

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 342**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 15/06 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 21/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2005 PCT/FR2005/000531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2005 WO05085818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2005 E 05736918 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1730505**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para medir y caracterizar en línea una biomasa en una fermentación con bacterias lácticas**

30 Prioridad:

05.03.2004 FR 0402368

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.12.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE MONTPELLIER (50.0%)
163, rue Auguste Broussonet
34090 Montpellier, FR y
COMPAGNIE GERVAIS DANONE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARNOUX, ANNE-SOLENN;
PREZIOSI-BELLOY, LAURENCE;
ESTEBAN, GEOFFREY;
TEISSIER, PHILIPPE;
BARBEAU, JEAN-YVES y
GHOMMIDH, CHARLES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 594 342 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para medir y caracterizar en línea una biomasa en una fermentación con bacterias lácticas

La presente invención se refiere a un procedimiento para medir y caracterizar en línea una biomasa en un proceso de fermentación de bacterias lácticas. Asimismo, esta se encamina a un dispositivo que pone en práctica este procedimiento, así como a un procedimiento de pilotaje de un sistema de fermentación que pone en práctica tal dispositivo.

Ya son conocidos procedimientos de determinación de la concentración de biomasa en un reactor de fermentación, que ponen en práctica medidas de capacitancia o medidas ópticas.

Sin embargo, aun cuando la biomasa es, a todas luces, la variable cuyo conocimiento prima en importancia para tener controlados los procesos fermentativos, los sensores para medirla son, a día de hoy, raros, caros y, muchas veces, mal conocidos. Una de las principales razones es, probablemente, el carácter relativamente vago de la idea de biomasa: según los campos de aplicación, los operarios miden el volumen celular, el peso seco, el número de células, el número de colonias tras el cultivo, la turbidez, e incluso la actividad metabólica (respiración, velocidad de acidificación...). La coincidencia de las medidas obtenidas mediante estos diversos métodos dista de ser constante, y evoluciona en función de las condiciones de cultivo. No siempre son utilizables todas ellas, como por ejemplo la medida de la concentración de materia seca tras la filtración cuando el medio es viscoso o contiene partículas en suspensión.

La noción de estado fisiológico también es delicada de definir: según las aplicaciones, esta hace referencia a la posición de las células en su ciclo vegetativo, a su estado de viabilidad, a su morfología... Con todo, los operarios describen su cultivo como en "buen (o mal) estado fisiológico", en función de criterios, no siempre objetivos, ligados generalmente a la evolución temporal de la fermentación. Aquí nos encontramos con un problema semántico similar al apuntado con respecto a la biomasa. Entre los medios ordinarios de evaluación del estado fisiológico de una población, cabe citar:

la medida de la morfología celular por microscopía (con el ocasional concurso de técnicas de análisis de imagen). Se puede medir la longitud (o el diámetro) de las células, el estado de agregación (células aisladas, por parejas...), el estado de división (razón de células en división / células aisladas);
la aptitud para la división, tras el cultivo sobre un medio apropiado (agar, membrana...). Se hace entonces el recuento del número de colonias obtenidas y se calcula la razón al número inicial de células;
el seguimiento por microscopía o citometría de flujo de la penetración de marcadores coloreados, muchas veces fluorescentes, y su ocasional metabolización, que permite evaluar la permeabilidad de la membrana y la presencia de actividades fisiológicas particulares;
la medición de una actividad metabólica de conjunto (velocidad de acidificación, velocidad de consumo de oxígeno, de producción de CO₂), dividida por la concentración total de biomasa (expresada generalmente en concentración de materia seca).

Junto a las medidas convencionales, que generalmente precisan de un muestreo, empieza a popularizarse la puesta en práctica de sistemas de medida *in situ*. Esencialmente, existen dos tecnologías concurrentes, basadas, ya sea en las propiedades ópticas de las suspensiones microbianas, o bien en las propiedades dieléctricas de las células vivas.

Las medidas ópticas se basan generalmente en la evaluación simultánea del conjunto de fenómenos (absorción, reflexión, refracción, difracción) que afectan a las suspensiones de microorganismos. Su principal ventaja está en su sensibilidad a las pequeñas concentraciones de biomasa. Su principal inconveniente está en la detección de partículas distintas a la biomasa y, en menor medida, de las células muertas. Así, el documento US 4893935 describe un dispositivo y un procedimiento para determinar una biomasa de un medio, a partir de una medida de densidad óptica del medio.

