

03072  
2  
2eje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**AUTONOMA**

**DE**

**MEXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**TESIS CON  
SALA DE ORIGEN**

**CUERNAVACA, MOR.**

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

03072

**DESARROLLO Y OPTIMIZACION DE CONDICIONES DE  
FERMENTACION, A ESCALA SEMIPILOTO PARA LA  
PRODUCCION DE PROTEINAS HIBRIDAS QUE LLEVEN LAS  
CADENAS A y B DE INSULINA HUMANA EN CEPAS  
RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**QUE**

**PRESENTA**

**RAMON DE ANDA HERRERA**

**mayo de 1994**

# **I N D I C E**

## **RESUMEN**

### **1 INTRODUCCION**

### **2 ANTECEDENTES**

- 2.1-** La diabetes mellitus y la hormona insulina.
- 2.2-** Métodos de obtención de insulina.
- 2.3-** Métodos utilizados para la producción de la insulina humana por DNA recombinante.
- 2.4-** Tecnología desarrollada en el IBT/UNAM para la producción de insulina humana en *Escherichia coli*.

### **3 OBJETIVOS**

### **4 MATERIAL Y METODOS**

- 4.1. -Material y reactivos**
  - 4.1.1 -Microorganismos**
  - 4.1.2 -Medio de cultivos**
- 4.2. -Cálculo de las variables de estado del proceso para la producción de la insulina humana**
  - 4.2.1 -Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

4.2.2 -Rendimiento ( $Y_e = X/S$ )

### 4.3 -Métodos analíticos

4.3.1 -Colecta y procesamiento de las muestras

4.3.2 -Estimación de biomasa

4.3.3 -Cuantificación de glucosa

4.3.4 -Determinación de la proteína híbrida

4.3.5 -Determinación de L-triptofano en el medio de cultivo

4.3.6 -Determinación de células resistentes a ampicilina durante la fermentación

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 -Cepa de trabajo seleccionada

5.2 -Influencia del método de conservación de la cepa, sobre la productividad del sistema

5.2.1 Transformación y conservación de cultivos en caja

5.2.2- Transformación y liofilización de cultivos

5.3 -Cultivo en matraz e inducción del sistema recombinante *W3110 trp(pNF-21B)* con Acido 3- $\beta$ -indolacrílico (AIA)

5.4 -Cultivo tipo lote e inducción del sistema recombinante *W3110 trp(pNF-21B)*.

5.5 -Cultivo tipo lote con medio FEM a 10 lt

5.6 -Efecto de restringir el crecimiento ( $\mu$ ) por temperaturas bajas

5.7 -Producción de cI-B, mediante el control de la velocidad específica de crecimiento por restricción de nutrientes (cultivo lote alimentado)

- 5.8 -Efecto de la velocidad de crecimiento sobre la producción de biomasa y proteína híbrida:**
- 5.8.1 -Velocidad específica de crecimiento
- 5.9 -Transferencia del alelo *trp*<sup>+</sup> a la cepa *W3110 trp***
- 5.10 -Cinética de producción de biomasa y proteína híbrida en la cepa *Escherichia coli W3110 trp*<sup>+</sup>**
- 5.11 -Producción de la proteína híbrida cI-cadena "A", mediante la tecnología desarrollada para la proteína híbrida cI-"B"**
- 5.12 -Producción de la proteína híbrida cI-cadena "A" a nivel de 100 l. Estudios preliminares.**

## **6 CONCLUSIONES**

## **7 PUBLICACIONES**

## RESUMEN

El presente trabajo de tesis se encaminó al desarrollo de una tecnología a nivel semipiloto, de procesos fermentativos con microorganismos recombinantes.

En este estudio se mencionan aquellos factores que afectan de forma importante el comportamiento del sistema microorganismo-plásmido durante el crecimiento celular, tales como: temperatura, nivel de oxigenación, alimentación de los nutrientes, velocidad específica de crecimiento, etc y que repercuten finalmente en el nivel de producción de proteínas heterólogas.

En nuestro sistema se trabajó con bacterias de *Escherichia coli* que llevan genes híbridos que codifican para **cI-cadena A o B** de insulina humana.

Este sistema está bajo la regulación del promotor del operón de triptofano. Como parte del trabajo se hicieron algunas consideraciones sobre la inducción del promotor de triptofano y para tal efecto se construyó una cepa isogénica a la cepa de trabajo seleccionada. Así mismo, se compara el crecimiento y la producción de proteína en cultivos lote y alimentado, donde se analiza la concentración celular alcanzada y el nivel de proteína híbrida **cI-cadena B** de insulina humana.

Este trabajo forma parte de estudios realizados en nuestro laboratorio encaminados a valorar la factibilidad del proceso, así como a la extracción y purificación de las proteínas híbridas **cI-cadena A y B** de insulina y la producción de insulina activa.

# 1 INTRODUCCION

Con el arribo de técnicas de DNA recombinante (DNAr), la Biotecnología cuenta con tecnologías directas para la producción de una amplia variedad de productos bioquímicos a partir de microorganismos industriales, así como de células de mamíferos y de plantas.

Los organismos más comúnmente explotados con propósitos de producción industrial de proteínas recombinantes, han sido las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>1</sup>

Estas proteínas recombinantes se encuentran codificadas en secuencias de DNA que se transfieren a la célula receptora, usualmente por la introducción de DNA extracromosomal en forma de plásmido o fago.

El uso de plásmidos como vectores es casi indispensable en la ingeniería genética para la expresión de genes de origen homólogo o heterólogo en organismos procariontes o eucariotes.

Los primeros experimentos en donde se aislaron y se introdujeron genes de un organismo a otro, fueron reportados en 1974 por Boyer y Cohen.<sup>2</sup> Posteriormente en 1978, el grupo de Herbert Boyer en colaboración con investigadores de City of Hope en Los Angeles E.U.A., lograron sintetizar un gene y expresarlo en la bacteria *Escherichia coli*. Este gene sintético codifica para la hormona somatostatina humana, siendo éste el primer ejemplo a nivel mundial en donde fue posible demostrar la producción de hormonas humanas en bacterias.<sup>3</sup> Un año después en 1979, por primera vez en el mundo, la compañía Genentech, de San Francisco, USA produce insulina



humana por medio de técnicas de ingeniería genética. Años más tarde se pudo expresar otras proteínas de uso terapéutico como: la hormona de crecimiento, el activador de plasminógeno tisular, los interferones, factores de coagulación, etc. <sup>4</sup>

## La diabetes mellitus y la hormona insulina.

La insulina es una hormona producida en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, cuya deficiencia absoluta o relativa en el organismo, causa una enfermedad metabólica llamada *diabetes*.

En 1889, al extirpar el páncreas a un perro, por primera vez se produjo un caso de *diabetes experimental*. Posteriormente se acuñó el término *mellitus* para diferenciar la *diabetes insípida* de la *diabetes mellitus* (dulce). Cabe señalar, que tan solo el 10 % de los diabéticos padecen *diabetes mellitus*.

La *diabetes mellitus Tipo I* o insulino dependiente, se caracteriza por una alteración en el transporte de la glucosa, aminoácidos, calcio, potasio y fosfato inorgánico, hacia el interior de la célula.<sup>5</sup> Entre las manifestaciones clínicas de la deficiencia de insulina en el organismo humano se encuentran: elevación patológica de la glucosa y cetonas en el plasma sanguíneo; aumento en la filtración de glucosa y cetonas; excreción alta de sodio y agua; disminución del volumen plasmático; bajo retorno venoso; débito cardíaco bajo; hipotensión arterial y flujo sanguíneo bajo.<sup>6</sup>

La molécula de insulina humana está constituida por 51 aminoácidos estructurados en dos cadenas. una **cadena A** con 21 aminoácidos y una **B** con 30.

Ambas cadenas están unidas entre sí, por dos puentes disulfuro S-S entre residuos de

cisteína de cada una de las cadenas.<sup>6</sup>

La estructura primaria de la insulina se muestra en la fig. 1.

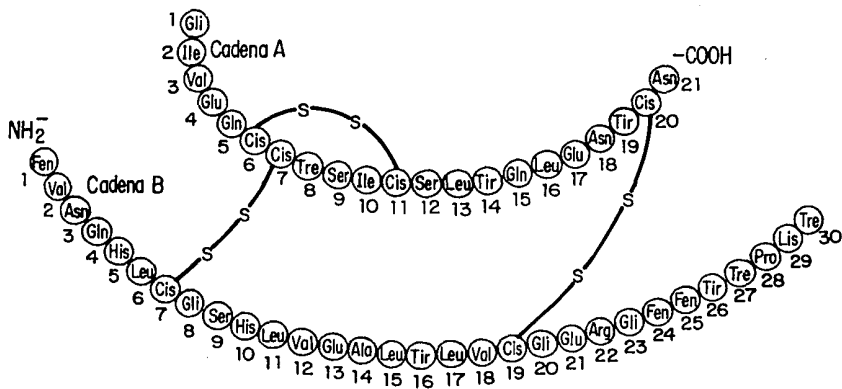


fig. 1. Estructura primaria de la insulina humana.

## ANTECEDENTES

### 2.1-Métodos de obtención de la insulina.

La insulina bovina se pudo aislar en 1921 gracias a las investigaciones de Banting y Best<sup>7</sup>, quienes tardaron mas de 20 años en lograrlo, debido a que era hidrolizada por la actividad proteolítica de las enzimas pancreáticas contenidas en el jugo gástrico.

Hasta hace poco, la insulina disponible en el mercado para el tratamiento clínico de la diabetes era sólo de origen animal; se obtenía del páncreas de ganado bovino, ovino y porcino por extracción con solventes, para purificarlo luego por métodos cromatográficos. La mayor parte de las presentaciones comerciales de la insulina animal contienen una formulación de 2/3 partes de insulina bovina y 1/3 parte de porcina.<sup>8</sup>

El uso continuo de esta insulina puede ser problemático en algunos individuos dada su potencialidad antigénica pudiéndose producir anticuerpos anti-insulina, debido a la diferencia parcial existente en la cadena "B" bovina, con respecto a la humana. Esto en un momento dado, puede llevar a una alergia local o generalizada, resistencia inmunológica a la insulina y lipoatrofia en los sitios de inyección.

Debe señalarse que a nivel mundial el control de la *diabetes mellitus* ha sido objeto de importantes campañas médico-gubernamentales, ya que representa un problema de magnitud considerable tanto desde el punto vista de morbilidad como de mortandad.

En México, la diabetes mellitus está entre las diez enfermedades más importantes y que además presenta un crecimiento muy acelerado en la tasa de mortandad.<sup>8</sup>

En la actualidad ya existen métodos alternos basados en la ingeniería genética que permiten obtener insulina humana, la cual nos ofrece ventajas sobre la insulina de origen animal.

## **2.2-Métodos utilizados para la producción de la insulina humana por DNA recombinante**

La ingeniería genética permite el aislamiento o la síntesis de genes humanos y su expresión en microorganismos.

En 1977, utilizando estas técnicas, se obtuvieron clonas bacterianas que sintetizaban proinsulina de rata.<sup>9 y 10</sup>

En la actualidad, existen dos métodos para producir insulina humana por medio de técnicas de ingeniería genética. El primero se basa en la producción por separado en bacterias de las cadenas A y B; posteriormente se purifican estos péptidos y finalmente, *in vitro*, se asocian para obtener la insulina activa.

El segundo método consiste en producir la proinsulina, para luego procesarla enzimáticamente hasta obtener la insulina humana. De esta última manera las compañías Genentech y después Eli-Lilly, han logrado la producción de la insulina humana en cepas de *Escherichia coli K-12*, que hoy se vende en varios países con el nombre de *Humulin*.<sup>8</sup>

### **2.3-Avances en el IBT/UNAM para el desarrollo de tecnologías para la producción de la insulina humana**

En México en 1987, como uno de los resultados para producir la hormona insulina humana, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se publicó la construcción de un vector para la expresión en *Escherichia coli* de proteínas híbridas. Como ejemplo se logró la expresión de la proteína híbrida cI-cadena "B" de la insulina humana bajo el control del promotor del operón de triptofano.

En dicho trabajo la proteína acarreadora cI, es un fragmento del represor del *fago lambda*, que forma parte de la región amino terminal de la proteína híbrida.<sup>9</sup> Esta investigación sirvió de punto de partida para los estudios posteriores que se realizaron en el laboratorio, y que constituyó el motivo de la investigación que se presenta.

En nuestro laboratorio se contaba con un método para expresar genes bajo control del promotor de triptofano de *Escherichia coli* a nivel de matraz.<sup>12</sup>

Mediante este proceso, se logró la expresión del gene que codifica para la proteína híbrida cI-cadena B de insulina humana.

### 3.-OBJETIVOS

**3.1- General:** desarrollo y optimización de condiciones de fermentación y expresión genética a escala semipiloto que permitan expresar la proteína híbrida cI-cadena "A" y "B" de la insulina humana en *Escherichia coli*.

**Particulares:**

- selección de cepas microbianas
- selección del tipo de cultivo
- desarrollo de estrategias y condiciones de escalamiento para incrementar la concentración de biomasa, en cultivo
- desarrollo de condiciones y escalamiento para la producción de proteínas híbridas
- comparación del nivel de producción de la proteína híbrida cI-B y la biomasa, entre las cepas *W3110 trp<sup>-</sup>* y la *W3110 trp<sup>+</sup>*
- estudios de estabilidad de los plásmidos *pNF21B*, *pNF21A* y su relación con el nivel de producción de la proteína híbrida

## 4 MATERIAL Y METODOS

### 4.1-Material y reactivos

#### 4.1.1.-Plásmidos y vectores de expresión

En nuestro laboratorio se construyeron los plásmidos *pNF21A* y *pNF21B*<sup>1</sup> derivados del plásmido *pBR322*.<sup>11 y 13</sup>

Estos plásmidos son portadores de los genes que codifican para las cadenas "A" y "B" de la insulina humana, en forma de proteínas híbridas *cI-cadena A* y *cI-cadena B*. Dichos genes están bajo control del promotor del operón de triptofano de *Escherichia coli*, tal y como se muestra en la figura 2.

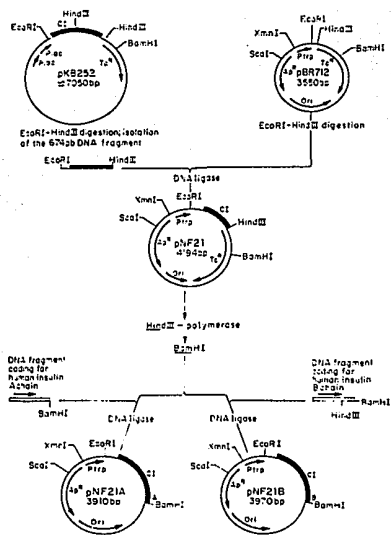


fig.2. Construcción de los plásmidos pNF21A y pNF21B

#### 4.1.2 -Microorganismos

Las cepas ensayadas para la expresión de los plásmidos que producen las proteínas cI-A y cI-B, fueron *W3110 trp<sup>-</sup>*, *CS520 trp<sup>-</sup>*, *C600 trp<sup>+</sup>* y la *294 trp<sup>+</sup>* derivadas, todas ellas, de la *Escherichia coli K-12*.



Al final de este estudio se comparó la expresión del gene híbrido *cl-cadena B* y la regulación del promotor de triptofano en la cepa *W3110 trp-* contra la cepa *W3110 trp\**. Esta cepa fue construida mediante una transducción generalizada, por medio del fago *PI*.

#### 4.1.3-Medios de cultivo

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron diferentes medios de cultivo: ricos tales como (LB), medio mínimo (M9).

Los medios de cultivo, se fueron modificando con la intención de: primero, tener hasta donde fuera posible un medio de cultivo definido; segundo, lograr un medio de cultivo con capacidad de generar alta concentración celular.

A continuación se presentan composición de estos medios de cultivo.

#### Medio rico Luria-broth. (L-B)

gramos por litro (g/l)

Triptona ----- 10.0

Ext. de levadura----- 5.0

NaCl----- 5.0

**Medio mínimo (M9)<sup>14</sup>**

(g/l)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	6.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	3.00
NaCl -----	0.50
NH <sub>4</sub> Cl -----	1.00
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	0.24
CaCl <sub>2</sub> -----	0.01
glucosa -----	2.00

El pH se ajusta a 7.4 con NaOH al 50 % (p/v).

Considerando los estudios de factibilidad realizados para este proyecto<sup>5</sup>, uno de los puntos de interés en este trabajo fue el de incrementar biomasa, por lo que se tuvo que diseñar un medio de cultivo que nos permitiera tener concentraciones elevadas de células, la formulación del medio de cultivo se basó principalmente en el reporte de Bauer y Schiloac.<sup>15</sup>

Los medios de cultivo diseñados para alta densidad celular se denominaron INO y FEM. INO para el inóculo de diez litros y FEM para el desarrollo de la fermentación. La composición de estos medios es la siguiente:

Composición en gramos por litro.

	Medio INO	Medio de FEM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	----- 3.0	3.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	----- 3.0	3.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	----- 2.0	2.0
Extrac. Lev.	----- 5.0	5.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	----- 1.7	17.0
Glucosa	----- 2.0	60.0

El pH se ajustó a 7.4 con NaOH al 50 % (p/v).

A los medios de cultivo se les adicionó L-triptofano en una concentración de 100 µg/ml como correpresor de la expresión del promotor de triptofano, y para suplir la auxotrofia de la cepa *trp*.

Como presión de selección, se utilizó una solución de ampicilina en una concentración de 100 µg/ml, la cual fué añadida a diferentes tiempos.

## **4.2-Cálculo de las variables de estado del proceso, para la producción de la insulina humana.**

### **4.2.1-Velocidad específica de crecimiento**

Para determinar la velocidad específica de crecimiento, se empleó la siguiente ecuación:

$$\ln X/X_0 = \mu t \quad \text{de donde}$$

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

En la cual  $X$  y  $X_0$  son la biomasa final e inicial respectivamente, expresadas en g/l; y  $(\mu)$  es igual a la velocidad específica de crecimiento en  $h^{-1}$ , y  $t$ , el intervalo de tiempo en horas.

