manipulada és el cabal d'addició de la bomba, realment el que es manipula en el bioreactor és el volum de solució puntual que s'addiciona de forma discontinua. D'altra banda, cal remarcar que a les primeres hores de cultiu el volum d'addició calculat per la llei de control prendrà valors negatius, ja que el medi disposa de prou glucosa, i el sistema de control no pren cap actuació sobre el procés mentre que el valor d'aquesta variable continui per sota de zero. De fet, aquesta resposta del sistema de control és lògica, ja que a l'inici del cultiu el nivell de glucosa en el bioreactor estarà per sobre del punt de consigna i, a més a més, el consum de glucosa encara no serà suficientment important com per a què $Glc_{add,i} = 0.0$, i s'hagi d'afegir solució concentrada de nutrients. L'expressió que pren la llei de control pel cabal a addicionar és:

$$Q_{add,i} = \frac{V_{add,i}}{t_{pols}} = \frac{Glc_{add,i} V_{r,i}}{t_{pols} Glc_{aliment}} \quad (\text{Eq. 6.14})$$

on $Glc_{aliment}$ és la composició de glucosa en la solució d'addició, 300 mM, t_{pols} té un valor de 1 minut, i $V_{r,i}$ és el volum del bioreactor, en ml, que fluctua al llarg del procés al voltant del volum inicial. Fent un balanç màssic del reactor s'obté la següent expressió que permet determinar el seu valor per a qualsevol temps t_i :

$$V_{r,i} = V_{r,i-1} + V_{add,i-1} + V_{NaOH,i} - V_{mostra,i-1} \quad (\text{Eq. 6.15})$$

on $V_{r,i-1}$ és el volum del reactor en el temps anterior, $V_{add,i-1}$ és el volum de solució addicionada en l'anterior acció de control, $V_{NaOH,i}$ és el volum de solució de NaOH (200 mM) afegit durant

el període $t_i - t_{i-1}$, i $V_{mostra,i-1}$ és el volum de mostra per a l'anàlisi fora de línia. Aquest s'extreu tot just abans que el controlador faci la següent addició de nutrients. Tots aquests volums es calculen en unitats de ml.

El sistema de control proposat es transforma en llenguatge ANSI C dins del programa de gestió i control, l'aplicació Sequen, i en l'arxiu de protocol, FEDBATCH.TXT, que conté totes les ordres per poder realitzar l'estratègia d'addició. Aquest arxiu de protocol s'estructura d'acord al diagrama de flux que es presenta a la Figura 6.16, i el llistat d'ordres que conté es mostra a l'Apèndix B. La crida a la funció Processa() es realitza des de l'arxiu de protocol amb la sintaxi de Sequen, **PROC**CARGUMENT. Algunes de les funcions o arguments, ja descrits en l'operació en discontinu s'han actualitzat, ampliant-se les possibilitats de processament de dades que realitzaven. A la Taula 6.2 es presenta el conjunt de funcions i els paràmetres que es calculen en línia.

FUNCIONS	VARIABLES PROCESSADES
CALCULA OUR	Velocitat del consum d'oxigen, consum d'oxigen acumulat, velocitat específica de creixement amb dades OUR (μ_{OUR})
CALCULA BIO	Filtratge del senyal d'Aquasant, concentració de cèl·lules viables, velocitat específica de creixement (μ)
CALCULA SOUR	Velocitat específica del consum d'oxigen a partir de les dades obtingudes de OUR i X
CALCULA VARDCU	Homogeneïtzació respecte el temps dels valors de temperatura, oxigen dissolt, pH, volum d'àlcali i CO ₂
CALCULA GLC	Glucosa en el bioreactor i predicció consum de glucosa
CALCULA VOL	Volum del bioreactor
CALCULA ADD	Volum de solució d'aliment i cabal de la bomba FE211 consignat segons el protocol de comunicació de la DCU

Taula 6.2. Resum de les funcions contingudes al mòdul Proces que es criden des de l'arxiu de protocol.

A continuació, es presenta l'estudi realitzat per a diferents cultius en *fed-batch*, on es dóna especial atenció a les condicions òptimes de cultiu que maximitzen la concentració de cèl·lules viables i que redueixen les concentracions d'amoni i lactat respecte als cultius en discontinu realitzats amb medi estàndard i concentrat.

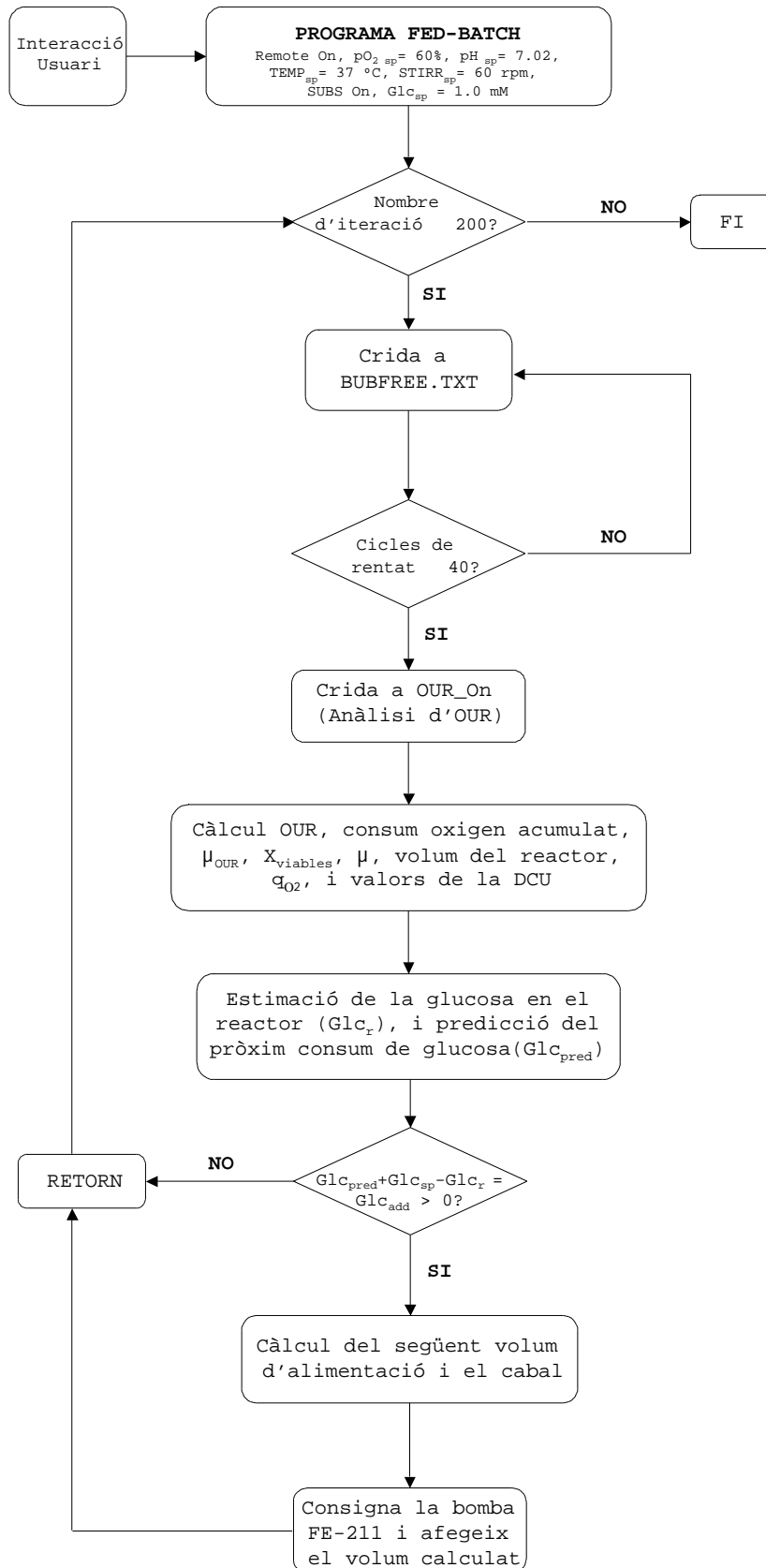


Figura 6.16. Diagrama de flux de l'arxiu de protocol FEDBATCH.TXT de l'operació en *fed-batch*.

6.3.2. *Fed-batch* amb control dinàmic de nutrients en línia.