Por otro lado, las estructuras membranosas, que impiden la libre circulación de los iones, confieren a las células vivas el comportamiento de pequeños condensadores. Las medidas de capacitancia (no confundir con las medidas de impedancia) permiten, en principio, una evaluación directa del volumen celular. La señal obtenida depende del tamaño de las células, las de tamaño pequeño se polarizan más rápidamente que las células de gran tamaño. La señal depende asimismo del estado de las membranas, las células en "mal estado" tan solo se polarizan débilmente, lo cual constituye la principal ventaja de las medidas de capacitancia. Cabe citar, especialmente, el artículo titulado "On-line, real-time measurement of cellular biomass using dielectric spectroscopy" de Yardley et al., publicado en "Biotechnology and Genetic Engineering Reviews", (2000) Vol. 17. Adicionalmente, los documentos US 4810650 y WO 03/069334 describen un dispositivo y un procedimiento para determinar una biomasa de un medio, a partir de una medida capacitiva del medio para una pluralidad de frecuencias.

Se advierte, pues, que el problema que se plantea, a un tiempo, está mal definido desde el plano semántico, es complejo y delicado de estudiar debido a la falta de medios de investigación adaptados.

El objetivo de la presente invención es aportar una solución técnica a este problema, proponiendo un procedimiento de medida de concentración en línea de una biomasa de bacterias lácticas en fermentación, que proporcione simultáneamente, *in situ* y en tiempo real, una evaluación del estado fisiológico de las poblaciones microbianas contenidas en esa biomasa.

Este objetivo se alcanza con un procedimiento de medida y de caracterización en línea de una biomasa en un proceso de fermentación de bacterias lácticas en suspensión en un medio según la reivindicación 1.

De manera esquemática, se puede escribir que la capacitancia C y la densidad óptica D de una suspensión celular son funciones de la concentración de biomasa X , del tamaño de las células Φ y de su estado fisiológico Ψ .

$$C = f(X, \Phi, \Psi)$$

$$D = g(X, \Phi)$$

Teóricamente, debería ser posible resolver este sistema realizando las medidas de capacitancia y de densidad óptica a diferentes frecuencias, en orden a disponer de un número suficiente de ecuaciones.

Un análisis temporal de las señales también puede aportar una información sobre el estado de agregación de las células.

Las dificultades se dan en diferentes niveles: las funciones f y g tan solo están definidas parcialmente, y las variables Φ y Ψ son, en realidad, distribuciones.

Acoplando las medidas de espectroscopia de impedancia, de espectroscopia óptica y de difracción, y apoyándose en las modernas técnicas de análisis de datos (quimiometría), debería ser posible llegar a las tres variables de interés. Técnicamente, se trata de establecer una correspondencia entre, por una parte, toda la información disponible, obtenida por los medios convencionales y, por otra, todas las señales medibles *in situ*, y ello, para el mayor número posible de muestras, correspondientes a las más variadas situaciones. Las técnicas avanzadas de análisis de datos permiten, a continuación, dar con las variables más portadoras de información y establecer las correlaciones más pertinentes.

A efectos prácticos, se advierte que es relativamente simple combinar la información aportada por varios sensores de principios diferentes para obtener una información útil para el operario. En efecto, se puede acotar la dimensión del problema introduciendo hipótesis simplificadoras. Por ejemplo, si se postula que las células tienen siempre el mismo tamaño (o distribución de tamaños) y se hallan siempre en el mismo estado fisiológico, entonces la medida de capacitancia $C = f(X, \Phi, \Psi)$ proporcionará directamente una medida de la concentración de biomasa. Sin embargo, si el tamaño de las células varía en el transcurso de la fermentación, ya no es posible saber si la variación observada de la señal está causada por una variación de la concentración celular o una variación del tamaño medio de la población o una variación del estado de membranas, o cualquier combinación de los tres factores.

De este modo, con el procedimiento según la invención, se hace posible medir la concentración de biomasa y evaluar simultáneamente el estado fisiológico de poblaciones microbianas, en tiempo real e *in situ*.

Otras ventajas y características de la invención se irán poniendo de manifiesto con la detenida observación de la descripción detallada de una forma de puesta en práctica, en absoluto limitativa, y de los dibujos que se acompañan, en los cuales:

la figura 1 ilustra la evolución de la permitividad y de la densidad óptica a lo largo de dos cultivos de de *Lactobacillus casei*, y la influencia de un cambio de pH;

la figura 2 ilustra una conexión entre la relación permitividad dieléctrica / Densidad óptica y la longitud media de *Lactobacillus casei*; y

la figura 3 ilustra un ejemplo práctico de realización de un dispositivo de medida de biomasa según la invención.