#### **4.2.2-Rendimiento**

El rendimiento con respecto a la fuente de carbono se calculó mediante la expresión:  $Y_c = X/S$

En la cual  $Y_c$  = rendimiento para carbono.

$X$  es la biomasa expresada en g/l, y  $S$  es el sustrato (glucosa), también expresada en gramos por litro.

#### **4.3.-Métodos analíticos.**

##### **4.3.1-Colecta y procesamiento de las muestras**

La colecta de las muestras se realizó cada dos horas en condiciones de esterilidad a través del tubo muestreador, tomando en cada ocasión 3 ml, de los cuales, 1 ml se centrifugó para cuantificar glucosa y L-triptofano. Los 2 ml restantes, se utilizaron para determinar peso seco, o hacer análisis de proteínas celulares mediante electroforesis de proteínas.

##### **4.3.2-Estimación de biomasa**

La estimación del peso seco se obtuvo mediante la correlación en una curva de densidad óptica vs. peso seco. De esta correlación se determinó que una unidad de densidad óptica a 540 nm, equivale a 0.43 g de células peso seco/lt.

#### **4.3.3-Cuantificación de glucosa.**

Para cuantificar la glucosa remanente en el medio de cultivo se empleó un método colorimétrico, basado en la reacción catalizada por las enzimas hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, utilizando reactivos Sigma.<sup>16</sup>

#### **4.3.4-Determinación densitométrica de proteínas híbridas**

Por densitometría de las proteínas totales de *Escherichia coli*, se cuantificó de una manera indirecta la cantidad de proteína híbrida cadena-B, presente en un gel de acrilamida-SDS al 15 % en fresco, integrando el área bajo la curva de cada proteína, y relacionándola contra la banda de interés. De esta manera, se estima el porcentaje que representa cada proteína, con respecto al total de las proteínas celulares.

Se tomó como la cantidad de proteína total para *Escherichia coli* el 55 % del peso seco.<sup>17</sup>

#### **4.3.5-Determinación del L-triptofano en el medio de cultivo**

El L-triptofano se cuantificó por medio de un fluorómetro marca LDC/Milton Roy, modelo fluoroMonitor III equipado con dos filtros, uno de emisión a 254 nm y otro de excitación a 370 nm, seleccionados en base a los límites inferior y superior que presenta el pico de mayor emisión, de acuerdo con lo reportado por Jaine-Ke Li 1991.<sup>18</sup> Mediante una curva patrón se correlacionó la cantidad presente en 0.5 ml de muestra, volumen con el que se alimentó al equipo.

#### **4.3.6-Estimación de las células resistentes a ampicilina durante la fermentación**

La estimación se realizó plateando por triplicado células en cajas de medio rico con antibiótico y sin antibiótico, a los tiempos: 0, 12 y 24 h de fermentación cuantificando posteriormente el porcentaje de células crecidas.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1.- Cepa de trabajo seleccionada

El principal objetivo de este trabajo consistió en establecer una metodología que permitiera lograr expresar proteínas híbridas de origen heterólogo, en *Escherichia coli*. El desarrollo del presente estudio se inició con la selección de la cepa de trabajo y con la definición de un proceso para la inducción a nivel de matraz de genes bajo el control del promotor *trp*.

Por lo anterior se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* existentes en el laboratorio; *W3110 trp<sup>-</sup>*, *CS520 trp<sup>-</sup>*, *294 trp<sup>+</sup>* y *C600 trp<sup>+</sup>*, transformadas con el plásmido *pNF21B*.

Cabe señalar que al hacer el ensayo con las cepas ya mencionadas surgieron algunas interrogantes como: Qué influencia tiene el fondo genético en la expresión de genes heterólogos ? Será determinante que una cepa sea auxótrofa o no auxótrofa a triptofano para la expresión de genes clonados bajo el promotor de triptofano ?. La respuesta a estas preguntas se trataron de resolver durante el desarrollo del presente estudio.

Finalmente, se eligió como cepa de producción a la *W3110 trp<sup>-</sup>* con base en el mayor nivel de producción de proteína híbrida cI-cadena B observada en gel de acrilamida-SDS al 15 %, tal como se muestra en la figura 3.



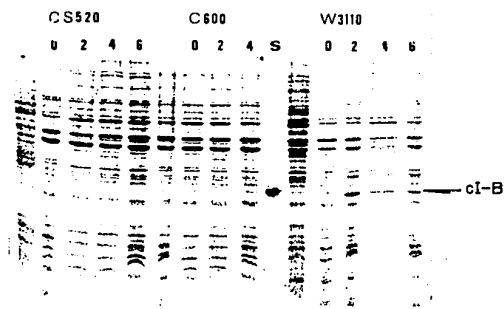


fig.3 Inducción de las cepas probadas en matraz con (AIA) a los tiempos 0,2,4 y 6 h.

Cabe señalar que cada cepa presenta características genéticas y fisiológicas particulares, lo que ocasiona que la expresión del gene híbrido ci-cadena B sea cuantitativamente diferente entre ellas. Por esa razón la elección de la cepa de trabajo juega un papel cardinal dentro del sistema de producción (cepa-plásmido).

## **5.2.- Influencia del método de conservación de la cepa sobre la productividad del sistema.**

### **5.2.1.-Transformación y conservación de cultivos en caja**

Uno de los principales problemas con los que se enfrenta al trabajar con microorganismos recombinantes, es como ya se ha mencionado, la pérdida de plásmidos durante la fermentación. Sin embargo, esta pérdida de plásmidos no sólo se presenta durante el proceso de producción, sino también en las cepas transformadas y almacenadas en cajas con medio nutritivo y presión de selección, ya que su proceso de multiplicación no cesa, sino solamente disminuye. En el caso particular de plásmidos que codifican para resistencia a la ampicilina, ésta se degrada en períodos de tiempo muy cortos (datos no mostrados). Por consecuencia, las células que crecen sobre las primeras no están en presencia del antibiótico, ya que ha sido degradado por la  $\beta$ -lactamasa codificada por el plásmido con base a lo anterior, al probar las cepas transformadas con más de una semana de almacenamiento a 4°C, o re sembradas en medio con antibiótico, éstas no fueron productoras de proteína híbrida, o en el mejor de los casos esta producción fue muy baja.

### **5.2.2-Transformación y liofilización de cultivos**

Como solución al problema mencionado en el inciso anterior, se encontró que la cepa de trabajo transformada e inmediatamente liofilizada, tuvo un comportamiento

totalmente distinto comparada con la cepa que solamente fue resembrada. Bajo las mismas condiciones de fermentación, a esta cepa se le estudió prospectivamente durante 8 meses, probando cada mes la producción de proteína híbrida. Durante este tiempo no se observó una disminución en el nivel de la inducción, como se muestra en el gel de acrilamida-SDS al 15% que se aprecia en la fig 4. Este hecho es muy importante ya que facilita el trabajo, reduce los riesgos de contaminación y finalmente, permite una mayor reproducibilidad del proceso.

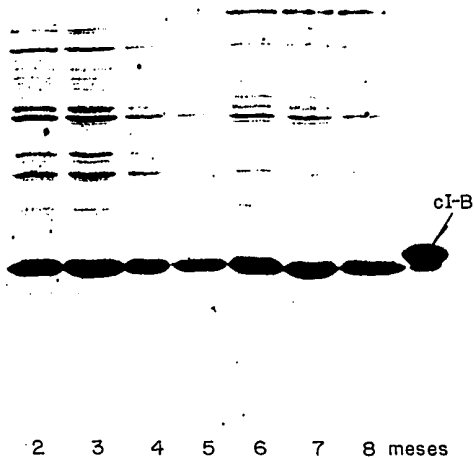


Fig 4. Efecto de liofilización sobre la producción de proteína híbrida cI-cadena B a lo largo del tiempo

### **5.3- Cultivo en matraz e inducción del sistema recombinante W3110 *trp*<sup>r</sup> (pNF21B) con ácido 3-β-indolacrílico (AIA).**

La inducción del promotor de triptofano a nivel matraz se realizó en términos generales como se describe en Métodos en Enzimología<sup>12</sup>. La proteína híbrida lograda en matraz de 250 ml con 20 ml de medio LB, a 37°C y con una agitación de 200 rpm en incubadora de aire fue aproximadamente de 20 % en promedio, con respecto al total de la proteína celular, tal y como se muestra en la fig. 5, cuantificada por densitometría como se describió en Material y Métodos inciso (3.3.4). Este es un valor aceptable para un gene heterólogo, ya que el promedio reportado fluctúa entre 5 % y 6 % con respecto al total de las proteínas celulares para *Escherichia coli*.<sup>17</sup> Sin embargo, es importante mencionar que la cantidad de masa celular final alcanzada en estos experimentos fue apenas en promedio de 0.12 g/l en términos de peso seco probablemente por limitación de nutrientes en el medio. Lo anterior indica que ésta no es una estrategia de producción eficiente.

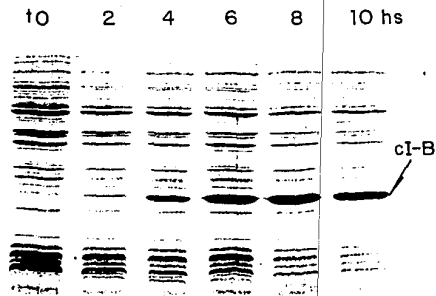


fig. 5.Inducción con (AIA) del gene híbrido y producción en la cepa W3110 trp<sup>-</sup> (pNF21B).

#### 5.4- Cultivo tipo lote e inducción del sistema recombinante W3110 trp<sup>-</sup> (pNF21B) en medio M-9.

Una vez establecida la metodología en matraz, era deseable que este proceso se pudiera reproducir a nivel de 10 litros, por lo que fue necesario estudiar el comportamiento de la cepa de producción, bajo distintas condiciones de crecimiento en fermentador.

Primeramente se decidió hacer los estudios necesarios en fermentador a nivel de un litro, para obtener parámetros medibles como pH, aereación, temperatura y velocidad específica de crecimiento y, así, poder determinar la productividad máxima del cultivo en condiciones determinadas.

Los primeros ensayos se hicieron en un fermentador New Brunswick Sc. modelo Multi-Gen, con un volumen de trabajo de 1.0 lt.

El inóculo se preparó en un matraz Fernbach de 1.8 lt, con un volumen de 200 de medio M9 inoculado a partir de una colonia recién transformada al que se le añadió ampicilina en una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , y 1  $\mu\text{g/ml}$  de L-triptofano. Estapreparación se incubó a 37°C durante 14 horas, a 200 rpm.

Al medio M9 del fermentador se le agregó 100  $\mu\text{g/ml}$  y 20  $\mu\text{g/ml}$  de Ampicilina y (AIA) respectivamente, además de los nutrientes.

Con el fin de encontrar el valor del pH en el cual la cepa de producción seleccionada presentara el mejor crecimiento se hicieron cultivos ajustando en cada caso el pH a los valores siguientes: 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 a una temperatura de 37°C que es óptima para el crecimiento de *Escherichia coli*.<sup>18</sup>

Durante el estudio anterior se observó que el valor de pH en el cual creció mejor la cepa *W3110 trp* fue de 7.5, valor muy cercano al reportado por otros autores, como se observa en la figura 6. Aunque en esta figura no aparecen las cinéticas correspondientes a cada uno de los valores de pH ensayados, si se muestra la cinética entre los valores que se observa una separación mayor de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

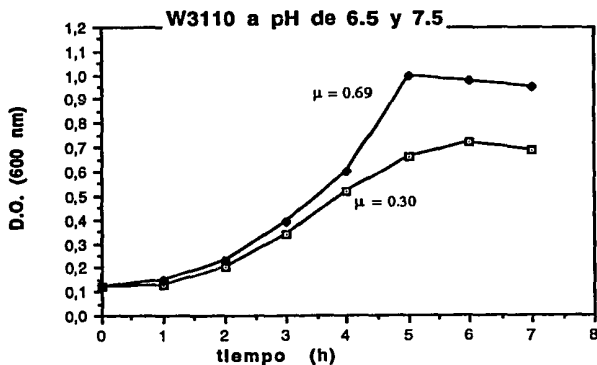


fig. 6 efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa de trabajo W3110.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), se estableció en función de la mayor concentración de proteína híbrida cI cadena-B por gramo de biomasa obtenida a diferentes velocidades específica de crecimiento. Para determinar lo anterior se realizó un barrido de la velocidad de agitación rpm, manteniendo el flujo de aire en 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm).

En la fig. 7 se muestra dicha relación promedio (dos experimentos) a una temperatura de 37°C y un pH de 7.5, para cultivo tipo lote (1.0 lt) en medio M9.

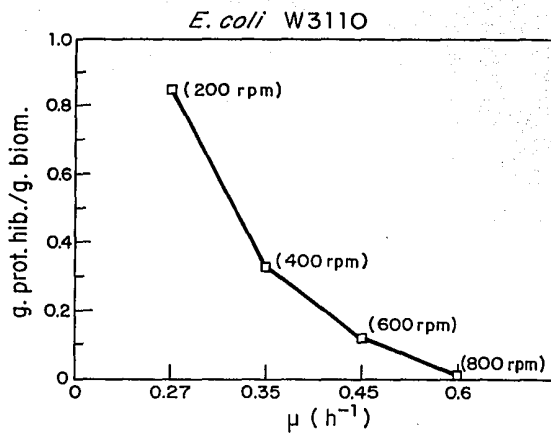


fig. 7 relación protefna hbrida/biomasa a diferentes ( $\mu$ )

Del resultado anterior, se observó que el nivel mayor de protefna hbrida corresponde a la velocidad específica de crecimiento mas baja. Los resultados anteriores graficados se muestran en la tabla 2.



**Tabla 2****Producción de proteína híbrida cI-cadena B a diferentes velocidades de agitación \***

(rpm)	200	400	600
<b>Biomasa (mg/l)</b>	<b>600</b>	<b>640</b>	<b>700</b>
<b>Proteína híbrida (mg/l)</b>	<b>120</b>	<b>43</b>	<b>23</b>
<b>Proteína híbrida total (%)</b>	<b>20</b>	<b>6.7</b>	<b>3.3</b>
<b>Productividad (mg/l-h)</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

**tiempo de fermentación 12 h**

**\* A 37°C, pH= 7.5 en fermentador con 1 lt de medio**

Los parámetros de trabajo seleccionados para posteriores experimentos que se derivaron del resultado anterior para la producción de la proteína cI-cadena "B", fueron aquéllos donde se obtuvo una mayor cantidad de proteína híbrida, estos parámetros fueron los siguientes:

<b>Temperatura</b>	-----	<b>37°C.</b>
<b>pH</b>	-----	<b>7.5</b>
<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	-----	<b>0.27</b>
<b>rpm</b>	-----	<b>200</b>

Se pudo apreciar también que en todas las fermentaciones realizadas, la mayor concentración de proteína híbrida se acumuló en las primeras 4 horas, donde la velocidad específica de crecimiento tiene valores por debajo de 0.3 h<sup>-1</sup> y, que cuando el tiempo de fermentación se prolongó más allá de 10 horas, esta banda de proteína híbrida decrece.

Una posible explicación pudiera ser que al no controlarse la velocidad específica de crecimiento, se incrementa la tasa de segregación del plásmido, y que la cantidad de células no productoras aumentan a una velocidad mayor que las productoras, a lo largo de la fermentación, por lo tanto, la cantidad de la proteína híbrida se va diluyendo conforme pasa el tiempo según muestra la fig. 8.

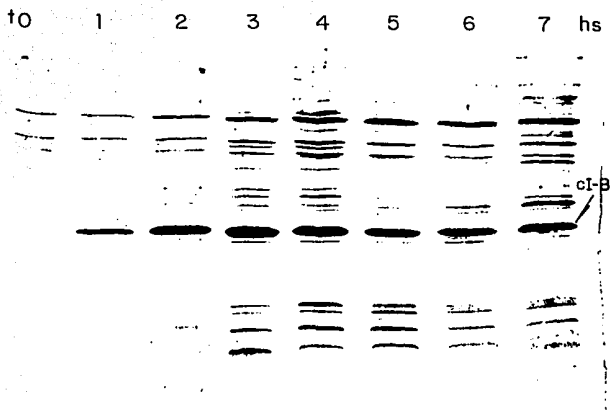


fig. 8. Producción de la proteína híbrida cI-B en medio M9 a diferentes tiempos de cultivo.

### 5.5 -Cultivo tipo lote, con medio FEM en fermentador de 10 litros

Una vez establecidos los parámetros de trabajo a escala de 1 lt, se analizó la posibilidad de incrementar la concentración celular y llevar el proceso a 10 litros.

Debe tenerse en mente en este escalamiento que, al aumentar la concentración celular puede disminuir la concentración de proteína híbrida cI-cadena B, ya que el número de generaciones es mayor y por lo tanto también se incrementa la segregación del plásmido.

Para ésto, desarrollamos los medios de INO y FEM (ver capítulo 4, Materiales y Métodos), como medio para cultivos de alta densidad celular. Lo primero que se hizo fue intentar reproducir a 10 litros, el nivel de inducción obtenido anteriormente en fermentaciones de un litro en medio M9, utilizando para este fin, los medios INO y FEM.

La cantidad de las fuentes de carbono y nitrógeno se calcularon para obtener una concentración celular de 20 g/l peso seco. Lograr una biomasa de al menos esta concentración, fue elemento indispensable para pretender desarrollar un proceso escalable y rentable; esto se deriva de un estudio de factibilidad realizado en el laboratorio, para la producción de insulina humana.<sup>8</sup>

Además el rendimiento fijado fue de 0.3, valor intermedio de los reportados por la literatura para *Escherichia coli*.