Com s'ha comentat anteriorment, experiments previs amb un cultiu en continu de l'hibridoma KB-26.5 demostraren que si les concentracions en el bioreactor de glucosa i de glutamina es mantenen per sota de 0.3 mM i de 0.6 mM respectivament, es podia assegurar una reducció molt important de la producció de lactat i amoni, i un descens substancial de les velocitats de consum, tant la de glucosa com la de glutamina. Aquests valors són bastants similars als presentats per altres autors. Però d'altra banda, treballar a nivells molt baixos de concentració pot tenir inconvenients. Primer, la velocitat específica de creixement es pot reduir. Un segon inconvenient es deu al disseny del sistema de control de nutrients. Com que en aquest cas no es realitzen mesures directes de la variable a controlar, el nivell de glucosa en el bioreactor, si alguna de les estimacions no és molt precisa, a aquests nivells tan baixos no es té gaire marge per a l'error. Aleshores, un càlcul inadequat del volum d'addició pot portar a l'esgotament de la glucosa i/o de la glutamina, i la més que probable pèrdua del cultiu. Per tant, cal situar l'operació del reactor en unes condicions que s'eviti l'acumulació de metabolits, però al mateix temps s'eviti l'esgotament dels components del medi. Del que s'ha exposat, es decideix finalment com a objectiu d'aquest experiment portar a terme el cultiu en *fed-batch* en uns rangs de concentració de 0.3-1.5 mM per a la glucosa i 0.6-2.5 mM per a la glutamina.

6.3.2.1. Cultiu en *fed-batch*, FB01.

Seguint el criteri fins ara explicat s'ha realitzat un primer experiment en *fed-batch* (FB01), amb un volum inicial de 2 litres de medi DMEM, i unes concentracions inicials de glucosa i glutamina de 2.5 mM i 2.2 mM respectivament. El bioreactor s'ha inoculat amb una concentració de cèl·lules viables de 0.24×10^6 cèl·lules/ml utilitzant cèl·lules a la meitat de la fase de creixement exponencial d'un cultiu en flascó agitat. Els resultats es presenten a la Figura 6.17. Durant el cultiu, l'arxiu de protocol, FEDBATCH.TXT, carregat en l'aplicació Sequen, envia les ordres necessàries al mòdul Proces, que permeten obtenir les estimacions en línia de la velocitat del consum d'oxigen i de la concentració de cèl·lules viables. La glucosa total que cal afegir al cultiu s'ha avaluat segons la configuració de control dissenyada. Cada vegada que es finalitza la seqüència d'anàlisi de la mesura de la OUR, el sistema de control, si cal, afegeix un volum de solució de nutrients concentrada sense sals. Aquesta addició s'ha iniciat automàticament després que la quantitat estimada de glucosa a afegir en el bioreactor ($Glc_{add,i}$) tingués un valor positiu, fet que ha tingut lloc a les 18.7 hores de cultiu i a una concentració estimada al bioreactor de 1.06 mM. La solució d'addició utilitzada és la que s'ha descrit a l'apartat 8.6.2, i a més de mantenir la concentració de glucosa al voltant del punt de consigna, que s'ha fixat en un valor de 1.0 mM, aquesta solució permet subministrar la glutamina i la resta de nutrients necessaris per al creixement.

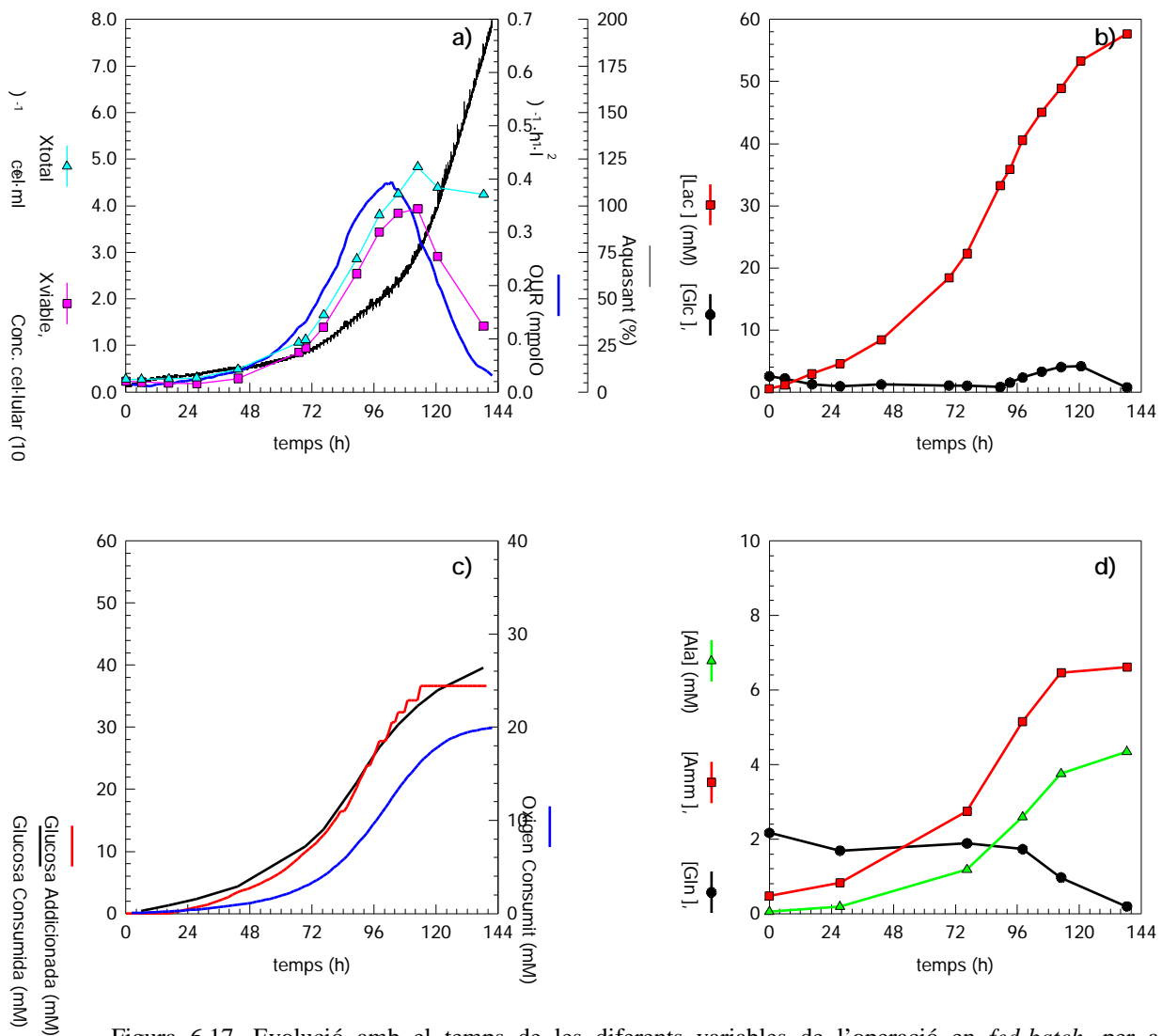


Figura 6.17. Evolució amb el temps de les diferents variables de l'operació en *fed-batch*, per a l'experiment FB01, a) de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i totals (X_{total}), de OUR i del senyal del sensor turbidimètric; b) Concentracions de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]) al bioreactor; c) Glucosa i oxigen consumits i glucosa addicionada; d) Concentracions de glutamina ([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]) al bioreactor.

Passat el moment inicial de la inoculació, les cèl·lules del cultiu han restat en una fase de latència inusual per a aquest tipus de procés. Aquesta fase observable pels diferents paràmetres de la Figura 6.17a, es pot explicar pel fet que les cèl·lules emprades en la inoculació no estiguessin en un bon estat i, per tant, les cèl·lules s'han hagut de recuperar durant un temps de latència de quasi 43 hores (a temps zero la viabilitat ha estat del 86% decreixent fins al 59% a les 43 h). Aleshores, ja que les concentracions inicials de glucosa i glutamina són força baixes, els valors del $Y_{O_2/Glc}$ i la q_{Glc} , necessaris per al sistema de control, s'han adaptat a les noves condicions de no-creixement de la fase latència, prenent valors de 0.20 mmolO₂/mmolGlc i 400 nmolGlc/(10⁶ cèl·lules·h). Operant d'aquesta forma s'ha evitat que s'acumulés inicialment en el bioreactor quantitats excessives de nutrients degut al retard

provocat per l'estat de l'inòcul. Quan el cultiu ha començat a créixer clarament en forma exponencial, els valors s'han retornat als previstos a l'inici de la posta en marxa (interacció de l'usuari), calculats a partir de cultius previs en discontinu ($Y_{O_2/Glc} = 0.37 \text{ mmolO}_2/\text{mmolGlc}$ i $q_{Glc} = 350 \text{ nmolGlc}/(10^6 \text{ cèl·lules}\cdot\text{h})$). La velocitat específica del consum de glucosa s'ha mantingut invariable fins al final del cultiu.

