

PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD

**TÍTULO: BIOREACTOR CON MEDIDOR EXTERNO DE
 DENSIDAD ÓPTICA.**

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un equipo bioreactor con medidor externo de densidad óptica y desmontable sin la necesidad de apertura del bioreactor.

El campo tecnológico de la invención se relaciona con cultivo de microorganismos en bioreactores. El cultivo de microorganismos en bioreactores es un proceso común que permite establecer velocidades de crecimiento microbianas como respuesta a diferentes condiciones de alimentación y temperatura, entre otras. En particular, los estudios de crecimiento se realizan mediante la toma de muestras y posterior lectura de densidad óptica. Para ello se hace necesario el uso de equipos tales como espectrofotómetros o colorímetros.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los bioreactores son útiles tanto para la producción de biomasa como de biomoléculas de interés. En el cultivo de microorganismos y cultivos celulares, en particular de células animales, vegetales y humanas, se utilizan diversos tipos de bioreactores. Un ejemplo de estos es el bioreactor de elevación por aire.

En el bioreactor de elevación por aire, se introduce gas como, por ejemplo, aire, en un compartimento dirigido hacia la cima del bioreactor, en la especialidad también conocida como elevador. Preferiblemente, la introducción de gas tiene lugar como burbujas finas. El elevador está conectado en su extremo superior e inferior al extremo superior e inferior de un compartimento adicional dirigido hacia el fondo del bioreactor, conocida en la especialidad como descendente.

Una amplia variante del bioreactor de elevación por aire, generalmente cilíndrico, contiene un tubo guía dispuesto centralmente que divide el bioreactor de elevación por aire en una parte ascendente (tubo ascendente) dentro del tubo guía y una parte descendente (bajante) en el espacio anular entre el tubo guía y la pared exterior del vaso del bioreactor de elevación por aire. La parte ascendente puede situarse igualmente en el espacio anular entre el tubo guía y la pared exterior del vaso y la parte descendente dentro del tubo guía. La alimentación de, por ejemplo, gas enriquecido con oxígeno en el extremo inferior del tubo ascendente disminuye la densidad media del cultivo en suspensión en el tubo ascendente, lo que conduce a un flujo de líquido dirigido hacia arriba en el tubo ascendente, que en consecuencia reemplaza el contenido líquido del descendente, que a su vez fluye hacia el extremo inferior del elevador. De esta manera, se genera una circulación líquida que mezcla el cultivo en suspensión lo suficiente y mantiene las células en suspensión, es decir, en suspensión libre. En el caso de células que requieren oxígeno, el oxígeno gaseoso se disuelve, por ejemplo, en el medio nutriente y se usa en la respiración para formar dióxido de carbono por las células presentes en el cultivo en suspensión. La ventaja de este bioreactor "agitado" es que con el suministro suficiente de oxígeno al medio nutriente y la eliminación suficiente del dióxido de carbono formado en la respiración, no son necesarias piezas móviles como un agitador mecánico.

De esta manera, los reactores cerrados usados en los procesos de producción de microorganismos ofrecen un mayor control de las condiciones de cultivo y reducen significativamente las posibles contaminaciones.

El estado de la técnica revela que los estudios de crecimiento se realizan mediante la toma de muestras para lo que se hace necesario abrir el bioreactor para la toma de muestra, su traslado a un lugar donde se dispone el espectrofotómetro o colorímetro y posteriormente la debida lectura de densidad óptica. Durante ese trayecto, las posibilidades de interferir con el adecuado crecimiento de los microorganismos son sustanciales. Efectivamente, el cultivo puede contaminarse a la toma o durante el proceso de medida que resulta por su exposición al ambiente por breves periodos entre cada muestreo y el tiempo que dura la apertura del bioreactor para tomar la muestra, traslado y evaluación.

En adición a lo anterior, la técnica del estado del arte revela que la toma de muestras se debe hacer de manera periódica y frecuente, requiriendo la dedicación de un operario calificado tanto en la toma de muestras como en su posterior lectura en un equipo especializado de densidad óptica.