A continuación se pasa a describir, con referencia a las aludidas figuras, un ejemplo de puesta en práctica del procedimiento según la invención. A efectos de ilustración, la figura 1 representa la evolución temporal de la permitividad dieléctrica de dos suspensiones bacterianas (*Lactobacillus casei*). A lo largo de uno de estos cultivos, se rebajó el pH del medio (regulado mediante adición controlada de potasa). Se advierte una ruptura de la curva de permitividad correspondiente, que podría indicar una parada del crecimiento. Sin embargo, la medida simultánea de la densidad óptica muestra que la variación de pH tan solo produce una ligera ralentización del crecimiento. Medidas independientes (no en línea, no presentadas) de concentración de materia seca confirman el hecho de que la

variación del pH tan solo ha repercutido de manera marginal en el crecimiento. En realidad, la variación del pH provoca una disminución progresiva del tamaño de las bacterias, que pasa de $9,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, antes de la bajada del pH, a $5,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ en el final de cultivo, con una correspondiente disminución de la señal capacitiva. Si trasladamos la relación de las medidas Permitividad / Densidad óptica en función de la longitud media de las bacterias, medida en microscopía óptica, se obtiene una correlación muy satisfactoria, que a continuación puede ser utilizada en sentido inverso para evaluar la longitud media a partir de las medidas simultáneas de densidad óptica y de permitividad dieléctrica.

Así, la figura 2 presenta un conjunto de medidas realizadas a lo largo de seis fermentaciones, en cuyo transcurso se modificó la longitud media de las bacterias, operando, ya sea sobre el pH, o bien sobre la temperatura de cultivo. Los puntos característicos de forma triangular corresponden a variaciones de longitud inducidas mediante cambios de temperatura (35, 37 y 39 °C).

Las variables de tamaño y de estado fisiológico generalmente van ligadas a lo largo de un mismo proceso fermentativo y, muchas veces, cabe contentarse con una estimación del tamaño medio, sin preocuparse de la distribución de tamaños. Esto no significa que este tipo de información (estado de distribución) no sería interesante para el operario, sino que estriba en una constatación simple: a día de hoy, la mayoría de las fermentaciones se llevan a cabo sin medida en línea de la biomasa, en defecto de medios técnicos adecuados (disponibilidad, coste...).

De este modo, se ha podido medir simultáneamente la concentración y el tamaño de bacterias lácticas utilizando simultáneamente un analizador de biomasa, desarrollado y comercializado por la compañía Fogale Nanotech, y una sonda óptica Wedgewood (sistema que mide en el infrarrojo cercano la densidad óptica de suspensiones microbianas), tal y como ilustra la figura 3.

El analizador de biomasa comprende, tal como ilustra especialmente el documento WO 0179828, una sonda capacitiva para la determinación de la biomasa de células vivas cuya superficie celular es inferior o igual a $10 \mu\text{m}^2$. Esta sonda capacitiva está diseñada para sumergirse en un reactor de fermentación que contiene un medio de células en suspensión. Comprende un primer par de electrodos de intensidad, para inyectar una corriente eléctrica en el medio, un segundo par de electrodos de tensión, para recoger la tensión aplicada a este medio, y un circuito de medida de la corriente eléctrica inyectada. El analizador de biomasa comprende un acondicionador que incluye un circuito para suministrar una tensión alterna aislada galvánicamente que se aplicará entre los electrodos de intensidad, y un circuito para tratar señales representativas de la corriente inyectada en el medio y de la tensión recogida en bornes de los electrodos de tensión, para así entregar señales de medida de la capacitancia y de la conductancia del medio.

El circuito de tratamiento comprende (i) un puente de medida por método de cero establecido para tratar una señal imagen de la corriente inyectada y una señal imagen de la tensión recogida, aplicándose estas dos señales respectivamente a una rama de referencia y a dos ramas de oposición, y (ii) un circuito de control automático de este puente a partir de la señal de medida de conductancia.

El puente de medida por método de cero se halla dispuesto aguas abajo de unos circuitos que entregan señales imagen respectivamente de la corriente inyectada y de la tensión en bornes de la impedancia que ha de medirse.

El procedimiento de medida en línea de la concentración de biomasa según la invención está principalmente dedicado a las bacterias lácticas, especialmente los lactobacilos, los estreptococos, las bifidobacterias.