Després d'aquest retard en l'arrancada del cultiu, les cèl·lules han crescut exponencialment fins a assolir un màxim cel·lular de 3.9×10^6 cèl·lules/ml després de 105 hores d'haver iniciat el cultiu (Figura 6.17a), recuperant-se dels baixos valors de viabilitat de l'inici fins a assolir viabilitats superiors al 90% en el punt de màxim cel·lular. El creixement cel·lular s'estabilitza durant unes 8 h més, i seguidament decau la viabilitat constantment fins al final del cultiu (138 h). Com es pot observar a la Figura 6.17b i 6.17d, al llarg de la fase exponencial el cultiu es manté a nivells baixos de concentració de substrats, entre 0.9 i 1.2 mM en el cas de la glucosa i al voltant de 1.7 mM per a la glutamina. Les acumulacions de metabolits al final del cultiu com el lactat, l'amoni i l'alanina han assolit valors de concentració de 57.6 mM, 6.6 mM i 4.3 mM respectivament. A la Figura 6.18 s'observa com no s'ha esgotat cap aminoàcid lentament metabolitzable durant el cultiu cel·lular. És remarcable també que no s'han acumulat quantitats significatives d'aminoàcids al llarg del procés.

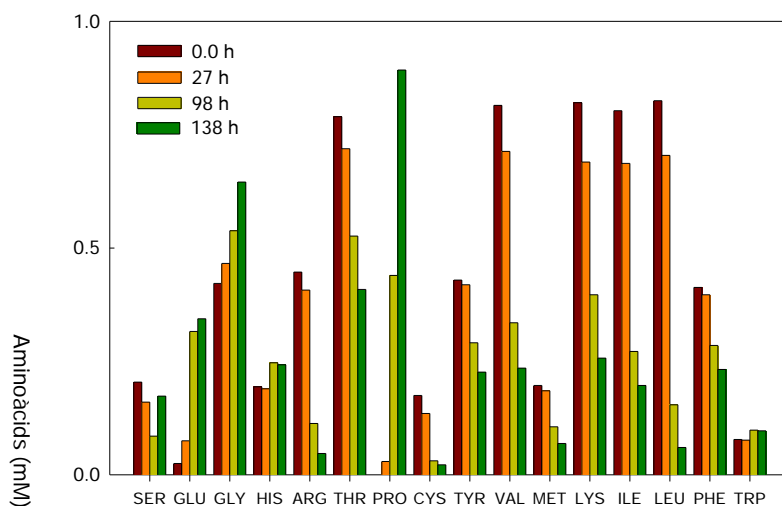


Figura 6.18. Evolució de la concentració dels aminoàcids restants al cultiu en *fed-batch* FB01.

A la Figura 6.17c es pot observar com el consum total d'oxigen al llarg del cultiu assoleix un valor al voltant de 20 mM i el de glucosa de 39.6 mM. El valor de OUR augmenta al llarg del cultiu amb l'evolució del creixement cel·lular, arribant a un nivell màxim de $0.394 \text{ mmolO}_2/(1\cdot\text{h})$ a les 103 de cultiu. Aquest moment de màxim consum d'oxigen coincideix amb el de màxima densitat cel·lular. Un aspecte molt rellevant és que en el perfil de l'evolució de

la OUR s'observa com aquesta variable comença a decreïxer abans que s'observi la disminució de la concentració de les cèl·lules viables. Aquest moment correspon aproximadament a les 89 hores i indica que el cultiu ha entrat en un nou estat fisiològic que el portarà fins a la fase de mort. Una vegada l'activitat del cultiu comença a decreïxer, com s'observa a la Figura 6.17a, s'acumula la glucosa en el bioreactor (Figura 6.17b). A partir d'aquest moment la q_{Glc} no es pot considerar constant. Al llarg de tot el cultiu, el volum total de solució afegida al cultiu arriba als 250 ml, havent-se addicionat un total de 36.7 mM de glucosa (Figura 6.17c) i 9.1 mM de glutamina en el bioreactor. Després de totes les addicions de base per regular el pH (104 ml de NaOH) i de solució de nutrients, i l'extracció de mostres per a l'anàlisi fora de línia, el volum del bioreactor al finalitzar el cultiu ha estat de 2220 ml. Els valors de glucosa consumida i glucosa addicionada estan normalitzats respecte al volum inicial del cultiu (2000 ml).

Com es pot observar a la Figura 6.17a, la qualitat del senyal turbidimètric ha millorat bastant respecte al cultiu de referència, degut al filtratge en línia realitzat amb la nova versió de la funció `CALCULA_BIO` del mòdul de Proces. A més d'aquest filtratge, s'han realitzat en línia les estimacions de densitat cel·lular a partir de la recta de calibratge (corbes a l'Apèndix C) que relaciona concentració de cèl·lules vives amb el senyal, donant així les mesures necessàries per predir les necessitats nutricionals del pròxim interval de temps. Les característiques d'aquest tipus de cultiu cel·lular (dinàmica molt lenta), i per tant del sistema de control de nutrients dissenyat (freqüència d'actuació baixa), fan que no sigui necessària l'obtenció molt contínua de dades del turbidímetre. Per tant, les dades adquirides cada 20 segons es filtren en cada interval de temps d'addició i amb les últimes dades es fa la mitjana per donar un valor fiable i bastant acurat de la concentració de cèl·lules viables. Aquest filtratge funciona de la següent forma: un cop es té el conjunt de dades adquirides pel sensor, es detecta quin és el valor mínim d'aquest conjunt, ja que el soroll sempre es presenta amb l'augment del senyal, i es defineix un rang de validesa pel conjunt de dades. Es realitza una recerca dels valors que compleixen la condició d'estar confinats dins del rang, i amb els últims punts d'aquest subconjunt de valors es calcula una lectura turbidimètrica mitjana. Quant a la resposta de les cèl·lules davant d'aquest sensor, cal tornar a remarcar que el senyal només és vàlid en la zona de creixement exponencial.

El control de nutrients dissenyat ha mantingut satisfactòriament la concentració de glucosa en el nivell consignat i la de glutamina proporcionalment a aquest nivell (figures 6.17b i 6.17d) durant la major part del cultiu. Aquesta configuració de control ha mantingut també a baixes concentracions la resta de nutrients sense produir-se l'acumulació d'aquests, al llarg de les fases de latència i exponencial (Figura 6.18). No obstant, en l'última part de la fase exponencial es comença a acumular la glucosa com es mostra a la Figura 6.17b. La Figura 6.17c corrobora aquest fet: les corbes de la glucosa addicionada i la glucosa realment

consumida no segueixen una tendència paral·lela. Aquesta acumulació coincideix en el temps amb el ja mencionat canvi de comportament cel·lular en l'última part de la fase de creixement.

La concentració final d'anticòs en el brou de cultiu arriba fins a 52.2 µg/ml. Considerant com 138 h el temps d'operació del cultiu, el valor de la P_{vol} és igual a 0.37 µg/(ml·h). Aquesta baixada en la productivitat del cultiu respecte als cultius realitzats en discontinu es pot atribuir directament al perllongament de la fase de latència. De totes formes cal destacar l'increment de concentració de producte final respecte al cultiu de referència (gairebé un 84% més).

6.3.2.2. Cultiu en *fed-batch*, FB02.

Donada la llarga fase de latència observada en l'anterior experiment, es planteja un nou cultiu *fed-batch* (FB02), en el que s'intenta eliminar aquest efecte. Aquest cultiu s'ha iniciat en un medi DMEM amb 2.4 mM de glucosa i 1.9 mM de glutamina i s'ha inoculat amb una concentració de cèl·lules viables igual a la del cultiu FB01, fent especial atenció que les cèl·lules estiguin a la meitat de la fase exponencial i amb alta viabilitat en el moment de la inoculació. A la Figura 6.19 es presenten els perfils d'evolució de les diferents variables en aquest cultiu. L'estratègia d'operació ha estat la mateixa que la del cultiu FB01, i en general els resultats han estat semblants, amb la diferència més notable que ara no s'ha observat la perllongada i anormal fase de latència del cultiu anterior, i que en conseqüència el temps total del cultiu s'ha reduït també de forma considerable. La densitat cel·lular màxima, assolida a les 72 hores de cultiu, correspon a un valor de 4.4×10^6 cèl·lules/ml, una mica per sobre de l'assolit en l'experiment FB01. Aquest increment segurament es deu a les millors condicions d'operació del cultiu: l'acumulació de lactat ha estat de 47.6 mM i s'han afegit un total de 100 ml de NaOH. El consum màxim d'oxigen també ha augmentat, assolint un valor de 0.42 mmolO₂/(l·h). El volum total de solució d'addició ha estat de 228 ml, 32 ml menys que els necessaris per al cultiu FB01. Aquest fet ve donat perquè la durada del cultiu ha estat de només 96 h front les 138 h de l'experiment FB01. Cap nutrient s'ha exhaurit, com es pot observar als diferents gràfics de la Figura 6.19 i la Figura 6.20. La glucosa total consumida s'ha reduït (33.4 mM), a l'igual que la de glutamina (8.9 mM). Els nivells de glucosa al bioreactor s'han mantingut al voltant de 1.2 mM, mentre que el de glutamina ho ha fet a 1.25 mM. Com en el cultiu anterior, al final de la fase exponencial la glucosa del bioreactor s'ha anat acumulant fins a assolir un màxim de 5 mM, coincidint amb la zona on les lectures de la sonda turbidimètrica no són representatives de la concentració de cèl·lules viables. En aquest punt del cultiu el control d'addició s'ha aturat.