El trabajo se inició definiendo primeramente las condiciones de preparación del inóculo, para lo cual se seleccionaron el tiempo y la temperatura de incubación de este inóculo. Para ello, se midieron el número de colonias presentes a diferentes intervalos de tiempo durante la fermentación, que se realizó a dos temperaturas y en tres intervalos de tiempo, tal como se como se observa en la tabla 3.

**TABLA 3****Porcentaje de células resistentes a Ampicilina en el inóculo**

Temp.	tiempo		
	0 h	7 h	14 h
30°C	100%	100%	98-100 %
37°C	100%	95%	85-90 %

**Biomasa final en ambos casos 0.67 g/l.**

**Matraz agitado (200 rpm) con 1 lt de medio INO.**

Del estudio realizado, se seleccionaron los siguientes parámetros para el desarrollo del inóculo: Temperatura 30°C, tiempo 14 hs, velocidad de agitación 200 rpm.

Es importante señalar que la preparación del inóculo juega un papel determinante dentro del desarrollo de un proceso fermentativo, principalmente si se manejan microorganismos recombinantes, donde la posibilidad de fracaso depende principalmente de la relación que guarde la población de células segregantes con respecto a las no segregantes. Esta segregación del plásmido durante el proceso fermentativo puede ser multifactorial; sin embargo, uno de los factores más determinantes de este fenómeno es la velocidad de crecimiento celular, que si es superior a  $0.3 \text{ h}^{-1}$  generará cultivos donde haya un alto % de segregantes.

La jarra del fermentador, contenía 7 litros de medio FEM a un pH de 7.5. También se añadió ampicilina y L-triptofano a la misma concentración señalada en los párrafos

anteriores, además del inductor (AIA) a una concentración de 40  $\mu\text{g/ml}$ . La aereación se fijó en 1 volumen de aire por volumen de medio/min (vvm).

La velocidad de agitación se ajustó durante la fermentación, para mantener una concentración de oxígeno disuelto en el medio, mayor o igual a 20 % para no limitar el crecimiento microbiano por este nutriente.

Se tomaron muestras cada dos horas para medir la concentración celular y cuantificar glucosa y L-triptofano por los métodos ya descritos.

Primeramente se ensayaron cultivos tipo lote con y sin el inductor químico (AIA). Analizando los resultados después de varias fermentaciones, se encontraron dos hechos sobresalientes, para ambos casos: a) se produjo por primera vez, una biomasa superior 12.0 g/l a la encontrada tanto en matraz, como en fermentador de 1 litro en medio M9. ver fig 9 y tabla 4 b) la inducción del promotor de triptofano se logró aún en presencia de triptofano y sin la adición del inductor químico.

Cabe señalar sin embargo que la cantidad de biomasa producida fue 35 % inferior a la biomasa calculada teóricamente, y que el nivel de proteína híbrida también resultó inferior al observado en los ensayos en matraz, tal como muestra la tabla 4.

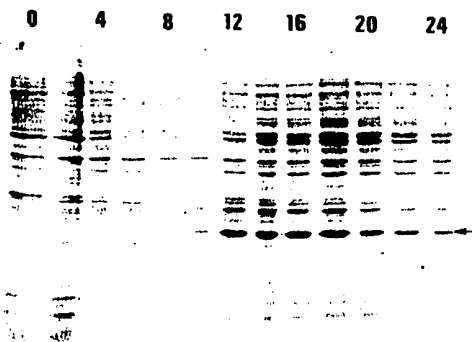


fig. 9. Producción de proteína híbrida cI-B en cultivo tipo lote sin inductor químico a diferentes tiempos

**TABLA 4**

**Resultado de 3 fermentaciones tipo lote a 10 lt en medio FEM**

Biomasa (g/l) -----	12.00
$Y_c$ -----	0.30
$(\mu)$ (h <sup>-1</sup> ) -----	0.31
Proteína híbrida. (g/l) - - - -	0.39
Cuentas viables.(%) Amp <sup>r</sup> - - -	32.0
Productividad.(g/l-h.)- - - - -	0.03
tiempo de fermentación (h) - - -	24

### **5.6-Efecto de restringir la $\mu$ utilizando temperatura baja en el fermentador**

Al igual que todos los microorganismos, *Escherchia coli* tiene una temperatura "óptima" de crecimiento en donde crece muy eficientemente, aunque segrega plásmidos, como ya se mencionó anteriormente. En este caso fue interesante determinar si temperaturas inferiores a 37°C afectan el nivel de segregación de plásmido, ya que al disminuir el metabolismo bacteriano se disminuye la velocidad específica de crecimiento. Este proceso pudiera entonces permitir incrementar el nivel de proteína híbrida sin que la bacteria estuviera limitada por algún nutriente como oxígeno o glucosa.



Las temperaturas a las cuales se hicieron los cultivos fueron las siguientes: 20, 25, 30 y 37 °C. El resultado fue el que se señala en la tabla 5.

**Tabla 5**

**Efecto de la temperatura sobre la producción de la proteína híbrida cI-B en cultivo tipo lote \***

	20°C	25°C	30°C	37°C
<b>Biomasa (g/l)</b>	8.00	9.50	11.00	12.00
<b>Tiempo de fermentación (h)</b>	64.00	40.00	16.00	14.00
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.09	0.12	0.13	0.31
<b>Y<sub>c</sub></b>	0.06	0.12	0.18	0.21
<b>Proteína híbrida (mg/l)</b>	0.00	430	500	340
<b>Proteína híbrida total (%)</b>	0.00	4.52	4.54	2.83
<b>Cuentas viables (%)</b>	0.00	5.00	98.0	70.0
<b>Productividad hib. (mg/l.h)</b>	0	10	30	36

\* pH = 7.5 controlado, aereación > al 20 %.

Como puede observarse en la tabla 5, la temperatura de incubación afecta la tasa de crecimiento, pues influye en las reacciones celulares. En suma, la temperatura puede afectar la actividad metabólica, los requerimientos celulares y la composición celular

bacteriana. Para tener una idea más clara del efecto de la temperatura sobre el metabolismo celular, señalaré que en estudios realizados en *Escherichia coli* a 8°C se requirieron 24 horas para obtener una generación. En cambio, a la temperatura óptima, tan sólo bastaron 21 minutos.<sup>20</sup>

Al analizar la tabla 5, nos encontramos sin embargo con algunos resultados no esperados como la concentración de proteína híbrida y el nivel de cuentas viables, que hasta cierto punto contradicen lo postulado antes cuando se señaló que a  $\mu$  bajas correspondían tasas de segregación menores. No obstante, se debe tomar en cuenta que existen reportes en la literatura que señalan que *Escherichia coli* en estado de "estrés," ocasionado también por la baja temperatura, presenta segregación del plásmido, posiblemente para aliviar una carga extra metabólica. Esta podría ser una razón por la cual a 20°C no se encontró población resistente al antibiótico, y por ende no hubo producción de proteína híbrida.

Por otro lado, se aprecia también en la misma tabla 5, que 30°C es la temperatura a la cual tenemos el mayor porcentaje de células resistentes al antibiótico (cuentas viables), así como la mayor concentración de proteína híbrida; pero al compararlo con el cultivo a 37°C, este último tiene una productividad ligeramente mayor que todos los cultivos realizados a temperaturas inferiores, por lo que se considera que para este caso en particular bajar la temperatura no es la mejor estrategia para modular la ( $\mu$ ) y disminuir el nivel de segregantes.

### **5.7.-Producción de la proteína híbrida cI-B mediante el control de la velocidad específica de crecimiento, por restricción de nutrientes: cultivo tipo lote alimentado.**

De acuerdo con resultados anteriores se pensó en modificar la estrategia para controlar la velocidad específica de crecimiento. Por ello se decidió en controlar la concentración de nutrientes en el medio de cultivo a través del uso de cultivos tipo lote alimentado .

La estructuración de este tipo de cultivo se realizó en términos generales igual que para el cultivo tipo lote.

La diferencia fundamental estriba en que la glucosa y el amonio (fuente de nitrógeno) se adicionan mediante una bomba, en la cual la tasa de alimentación se determinó en función a la biomasa nueva que se generaría a una  $\mu = 0.2 \text{ h}^{-1}$ .

La composición de los medios y las condiciones de trabajo fueron realizadas como se reportan en el artículo: Recombinant protein production in cultures of and *Escherichia coli trp<sup>-</sup>* strain. Gosset *et al*<sup>1</sup>

En la fig 10 se muestra un esquema general de como se preparó este tipo de cultivo.

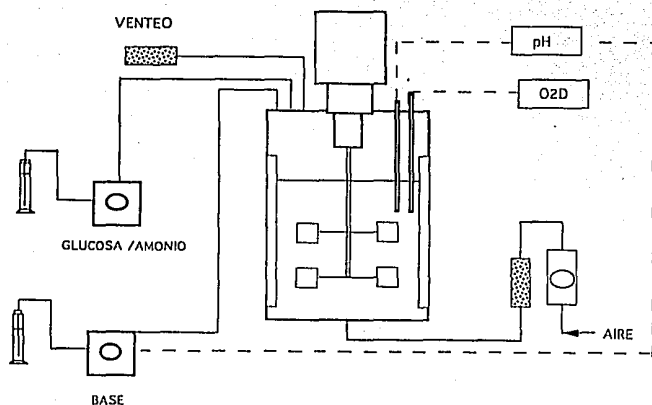


fig. 10. Implementación del cultivo tipo lote alimentado.

\* Cultivo a 37°C, pH = 7.5, O<sub>2</sub> disuelto > del 20 %.

Utilizando este método se pudo lograr un incremento del nivel de proteína híbrida porcentual, con respecto al cultivo tipo lote en medio FEM. (fig 11B), la biomasa final obtenida en el cultivo fue igual a la calculada teóricamente, como se observa en la cinética de crecimiento microbiano (fig 11A) donde también se muestra la cantidad de triptofano remanente en el medio.

figura 11B, corresponde a una electroforesis de proteínas totales donde se aplicaron muestras del cultivo a intervalos de tiempo de cada 2 h a partir del momento de inoculación del fermentador ( $t_0$ ). La proteína híbrida cI-cadena B es señalada por una flecha.

La fig 11A nos muestra diferentes parámetros que fueron medidos durante el período de fermentación, tales como el porcentaje de células portadoras de plásmido resistentes a la ampicilina (línea discontinua), al cabo de 24 horas de cultivo. También observamos como se acumula el aminoácido L-triptofano durante las primeras 6 a 7 h del cultivo (cuadros vacíos) debido a las adiciones periódicas señaladas en la gráfica por flechas, disminuyendo éste a medida que la biomasa se incrementa (esferas vacías) ya que la cepa W3110 es auxótrofa a triptofano, el cambio de pendiente en la curva del triptofano remanente en el medio coincide con la visualización inicial de la proteína híbrida cI-cadena B (cuadros llenos) que se va incrementando a lo largo de la fermentación.

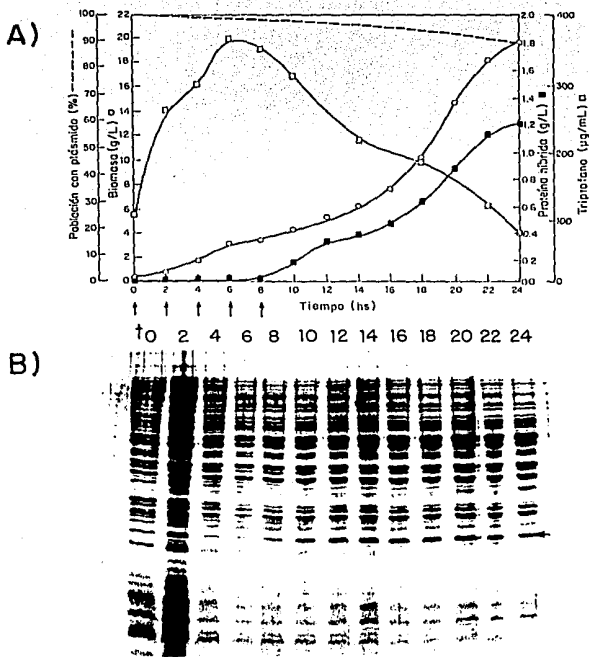


fig 11. Crecimiento e inducción de la cepa *W3110 trp<sup>-</sup>* en cultivo tipo lote alimentado.

\* Cultivo a 47 °C, pH= 7,5, aireación mayor del 20 %

**Tabla 6 Comparación de los cultivos lote y lote  
alimentado en medio FEM**

		<b>Lote</b>	<b>Lote alimentado</b>
<b>Biomasa</b>	<b>(g/l)</b>	<b>12.00</b>	<b>20.00</b>
<b>(<math>\mu</math>)</b>	<b>(h<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.30</b>	<b>0.14</b>
<b>Y<sub>c</sub></b>		<b>0.21</b>	<b>0.32</b>
<b>Proteína híbrida</b>	<b>(mg/l)</b>	<b>530</b>	<b>1210</b>
<b>Proteína híbrida total</b>	<b>(%)</b>	<b>4.41</b>	<b>6.0</b>
<b>Cuentas viables</b>	<b>(%)</b>	<b>62</b>	<b>90</b>
<b>Productividad de prot. hib.</b>	<b>(mg/l-h)</b>	<b>22</b>	<b>50</b>
<b>tiempo de fermentación</b>	<b>(h)</b>	<b>24</b>	<b>24</b>

Una de las principales ventajas que ofrece el cultivo tipo alimentado comparado con el cultivo lote, (ver tabla 6) es la capacidad que se tiene de poder modular la velocidad específica de crecimiento con lo cual se disminuye la demanda de oxígeno del microorganismo, la producción de metabolitos inhibidores del crecimiento como el ácido acético principalmente y se reduce también la pérdida de plásmido.

Como consecuencia de lo anterior se pueden lograr concentraciones celulares altas, dada la tasa baja de crecimiento celular, y una productividad mayor.

Manejar la velocidad específica de crecimiento, permite también modular la segregación plasmídica, ya que este problema representa un peligro potencial para generar una baja productividad, sobre todo cuando se trata de cultivos de alta densidad celular.

Se han reportado diferentes estrategias para modular la velocidad específica de crecimiento. En nuestro caso la vía utilizada fue limitar el crecimiento microbiano mediante la adición controlada de la fuente de carbono, esta metodología es fácil de implementar.

Por otro lado, la inducción del promotor de triptofano se produjo en la cepa *W3110 trp<sup>-</sup>* sin la adición del inductor químico, tanto en el cultivo lote, como en el cultivo lote alimentado. Este dato fue sorprendente; al parecer, la concentración del represor intracelular (L-triptofano) en las fases finales del cultivo no tiene un efecto de represión sobre la inducción. Dado las condiciones de crecimiento establecidas, se pudiera incrementar el número de copias del plásmido y por ende presentarse el fenómeno denominado "titulación del represor".<sup>22</sup> Sin embargo, cuando se agregó L-triptofano por arriba de 300 a 400  $\mu\text{g/ml}$  se observó un retraso en el inicio de la inducción.



## **5.8.- Efecto de la velocidad de crecimiento sobre la producción de biomasa y proteína híbrida**

### **5.8.1-Velocidad específica de crecimiento**

Dentro de los experimentos realizados en este estudio tendientes a encontrar la relación que guarda la producción de proteína híbrida, cuando se modifica la velocidad específica de crecimiento en la cepa seleccionada, se encontró que a menor ( $\mu$ ) hasta un cierto rango generalmente hay mayor nivel de híbrido, ver figura 7.

Se ha reportado, que la cantidad de copias de plásmido es inversamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento del microorganismo.<sup>23</sup>

Debe mencionarse que en el estudio mencionado con anterioridad se incluye al *pBR322* y que el plásmido objeto del presente trabajo es derivado de este plásmido, el cual cuenta con un número de copias que oscila entre 20 y 30, por lo que si comparamos el comportamiento del *pNF21B*, con el *pBR322* muy probablemente se comporte de la misma manera.

Por otro lado, si se mantiene una velocidad específica de crecimiento en términos generales constante, se menciona que aún bajo esta característica existe segregación plasmídica.<sup>24</sup> La velocidad específica de crecimiento con la que se trabajó (0.2 h<sup>-1</sup>), permite mantener un nivel de segregación plasmídica en cultivo lote alimentado de alrededor de un 10 %, en un tiempo de fermentación de 24 horas.

### **5.9.-Transferencia del alelo *trp*<sup>+</sup> a la cepa *W3110 trp*<sup>-</sup>**

Se decidió construir una cepa derivada *trp*<sup>+</sup> de la *W3110 trp*<sup>-</sup> con la que se había venido trabajando mediante una transducción generalizada con el fago *PI* para determinar si en una cepa isogénica *trp*<sup>+</sup> no pudiera haber el mismo tipo de inducción del promotor de *trp* observada en la isogénica *trp*<sup>-</sup>.

### **5.10.-Producción de biomasa y proteína híbrida, en la cepa**

#### ***Escherichia coli W3110 trp*<sup>+</sup>**

Una vez construida la cepa *W3110 trp*<sup>+</sup>, que de ahora en adelante se denominará *PB10*, resultó interesante compararla con la cepa con la que se estuvo trabajando *W3110 trp*<sup>-</sup>; para esto, se hicieron varias fermentaciones tipo lote alimentado en fermentadores de 10 litros.

Como resultado de esto se encontró que la velocidad específica de crecimiento de las dos cepas con y sin triptofano en el medio, no presentó diferencia significativa; sin embargo, el nivel de proteína híbrida fue mayor en la cepa *PB10*, tal y como se observa en la tabla 7.

Un hecho notable fue que en los cultivos con la cepa *PB10* a los cuales se les agregó triptofano, se advirtió un retraso en el inicio de la inducción, a diferencia de aquellos cultivos realizados con la cepa auxótrofa a triptofano.