Entre los lactobacilos, cabe citar *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*. Entre los estreptococos, cabe citar *Streptococcus thermophilus*.

Entre las bifidobacterias, cabe citar *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*.

Las bacterias lácticas a las que atañe el procedimiento de medida en línea según la invención son células cuya superficie no excede de $10 \mu\text{m}^2$.

El procedimiento de medida en línea según la invención puede ser llevado a la práctica en un biorreactor o fermentador, de tipo industrial o de laboratorio. Se puede aplicar en fermentaciones tradicionales por lotes o en medio continuo. También puede ser llevado a la práctica para el seguimiento de fermentaciones de tipo "fedbatch", especialmente en un procedimiento de pilotaje de un sistema de fermentación de bacterias lácticas regulado mediante ajuste de parámetros de acción para obtener una biomasa que cumpla al menos con un criterio objetivo determinado en cuanto a tamaño de células o a actividad fisiológica. Al menos uno de estos parámetros de acción se puede calcular a partir de al menos un parámetro de estado medido por medio de un dispositivo de medida en línea según la invención.

Claro es que la invención no queda limitada a los ejemplos que se acaban de describir, y que en estos ejemplos se

pueden introducir numerosas adecuaciones sin salir del ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de medida y de caracterización en línea de una biomasa en un proceso de fermentación de bacterias lácticas, en suspensión en un medio, comprendiendo este procedimiento:

- 5
- una medida de la capacitancia C de dicho medio para una pluralidad de frecuencias,
 - una medida de la densidad óptica de dicho medio, para dicha pluralidad de frecuencias, y
 - un tratamiento en tiempo real de las señales de medida de capacitancia y de densidad óptica mediante
- 10
- resolución de un sistema en el que la capacitancia C y la densidad óptica D son cada una de ellas funciones de la concentración de biomasa X y del tamaño de las bacterias lácticas Φ para determinar, simultáneamente, la concentración de biomasa X y el tamaño de las bacterias lácticas Φ .