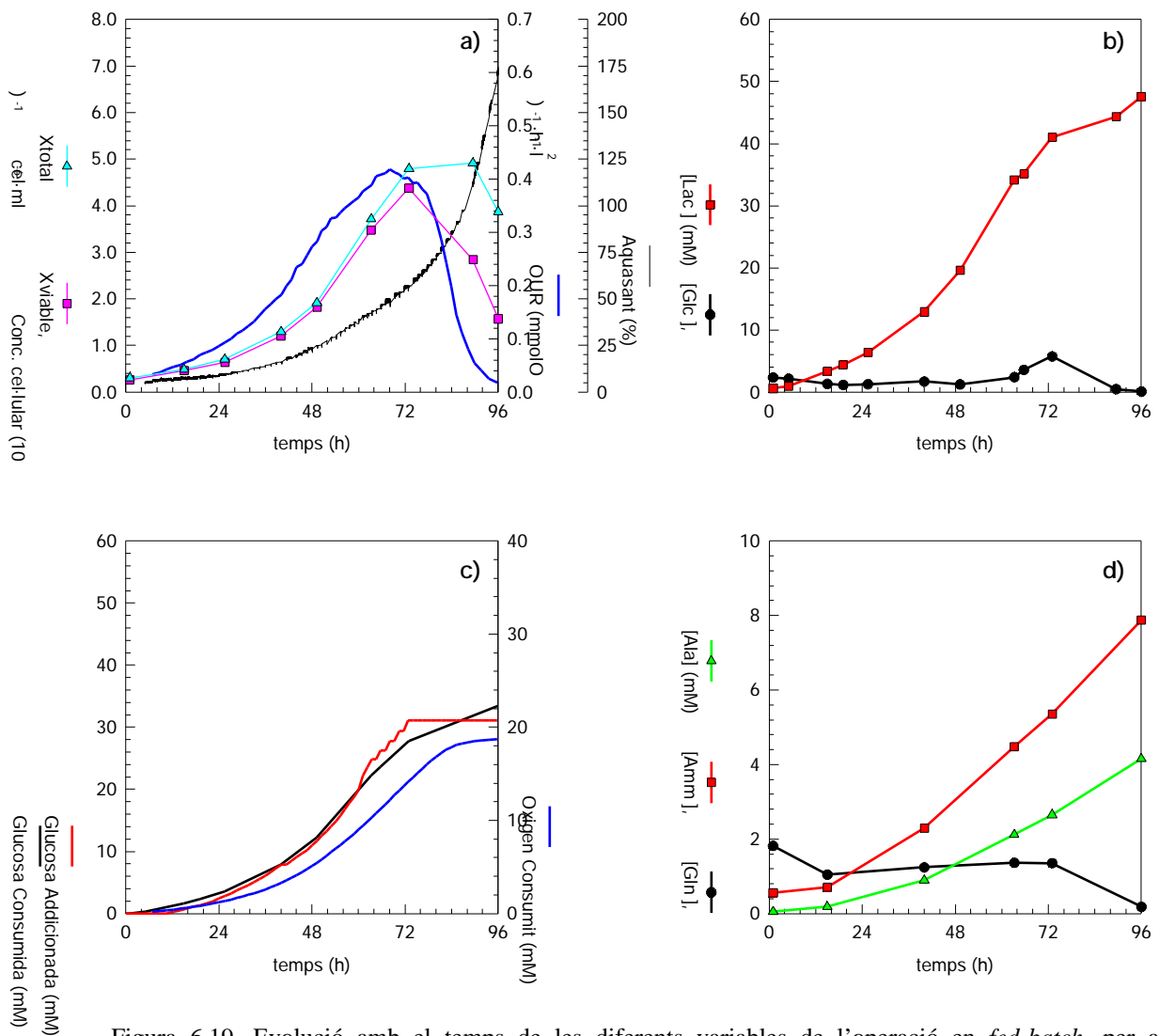


Figura 6.19. Evolució amb el temps de les diferents variables de l'operació en *fed-batch*, per a l'experiment FB02, a) de la concentració de cèl·lules viables (X_{viable}) i totals (X_{total}), de OUR i del senyal del sensor turbidimètric; b) Concentracions de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]) al bioreactor; c) Glucosa i oxigen consumits i glucosa addicionada; d) Concentracions de glutamina ([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]) al bioreactor.

S'ha de remarcar també la productivitat volumètrica assolida en aquest cultiu, $0.51 \mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$. Com es podia pensar la P_{vol} s'ha incrementat respecte al cultiu FB01, en un alt percentatge, el 38%. Però com també calia esperar la concentració final de producte en el brou no ha sofert cap increment significatiu, i és de $48.6 \mu\text{g}/\text{ml}$. Aquest cultiu posa de manifest la rellevància que té la selecció d'un bon inòcul per iniciar el creixement cel·lular. Per aquest motiu també s'evidencia la necessitat de disposar d'eines d'instrumentació i control per saber en quin estat es troba el cultiu i, segons això, realitzar les accions pertinents. En aquest tipus de cultius cel·lulars no es poden aplicar estratègies d'addició de nutrients més senzilles, per exemple aquelles que no utilitzen cap tipus de llaç de control ni mesura de cap paràmetre, i es basen en l'addició de l'aliment a una velocitat constant o de forma pseudoexponencial

(d'acord amb l'augment de densitat cel·lular, o programada d'acord amb l'experiència prèvia).

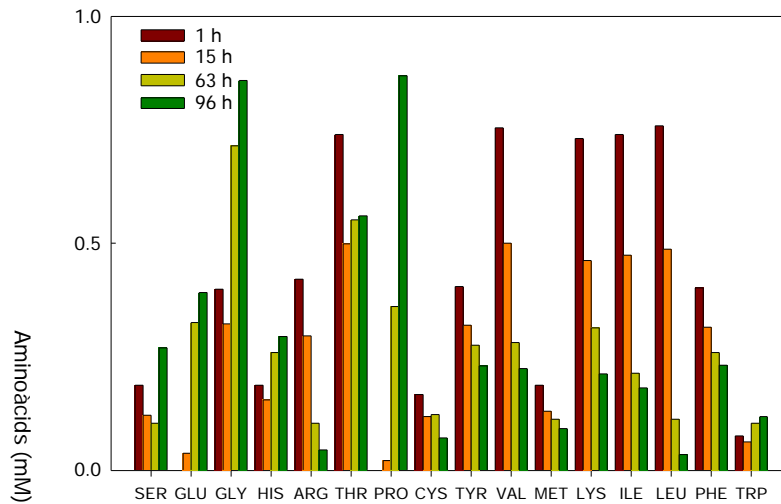


Figura 6.20. Evolució de la concentració dels aminoàcids restants al cultiu *fed-batch* FB02.

6.3.2.3. Cultiu en *fed-batch*, FB03.

En els cultius anteriors s'ha observat com l'estratègia de control proposada es començava a desajustar a partir del final de la fase de creixement exponencial, i el començament de la davallada de la concentració cel·lular. En aquest moment es produeixen simultàniament dos fets, d'una banda al començar a haver-hi cèl·lules mortes al cultiu, la lectura de la sonda turbidimètrica deixa de ser fiable, i d'altra banda, al llarg del cultiu es produeixen canvis fisiològics que fan que el valor del $Y_{O_2/Glc}$ no sigui constant i, per tant, l'estimació de la glucosa a afegir a partir del consum d'oxigen serà errònia si no s'actualitza el valor de forma periòdica. Tenint en compte tots aquests fets es proposa un nou experiment amb una estratègia d'operació diferent.