**TABLA 7**

**Comparación entre las cepas isogénicas W3110 trp<sup>-</sup> y trp<sup>+</sup> en cultivo tipo lote a 10 lt.**

		<b>W3110 trp<sup>-</sup> *</b>	<b>PB10 **</b>
<b>Biomasa</b>	(g/l)	<b>20.00</b>	<b>20.00</b>
( $\mu$ )	(h <sup>-1</sup> )	<b>0.11</b>	<b>0.10</b>
<b>Y<sub>c</sub></b>		<b>0.28</b>	<b>0.31</b>
<b>Proteína híbrida</b>	(g/l)	<b>0.88</b>	<b>1.10</b>
<b>Proteína híbrida total (%)</b>		<b>4.4</b>	<b>5.5</b>
<b>Cuentas viables</b>	(%)	<b>87.0</b>	<b>90.0</b>
<b>tiempo de fermentación (h)</b>		<b>24</b>	<b>24</b>
<b>Productividad de hīb.</b>	(mg/l.h)	<b>30</b>	<b>40</b>

\* Cultivo a 37°C, pH = 7.5 y con triptofano en el medio

\*\* Cultivo a 37°C, pH = 7.5 y sin triptofano en el medio

Un hecho sobresaliente fue que la cepa de *Escherichia coli* **PB10** resultó ser una cepa muy adecuada para la expresión de diversos genes bajo el promotor de triptofano tales como aquéllos que codifican para proteínas híbridas que llevan las cadenas A y B de la insulina humana, la hormona de crecimiento, proinsulina y varias proteínas de rotavirus, entre otras ver fig 12.

Debe remarcarse que trabajar con la cepa *PB10* ofrece ventajas al no necesitarse triptofano exógeno para crecer ya que esto, disminuye el riesgo de contaminación por manipulación y es mas económico. En la siguiente figura se muestra un gel de acrilamida-SDS al 15 % donde se muestra la inducción de varios genes en las dos cepas *trp*<sup>-</sup> y *trp*<sup>+</sup>.

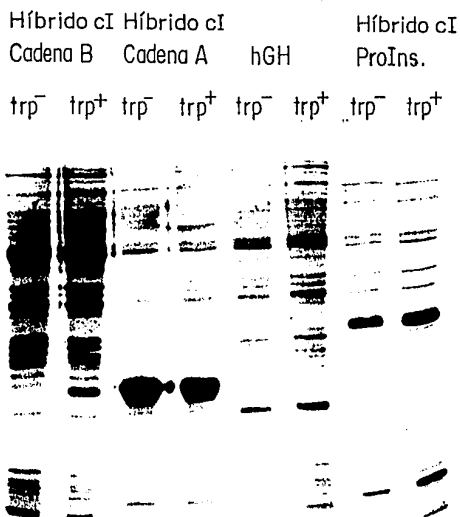


Fig. 12. Inducción de la cepa *W3110 trp*<sup>-</sup> y *PB10* con diversos genes.

Finalmente es importante enfatizar que el costo de producción al no agregar L-triptofano al medio, disminuye en 6 %, como se observa en la fig. 13.

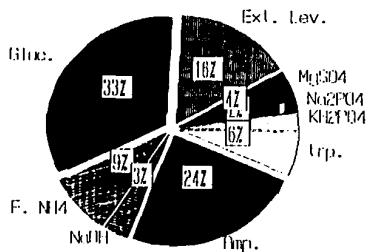


Fig. 13. Costo de los ingredientes del medio FEM en (%)

### 5.11.-Producción de la proteína híbrida cI-cadena "A" mediante la metodología desarrollada para la proteína híbrida cI-cadena B

Se analizó el comportamiento del gene clonado híbrido cI-A presente en el plásmido *pNF21A* y su expresión bajo el promotor de *trp*, mediante la estrategia de producción de la proteína híbrida *cI-B*.

Realizado el cultivo lote alimentado y analizado los datos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8**

**Cultivo lote alimentado para la expresión de la proteína híbrida cI-cadena A en la cepa W3110 *trp*-(*pNF21A*).**

<b>Biomasa</b>	<b>(g/l)</b>	<b>-----</b>	<b>21.00</b>
<b>Cuentas Viables</b>	<b>(%)</b>	<b>-----</b>	<b>85.00</b>
<b><math>\mu</math></b>	<b>(h<sup>-1</sup>)</b>	<b>-----</b>	<b>0.13</b>
<b>Proteína híbrida</b>	<b>(mg/l)</b>	<b>-----</b>	<b>0.80</b>
<b>Proteína híbrida total</b>	<b>(%)</b>	<b>-----</b>	<b>3.8</b>
<b>Productividad</b>	<b>(mg/l.h)</b>	<b>-----</b>	<b>30</b>

Al analizar los resultados de la expresión de este sistema surgieron datos no esperados: no se esperaba que el inicio de la inducción del gene híbrido ocurriera desde el principio de la fermentación, y que el nivel de la proteína híbrida tuviera un pico máximo entre las 9 y las 10 horas, tal y como se observa en la fig. 14.

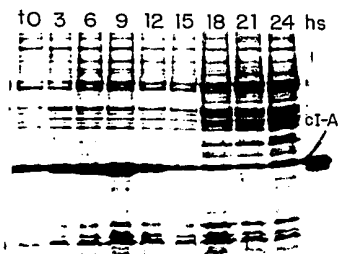


Fig. 14. Inducción del gene híbrido que codifica para la proteína híbrida cI-A en la cepa W3110 *trp*-(pNF21A)

Estos hallazgos sugieren que al comparar el híbrido cI-B, contra la proteína cI-A esta última pudiera ser mas estable y por lo tanto se acumula mas rápidamente. Como consecuencia, se genera en la célula una sobrecarga metabólica por la acumulación de la proteína de origen heterólogo, por lo que la bacteria pierde plásmido desde el inicio y así probablemente alivia el exceso de la carga metabólica.

Desde el punto de vista fermentativo, no es fácil sugerir una estrategia para mantener la cantidad de híbrido constante. No obstante para este caso en particular, al suspender la fermentación entre 14 y 15 horas, fue posible recuperar una cantidad de proteína híbrida cI-A que duplicaba en este tiempo, la concentración del híbrido cI-"B" en 24 horas. Hay que resaltar una ventaja en este caso en particular el suspender el cultivo, en este tiempo ya que se tienen menos células con más híbrido intracelular lo que implica una mayor productividad específica.

#### **5.12- Producción de la proteína cI-cadena "A" en cultivo lote a 100 litros en la cepa W3110 trp-(pNF21A).**

De acuerdo con los datos logrados a 10 lt, se consideró interesante llevar a una escala mayor, a escala piloto, la producción de células productoras de cadena A. Primeramente se decidió el tamaño del inóculo (10 % del volumen nominal del reactor). A continuación, se realizaron estudios dirigidos a encontrar las condiciones de crecimiento para el inóculo para 100 litros.

Como resultado se estableció que la adición de 100 µg/ml de triptofano al medio de cultivo cada hora durante tres horas y media y una temperatura de 30°C, permitió mediante un cultivo alimentado truncado, reproducir la biomasa y las condiciones fisiológicas del inóculo utilizado en la fermentación de 10 litros.

El cultivo a 100 lt se desarrolló de igual manera que a 10 lt, es decir un cultivo lote interrumpido a las doce horas. Para esto se cuantificó la biomasa esperada y la demanda de oxígeno en el lapso de tiempo señalado, comprobando si el equipo era



suficiente para transferir la cantidad de oxígeno demandada.

El resultado fue el esperado, encontrándose una biomasa igual y una inducción equiparable a la obtenida en el cultivo de 10 litros, como se observa en la figura 15.

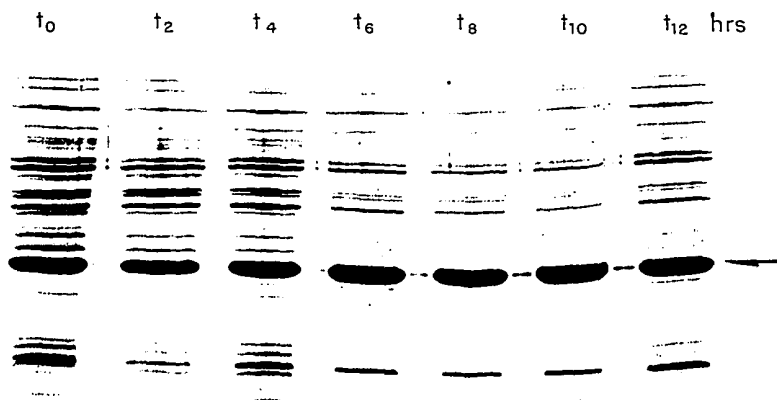


fig. 15. Inducción de la proteína híbrida cI-A en una fermentación de 100 lt en la cepa *W3110 trp(pNF21A)*.

## 6 CONCLUSIONES.

El presente trabajo fue encaminado a desarrollar condiciones de fermentación y escalamiento en cepas con plásmidos recombinantes. Se pretendió entender y resolver problemas específicos del sistema cepa-plásmido, es decir, el comportamiento y la relación que guardan entre sí, durante el crecimiento microbiano y la síntesis de las proteínas híbridas cI-cadena A y B, de la insulina humana.

Debe entenderse que para desarrollar una tecnología en un proceso fermentativo o alcanzar su optimización con fines de producción, el trabajo debe estructurarse cuidadosamente, teniendo una visión amplia de todos los factores que en él influyen: como el tipo de cepa, vector, condiciones y medios de crecimiento principalmente.

En este sentido, dentro de los estudios realizados durante este trabajo, se puede concluir lo siguiente: En cuanto a la cepa de trabajo, resulta bastante difícil encontrar en la naturaleza la cepa ideal como tal. Por lo tanto, se debe generar una cepa mediante técnicas de genética clásica, que se acerque lo más posible al hospedero multipropósito, en el cual se puedan expresar una gran variedad de genes. La cepa **PB10** construida en el laboratorio resultó una cepa idónea para la expresión de diversos genes y la concomitante disminución del costo del proceso.

Por otro lado, de las fermentaciones ensayadas en este estudio tanto en matraz como a nivel de 10 litros, se puede concluir que la mejor estrategia para producir la proteína híbrida cI-cadena "B" fue el cultivo tipo lote alimentado, donde se moduló la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) por la adición de glucosa, ya que bajo este sistema se alcanzó la mayor productividad, tal y como se observa en la tabla 9.

**TABLA 9**

**COMPARACION DE LA PRODUCCION Y PRODUCTIVIDAD EN LOS  
DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS REALIZADOS PARA CADENA B**

<b>Tipo de cultivo</b>	<b>C. en matraz</b>	<b>C. lote</b>	<b>C. lote Alimentado.</b>
	<b>20 ml.</b>	<b>10 lt</b>	<b>10 lt</b>
<b><math>\mu</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.27</b>	<b>0.31</b>	<b>0.14</b>
<b>Producción de biomasa (g/l)</b>	<b>0.30</b>	<b>12.00</b>	<b>20.00</b>
<b>Productividad de proteína híbrida (mg/l.h)</b>	<b>8</b>	<b>470</b>	<b>800</b>
<b>Proteín a híbrida total (%)</b>	<b>2.66</b>	<b>3.9</b>	<b>4.0</b>

En cuanto a los resultados obtenidos, cabe señalar que:

1.- Se establecieron condiciones de fermentación a 10 lt en cultivo lote alimentado que permitieron alcanzar del orden de 20 g/lt de biomasa en los cuales la productividad del híbrido fue de 0.80 que fue el doble de lo alcanzado en cultivo tipo lote.

2.- El estudio realizado para inóculo permitió establecer condiciones que hicieron posible disminuir el nivel de segregación de plásmido en un 30 %.

3.- En cuanto a la conservación de las cepas, el hecho de transformar a la cepa y liofilizarla permitió que:

a) se redujera el tiempo de preparación del inóculo, de tal manera que para hacer 24 fermentaciones anuales se invierte un día. De lo contrario se tendría que invertir en total 24 días para el mismo número de fermentaciones.

b) Debido a este hecho es posible aumentar la reproducibilidad del inóculo y por ende de la fermentación.

4.- En cuanto al uso de cepas *trp-* vs *trp+* para la producción de la proteína híbrida *cI-cadena B*, se pudo incrementar la biomasa con el uso de la cepa *PB10*.

Otro resultado aunado al anterior es que se disminuyó el costo de producción en un 6 % por tan solo el no agregar triptofano al medio, además se redujo el riesgo de contaminación del cultivo por manipulación.

5.- Tanto el incremento de biomasa como en la proteína híbrida señalados en la tabla 9, fueron el resultado del esfuerzo encaminado a la manipulación de la velocidad específica de crecimiento que nos permitió la reducción en el número de segregantes con la posibilidad de lograr una mayor concentración celular por unidad de volumen.

6.- Con estos resultados se pudieron implementar condiciones de fermentación a 10 lt para *cI-A*, que permitieron adecuar el cultivo a las características específicas de esta proteína híbrida.

7.- De los resultados anteriores para la protefna hbrida cI-A a 10 lt permitieron que el cultivo se escalara a 100 lt donde se obtuvo una concentracion de protefna hbrida superior a cI-cadena-B.

A continuacion se muestra una metodologfa, que resume de manera secuencial los pasos que permitieron optimizar la expresion de la cadena "B" de la insulina humana recombinante, con lo cual se cumple el principal objetivo de este estudio fig. 16.

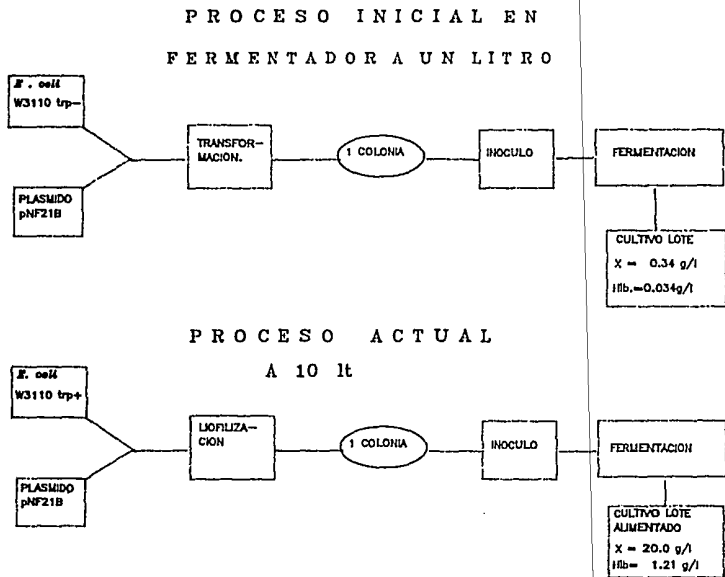


fig. 16 proceso fermentativo para la obtención de la protefna hbrida cI-B

Por último se debe señalar que en un proceso fermentativo, confluyen una gran variedad de factores físicos y biológicos que afectan de distinta manera el resultado final del proceso siendo, algunos, determinantes en el éxito o en el fracaso del mismo. Dentro de estos factores biológicos, se encuentran principalmente la segregación del plásmido, el control sobre la inducción de genes (regulación de promotor) y la estabilidad de la cepa de producción. Sin embargo, si se instrumenta al máximo los procesos fermentativos, se podrá generar un mayor conocimiento sobre el comportamiento del sistema cepa-plásmido y por ende un mayor control sobre los factores señalados anteriormente, alcanzando un mayor éxito.

No se puede finalizar sin antes mencionar que en todo proceso fermentativo siempre queda la posibilidad de mejorarlo. Este estudio no es la excepción.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- P.K.R. Kumar, H-E Maschke, K. Friehs and K. Schügerl. **Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.** TIBTECH August (Vol 9) pp. 279-284. 1991.
- 2.-Morrow, J. F., Cohen, S. N., Chang A. C., Boyer H. W., Goodman H. M. y Helling, R. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 71, 1743 (1974).
- 3.-Itakura, S., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. y Boyer, H. W. Science, Vol. 198, 1056 (1977).
- 4.-Antebi, E. y Fishlock, D. Biotechnology. The MIT Press. 1986.
- 5- Vander-Sherman-Luciano. **Fisiología humana.** pp 311-312. Mc.Graw-Hill 1975.
- 6- Hellmut Mehnert, Harold Foster. **Enfermedades del metabolismo.** pp 158-160. Salvat ditores, S. A. (1977).
- 7.-Banting, F.G. and Best C. H. Pancreatic extracts in treatment of Diebetes Mellitus. Canadian Medical Association Journal. vol. 12 pp. 144, 1922.  
Goberna, R. **Cómo se segrega la Insulina.** Investigación y Ciencia. Núm. 1, Junio, pp. 92-103 (1978).
- 8.-De la Rosa P. Luis Bernardo, Favela F. Rodrigo. **"Estudio de factibilidad de producción de insulina humana por medio de biotecnología a nivel industrial con el uso de la tecnología UNAM."** (I.B.T.) Tesis mancomunada para obtener el grado de Ingeniero Químico, UNAM, (1989).

- 9.-Ullrich, A. et al. **Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequence** Science, vol.196, pp. 1313 (1977).
- 10.-Villa-Komaroff, L. et al. **Bacterial clone synthesizing proinsulin** Proceeding of the National Academy of Science (EUA). Vol.75 pp 3727, (1978).
- 11.-Goberna, R. **Investigación y Ciencia**, vol. 92 (1978).
- 12.-Flores, N.; de Anda, R.; Guereca, L.; Cruz, N.; Antonio, S.; Balbás, P.; Bolivar, F. y Valle, F. **A new expression vector for the production of fused proteins in *Escherichia coli***. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 25, pp 26 (1986).
- 13.-Daniel G. Yansura and Denis J. Henner. **Use of *Escherichia coli trp* Promoter for Direct Expression of proteins**. Methods in Enzymology. vol. 185 Edited by David V. Goeddel. Academic Press. Inc. (1990).
- 14.-Bolivar, F., Rodríguez, R. L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S., **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system**. Gene, Vol. 2, pp. 95-113 (1977).
- 15.-J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. **Molecular Cloning**. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press . Vol.3: Appendix A.2. Bacterial Media, Antibiotics, and Bacterial Strains 1989.
- 16.-Shiloach, J. y Bauer, S. Biotechnol. **High-Yield growth of *E. coli* at different temperatures in a Bench scale fermentor**. Bioeng., Vol. 17, pp.227-239 (1975).