El arte anterior revela por ejemplo, J.M. Sandnes et al. [Journal of Biotechnology. 2006, V122 (I2), Páginas 209-215] donde su desarrollo de “Monitoreo en Tiempo Real y Control Automático de Densidad de Cultivos de Microalgas a Gran Escala Utilizando Sensores de Densidad Óptica de Infrarrojo Cercano (NIR)”, se centró en los sensores de transmisión de luz del infrarrojo cercano (NIR) y define que se usaron tanto para el monitoreo en tiempo real de la densidad de la biomasa de algas en cultivos en masa en crecimiento, como también para retroalimentación en un sistema que controla la densidad del cultivo mediante inyección automática. Este artículo define que cuando se operó en un modo de producción semicontinua entre valores de densidad predefinidos, se registraron en línea los patrones de crecimiento diurno que proporcionaron información sobre la dinámica de los cultivos de microalgas con respecto a las condiciones ambientales. El sistema de bioreactor definido allí, también fue programado para operar en modo de densidad de biomasa constante, manteniendo así el cultivo en la densidad de población óptima (OPD) y manteniendo altos niveles de producción de biomasa. El sistema de esta

anterioridad tiene potencial para operar un punto de ajuste de densidad dinámica para cultivos de microalgas donde la densidad de población óptima varía en función de las condiciones ambientales de crecimiento. No obstante, esta anterioridad no revela un medidor externo de densidad óptica y desmontable sin la necesidad de apertura del bioreactor

Igualmente, el arte anterior revela sistemas de evaluación por medios ópticos tales como el revelado en la Solicitud de Patente PCT/WO2017004236 de Kacira Murat et al., donde se define un sistema de sensor óptico basado en un diodo láser de longitud de onda múltiple capaz de monitorear la dinámica y los cambios fisiológicos de un cultivo de microorganismos en tiempo real. Esta anterioridad revela que el cultivo de microorganismos está definido en una cámara de producción que incluye una cámara de flujo y los diodos láser emiten luz a ciertas longitudes de onda y evalúan dicha cámara de flujo, con detección por fotodiodos. Un microprocesador lee y registra las señales de voltaje correspondientes a las longitudes de onda y un sistema de adquisición de datos convierte dichas señales de voltaje en mediciones de parámetros biológicos, que se muestran en una interfaz gráfica de usuario y permiten al usuario monitorear las mediciones en tiempo real. No obstante, el sistema revelado en esta anterioridad, no es un medidor externo y desmontable sin la necesidad de apertura del bioreactor.

También se relacionan medidores de densidad óptica sumergibles. Los medidores de densidad óptica que pueden sumergirse y por lo tanto instalarse dentro de un bioreactor, normalmente no son adecuados, pues habría que esterilizarlos para instalarlos y además se debe abrir el bioreactor. Un sensor sumergible también está expuesto a que los microorganismos se le adhieran y ese ensuciamiento puede interferir con las lecturas. En nuestro sistema, se reduce la adhesión de los microorganismos debido a que hay flujo permanente del cultivo a través del tubo transparente. De hecho, se eligió una configuración de bioreactor de burbujas conocido con su nombre en inglés de “airlift” de tubo externo para que

el cultivo estuviera bien mezclado y circulando permanentemente por el tubo a donde se acopla el lector de densidad óptica.

Por lo tanto, una necesidad creciente en la técnica, es buscar un equipo capaz de medir el crecimiento de los microorganismos de manera eficaz y en tiempo real mediante un medidor de densidad óptica incorporado y sin la necesidad de abrir el bioreactor, evitando la contaminación por alguna fuente externa.

OBJETO DE LA INVENCION

Por consiguiente, un primer objeto de la presente invención es evitar las desventajas del arte previo. Más particularmente, un objeto de la presente invención es crear un equipo bioreactor con medidor de densidad óptica incorporado.

Otro objeto importante de la invención comprende la obtención, en tiempo real, del nivel de crecimiento de microorganismos y su consecuente transmisión a medios externos para su posterior evaluación.

Un objeto no menos importante es el hecho de que el equipo comprende medios de medición de densidad óptica de fácil armado y desarmado para limpieza y nuevo posicionamiento.

Otro objeto importante comprende crear un equipo que no necesita abrirse durante el cultivo de los microorganismos para establecer su crecimiento, de manera que se minimiza sustancialmente el contacto de los microorganismos con el medio externo y se minimiza el riesgo de contaminación del cultivo.