Com es pot observar a la Figura 6.21, l'estructura del control és manté bàsicament igual a la proposada anteriorment, però es canvia el llaç de control de la predicció de glucosa en el bioreactor, i l'usuari ha d'alimentar el sistema de control un o dos cops al dia amb mesures fora de línia. Aleshores, el model de predicció ja no es basa en la projecció dels ICV, sinó que es basa en la projecció en el temps del consum d'oxigen acumulat per a l'interval (OC_{i+1}), i la relació entre aquest i el rendiment oxigen/glucosa, que varia al llarg del cultiu. En definitiva, la informació que flueix cap a l'estimació i el model de predicció de la concentració de glucosa és la mateixa, les mesures en línia de la OUR. Per tant, la forma que pren el model predicció del consum de glucosa ($Glc_{pred,i}$) en un temps actual t_i és:

$$Glc_{pred,i} = \frac{OC_{i+1}}{Y_{O_2/Glc,j}} = \frac{(OUR_{i+1} + OUR_i)(t_{i+1} - t_i)}{2Y_{O_2/Glc,j}} \quad (\text{Eq. 6.16})$$

on $Y_{O_2/Glc,j}$ és l'últim rendiment d'oxigen/glucosa variable calculat fora de línia en el temps t_j , en $\text{mmolO}_2/\text{mmol/Glc}$, OUR_{i+1} i OUR_i són les velocitats de consum d'oxigen en el temps projectat (t_{i+1}) i el temps actual (t_i) respectivament, en unitats de $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ per a la OUR i d'hores per al temps.

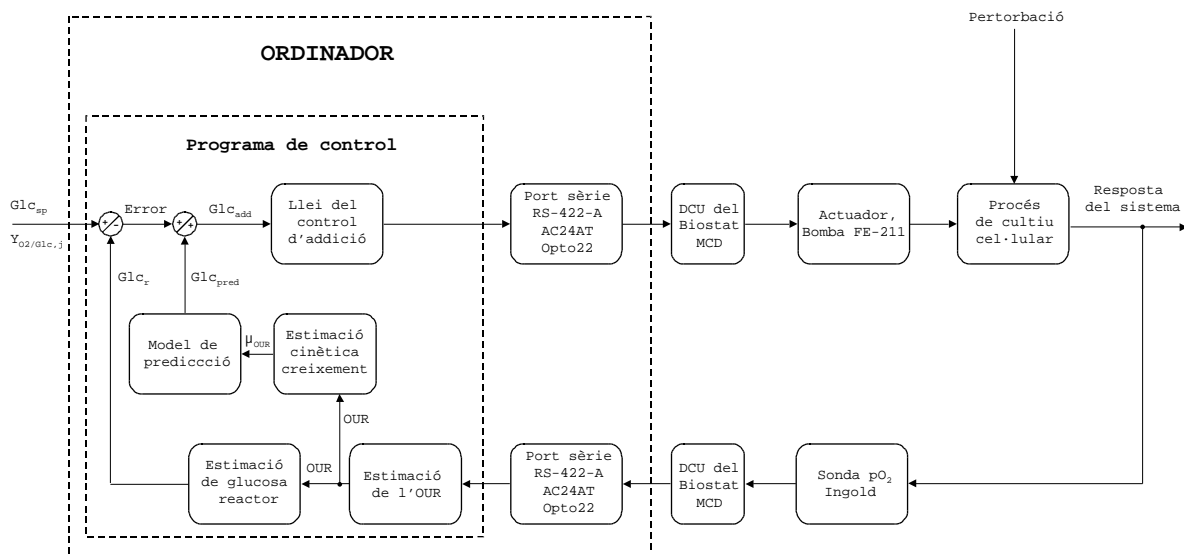


Figura 6.21. Esquema de la configuració del segon sistema de control utilitzat per mantenir la glucosa a un nivell baix de concentració al cultiu en *fed-batch* FB03.

Pel que fa a l'estimació de la velocitat de creixement, es proposa una metodologia basada directament en dades de OUR i, per tant, evitant els desajustos de la mesura turbidimètrica a partir del final de la fase exponencial. Substituint l'equació 6.10 en la 6.5, ambdues descrites a l'apartat 6.2.4 d'aquest capítol, es pot obtenir una expressió per a la OUR que descriu, d'una forma similar que per a la concentració de cèl·lules viables, el comportament cinètic del consum d'oxigen amb el temps, mitjançant la següent expressió:

$$OUR_i = OUR_0 \exp(\mu_{OUR} t_i) \quad (\text{Eq. 6.17})$$

on OUR_0 és la velocitat inicial del consum d'oxigen en $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$ i μ_{OUR} és la velocitat específica del creixement estimada a partir de dades del consum d'oxigen i en unitats de h^{-1} . Si se substitueix l'equació 6.17 per a una OUR projectada en el temps, en l'expressió 6.16, agrupant termes s'obté una expressió molt similar a la descrita a l'anterior model de predicció:

$$Glc_{pred,i} = \frac{OUR_i \left[1 + \exp(\mu_{OUR,i} \Delta t_{i+1}) \right] \Delta t_{i+1}}{2Y_{O_2/Glc,j}} \quad (\text{Eq. 6.18})$$

on l'interval de temps Δt_{i+1} es defineix com $\Delta t_{i+1} = t_{i+1} - t_i$ i s'expressa en unitats d'hores (h), OUR_i en $\text{mmolO}_2/(\text{l}\cdot\text{h})$, $\mu_{OUR,i}$ en h^{-1} i $Glc_{pred,i}$ en mM. A l'igual que l'equació 6.12, l'equació 6.17 necessita disposar de la velocitat específica de creixement pel temps actual, però la calculada a partir de dades de la demanda d'oxigen ($\mu_{OUR,i}$), que es determina a partir del pendent de la recta lineal que relaciona el logaritme neperià de tres punts de velocitat del consum d'oxigen amb el temps, l'actual (OUR_i) i els dos anteriors a la present mesura (OUR_{i-1} i OUR_{i-2}). Una vegada es prediu el consum de glucosa ($Glc_{pred,i}$) per al pròxim interval de temps, el procediment que se segueix és el mateix al descrit en l'anterior configuració de control.

Per al càlcul de $Y_{O_2/Glc,j}$ s'han de considerar les mesures del consum d'oxigen acumulat entre els temps de dues mesures fora de línia de glucosa i el balanç de la glucosa consumida acumulada també entre aquests dos temps (ΔGC_j), el temps actual de la mesura de glucosa fora de línia (t_j) i el temps de la penúltima mesura realitzada (t_{j-1}). Per tant, l'expressió pren la forma:

$$Y_{O_2/Glc,j} = \frac{\int_{t_{j-1}}^{t_j} OUR dt}{\Delta GC_j} \quad (\text{Eq. 6.19})$$

on $\Delta GC_j = GC_j - GC_{j-1}$, essent GC_{j-1} i GC_j les concentracions de glucosa consumida acumulada calculades a partir de mesures fora de línia pel temps actual (t_j) i pel temps de l'anterior mostra (t_{j-1}), en unitats de mM. El seu increment es calcula d'acord amb la següent expressió:

$$\Delta GC_j = \int_{j-1}^j Glc_{add,i} - Glc_{off,j} + Glc_{off,j-1} \quad (\text{Eq. 6.20})$$

on $\int_{j-1}^j Glc_{add,i}$ és el total de glucosa adicionada entre l'interval de temps de mesures de glucosa fora de línia, en mM, essent $Glc_{off,j}$ i $Glc_{off,j-1}$ les concentracions de glucosa en el reactor, en unitats de mM, mesurades fora de línia en el temps actual i l'anterior respectivament. El valor inicial que pren $Y_{O_2/Glc,0}$ és de $0.25 \text{ mmolO}_2/\text{mmolGlc}$.

Aquesta segona proposta de sistema de control segueix els mateixos passos de transformació a codi de programació que el primer sistema de control, essent l'arxiu de

protocol molt similar (el llistat d'ordres que conté es mostra a l'Apèndix B). Per tant, segueix vigent l'estructura del diagrama de flux que s'ha presentat a la Figura 6.16 pel primer sistema de control.