- 17.-Carrol JJ. Smith N, Babson A. **A colorimetric serum glucosa determination using hexokinasa and glucose-6-phosphate dehydrogenase.**  
Biochem. Med. Vol.4. pp.171, 1970.
- 18.-Neidhardt, I., Frederick C. ***Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*.** Vol. 2.pp. 1543-1548. (1991).
- 19.-Jaine-Ke Li and Arthur E. Humphrey. **Use of fluorometry for monitoring and control of a bioreactor.** Biotechnology and Bioengineering, Vol.37, pp. 1043-1049 (1991).
- 20.-Satish K. Sharma. **On the recovery of genetically engeered proteins from *Escherichia coli*.** Separation science and tecnology, vol. 21(8), pp 701-726, (1986).
- 21.-Costilow N. Ralph. **Biophysical factors in growth. Manual of Methods for General Bacteriology.** American Society for Microbiology. pp 70-71. Washington,DC. 1981.
- 22.-G. Gosset; R. de Anda; N. Cruz; A. Martfnez; R. Quintero and F. Bolivar. **Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli trp* strain.** Appl. Microbiol Biotechnol Vol.39 pp 541-546 (1993).
- 23.-Smith and Wood. **Molecular Biology and Biotechnology.** Edit. Chapman and Hall pp. 125-130, 1991.
- 24.-Jin-Ho Seo and James E. Bailey. **Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*.** Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVII, pp. 1668-1674 (1985).

25.-David K. Summers. **The kinetics of plasmid loss.** Tibtech vol.9 pp. 273-278  
(1991).

## 7 PUBLICACIONES

Los métodos desarrollados han permitido producir biomasa con híbridos de cadena-A y B de insulina humana, que se han utilizado para la purificación de estas cadenas. Todo lo anterior ha sido publicado en tres artículos de los cuales soy coautor.

### **Artículo 1:**

**1.-Recombinant protein production in cultures of an Escherichia coli trp- strain.**

G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez, R. Quintero y F. Bolívar. Appl Microbiol Biotechnol (1993) 39:541-546.

### **Artículo 2:**

**2.-Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in Escherichia coli.** N. Cruz, S. Antonio, R. de Anda, G. Gosset y F. Bolívar. 1990. Journal of Liquid Chromatography, 13:1517-1528.

### **Artículo 3:**

**Preparative isolation of recombinant human insulin A chain by ion exchange chromatography.** N. Cruz, M. López, G. Estrada, X. Alvarado, R. de Anda, P. Balbás,

G. Gosset y F. Bolívar. 1992. Journal of Liquid Chromatography, 15:2311-2324.

## Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli* *trp*<sup>-</sup> strain

G. Gosset, R. de Anda, N. Cruz, A. Martínez, R. Quintero, F. Bolívar

Departamentos de Biología Molecular y Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received: 27 August 1992/Accepted: 15 January 1993

**Abstract.** Fermentation conditions were developed in order to achieve simultaneously a high biomass concentration and high-level expression of a hybrid cl-human insulin B peptide gene. In our system, this hybrid gene is under control of the *Escherichia coli* *trp* promoter, in a *trp*<sup>-</sup> derivative strain of *E. coli* W3110. The dual role of tryptophan concentration on cellular growth and hybrid gene regulation was studied in 10-l batch fermentations. In the best batch conditions, a biomass concentration of 12 g dry weight/l can be obtained, and 0.53 g/l of cl-insulin B hybrid protein is produced. Tryptophan in the culture medium is consumed by the growing culture, until a level is reached that causes induction of the hybrid gene. Plasmid loss was detected, as only 62% of the cells retained the recombinant plasmid. In order to increase the hybrid protein production level, a fed-batch culture strategy was developed whereby the specific growth rate of the cells was restrained. Using the same amount of nutrients as in the batch fermentations, it was possible to increase the final biomass concentration to 20 g/l, plasmid-bearing cells in the population to 90% and recombinant hybrid protein to 1.21 g/l.

### Introduction

Recombinant DNA technology has permitted the development of microorganisms with improved or new biosynthetic capabilities and a clear example is the production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. However, laboratory-scale procedures are generally not applicable to a larger scale and, therefore, specific production strategies must be developed.

There are three main factors that may influence the productivity of a particular recombinant fermentation: plasmid stability, induction of the specific gene(s) and final biomass concentration. These factors have a limit imposed by the genetic characteristics of the recombinant plasmid and the bacterial host; however, they can

be optimized by the manipulation of the culture conditions (Zabriskie and Arcuri 1986).

Several strategies can be followed to favour the growth of plasmid-bearing cells over the ones that have lost the plasmid, and one of them is the use of selective methods for plasmid maintenance, such as antibiotic resistance. This strategy alone, however, may not be sufficient for the maintenance of a pure plasmid-bearing population (Pierce and Gutteridge 1985). Another strategy is the reduction of the cellular specific growth rate ( $\mu$ ), which generally increases plasmid copy number, and therefore a reduction in the frequency of appearance of plasmid-less cells (Koizumi et al. 1985; Seo and Bailey 1985, 1986; Lee et al. 1989).

In *Escherichia coli*, the tryptophan operon regulatory region has been widely used for heterologous gene expression, since it possesses a strong promoter that exhibits a low basal expression level under repression conditions. The culture strategy commonly employed to achieve an adequate induction for this promoter, consists of maintaining repression until the late logarithmic growth phase, and then inducing the promoter by a severe reduction of the tryptophan intracellular pool (Mizukami et al. 1986). The most commonly used method at the laboratory level, involves a 25-50-fold dilution of the culture in minimal medium, and the subsequent addition of indole-3-acrylic acid (IAA) as the inducer (Yansura and Henner 1990).

To obtain a high cellular concentration is an important objective for most fermentation processes. At least two factors usually limit the attainment of a high cell density in a fermentor: an O<sub>2</sub> uptake rate higher than the O<sub>2</sub> transfer rate of the equipment, and the production and accumulation of growth-inhibiting metabolites by the cells in the culture (Paalme et al. 1989). Several strategies have been employed to overcome these problems, such as the use of pure O<sub>2</sub> for sparging (Shiloach and Bauer 1975), cross-flow filtration to remove inhibitory metabolites (Lee and Chang 1990) and reduction of O<sub>2</sub> consumption through limitation of  $\mu$  (Cutayar and Poillon 1989; Gleiser and Bauer 1981; Lee et al. 1989; Paalme et al. 1989; Zabriskie and Arcuri 1986).

We have previously reported a process for the production of human insulin, whereby the A and B peptides are independently synthesized in two *E. coli* strains, purified, and associated *in vitro* to produce active insulin (Balbás et al. 1988; Cruz et al. 1990, 1992). To transfer this laboratory-level process to a larger scale, we decided to develop as a first stage a 10-l pilot-plant-scale fermentation process, which could be further scaled-up. In this study we report the characterization and use, under different fermentation conditions, of an *E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> strain, for the expression of a *trp*-promoter-regulated recombinant heterologous gene. By limiting the specific growth rate in a fed-batch culture, we have been able to obtain 1.2 g/l of the hybrid protein. Induction of the *trp* promoter is accomplished by depletion of tryptophan in the culture medium by growing cells.

## Materials and methods

**Bacterial strains and plasmids.** A *trp*<sup>-</sup> derivative of *E. coli* strain W3110, was obtained from C. Yanofsky. Plasmid pNF21B was constructed in our laboratory. It contains a hybrid gene, under control of the *trp* promoter, that codes for a 21992-Da hybrid protein carrying the first 156 amino acid residues from the lambda cI repressor joined by a methionine residue to the human insulin B chain. This plasmid, a 3970-bp derivative of pBR322 (Bolivar et al. 1977), contains the gene that codes for the  $\beta$ -lactamase enzyme (Flores et al. 1986).

**Media, inoculum development and growth conditions.** Composition for the inoculum medium (INO) was as follows: 3 g/l of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/l of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l of glucose and 5 g/l of yeast extract. The initial pH of this medium was adjusted to 7.4 with NaOH. Medium for batch fermentations (FEM) is similar to the INO medium with the following differences: 66 g/l of glucose and 17 g/l of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Unless otherwise indicated, in all fermentations, 100 µg/ml of ampicillin, 25 µg/ml of thiamine, and 20 ml/l of the following trace element solution were added to the culture media: 0.1 g/l of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 g/l of CuCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l of CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2 g/l of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l of MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.01 g/l of Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Inocula were prepared as follows: single colonies of the W3110 *trp*<sup>-</sup> strain transformed with plasmid pNF21B and plated in L-broth (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract and 5 g/l NaCl) plus ampicillin, were used to inoculate 2-l flasks containing 1 l INO medium plus 100 µg/ml of tryptophan and ampicillin, and were grown for 14 h at 30°C at 200 rpm.

Batch and fed-batch 10-l cultures were performed in a 14-l Microferm fermentor from New Brunswick Scientific. For batch fermentations, a 10% inoculum was used in FEM medium. At the moment of inoculation, ampicillin was added to the fermentor; the antibiotic was supplied every 2 h as indicated in the figures.

For fed-batch fermentations, a 10% inoculum was used in FEM medium without glucose and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. A sterile nutrient solution (2 l) composed of glucose (330 g/l) and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (85 g/l) was continuously fed to the fermentor immediately after inoculation, following a precalculated feeding rate to maintain an approximately constant  $\mu$  of 0.2 h<sup>-1</sup>. These nutrients were fed in order to maintain a constant low level and avoid possible acetic acid accumulation or growth inhibition due to high ammonium ion concentrations (Paalme et al. 1989; Thompson et al. 1985). An average cellular growth yield on glucose of 0.3 g cells/g glucose was used to calculate the nutrient solution feed rate. To maintain a constant 10-l volume, culture broth was periodically removed from the fermentor. Ampicillin and tryptophan (100 µg/ml) were added every 2 h until the 4th hour.

The following conditions were used for batch and fed-batch fermentations: temperature 37°C; pH regulated at 7.4 with 10 M NaOH; dissolved O<sub>2</sub> maintained above 20%; air flow 1 vvm; silicone antifoam was added as needed.

**Analytical methods.** Tryptophan concentrations were determined by measuring fluorescence emission at 370 nm in an LTC/Milton Roy Fluoro Monitor III (Riviera, Beach, FL, USA). Glucose was assayed enzymatically with a Glucose Analyzer 2 from Beckman Instruments (Fullerton, Calif., USA). Cell concentrations were determined by measuring the optical density of a diluted culture sample at 540 nm and comparison with a standard curve obtained by dry weight determinations. Drying was performed at 80°C to constant weight. The optical density unit was equivalent to 0.4 g dry weight/l.

Hybrid protein levels were measured by subjecting samples taken from the fermentor to denaturing 6% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the resulting protein band patterns quantified with a Biomed Instruments soft laser densitometer SCR-2D/1D (Fullerton, Calif., USA). From this analysis, the percentage of hybrid protein from the total cellular protein was determined. To calculate the amount of hybrid protein produced, it was considered that 55% of the cellular dry weight of *E. coli* W3110 corresponds to cellular protein, as determined using the method reported by Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as standard.

The fraction of plasmid-bearing cells was determined by parallel-plating diluted samples on non-selective L-broth plates and selective L-broth plates with ampicillin (100 µg/ml).

## Results and discussion

### Effect of tryptophan concentration on growth and hybrid protein production in batch cultures

In order to study the relationships between tryptophan concentration in the culture medium, expression of the *cl*-insulin B peptide hybrid gene and cellular growth, we carried out batch-culture experiments with different tryptophan concentrations.

In our system [*E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B)], tryptophan plays the double role of co-repressor for the expression of the hybrid gene and metabolite requirement for the *trp*<sup>-</sup> auxotrophy. For induction of the hybrid gene, a low tryptophan level is necessary, but this may be detrimental to the growth of the bacterial host. Therefore, the objective of the batch culture experiments was to determine the initial tryptophan concentration where the highest productivity of hybrid protein could be obtained.

The conditions studied differed only in the concentration of tryptophan in the culture medium. Figure 1 shows the biomass and tryptophan concentration profiles for the four conditions studied. It is important to acknowledge that in the F0 culture, where no exogenous tryptophan was added, the initial level of tryptophan is approximately 30 µg/ml; this amount, derived from the yeast extract, is also present in the other culture conditions. Cultures F1, F1.5 and F2 reached similar cellular concentrations (X), after 14 h of growth: 12, 12 and 13.9 g/l respectively. The specific growth rate was considerably reduced in the F0 after 10 h, reaching a cellular concentration of 6.7 g/l, so it was possible to infer that the amount of tryptophan in F0 becomes limiting at the final stage of this culture.

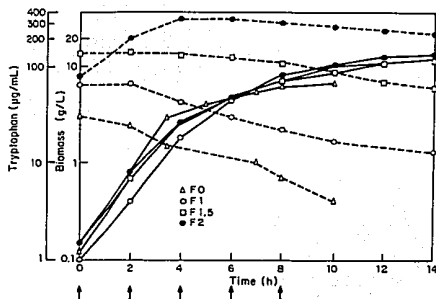


Fig. 1. Growth in FEM medium (see Materials and methods) of *Escherichia coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B) under batch culture conditions, supplemented with different amounts of tryptophan. Biomass final concentrations are presented by solid lines and tryptophan concentrations by dashed lines: F0, FEM medium without added tryptophan ( $\Delta$ ); F1, FEM medium plus 1 g/101 of tryptophan added at time 0 ( $\square$ ); F1.5, FEM medium plus 1.5 g/101 tryptophan added at time 0 ( $\circ$ ); F2, FEM medium plus 1 g/101 tryptophan added every 2 h five times, starting at time 0 ( $\bullet$ ). Arrows indicate ampicillin (100  $\mu$ g/ml) addition

Table 1 summarizes different parameters and results from these four culture conditions. Cultures F1 and F1.5 contained the highest percentage of cl-insulin B peptide hybrid protein (H), whereas culture F0, produced around half of that amount, and culture F2 contained a very low level of hybrid protein. The low tryptophan concentration in culture F0 not only caused a reduction in cellular concentration, but also reduced the amount of hybrid protein produced. A possible explanation for this low productivity is that tryptophan deficiency, which limited growth, also restricted protein bio-

synthesis. Culture F2 reached the highest cellular density; however, the high level of tryptophan in the culture medium repressed transcription of the hybrid gene and therefore, only a very small amount of hybrid protein was detected, as a result of the basal level of expression of the hybrid gene.

When the percentage of plasmid-bearing cells in the culture was determined for the four conditions studied, it was observed that samples taken at the start of the fermentation contained the expected number of colony forming units (cfu) (approximately  $2 \times 10^9$  cells/ml for every unit of optical density at 540 nm) when plated in non-selective media. However, samples from the late logarithmic growth phase, contained a lower number of cfu (cells/ml) as follows: condition F0,  $0.6 \times 10^9$ ; F1,  $0.2 \times 10^9$ ; F1.5,  $0.2 \times 10^9$ ; F2,  $1.0 \times 10^9$ . These differences can be explained considering that upon induction of the heterologous gene and the subsequent intracellular accumulation of the hybrid protein, some cells are unable to grow and form colonies when plated on selective or non-selective media (Fu et al. 1992). Considering that the difference between samples taken before and after induction of the hybrid gene correspond to plasmid-bearing cells, the values for the percentage of plasmid-bearing cells in the cultures were corrected. These results indicate that expression of the hybrid gene is an unfavourable physiological condition for cell growth, and that this effect is proportional to the level of induction, which depends on the level of tryptophan in the culture medium. The high level expression of the hybrid gene leads to a growth disadvantage of the plasmid-bearing cells, causing plasmid-less cells, already present in the culture, to overgrow them. The F2 culture, however, which did not exhibit induction, also presented a proportion of plasmid-less biomass at the end of the fermentation. Therefore, this alteration is possibly favoured by the constant basal level of expression from the hybrid gene.

Table 1. Effect of tryptophan concentration\* on batch fermentation parameters (a) and comparison between fed-batch and F1 batch fermentations (b)

Parameters	(a)				(b)	
	F0	F1	F1.5	F2	Fed-batch	Ratio of Fed-batch/ F1 batch fermentation
Biomass (g/l)	6.7	12	12	13.9	20	1.67
Plasmid-bearing population (%)	86	62	66	67	90	1.45
Plasmid-less population (%)	14	38	34	33	10	0.26
Ratio of hybrid protein to total cellular protein of total biomass (%)	4.6	7.9	7	<1	11	1.39
Ratio of hybrid protein to total cellular protein of plasmid-bearing biomass (%)	5.3	12.7	10.6	<1	12.2	0.96
Final hybrid protein concentration (g/l)	0.17	0.53	0.46	—	1.21	2.28
Total culture time (h)	10	14	14	14	24	1.71
Duration of growth phase (h)	5.2	5.2	6	14	8	1.54
Duration of induction phase (h)	4.8	8.8	8	0	16	1.82
Cell yield from glucose (g cells/g glucose)	—	0.21	—	—	0.3	1.43
Hybrid protein yield from glucose (g hybrid/g glucose)	—	0.009	—	—	0.018	2.00

\* Tryptophan concentrations used: F0, FEM medium without added tryptophan; F1, FEM medium plus 1 g/101 of tryptophan added at time 0; F1.5, FEM medium plus 1.5 g/101 of tryptophan

added at time 0; F2, FEM medium plus 1 g/101 of tryptophan added every 2 h five times, starting at time 0

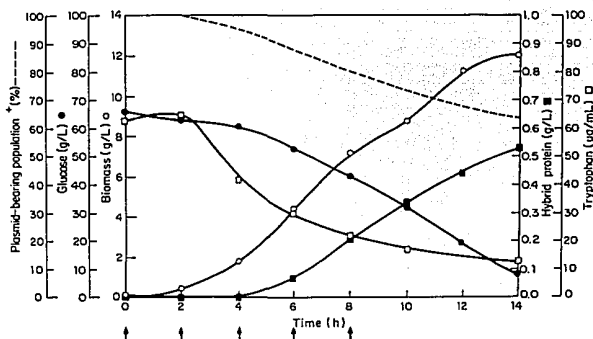


Fig. 2. Fermentation kinetics of an F1 batch culture of *E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B) in FEM1 medium: O, biomass; ■, cl-insulin B hybrid protein; ●, glucose; □, tryptophan; ----, plasmid-bearing cells levels. Arrows indicate addition of ampicillin (100 µg/ml)

The previous data indicate that if a high biomass concentration is desired, tryptophan must be added to the culture media for adequate growth of this *E. coli trp*<sup>-</sup> strain. However, a very high tryptophan concentration, as shown by the results obtained in the F2 condition, resulted in no product formation due to hybrid gene repression. It is important to point out that in F1 and F1.5 cultures, the tryptophan level is low enough to cause induction, but it is still sufficient for adequate protein synthesis and cellular multiplication in this *trp*<sup>-</sup> strain.