Las características novedosas que se consideran como fundamento de la invención son expuestas en particular en las reivindicaciones adjuntas y las ventajas adicionales del mismo, se entenderán mejor sobre la descripción

detallada siguiente con las modalidades preferidas y la debida referencia a los dibujos que la acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Para aclarar más la invención y sus ventajas comparadas con el arte conocido, se describen a continuación con la ayuda de los dibujos anexos, las posibles formas de realizaciones ilustrativas y no limitativas de la aplicación de dichos principios.

FIG. 1. Muestra una vista esquemática del bioreactor con medidor de densidad óptica incorporado según la presente invención.

FIG. 2. Muestra un despiece del bioreactor con medidor de densidad óptica incorporado según la presente invención.

FIG. 3. Muestra el ensamble del medidor de densidad óptica incorporado según la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un equipo bioreactor con medidor de densidad óptica incorporado externamente y de manera extraíble sin la necesidad de apertura del bioreactor.

Particularmente, con base en las figuras 1 y 2, la presente invención reside en un arreglo de equipo 1 para el cultivo de microorganismos que incluye un medidor de densidad óptica 2 incorporado para monitorear en tiempo real las lecturas de crecimiento de los microorganismos.

Dicho equipo 1 comprende entonces un contenedor principal 3. Dicho contenedor comprende un cuerpo cilíndrico alargado que define una altura. Incluye por su extremo superior una boca 4 de acceso a su interior como entrada superior roscada para recibir una tapa de cierre 5 y aislar el interior del contenedor principal.

Por su parte, dicha tapa de cierre 5 incluye una primera perforación pasante 6 en su superficie plana para el ingreso al contenedor principal de una línea de suministro de aire 7 y una segunda perforación 8 adyacente al perímetro de la tapa de cierre 5 para el paso de una línea de evacuación de aire 9.

Para el adecuado funcionamiento del bioreactor, la línea de suministro de aire 7 sobrepasa concéntricamente una rejilla para control de espuma 10 dispuesta al interior del contenedor principal sobre el nivel de fluido. Adicionalmente, el extremo interior de la línea de suministro de aire 7 finaliza en un difusor de burbujas 11.

Conforme a las figuras 2 y 3, el objeto principal de la presente invención comprende un medidor de densidad óptica 2 incorporado externamente para monitorear en tiempo real las lecturas de crecimiento de los microorganismos. Para ello, comprende una tubería de paso 12 dispuesta en paralelo respecto al alto del cuerpo del contenedor principal 3 en conexión desde un tubo de flujo superior 14 hasta el tubo de flujo inferior 13 por intermedio de un tubo lateral 15 mediante uniones de tubería de codos 16.

Dicho tubo lateral 15 está dispuesto en paralelo en relación con el cuerpo del contenedor principal 3 y sobrepasa el medidor de densidad óptica 2 que comprende una carcasa dividida en dos casquetes enfrentados que abrazan dicho tubo lateral 15, donde el primer casquete 17 aloja concéntricamente un emisor LED 18 dispuesto en dirección a una fotorresistencia 20 alojada en el segundo casquete 19. Dicho emisor de luz LED 18 emite un haz de luz en dirección a la

fotorresistencia 20, pasando por el volumen del tubo lateral 15 con el cultivo de microorganismos que transitan al interior del mismo. Para la adecuada toma de la lectura mediante el medidor de densidad óptica, el tubo lateral 15 es de pared transparente tal como vidrio, conformando una celda de lectura.

Para asegurar entre sí los casquetes se disponen de elementos de sujeción tales como pernos 21 y tuercas 22 enlazados que sobrepasan agujeros laterales 23 practicados en los casquetes 17, 19.

Así las cosas, el equipo bioreactor con medidor externo de densidad óptica incorporado, con base en la presente invención, permite cultivar microorganismos en un volumen reducido. El sistema de lectura de densidad óptica está automatizado y permite la cuantificación indirecta del crecimiento de los microorganismos sin necesidad de abrir el bioreactor o de tomar muestras.

En modalidades preferidas de la invención, el contenedor 3 comprende entre 3 cm a 8 cm de diámetro, preferiblemente de 5 cm de diámetro y entre 10 cm a 25 cm de alto, preferiblemente 16 cm de alto.