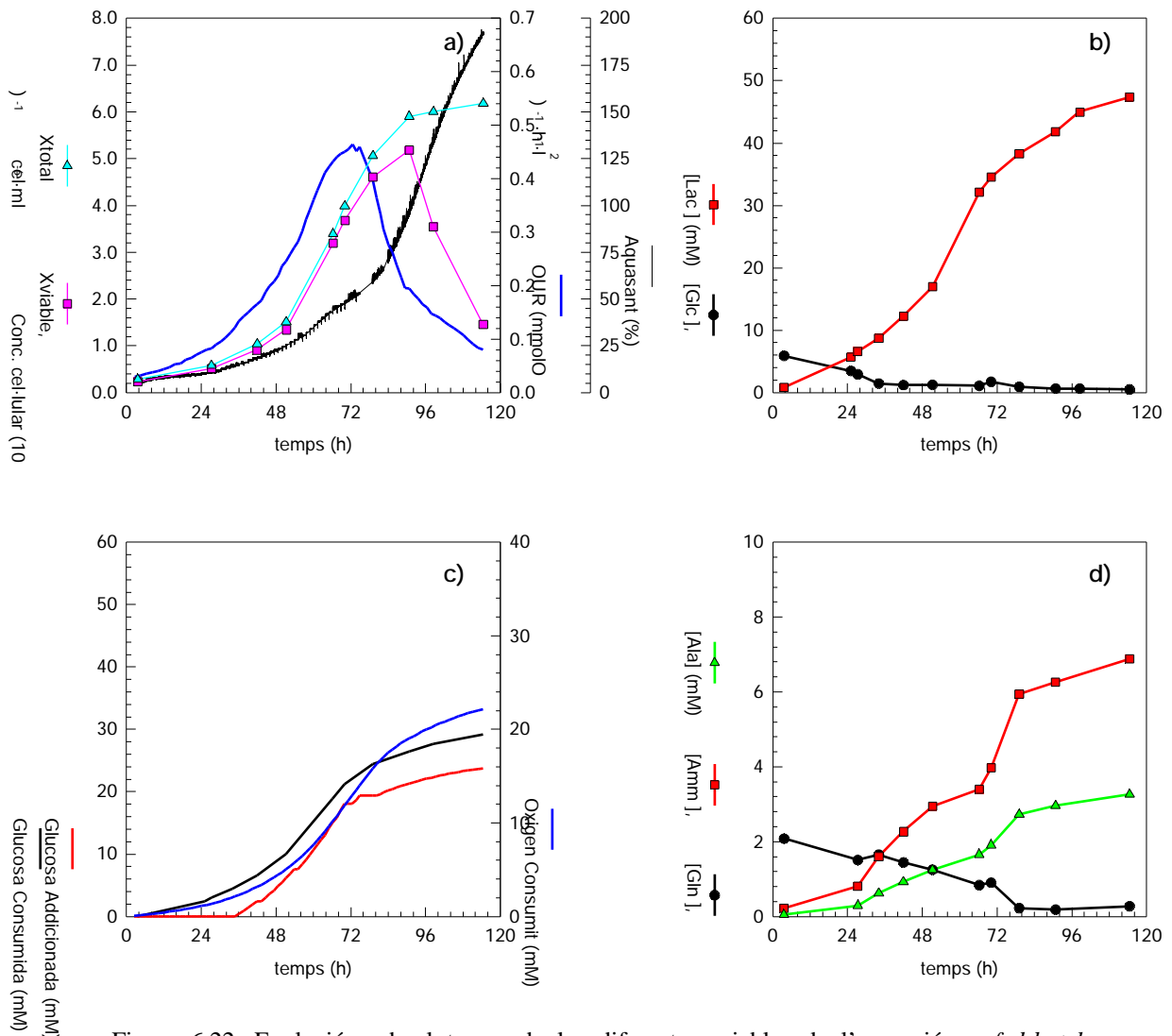


Figura 6.22. Evolució amb el temps de les diferents variables de l'operació en *fed-batch*, per a l'experiment FB03, a) de la concentració de cèl·lules viables (Xviable) i totals (Xtotal), de OUR i del senyal del sensor turbidimètric; b) Concentracions de glucosa ([Glc]) i lactat ([Lac]) al bioreactor; c) Glucosa i oxigen consumits i glucosa addicionada; d) Concentracions de glutamina ([Gln]), amoni ([Amm]) i alanina ([Ala]) al bioreactor.

Per comprovar l'eficàcia d'aquesta segona configuració de control s'ha preparat un cultiu en *fed-batch* (la configuració del sistema de cultiu i procediment operacional estan descrits amb detall al capítol de *Materials i Mètodes*), anomenat FB03 (Figura 6.22), en un medi inicial DMEM amb unes concentracions inicials de 6.0 mM de glucosa i de 2.2 mM de glutamina. La concentració de glucosa s'ha augmentat per evitar un inici prematur d'actuació del sistema de control per una possible fase de latència més llarga del normal (com va succeir

al cultiu FB01). De totes formes, com es veurà, aquesta mesura de seguretat no hauria calgut ja que la qualitat de l'inòcul de cultiu va ser bona. El sistema de control comença a actuar a les 36 hores després d'haver inoculat el cultiu (inòcul de 0.23×10^6 cèl·lules/ml). El creixement es perllonga fins a les 91 hores assolint un màxim de cèl·lules viables de 5.2×10^6 cèl·lules/ml (Figura 6.22a), però en aquest punt la viabilitat del cultiu ja ha començat a disminuir significativament (inferior al 80%). Com es pot observar a la Figura 6.22b i 6.22d, al llarg de la fase exponencial el cultiu es manté a nivells baixos de concentració de substrats, entre 0.9 i 1.2 mM de glucosa i entre 1.4 mM i 0.9 mM de glutamina. Les acumulacions dels metabolits al final del cultiu com el lactat, l'amoni i l'alanina han assolit valors de 47.4 mM, 6.9 mM i 3.3 mM respectivament. A la Figura 6.22c es pot observar com el consum total de glucosa al llarg del cultiu assoleix un valor de 29.2 mM. Una vegada la velocitat del consum d'oxigen comença a decaure en aquest cultiu, com s'observa a la Figura 6.22a, la glucosa no s'acumula al bioreactor (Figura 6.22b). A la Figura 6.23 s'observa com no s'ha esgotat cap altre aminoàcid durant el cultiu. Al llarg del procés s'han acumulat quantitats no gaire significatives de prolina (1 mM) i de glicina (0.8 mM). El volum final del bioreactor després de totes les addicions de nutrients i de NaOH, i les extraccions de mostra és de 2190 ml. La quantitat de volum de solució d'addició afegida al cultiu arriba només als 162 ml. D'igual forma, el volum total de NaOH necessari per regular el pH ha estat de 31 ml.

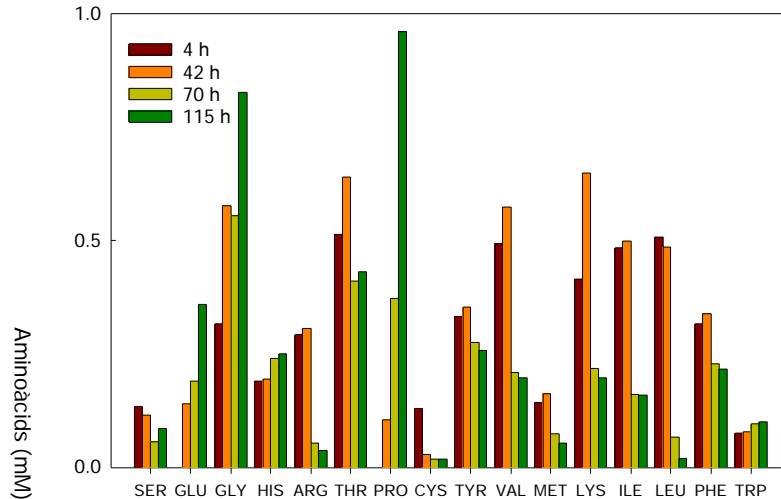


Figura 6.23. Evolució de la concentració dels aminoàcids restants al cultiu en *fed-batch* FB03.

Durant el cultiu, la glucosa ha estat mesurada fora de línia després de cada presa de mostra manual. Amb els valors mesurats s'ha ajustat la relació estequiomètrica entre l'oxigen i la glucosa ($Y_{O_2/Glc,j}$) d'acord amb l'equació 6.19 per evitar la desviació significativa del punt de consigna de glucosa del sistema de control. Els valors calculats han anat des de 0.25 $\text{mmolO}_2/\text{mmolGlc}$ a l'inici del cultiu fins als 1.2 $\text{mmolO}_2/\text{mmolGlc}$ en la part final d'aquest, essent 0.47 i 0.54 $\text{mmolO}_2/\text{mmolGlc}$ els valors utilitzats en la fase exponencial. A la Figura

6.22b es pot observar com la glucosa en el bioreactor no s'ha acumulat al llarg del cultiu, mantenint-se entre valors de 0.9-1.2 mM en la fase de creixement exponencial i valors de 0.6-0.8 mM en la fase de mort cel·lular del cultiu. Els perfils de glucosa adicionada acumulada i d'oxigen consumit acumulat es mostren a la Figura 6.22c. S'han consumit un total de 22 mM d'oxigen i s'han afegit durant el cultiu un total de 23.6 mM de glucosa. Les dues corbes de perfil de temps no són paral·leles, reflectint l'ajust de $Y_{O_2/Glc,j}$ amb el temps. En canvi, es pot observar com l'evolució de la glucosa consumida si és paral·lela al perfil de la glucosa adicionada. Aquest bon comportament dels perfils indica que, durant les diferents fases del cultiu, el sistema de control proposat permet ajustar-se més bé al consum real de glucosa que l'utilitzat en els cultius anteriors.