Fermentation kinetics for the best hybrid protein producing conditions (F1) are presented in Fig. 2. After 12–14 h of fermentation, the culture entered the stationary phase, reaching a cellular concentration of 12 g/l. There are several possible explanations for this growth arrest; one of these is that it could be caused by the accumulation of acetic acid or other growth-inhibiting metabolites, since 9 g/l of glucose was still present in the culture medium; the calculated final yield on glucose ( $Y_{p/s}$ ) was 0.21 g cells/g glucose, and the product yield on glucose ( $Y_{p/s}$ ) was 0.009 g hybrid protein/g glucose.

In this fermentation, 100 µg/ml of tryptophan were added at the moment of inoculation. As shown in Fig. 2, there was an initial consumption of the amino acid by the inoculum, since the concentration at time zero is 63 µg/ml. After 5.2 h of growth, when the tryptophan concentration was 32 µg/ml and biomass concentration 3.1 g/l, induction of the hybrid gene was detected. Figure 3A shows the electrophoretic pattern of a sample obtained from this fermentation after 2 h of inoculation. From the densitometric scanning, it can be seen that a very small amount of the hybrid protein is present before induction (0.8% of the total cellular protein). This band is not detected at the moment of inoculation (data not shown), but only after 1–2 h of growth. The presence of hybrid protein before induction indicates a basal level of expression from the hybrid gene. Figure 3B, shows the electrophoretic pattern and the corresponding densitometric scanning of a sample taken after 14 h of growth. The amount of hybrid protein represents, in this case, 7.9% of the total cellular protein (see Table 1).

The percentage of cells containing recombinant plasmid in this fermentation is also presented in Fig. 2. Starting from a proportion of plasmid-bearing population to total biomass ( $X^+%$ ) of 100%, this value decreased to 62%. From these data, it is evident that during this fermentation, most of the time there was a mixed culture with plasmid-bearing ( $X^+$ ) and plasmid-less cells ( $X^-$ ). These results also indicate that under the conditions studied, ampicillin was only partially effective as a selective agent, even though it was added five times up to the 8th hour.

When the hybrid protein level of the plasmid-bearing fraction of the culture is calculated ( $H_2$ ), the value reached 12.7% (see Table 1a). This is about half of the highest hybrid protein level reached with our production system ( $H_2$  value 20 to 25%), obtained with IAA induction (Yansura and Henner 1990) in low cell concentration (0.3 g/l) in shake-flask cultures (unpublished results).

#### Effect of controlling glucose and $(NH_4)_2HPO_4$ concentrations in fed-batch cultures on biomass concentration, plasmid loss and hybrid protein production

In order to increase the quantity of the cl-insulin B hybrid protein obtained in batch fermentations, we developed fermentation conditions that would provide simultaneously a high proportion of plasmid-bearing cells, a high final biomass concentration and a good induction level of the hybrid gene. A fed-batch process was chosen where a precalculated feeding strategy for both the carbon and inorganic nitrogen sources was employed. The feeding rate was calculated to maintain a  $\mu$  lower than  $0.2 \text{ h}^{-1}$  throughout the fermentation, in order to reduce plasmid loss,  $O_2$  consumption and accumulation of growth-limiting metabolites. Using these conditions it was expected to obtain a higher production of the hybrid protein and a higher cellular concentration than those produced in batch cultures (Paalme et al. 1989; Seo and Bailey 1985).

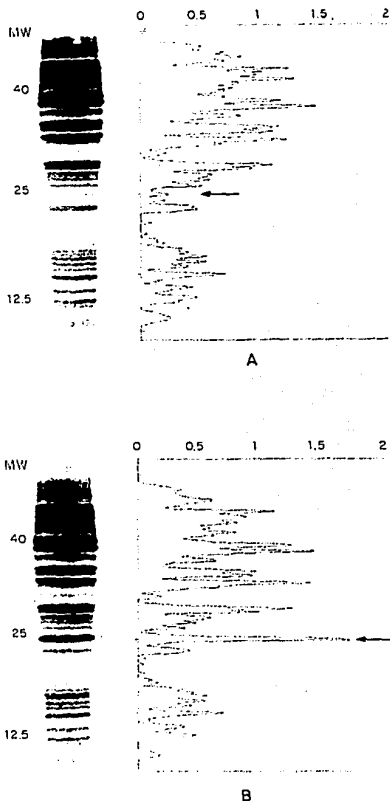


Fig. 3. A, B. Sodium dodecyl sulphate electrophoretic patterns and corresponding laser densitometric scans of total proteins from samples of an F1 batch culture of *E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B). The arrow indicates the position of the band corresponding to the cl-insulin B hybrid protein. A Sample taken after 2 h. B Sample taken after 14 h. Molecular masses (MW) in kDa are indicated at the side of the protein electrophoretic pattern. Absorbance units are indicated at the top of the densitometric scan.

Figure 4 shows the fermentation kinetics for a typical fed-batch culture of the *E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B) strain. After inoculation, feeding of glucose and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  was started. Tryptophan (at a final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added five times simultaneously with ampicillin, since a single addition of the

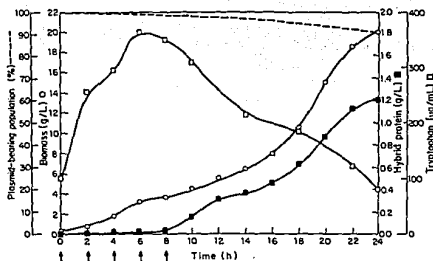


Fig. 4. Fermentation kinetics of a fed-batch culture of *E. coli* W3110 *trp*<sup>-</sup> (pNF21B): O, biomass; ■, cl-insulin B hybrid protein; □, tryptophan; ---, plasmid-bearing cells. Arrows indicate time of simultaneous addition of ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and tryptophan (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

amino acid resulted in a low induction of the hybrid gene (data not shown). After 24 h of growth, a cell density of 20 g dry weight/l was reached, then the culture entered the stationary phase (data not shown). Throughout the fermentation, the glucose concentration remained below 1 g/l.

From culture times 2 to 8 h, a basal preinduction level for the hybrid gene was detected, with an average H value of 1.7%. At the 8th hour, when the tryptophan concentration reached 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and X reached 3.2 g/l, induction of the hybrid gene was detected. In this culture, the final hybrid protein level reached 11%, that represents a concentration (P) of 1.21 g/l (see Table 1).

In this fermentation the cfu values from samples taken from the late logarithmic growth phase were 21% lower than the values of cfu from a sample taken at the beginning of the fermentation. Considering these data, the final  $X\% +$  value was calculated to be 90%, confirming that the slower growth rate, when compared to a batch fermentation (see Fig. 2), reduced considerably the proportion of plasmid-less cells. It is important to remark that the amount of ampicillin added to the culture was the same as in the F1 batch culture conditions.

Table 1b shows a comparison of relevant production parameters between batch F1 and fed-batch fermentations. Most of the parameters related to biomass concentration, product concentration and yield values are higher in the fed-batch than in the batch fermentation. A 2.28-fold increase in P over the best batch-fermentation conditions was achieved. The objective of significantly increasing P was accomplished even though  $H_1$  from the fed-batch culture was similar to that of the F1 batch condition, since the final X and  $X\% +$  were higher. It is important to remark that these results were obtained by using an equal amount of nutrients in both batch and fed-batch fermentations, with the exception of tryptophan, which was higher in the fed-batch fermentations in order to compensate for the higher biomass produced. It can also be observed that the fed-



batch strategy followed and the lower  $\mu$  caused a more efficient utilization of the carbon source, resulting in higher  $Y_{x/s}$  and  $Y_{p/s}$ .

This work shows that high levels of a recombinant protein can be produced in an *E. coli trp*<sup>-</sup> strain. The use of this strain allows efficient induction of the *trp* promoter, due to the consumption of tryptophan by the cells in the culture medium. In this system, chemical inducers such as IAA are not required.

The results presented also demonstrate the benefits of restricting the specific growth rate through the limitation of nutrients in order to increment the final biomass, a higher proportion of plasmid-bearing cells and a final higher concentration of the recombinant hybrid protein per litre, when compared to batch fermentations under similar conditions.

Adequate manipulation of growth conditions through the use of a fed-batch fermentation allowed this *trp*<sup>-</sup> *E. coli* culture to produce 1.21 g/l of a heterologous hybrid protein as part of a final biomass concentration of 20 g/l. One sixth of the hybrid protein corresponds to human insulin B chain, so at the end of a 10-l fermentation 2 g of this peptide can be recovered. An important characteristic of this process is that it can be scaled up easily. This strategy also avoids the use of costly elements to implement methods for large-scale fermentation induction. This culture system can also be applied to achieve the expression of the hybrid genes cI-A chain and cI-human proinsulin, controlled by the *trp* promoter, to obtain the hybrid proteins cI-A chain and cI-human proinsulin (data not shown). The production of the cI-A chain and cI-B chain hybrid proteins represents the first step in a process using purified A and B peptides for the production of human insulin (Goeddel et al. 1979).

Finally, we believe it is possible to further increase the productivity of this system, if a higher cell density is attained by using O<sub>2</sub>-enriched air for sparging (Fass et al. 1989), removing growth inhibitory metabolites by ultrafiltration (Lee and Chang 1990), using computer control (Paalme et al. 1989), or combinations of these strategies.

**Acknowledgements.** We wish to thank Paulina Balbás and Agustín López Munguía for critically reading this manuscript and Enrique Galindo for helpful discussions. We thank Mercedes Enzaldo, Mario Caro and Bernardo Urióstegui, for their technical assistance. This work was supported by grant IN300891 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., and grant 0248-N9107 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

## References

- Balbás P, Anda R de, Flores N, Alvarado X, Cruz N, Valle F, Bolívar F (1988) Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. In: Cañedo L, Todd L, Jaz J, Parker L (eds) Cell function and disease. Plenum Press, New York, p 59
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
- Cruz N, Antonio S, Anda R de, Gosset G, Bolívar F (1990) Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in *Escherichia coli*. *J Liq Chromatogr* 13:1517-1528
- Cruz N, López M, Estrada G, Alvarado X, Anda R de, Balbás P, Gosset G, Bolívar F (1992) Preparative isolation of recombinant human insulin A chain by ion exchange chromatography. *J Liq Chromatogr* 15:2311-2324
- Cutayar JM, Poillon D (1989) High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnol Lett* 11:155-160
- Fass R, Clem TR, Shiloach J (1989) Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 55:1305-1307
- Flores N, Anda R de, Guereca L, Cruz N, Antonio S, Balbás P, Bolívar F, Valle F (1986) A new expression vector for the production of fused proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 25:267-270
- Fu J, Togna AP, Shuler ML, Wilson DB (1992) *Escherichia coli* host cell modifications in continuous culture affecting heterologous protein overproduction: a population dynamics study. *Biotechnol Prog* 8:340-346
- Gleiser IE, Bauer S (1981) Growth of *E. coli* W to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnol Bioeng* 23:1015-1021
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolívar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci* 76:106-110
- Koizumi J, Monden Y, Aiba S (1985) Effects of temperature and dilution rate on the copy number of recombinant plasmid in continuous culture of *Bacillus stearothermophilus* (pLP11). *Biotechnol Bioeng* 27:721-728
- Lee J, Youn-Hee C, Shin-Kwon K, Hyung-Hwan P, Ik-Boo K (1989) Production of human leukocyte interferon in *Escherichia coli* by control of growth rate in fed-batch fermentation. *Biotechnol Lett* 2:695-698
- Lee YL, Chang HN (1990) High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. *Biotechnol Bioeng* 36:330-337
- Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Mizukami T, Oka T, Itoh S (1986) Production of active human interferon in *E. coli* 11, optimal condition for induced synthesis by 3,β-indoleacrylic acid. *Biotechnol Lett* 8:611-614
- Paalme T, Tiisma K, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R (1989) Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol Bioeng* 35:312-319
- Pierce J, Gutteridge S (1985) Large-scale preparation of ribulose-bisphosphate carboxylase from a recombinant system in *Escherichia coli* characterized by extreme plasmid instability. *Appl Environ Microbiol* 49:1094-1100
- Seo JH, Bailey JE (1985) Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 27:1668-1674
- Seo JH, Bailey JE (1986) Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. *Biotechnol Bioeng* 28:1590-1594
- Shiloach J, Bauer S (1975) High yield growth of *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* 17:227-239
- Thompson BG, Kole M, Gerson DF (1985) Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol Bioeng* 27:818-824
- Yansura DG, Henner DJ (1990) Use of *Escherichia coli trp* promoter for direct expression of proteins. *Methods Enzymol* 185:54-60
- Zabricki DW, Arcuri EJ (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb Technol* 8:706-717

**PREPARATIVE ISOLATION BY  
HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY OF HUMAN  
INSULIN B CHAIN PRODUCED IN  
ESCHERICHIA COLI**

**NORBERTO CRUZ, SALVADOR ANTONIO,  
RAMÓN DE ANDA, GUILLERMO GOSSET,  
AND FRANCISCO BOLIVAR**  
*Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética  
y Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 510-3  
Cuernavaca. Mor. 62271, Mexico*

**ABSTRACT**

A simple method has been developed for the analytical and preparative purification of human insulin B chain from recombinant origin. Three solvent systems: acetonitrile, isopropanol and methanol, were studied to determine their capacity to resolve the insulin B chain from a mixture of cyanogen bromide generated bacterial peptides. Using a  $\mu$ Bondapak C18 column, it was possible to resolve the insulin B chain in all three systems. On a preparative scale, using a PrePak 500 C18 column with the isopropanol system, it was possible to purify insulin B chain and to obtain a 95% protein recovery.

**INTRODUCTION**

Biosynthetic human insulin obtained by recombinant DNA techniques, represents a safe and important source of insulin for the treatment of

insulin-dependent diabetics. Since injection is at this time one of the few methods used for the administration of pharmaceutical proteins, the purification processes for these polypeptides must be designed to meet the stringent requirements of purity for solutions to be injected (1).

In the design of the recuperation procedure for a protein product, a number of parameters should be considered. These include the degree of purity desired, the physical and chemical properties of the product and its contaminants, and finally their cellular localization, for they may be found either in the cytoplasm, the periplasm or the growth media.

A purification process is usually a cascade of unitary operations, some of which may be repeated several times. Unfortunately, there is a loss of product in each operation and these losses grow geometrically with each step. For this reason, it is important to increase the yield in each step, or decrease the number of steps required (2).

The scale-up of a purification process from laboratory to pilot plant is not a direct process. It requires the knowledge of the physicochemical behavior of the product and its contaminants. Also it should be considered that the procedures used in the laboratory-scale purification process are not always convenient in other scales (3).

The method reported here for the purification of human insulin B chain from a bacterial peptide mixture, is based on the use of ion pair forming agents (4). In this case, formic acid and triethylamine were chosen since they modify the retention times of the peptides to be purified, allowing the resolution of human insulin B chain.

The criteria considered to develop this method were: capacity to purify the human insulin B chain from most of the bacterial contaminant peptides, low cost, flexibility for scaling up and the use of a volatile solvent system.

## MATERIALS AND METHODS

### High Performance Liquid Chromatography

#### Equipment.

Analytical chromatography was performed using the following equipment from Waters: M-45 and M-590 solvent delivery systems, automated gradient controller, U6K manual injector, Z module radial compression separation system and a M-481 L.C. spectrophotometer. Also, an OmniScribe recorder from Houston Instruments was utilized.

The preparative chromatography was performed using the Prep LC/System 500 A Liquid Chromatograph from Waters with a M-481 L.C. spectrophotometer with a preparative cell, and the OmniScribe recorder from Houston Instruments.

The columns used were: a  $\mu$ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) from Waters, a metallic column (4.6 mm x 150 mm) packed with 1 gram of Pre-C18 preparative packing, and a PrepPAK 500 C18 cartridge (57 mm x 300 mm) from Waters.

#### Reagents

HPLC/Spectro grade methanol, isopropanol, and acetonitrile from Merck. Formic acid, sodium sulfite, urea and triethylamine from J. T. Baker. Cyanogen bromide and sodium tetrathionate from Sigma Co. Guanidinium chloride from Pierce. Insulin B chain derived from porcine (Sigma I-3505) was used as a standard.

### Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Slab gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate was performed as described by Laemmli (5).

Isolation and Purification of Inclusion Bodies

The method used was the one reported by Flores et al. (6).

RESULTS AND DISCUSSION

Our group has reported the construction of a recombinant plasmid where the human insulin B chain is produced as the carboxyl terminus of a fusion protein with the amino fragment from phage lambda cl protein. This hybrid protein is aggregated intracellularly as inclusion bodies, which after cell lysis are purified by a simple differential centrifugation step (6). The inclusion bodies are dissolved in 70% formic acid and treated with cyanogen bromide to release the insulin B chain (7). The formic acid is evaporated and the bacterial peptide mixture is dissolved in 8M guanidinium chloride. Sodium sulfite and sodium tetrathionate are added to protect sulfhydryl groups in the B chain from final oxidation, transforming them to sulfonate radicals or Bunte salts (8,9). The peptide mixture is dialysed, and urea is added to 8M. The resulting solution is diluted 1:1 with 5% formic acid, prior to HPLC.