Por su parte, el tubo lateral 15 es construido a partir de vidrio y tiene entre 0,5 cm a 3,0 cm de diámetro, preferiblemente 1,5 cm de diámetro y entre 4 cm a 10 cm de alto, preferiblemente de 6 cm de alto. Este tubo lateral 15 funge como celda de lectura de densidad óptica, puesto que cumple con los requisitos de transparencia y diámetro uniforme.

Cada uno de los casquetes, 17 y 19, presenta un espacio cóncavo con un diámetro de entre 0.5 cm a 3,0 cm, lo que permite su ensamblaje alrededor del tubo lateral anteriormente descrito.

El primer casquete 17 entonces cuenta con una fuente de luz LED 18 intercambiable alojada en su interior, mientras el segundo casquete 19 comprende

una fotoresistencia 20 centrada en su interior y dispuesta en dirección a la luz LED 18. Estos casquetes son acoplados entre sí, en la pared del tubo lateral 15, de manera que permite cuantificar la cantidad de luz que pasa a través del tubo lateral 15, la cual es inversamente proporcional a la densidad óptica y a la densidad celular del cultivo microbiano.

Los componentes electrónicos responsables de la lectura de densidad óptica operan mediante un circuito electrónico programable que puede tomar varias lecturas por segundo. Éstas son almacenadas en una memoria externa tal como una microSD. Por tanto, el lector de densidad óptica que comprende un emisor LED por un lado y una fotoresistencia en correspondencia, está en conexión con un controlador electrónico que incluye un sistema de almacenamiento de memoria externa. Opcionalmente también puede comprender conexiones a computadores externos y mediante diversos soportes lógicos, se puede establecer a partir de varias mediciones, comparaciones y cinéticas de crecimiento de varios tipos de microorganismos con fines de laboratorio e industrial.

Así las cosas, el medidor de densidad óptica 2 incorporado puede ser montado o desmontado del bioreactor 1 en cualquier momento sin afectar la operación, puesto que la lectura se realiza desde el exterior sobre el tubo lateral 15 de vidrio ubicado de manera extraíble.

El volumen de líquido contenido es de máximo 155mL operando de manera eficiente con 150mL.

Tiene un sistema de aireación alimentado por la línea de suministro de aire 7 que entra al bioreactor por la parte superior y va hasta el fondo hasta el difusor de burbujas 11. En operación el sistema de burbujeo tiene dos funciones: primero suministrar gases indispensables en el mantenimiento de los cultivos (oxígeno o dióxido de carbono) y segundo, promover el movimiento del líquido, lo que permite

una distribución homogénea de los nutrientes y los microorganismos en todo el contenido del reactor. Este movimiento del líquido es propio del sistema “*airlift*” y sucede debido a la división del bioreactor en dos espacios: el contenedor principal 3 o elevador y el tubo lateral 15 o descendente. El aire ascendente en el contenedor principal 3 arrastra el líquido hacia arriba, el cual luego desciende por el tubo lateral 15 y reingresa al contenedor principal 3 por la parte inferior. Este movimiento mantiene un buen mezclado en el bioreactor y con el brazo lateral libre de burbujas, por lo que permite que allí se haga la lectura de densidad óptica.

El sistema de lectura de densidad óptica opera por fuera del bioreactor, por lo tanto no debe realizarse la apertura del sistema con el fin de realizar el muestreo correspondiente, ni se requieren un colorímetro o un espectrofotómetro externo para la lectura de muestras. Además, los datos son almacenados automáticamente en una memoria externa.

Las lecturas pueden realizarse varias veces cada segundo, durante todo el tiempo de operación; algo que bajo la metodología actual (muestreo manual y lectura en equipo), resultaría físicamente imposible de realizar, puesto que excedería la capacidad del operario.

Las piezas en las cuales se encuentran empotrados los sistemas electrónicos son fácilmente reproducibles mediante la tecnología de impresión 3D, permitiendo la construcción de múltiples bioreactores en corto tiempo.

Sólo se han ilustrado a manera de ejemplo algunas modalidades preferidas de la invención. En este respecto, se apreciará que la construcción del equipo bioreactor con medidor externo de densidad óptica, se puede escoger de una pluralidad de alternativas sin apartarse del espíritu de la invención según las siguientes reivindicaciones.