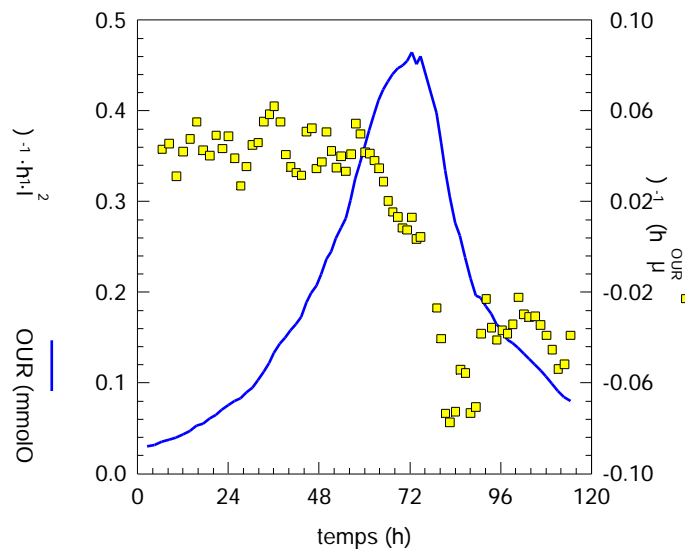


Figura 6.24. Evolució amb el temps de la velocitat de consum d'oxigen (OUR) i de la velocitat específica de creixement a partir dels valors de OUR, μ_{OUR} , en el *fed-batch* FB03.

A la Figura 6.24 es mostren els perfils de la OUR i de la velocitat específica de creixement, $\mu_{OUR,i}$, calculada en línia a partir de les dades de la demanda d'oxigen per a qualsevol temps t . Durant la fase de creixement exponencial s'obté un valor mig de $\mu_{OUR,i}$ igual a $0.0436 \pm 0.0084 \text{ h}^{-1}$. Si aquest valor es calcula a partir de conjunt total de punts de OUR, s'obté un valor per a la μ_{OUR} global de 0.0438 h^{-1} . Ambdós valors es corresponen perfectament al valor calculat a partir de les dades de concentració cel·lular. Es pot observar com a les 62 hores d'haver-se iniciat el cultiu els valors de la velocitat específica de creixement cauen cap a valors de signe negatiu. Entre les 73 i 75 hores s'han assolit els màxims consums d'oxigen que se situen al voltant de $0.46 \text{ mmolO}_2/(l \cdot h)$. Aquests dos paràmetres indiquen que el creixement exponencial s'ha aturat, tot i que la inèrcia del cultiu fa que s'observi creixement fins a les 91 hores.

Quant al producte, s'ha obtingut una concentració de 60.1 $\mu\text{g/ml}$ al final del cultiu (115 h), el doble del cultiu de referència. Tot i que la concentració cel·lular s'ha incrementat en més de 2.6 vegades, no s'ha reflectit en la concentració final amb la mateixa proporció. La productivitat volumètrica assolida és de 0.52 $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$, molt similar a l'aconseguida en el cultiu FB02. Respecte el cultiu de referència, la P_{vol} s'ha incrementat en un 30%.

Finalment, es pot fer un estudi dels canvis que s'han observat pel que fa al comportament metabòlic de les cèl·lules quan es cultiven en *fed-batch*. S'analitza a continuació el cultiu FB03, donat que el comportament dels altres experiments en *fed-batch* és similar, comparant-lo amb el cultiu de referència (apartat 6.2.2). A la Taula 6.4 es dona un recull de les dades obtingudes per ambdós cultius, així com els valors de les relacions estequiomètriques i les velocitats específiques de consum i de producció calculades.

Paràmetres	Unitats	Discontinu Referència	<i>Fed-batch</i> FB03
$\text{Glc}_{\text{inicial}}$	mM	23.8	6.0
$\text{Gln}_{\text{inicial}}$	mM	3.2	2.2
X_{max}	10^6 cel/ml	2.0	5.2
$\text{ICV}_{\text{total}}$	10^6 cel-h/ml	86	245
$[\text{Mab}]_{\text{final}}$	$\mu\text{g/ml}$	28.4	60.1
Durada	h	72	115
P_{vol}	$\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$	0.40	0.52
$Y_{\text{Lac/Glc}}$	mmol/mmol	1.91	1.50
$Y_{\text{O}_2/\text{Glc}}$	mmol/mmol	0.37	0.51
$Y_{\text{Gln/Glc}}$	mmol/mmol	0.23	0.28
$Y_{\text{Amm/Gln}}$	mmol/mmol	0.79	0.61
$Y_{\text{Ala/Gln}}$	mmol/mmol	0.38	0.32
μ_{max}	h^{-1}	0.0440	0.0438
q_{Glc}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	-357	-285
q_{Gln}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	-96	-81
q_{O_2}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	-120	-159
q_{Lac}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	683	460
q_{Amm}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	60	43
q_{Ala}	$\text{nmol}/(10^6 \text{ cel}\cdot\text{h})$	37	26

Taula 6.4. Principals paràmetres i concentracions per als cultius discontinu de referència, i *fed-batch* FB03. Els valors dels diferents paràmetres s'han calculat per a la fase exponencial.

Treballant en el *fed-batch* a baixos nivells de concentració, tant de glucosa com de glutamina, s'observa una disminució de les velocitats de la glucòlisi i la glutaminòlisi. És a dir, les velocitats específiques del consum de glucosa i de glutamina s'han reduït en un 21% i un 15% respectivament. Per tant, aquesta reducció significativa ha de representar una disminució en la formació dels metabolits cel·lulars com el lactat, l'amoni i l'alanina. I, efectivament, això és el que ha succeït, ja que s'han reduït les velocitats de producció dels tres

metabolits, en un 33% per a la q_{Lac} , 28% per a la q_{Amm} , i 30% per a la q_{Ala} . Si es redueixen les velocitats també s'han de reduir els rendiments, essent els més rellevants els que relacionen els substrats amb el seu o seus subproductes: s'ha passat d'una proporció lactat/glucosa de 1.91 mmolLac/mmolGlc a 1.50 mmolLac/mmolGlc i s'han obtingut uns rendiments amoni/glutamina i alanina/glutamina de 0.61 mmolAmm/mmolGln i de 0.32 mmolAla/mmolGln respectivament, també més baixos que al cultiu de referència, com es pot observar a la Taula 6.4.

Quan hi ha suficient glucosa en el medi de cultiu no s'observen canvis en la relació entre la glutamina i la glucosa ($Y_{\text{Gln/Glc}}$) (a l'apartat 6.2.4 aquest valor es mostra constant entre diferents cultius en discontinu). Quan el cultiu està limitat, pel baix nivell de concentració de glucosa, com és el cas de FB03 (que està limitat primordialment per glucosa més que per glutamina), al disminuir la q_{Glc} es produeix un augment en el rendiment $Y_{\text{Gln/Glc}}$ (increment del 22%). Aquest fet pot indicar que en estats on governa la limitació per glucosa sobre la de glutamina, les cèl·lules requereixen més energia per part de la glutamina. D'altra banda, la totalitat del consum d'oxigen que es produeix en cultius en discontinu sense limitació de glucosa s'utilitza per oxidar la glucosa. Per tant, en el cultiu FB03 hi ha d'haver un increment d'obtenció d'energia en la ruta de la glutaminòlisi (ATP via cicle de Krebs), i aquest augment ha de resultar en un increment de la q_{O_2} . Aquest major consum d'oxigen per part de les cèl·lules es reflecteix tant en les 159 unitats del valor de la velocitat específica del consum d'oxigen, incrementada un 32%, com en el rendiment oxigen/glucosa que s'ha incrementat en un 38%. Tot això tenint en compte que la velocitat específica de creixement màxima s'ha mantingut constant i igual a la del cultiu en discontinu ($\mu_{\text{max}} = 0.044 \text{ h}^{-1}$). Aleshores, es pot assumir que el subministrament controlat, sobretot de la glucosa, dóna com a resultat una més alta relació d'oxidació tant per la glucosa com per la glutamina.