Three analytical systems for the HPLC separation of human insulin B chain were studied. In all of them, the stationary phase employed was a  $\mu$ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) with a particle size of 10 $\mu$ . The mobile phase used in the three systems was an organic solvent and an aqueous buffer A containing reagents which form ion-pairs. Buffer A was composed of 2.5% formic acid and 15mM triethylamine. Table 1 shows the proportion of organic solvent for each system in the equilibrium and elution buffers, as well as the retention times for porcine insulin B chain used as a standard in all systems. In all cases flow rate used was 1 ml/min.

In the systems studied, elution was carried out in two steps: equilibrium and elution (isocratic). This alternative was selected since it

TABLE I

Summary of Solvent Systems and the Retention Times (rt) for Porcine Insulin B chain Utilized as a Standard\*.

		(a)	(b)	(c)	(d)
		$\mu$ Bondapak C18 column	Analytical column with C18 preparative packing	% organic equilibrium	% organic elution
		rt(min)	rt(min)		
System I	(Acetonitrile)	17.04	17.04	30%	33%
System II	(Isopropanol)	18.02	17.60	27%	30%
System III	(Methanol)	18.30	17.40	60%	70%

\* Retention times for porcine insulin B chain subjected to HPLC in systems I, II and III utilizing (a) a  $\mu$ Bondapak C18 and (b) an analytical column with preparative packing. The proportion of organic solvent for each system in the equilibrium and elution buffers is presented in lanes (c) and (d).

is easier to scale up than gradients systems. The equilibrium and the elution phases were chosen so that their composition were similar, thus reducing the time needed to obtain the initial equilibrium.

As it can be seen in fig. 1, we were able to obtain a good separation of insulin B chain from the peptide mixture using the isopropanol solvent system. Similar results were obtained with the acetonitrile and methanol systems, (data not shown).

To scale up the analytical systems previously described, a metallic column (4.6 mm x 150 mm) was packed with 1 gram of Pre-C18 preparative packing using a particle size of 55-105  $\mu$ . This experiment allowed the determination of the effect of the particle size on the resolution of the peptide

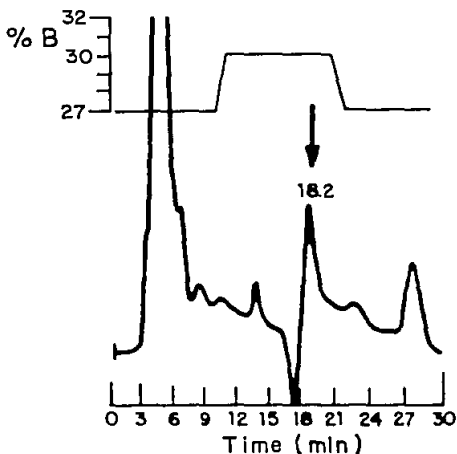


Figure 1. Analytical reverse-phase chromatography of the cyanogen bromide treated inclusion bodies containing the human insulin B chain. A 50  $\mu$ g peptide sample was passed through a  $\mu$ Bondapak C18 column, with a flow rate of 1 ml/min. The position of insulin B chain in the chromatogram is indicated with an arrow. The buffer system used for the purification was: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) isopropanol. Equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30% B, 10 min. Detection: 280 nm, 0.05 AUFS.

mixture, and the prediction of the mass load capacity for a larger column with the same packing. The conditions used were the same as for the analytical systems.

As it can be seen in fig. 2 panels I, II and III, the resolution of the peptide mixture diminishes as compared to the analytical system (fig. 1), due to the increment in the packing particle size. However, this decrement in resolution did not affect the objective of the experiment since retention times for the indicated peaks in fig. 2 are similar to those obtained with porcine insulin B chain used as a standard (see Table I). Polyacrilamide gel electrophoresis of the peaks marked with arrows in fig.

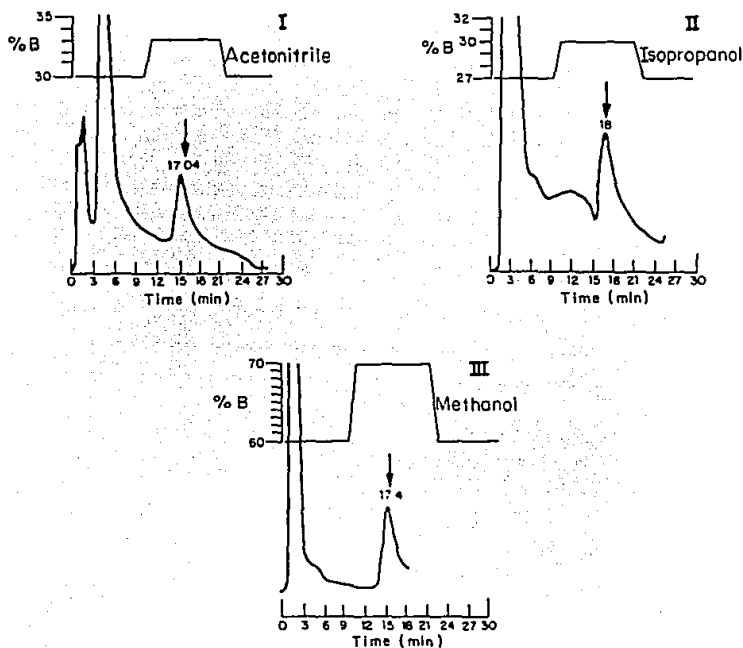


Figure 2. Analytical chromatographic purification of human insulin B chain. A reverse-phase chromatography using an analytical size metallic column with preparative packing of 100  $\mu$ g of the cyanogen bromide treated peptide mixture containing the insulin B chain polypeptide, is shown in panels I, II and III. Panel I, buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) acetonitrile; equilibrium: 30% B, 10 min; elution: 33% B, 10 min. Panel II, buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) Isopropanol; equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30% B, 10 min. Panel III, buffer composition (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) methanol; equilibrium: 60% B, 10 min; elution: 70% B, 10 min. The flow rate used in all systems was 1 ml/min. Detection: 280 nm, 0.02 AUFS. The position of the human insulin B chain in each chromatogram is marked by an arrow.



2 panels I to III revealed a peptide band which commigrates with the standard (data not shown).

Since the resolution obtained for insulin B chain is similar in all three systems, all of them can be directly scaled up to a preparative level of several grams, once the calculations for mass load capacity and flow rate are performed. On the basis of cost, since this criterion becomes important once the purification process is scaled up, the isopropanol system was selected.

To determine the mass load capacity for a PrepPAK 500 C18 cartridge, maximum load tests were performed in a metallic analytical column (4.6 mm x 150 mm) with 1 g of C18 preparative packing. The maximum protein load determined for this column was 86 mg. After each of the parameters, such as flow rate and time, were defined for the metallic column, the scale-up proportion was calculated using the following equation.

$$C_m = (R_2)^2 / (R_1)^2 \times L_2 / L_1$$

$$C_m = (28.5 \text{ mm}) / (2.3 \text{ mm}) \times 300 \text{ mm} / 150 \text{ mm} = 307$$

where  $C_m$  is the mass of the sample with known concentration;  $R_2$  is the radius of the larger column and  $L_2$  its length;  $R_1$  is the radius of the analytical column and  $L_1$  its length. This calculation indicated that the amount of material that can be subjected to chromatography in the large column is approximately 300 times the amount of the analytical column, and this, in turn, indicates that 26.4 g of protein can be loaded per run.

Figure 3 panel I shows the chromatogram of a preparative run of 10 g of the bacterial peptide mixture on a PrepPAK 500 C18 cartridge (57 mm x 300 mm), using a flow rate of 100 ml/min in a Prep LC/System 500 A Liquid Chromatograph. The arrow indicates the position where porcine insulin B chain is resolved. As it can be observed, the profile obtained is similar to the one described for the preparative packed column (fig. 2, panel II). The material from the peak region "D" obtained in this

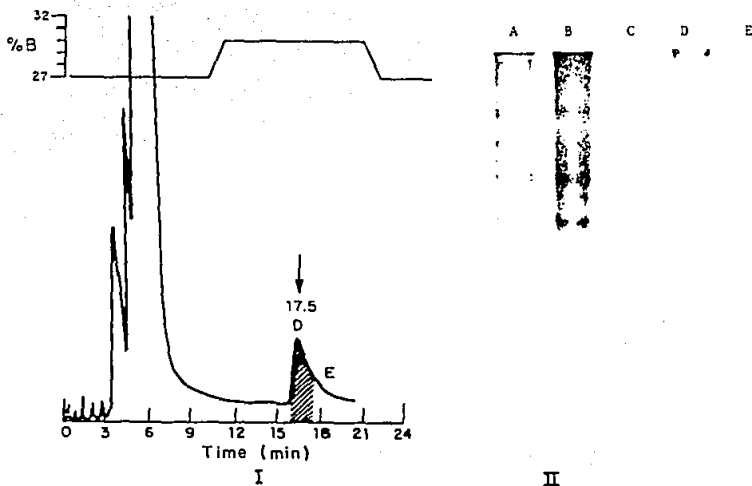


Figure 3. Preparative chromatographic purification of human insulin B chain. I) Preparative reverse-phase chromatography of 10 g of the cyanogen bromide peptide mixture containing the human insulin B chain. A PrePak 500 C18 column utilizing the Isopropanol solvent system was used and the flow rate was 100 ml/min. Buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) Isopropanol; equilibrium: 27% B, 10 min; elution: 30%B, 10 min. Detection: 280 nm, 0.1 AUFS using the same detector with a preparative cell. The fractions containing the insulin B chain are marked by letters "D" and "E".

II) PAGE analysis of preparative HPLC purified human insulin B chain. Lane A: 10  $\mu$ g of cyanogen bromide peptide mixture before purification; Lane B: 20  $\mu$ g of cyanogen bromide peptide mixture before purification; Lane C: 20  $\mu$ g of porcine pancreas insulin B chain (standard); Lane D: 5  $\mu$ g of fraction "D" from the preparative chromatogram; Lane E: 4  $\mu$ g of fraction "E" from the preparative chromatogram.

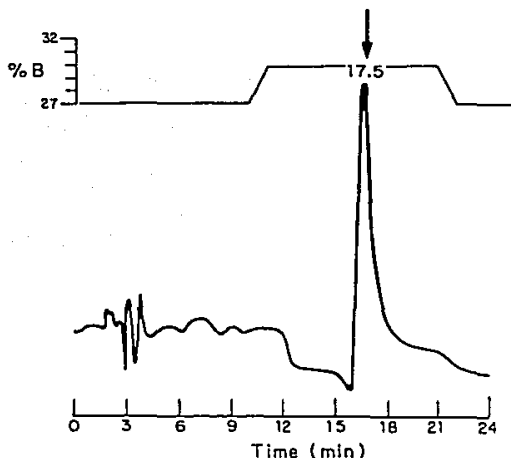


Figure 4. Rechromatography of a sample of material of fraction "D" derived from the preparative scale purification of insulin B chain. A sample of 5  $\mu$ l from fraction "D" (fig. 3, panel I) was passed through a  $\mu$ Bondapak C18 column using the acetonitrile solvent system. Buffer composition: (A) HCOOH 2.5%, TEA 15mM; (B) acetonitrile; equilibrium: 30% B, 10 min; elution: 33% B, 10 min.

purification was collected and a sample was passed through an analytical  $\mu$ Bondapak C18 cartridge (8 mm x 100 mm) using the acetonitrile solvent system. Figure 4 shows the chromatograph of this analytical run, where a major peak is evident.

As it can be observed in fig. 3, panel II, insulin B chain elutes in a peak that PAGE analysis revealed to be highly enriched for this peptide. Contaminant peptides are still present (fig. 3, panel II, lanes D and E), but in a much smaller proportion than in the unpurified mixture (fig. 3, panel II, lanes A and B). These peptides, originated mainly from the CNBr hydrolysis of the cl carrier protein, however, they do not interfere with the association reaction between the insulin A and B chains, and were eliminated in the HPLC purification of the correctly associated insulin molecules (data not shown) (6,10).

### CONCLUSIONS

Starting with 100 g dry weight of bacterial paste containing 20% of its total protein as the cl-insulin B chain hybrid polypeptide, it is possible to obtain, approximately, 1.2 g of human insulin B chain after a four step process: cell sonication, differential centrifugation for the purification of inclusion bodies, cyanogen bromide treatment of the inclusion bodies (6) and the preparative HPLC chromatography described in this communication. This process can be accomplished in four days, with a 62% overall protein recovery.

The human insulin B chain obtained after the preparative HPLC purification has been associated with insulin A chain to produce active human insulin (data not shown) (6,10). This purification method could be further scaled up in order to process a larger amount of biological material, and eventually be used in a process for the large scale production of human insulin.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by a Grant (A. Noriega) from the Organización de Estados Americanos (OEA). We wish to thank Marcela López for her technical assistance, and Paulina Balbás and Lourival Possani for their critical reading of this manuscript. We are also grateful to Ma. del Carmen González for the typing of this manuscript.

### REFERENCES

1. Frank, B. H. and Chance, R. Two routes for producing human insulin utilizing recombinant DNA technology. *Munch. Med. Wschr.* **125** (suppl. 1), 514 (1983).
2. James, L.D. Scaling up bio-product separation with high performance liquid chromatography. *Biotechnology* **2**, 957 (1984).

3. Gail, S. and Charles, M. From R & D to production: designing a chromatographic purification scheme. *Biotechnology* 5, 239 (1987).
4. Ladrón de Guevara, O., Estrada, G., Antonio, S., Alvarado, X., Güereca, L., Zamudio, F., and Bolivar, F. Identification and isolation of human insulin A and B chains by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat* 349, 91 (1985).
5. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970).
6. Flores, N., de Anda, R., Güereca, L., Cruz, N., Antonio, S., Balbás, P., Bolivar, F. and Valle, F. A new expression vector for the production of fused proteins in *Escherichia coli*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 25, 267 (1986).
7. Gross, E. The cyanogen bromide reaction. *Meth Enzymol.* 11, 238 (1967).
8. Cole, R.D. Sulfhytolysis. *Meth Enzymol* 11, 206 (1967)
9. Goeddel, D.V., Kleid, D.F., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.S.D. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 106 (1979).
10. Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. and Bolivar, F. Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. *Cell function and disease* (Cañedo, L., Todd, L., Jaz, J. and Parker, L., eds.) Plenum Press, New York, N. Y. 59 (1988).

## PREPARATIVE ISOLATION OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN-A CHAIN BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

NORBERTO CRUZ, MARCELA LÓPEZ, GEORGINA ESTRADA,  
XÓCHITL ALVARADO, RAMÓN DE ANDA, PAULINA BALBÁS,  
GUILLERMO GOSSET, AND FRANCISCO BOLIVAR

*Departamento de Biología Molecular  
Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 510-3  
Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico*

### ABSTRACT

A simple, selective and high capacity process is described for the preparative purification of recombinant human insulin A chain, using ion exchange chromatography. This process was developed considering the particular physicochemical characteristics of this peptide. We have found that the insulin A chain binds strongly to the anionic exchanger Macro Prep 50 Q, which permits the equilibration of the resin to an ionic strength of 0.5 M NaCl. These conditions avoid the adsorption of most contaminant components, thus incrementing the capacity of the support for the insulin A chain. Moreover, the process can be easily automatized and scaled-up.

### INTRODUCTION

Proteins produced through genetic engineering technology can be used as active substances, because they are chemically and biologically defined. Recent developments are focused to study and modify proteins to change their specificity in order to design new biological activities for industrial applications (1).

During the last decade, the development of the techniques for gene isolation and expression in different species, specially bacteria, has offered great possibilities, and in principle, today it is possible to produce a great variety of proteins. However, in some cases the expression of heterologous genes presents some inherent factors which may become significant obstacles for the production of proteins, such as the lack of knowledge about the final structure and the final biological activity of the protein produced (2). This aspect has fundamental importance for the development of purification processes, since factors such as temperature, pH, shear forces, oxidation, etc., may affect the final biological activity of the product (3).

Since the purification of recombinant proteins represents usually between 80-90% of the total cost of the process, it is necessary to design efficient methodologies, in order to lower the overall costs (4).

Typical purification processes for recombinant proteins from E. coli, require several chromatographic steps based on different physicochemical properties, such as: hydrophobicity, affinity, ionic exchange and gel permeation (1). As the number of steps increase in a particular purification process, there is also an increment in complexity, associated with higher costs and lower yields. Therefore, it is important to develop purification processes involving the fewest number of steps (5).

We have reported the construction of recombinant hybrid plasmids for the production of human insulin A and B chains in E. coli. These peptides are expressed fused to a fragment of the lambda cI repressor protein, and the in vitro association of the peptide chains yielded active human insulin (6). In order to scale-up these processes, it has been necessary to define the procedures and equipment required to work at larger scales. For these reasons, we have developed chromatographic systems that could be easily scaled-up.

Recently, we have reported the preparative purification of recombinant human insulin B chain, using HPLC (7). A similar procedure can be used for the isolation of the A chain; however,

considering the singularities of this peptide, we have developed an alternative, simpler and economical procedure. The insulin A chain is composed of 21 aminoacid residues, most of them acidic. Between them, there are four cysteine residues that when transformed to S-sulfonates (A-(SSO<sub>3</sub><sup>-</sup>),), there is an increase in the anionic character of the peptide and its solubility; the isoelectric point of this oxidized form is lower than 2 (8). Therefore, in a lightly basic pH, this peptide is strongly negatively charged. Because of these features, it is expected that insulin A chain may be purified using an anionic exchanger in a moderately basic pH.

### MATERIALS AND METHODS

#### Reagents

Formic acid, hydrochloric acid and sodium chloride from Baker. Urea from Merck. Trizma base, cyanogen bromide, sodium tetraborate and sodium sulfite from Sigma. Guanidinium hydrochloride from Pierce. Porcine insulin A chain from Sigma (I-3505) was used as a standard. Macro Prep 50 Q and BioGel P2 from Bio Rad. Dialysis bags with a cutoff of 1000 Da from Spectrum.