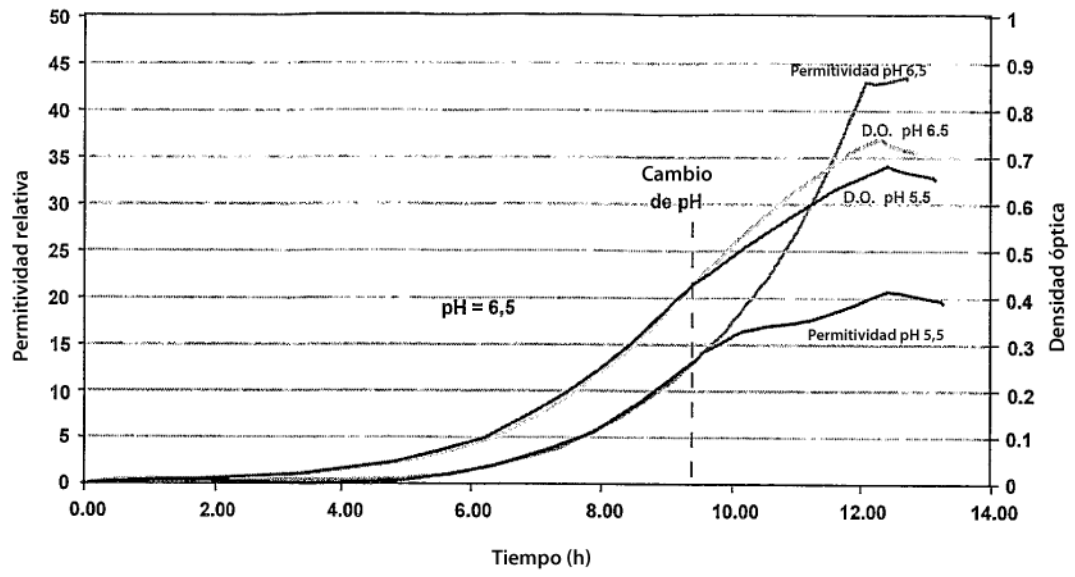


FIG. 1

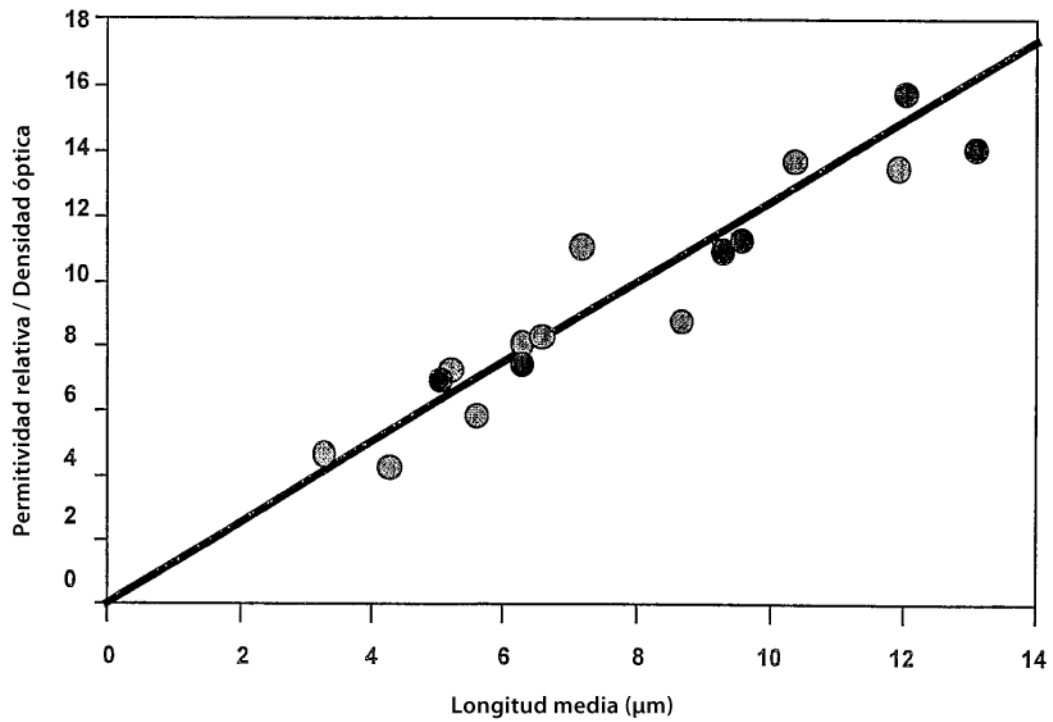


FIG. 2

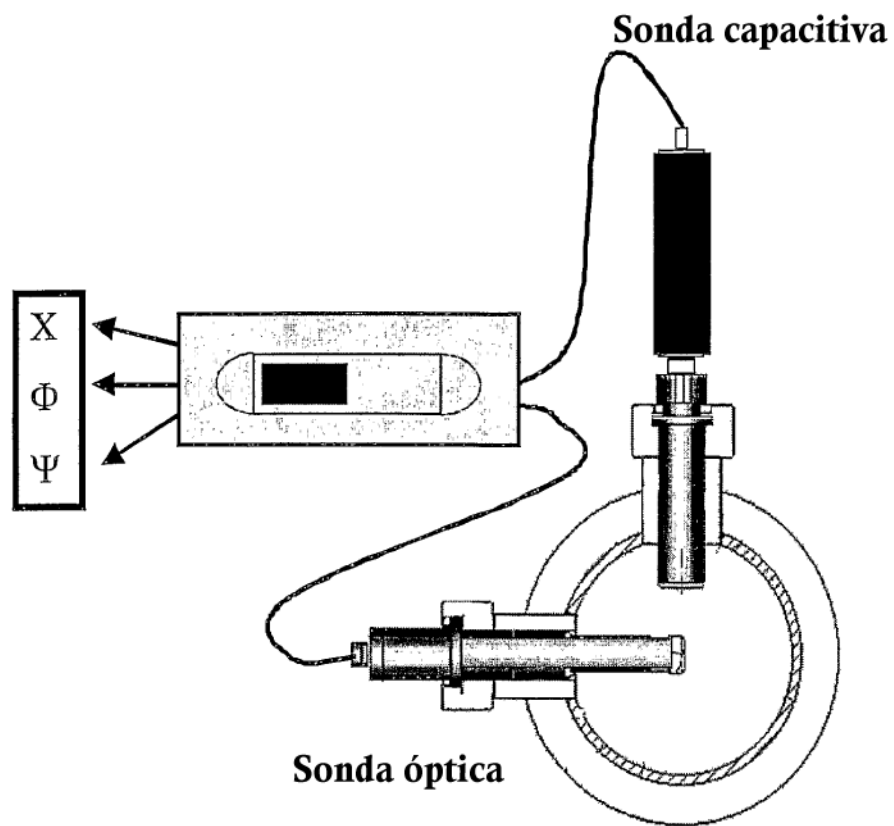


FIG. 3