Aquesta reducció en la formació de subproductes, ha portat en primer lloc, a un millor rendiment del cultiu i del metabolisme cel·lular, assolint densitats cel·lulars més altes i una major longevitat del cultiu que més tardanament han mostrat grans quantitats de subproductes. En segon lloc, la formació més lenta del lactat ha possibilitat la millora de l'entorn per al creixement cel·lular, ja que s'ha requerit menys volum d'àlcali per al control del pH, fent així el medi de cultiu menys carregat en sals. No obstant, tot i la reducció de l'amoni i el lactat, les concentracions d'ambdós encara són altes.

En el cultiu en *fed-batch*, el subministrament controlat que s'ha fet de la glucosa permet que se'n faci una utilització més eficient, i que no es produeixi a un nivell tan elevat la desregulació metabòlica observada en el cas del cultiu en discontinu. Això ha estat possible gràcies a mantenir sempre la glucosa a un nivell baix al llarg del cultiu *fed-batch*, i de fet corrobora l'anàlisi que s'havia fet en base als experiments en discontinu, i demostra també

que l'estratègia *fed-batch* proposada ha permès obtenir bons resultats des del punt de vista de l'obtenció d'un comportament metabòlic balancejat. Tot i aquestes millores, els cultius en *fed-batch* encara mantenen un comportament semblant al discontinu, pel que fa a l'acabament del cultiu, amb una molt ràpida transició des del final de la fase exponencial al començament de la fase de mort.

Donat que en els experiments en *fed-batch* hi ha hagut un subministrament de nutrients, que difícilment pot justificar que s'hagin exhaurit del medi de cultiu, es planteja la possibilitat que la mort cel·lular s'hagi produït per l'acumulació d'algun producte tòxic o inhibitori del creixement, fet que s'estudia en el següent apartat.

6.3.3. Estudi de la toxicitat del brou final dels cultius en discontinu i en *fed-batch*.

Una forma per comprovar l'acumulació de compostos tòxics o de substàncies inhibidores al medi de cultiu consisteix en la dilució del medi del final del cultiu (medi exhaurit) amb PBS (*Phosphate Buffered Saline*) i la utilització d'aquest medi diluït per iniciar un nou cultiu. D'aquesta forma, si la causa que determina la mort cel·lular és una limitació per algun nutrient essencial, quan el medi es dilueixi les cèl·lules moriran més ràpidament ja que s'estarà disminuint la concentració de tal nutrient. Si pel contrari la causa de la mort cel·lular és la presència d'algun producte tòxic, quan es dilueixi el medi, les cèl·lules creixeran millor. El procediment experimental seguit es descriu a continuació.

Quan s'ha observat que la viabilitat ha començat a disminuir tant en els cultius en *fed-batch* com en el cultiu fortificat en discontinu, s'han agafat alíquotes del medi, s'han centrifugat i eliminat les cèl·lules. L'anàlisi d'aquests medis de cultiu mostra que ni la glucosa, la glutamina ni cap aminoàcid es troben en concentracions limitants. S'ha afegit sèrum al 2% (v/v) per assegurar que aquest component no sigui limitant. A partir d'aquest medi se'n preparen dos: un és un medi diluït al 50 % amb PBS, i l'altre és un medi al que se li afegeix una solució concentrada de nutrients. Com a medis control, s'utilitza un medi DMEM estàndard, i el medi exhaurit al final de l'experiment, sense cap tractament, és a dir, sense diluir ni fortificar. Per tant, l'experiment es fa amb quatre medis diferents, que s'anomenen de la següent manera:

- CC: cultiu control realitzat amb medi DMEM estàndard.
- CME: cultiu realitzat amb medi exhaurit.
- CMES: cultiu realitzat amb medi exhaurit amb suplement nutricional.
- CMED: cultiu realitzat amb medi exhaurit diluït amb PBS.

Aquests medis se sembren amb un inòcul de cèl·lules creixent a la meitat de la fase exponencial, com es fa habitualment, i se segueix el creixement de les cèl·lules a les condicions de cultiu

habituals. Els resultats es presenten a la Figura 6.25a, pels experiments realitzats a partir del medi exhaurit de l'experiment en discontinu amb medi fortificat, i a la Figura 6.25b pels experiments fets a partir del medi exhaurit de l'experiment en *fed-batch*.

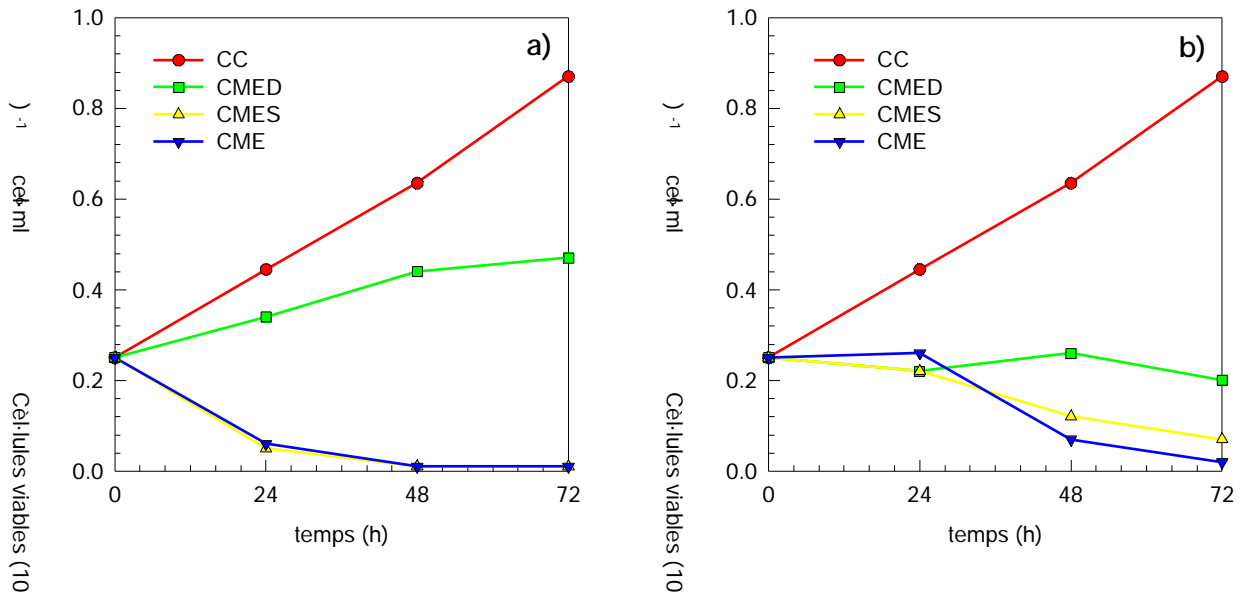


Figura 6.25. Efecte sobre el creixement cel·lular dels brous del medi final del cultiu a) en discontinu fortificat, b) en *fed-batch*.

Observant els resultats obtinguts de la Figura 6.25a i 6.25b, quan l'hibridoma KB-26.5 s'inocula en un medi fresc DMEM, creix fins a assolir concentracions cel·lulars de l'ordre de 0.9×10^6 cèl·lules/ml (CC). No obstant, quan s'inocula en medi exhaurit les cèl·lules semblen estar sotmeses a un efecte inhibitori, tant pel CME del *fed-batch* (Figura 6.25b) com pel CME del discontinu fortificat (Figura 6.25a). Igual comportament mostren els CMES davant el creixement cel·lular per ambdós brous. En canvi en el CMED per al discontinu fortificat s'observa com hi ha un lleuger però constant increment de densitat cel·lular. Per al CMED del *fed-batch* no s'obté realment un creixement, però si s'ha mantingut al voltant del valor de l'inòcul.

Aquests resultats corroboren doncs, la hipòtesi que el creixement de les cèl·lules porti associada la producció d'algun producte tòxic o inhibitor del creixement, que en sistemes en discontinu o *fed-batch* es va acumulant al medi de cultiu fins que l'acaba afectant. Això fa particularment atractiva l'estratègia d'operació en perfusió, donat que en aquest cas es va eliminant contínuament medi del reactor, i per tant s'hauria d'evitar l'acumulació d'aquest component. Per altra banda, en l'operació en perfusió es retenen les cèl·lules, de forma que la combinació d'un millor creixement amb la retenció cel·lular hauria de permetre arribar a més elevades concentracions. L'operació en continu amb perfusió s'estudia en el següent apartat.