Lysis buffer composition: 50 mM Tris, 0.1 mM EDTA and 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol.

#### Equipment

Büchi rotaevaporator. Ultrafilter DC 10 l and a hollow fiber cartridge with a filtration surface area of 0.45 and a cutoff value of 100 kDa, from Amicon. Manton Gaulin Homogenizer from Gaulin Corporation. Static centrifuge from Beckman. Columns 1 x 5 cm and 2.5 x 20 cm with adaptable pistons, fraction collector with UV detector and recorder from LKB. Masterflex peristaltic pump from Cole Parmer. For antifoam and precipitated salt removal, a Mont-Inox sieve No. 40 (0.42 mm), was used.

#### Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Slab gel electrophoresis in the presence of SDS was performed as described by Laemmli (9) for detection of hybrid proteins.



Slab gel electrophoresis without SDS was performed in 19% w/v acrylamide, 1% w/v bis-acrylamide gels for insulin A chain analysis (8).

#### Hybrid protein and A chain level measurements

The amount of cI-A protein and insulin A chain were determined by scanning polyacrylamide gels with the appropriate samples, using a soft laser scanner densitometer from Biomed Instruments, Inc. model SCR-2D/1D.

#### Protein determination

The method used was the one reported by Lowry (10).

#### Growth of recombinant *Escherichia coli*

The *Escherichia coli* W3110 strain transformed with the recombinant plasmid pINS-A (unpublished results) was used for the production of the cI-human insulin A chain hybrid protein. The production strain was grown under batch culture conditions using complex medium with the following parameters: temperature 37 °C, pH=7.4, and dissolved oxygen concentration maintained higher than 20%. A cellular concentration of 9 g/l dry weight was obtained, and the hybrid protein reached 9-12% of the total cellular protein.

### RESULTS AND DISCUSSION

After fermentation of the *E. coli* W3110 (pINSA) strain, the cI-A hybrid protein represented between 9-12% of the total cellular protein, as determined by densitometric scanning of SDS-PAGE of total cellular proteins. 18 l of culture containing 9 g/l of *E. coli* cells dry weight, were sieved to remove the antifoaming agent and precipitated salts and subjected to cross-flow ultrafiltration in order to replace the culture media with water and to concentrate the cells by reducing the volume to 4 liters. Cellular rupture was performed using a Manton Gaulin high pressure homogenizer. Three passes, at 10 °C and 500-600

Kg/cm<sup>2</sup>, were necessary for complete disruption. The recovery and partial purification of the cI-A protein inclusion bodies, was accomplished by 4 cycles of washing the pellet with lysis buffer and centrifugation.

The inclusion bodies were subjected to a cyanogen bromide (cyanogenolysis) reaction (11) to release the A chain from the cI carrier protein. The cI sequence was cleaved to several fragments of different sizes; more protein fragments were also generated from the CNBr action on contaminant proteins. The peptide mixture was further subjected to oxidative sulfitolysis, to protect the sulfhydryl groups of the cysteine residues, transforming them into stable S-sulfonate derivatives A-(SSO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, (12). Finally, the reaction mixture was dialyzed against water, in bags with a cutoff value of 1000 Da, to eliminate guanidinium hydrochloride and other salts used in the sulfitolysis reaction. As the ionic strength of the solution decreases, many proteins precipitate; since the insulin A chain is very soluble at pH>5, approximately 90% of it remains in the supernatant at the end of the dialysis. After several fermentations, the amount of A chain obtained varied between 2 to 5%, depending on the efficiency of the induction. Figure 1 shows the protein patterns obtained after these purification steps.

It has been found that the isoelectric point of the A chain as A-(SSO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, is lower than 2 (8), and it is also known that the solubility of the tetra S-sulfonate insulin A chain decreases drastically below pH=4 (13). As expected, this peptide is strongly adsorbed to an anion exchanger at neutral or slightly basic pH, when the maximum solubility of the peptide is reached.

A method for the chromatographic isolation of the tetra S-sulfonate A chain, was developed using a macroporous acrylic anion exchanger, Macro Prep 50 Q. The exchanger was equilibrated in a small column (1 x 2 cm), in 50 mM Tris/HCl pH=8 with an ionic conductivity of 1.0 millimhos, and a linear flow rate of 38 cm/hr.

A 5 ml aliquot of peptide sample with a protein concentration of 5.0 mg/ml adjusted to pH=8 with a few drops of NaOH 1 M (final

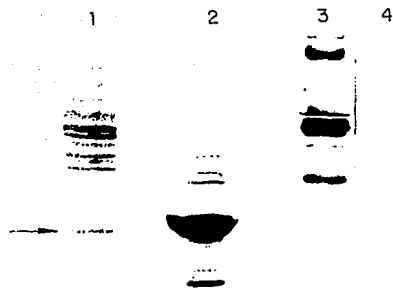


Figure 1.- Denaturing SDS polyacrylamide gel electrophoresis of several protein samples. Lane 1: total proteins from *E. coli* W3110 (pINSA); Lane 2: protein pattern obtained after purification of inclusion bodies. The arrow in lanes 1 and 2 indicate the position where the hybrid protein migrates; Lane 3: non-denaturing PAGE of peptide mixture obtained after CNBr treatment and sulficolysis; Lane 4: porcine insulin A chain, used as a standard. The arrow in lanes 3 and 4 indicate the position where the insulin A chain migrates.

conductivity of 2.3 millimhos), was loaded to the column and then washed with six column volumes of equilibration buffer until the baseline was reached. The adsorbed peptides were eluted with ten column volumes of a 0-1 M NaCl linear gradient, followed by five column volumes of 1 M NaCl.

Fractions (3 ml) were collected, and their conductivities determined. Fractions containing NaCl were desalted using Biogel

P2 for PAGE analysis. It was found, see figure 2, that the insulin A chain is the last peptide to elute, at a conductivity of 32-36 millimhos.

From these results, it was evident that it is possible to increase the ionic strength of the buffer, without causing the elution of the A chain. Therefore, a second run was performed using buffer with 0.5 M NaCl, which has a conductivity of 26.5 millimhos, to equilibrate the column. The conductivity of the sample was adjusted by the addition of NaCl. A 5 ml sample was applied with a linear flow rate of 38 cm/hr, followed by eight column volumes of equilibration buffer and a 0.5 - 1.0 M NaCl linear gradient was applied to elute proteins. As can be seen in figure 3, the amount of adsorbed protein was reduced considerably, and the predominant component adsorbed in these conditions was insulin A chain. After elution, an electrophoretic analysis revealed a purity of at least 95% for this peptide. The remaining 5% represented mainly the desamido form of the A chain (14).

Since the insulin A chain is the unique component adsorbed to the anion exchange resin in conditions of 26.5 millimhos (0.5 M NaCl), it was concluded that instead of a gradient, a single elution step could be applied, to elute the A chain as a pure peptide.

Therefore, a 5 ml sample was loaded to the column under the previously described conditions, and elution was done with five column volumes of buffer containing 1 M NaCl (48 millimhos). The electrophoretic analysis of the fractions from this chromatography, shown in figure 4, clearly demonstrated a high degree of purity for the resolved insulin A chain.

To determine the maximum load capacity for the exchanger, 1000 ml of the peptide sample, were applied to a column (2.5 x 15 cm), containing 75 ml of packing, using a linear flow rate of 51 cm/h. Collected fractions were analyzed by PAGE, to determine when the insulin A chain was no longer retained. As seen in figure 5, under this high ionic strength conditions (26.5 millimhos), the bed can be loaded with 920 ml of sample, without

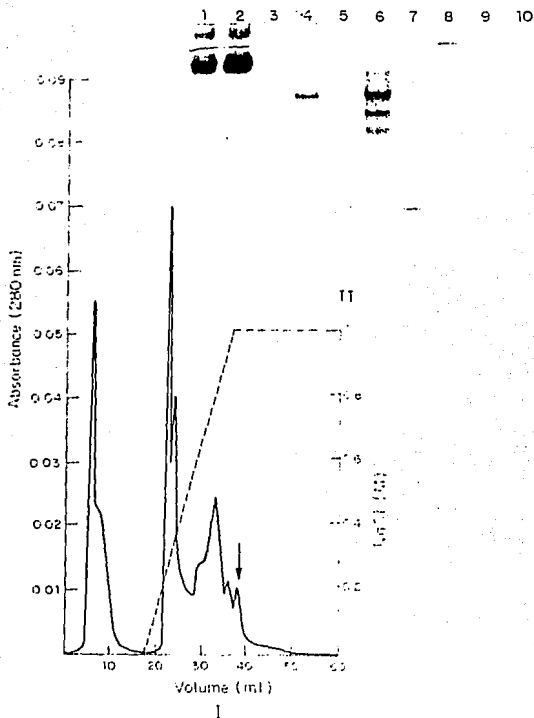


Figure 2.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h. Gradient: 0-1 M NaCl in a total of ten column volumes. The arrow indicates the peak where the insulin A chain elutes. II.- PAGE using 19% acrylamide crosslinked with 1% bis-acrylamide. Lanes 1-6 fractions collected before the A chain elution; lane 7 porcine insulin A chain as standard; lanes 8-10 represent the last fractions from the last peak.

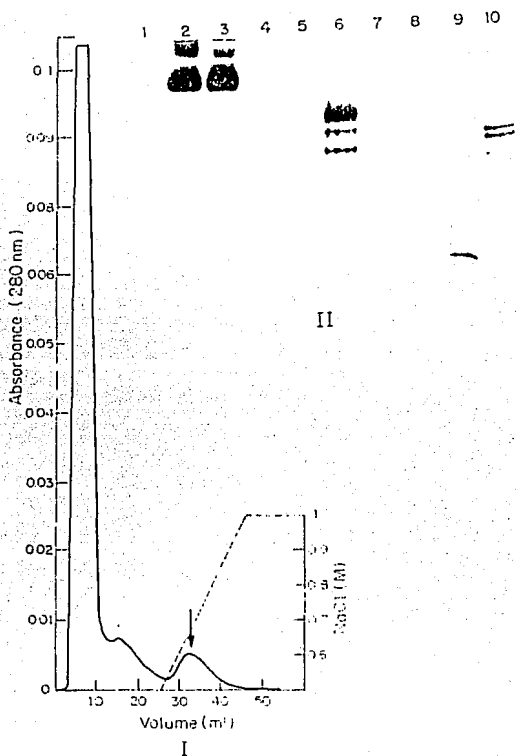


Figure 3.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h, equilibrated with a buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH=8 + 0.5 M of NaCl. The arrow indicates the peak where the A chain elutes. Gradient: 0.5-1 M NaCl in a total of ten column volumes. II.- Non-denaturing PAGE. Lanes 1-3, fractions of non adsorbed proteins; lanes 4-6, fractions eluted with equilibration buffer; lane 7, porcine insulin A chain as a standard; lanes 8 and 9, fractions of the peak eluted between 30 and 40 ml; lane 10, initial sample.

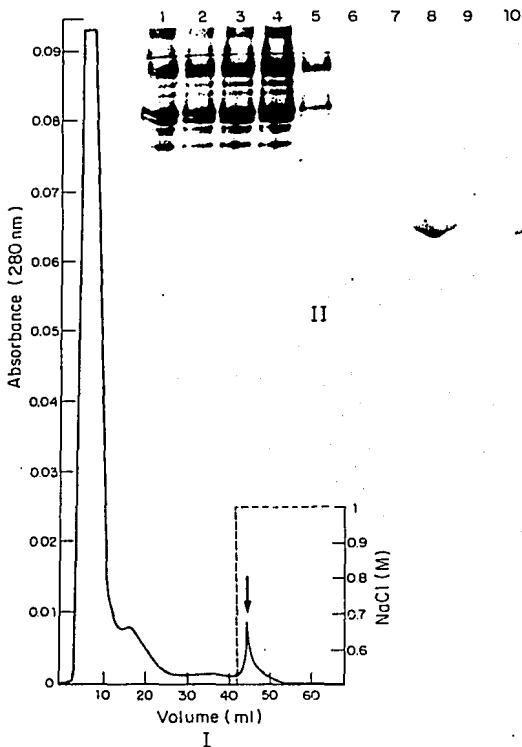


Figure 4.- I.- Chromatographic purification of 5 ml of a cyanogen bromide treated peptide sample in a column packed with 2 ml of preparative packing Macro-Prep 50 Q using a linear flow rate of 38 cm/h, equilibrated with a buffer composed of 50 mM Tris/HCl pH=8 + 0.5 M of NaCl. Elution was performed in a single step with equilibration buffer + 1 M of NaCl. The arrow indicates the fraction where the insulin A chain elutes. II.- Non-denaturing PAGE. Lane 1, initial sample, lanes 2-4, fractions of non-adsorbed protein; lanes 5-7, fractions of proteins eluted with equilibration buffer; lane 8, sample of the principal peak eluted; lane 9, fraction after elution of the principal peak; lane 10, porcine insulin A chain as a standard.

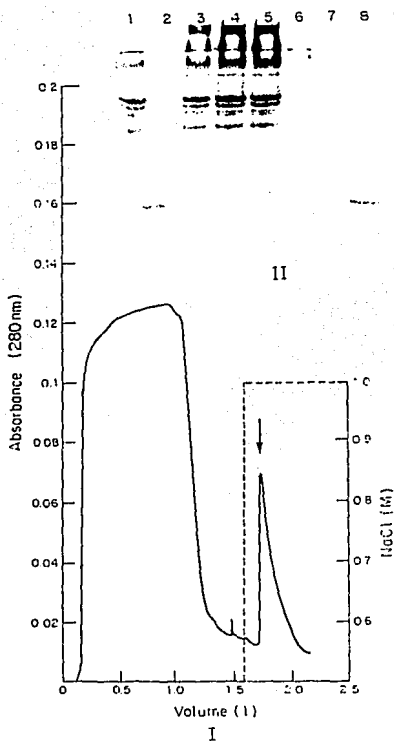


Figure 5.- I.- Chromatographic purification of 1000 ml of the cyanogen bromide treated peptide mixture (5 mg/ml) in a 2.5 X 20 cm column, packed with 75 ml of Macro-Prep 50 Q preparative packing, using a linear flow rate of 51 cm/h. Elution was carried out in the same conditions as indicated in figure 4. The arrow indicates the fraction where the insulin A chain elutes. II.- Non-denaturing PAGE. Lane 1, initial sample; lane 2, porcine insulin A chain used as a standard; lanes 3-5, fractions of non-adsorbed proteins; lane 6-7, proteins eluted with equilibration buffer, lanes 8-10; fractions of the principal peak.



eluting the A chain. Since the A chain represents 3.5% of the total protein in the sample, under the conditions established, the support had a capacity for A chain of 2.14 mg/ml of packed bed. This relatively low capacity is probably due to the extreme conditions used for the selective adsorption of the A chain, which resulted in a high degree of purification as well as a very simple process. These are important characteristics to be considered for automatization and scaling-up. However, utilizing a linear flow rate of 100 cm/h for a 20 cm long column, a cycle of 4.5 h is needed for loading (twelve column volumes), washing (five column volumes), eluting (three column volumes) and re-equilibration (five column volumes at 200 cm/h); under these conditions a throughput of 0.5 g of purified insulin A chain per liter of packed bed, per hour, can be obtained.

### CONCLUSIONS

The human insulin A chain displays singular physicochemical properties, which were used to develop a purification process, which offers high selectivity in a single chromatographic step.

An inherent advantage to the purification process developed was that the adsorption of contaminant peptides was avoided at the high ionic strength where the insulin A chain was quantitatively adsorbed with an acceptable capacity. The capacity of the support for the A chain was increased by minimizing the adsorption of contaminants.

The insulin A chain was recuperated quantitatively applying a single elution step, instead of a gradient elution, which reduced dilution. Moreover, the system operation is convenient for automatization and scaling-up. Further optimization of the flow rate at pilot-scale operation is needed to maximize throughput.

The purity of the human insulin A chain (95%) obtained by this method has been found adequate for chemical association with recombinant human B chain to yield human insulin with the expected efficiency (data not shown) (6,7).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank L. Güereca for the critical reading of this manuscript. We also thank H. J. Salinas for the gift of the Bio-Rad 50 Q support. This work was supported by grant IN300891 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, and grant 0248-N9107 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

1. Blohm, D., Bollschweiler, C. and Angew, H.H., Pharmaceutical proteins. Chem. Int. Ed. Engl. 27, 207 (1988).
2. Bialy, H., Recombinant proteins: virtual authenticity. Bio/Technology 5, 883 (1987).
3. Dunnill, P., Integrated Bioprocessing for Recombinant Proteins in: An International Conference from the Cambridge Series on Biotechnology St. John's College, Cambridge, UK 27th/28th September (1990).
4. Dwyer, J.L., Scale-up of bioproduct separation with high performance liquid chromatography. Bio/Technology 2, 957 (1984).
5. Bonnerjea, J., OH, S., Hoare and M.M. Dunnill, P., Protein purification: the right step at the right time. Bio/Technology 4, 954 (1986).
6. Balbás, P., de Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. and Bolívar, F., Overproduction of proteins by recombinant DNA: human insulin. Cell function and disease (Cañedo, L., Todd, L., Jaz, J. and Parker, L., eds.) Plenum Press, New York, N.Y. 59 (1988).
7. Cruz, N., Antonio, S., De Anda, R., Gosset, G., and Bolívar, F., Preparative isolation by high performance liquid chromatography of human insulin B chain produced in *Escherichia coli*. Journal of Liquid Chromatography 13, 1529 (1990).
8. Güereca, L., Aislamiento del péptido A de la insulina a partir de cepas bacterianas modificadas genéticamente. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Master Thesis (1984).

9. Laemmli, U.K., Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227, 680 (1970).
10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
11. Gross, E., The cyanogen bromide reaction. *Meth. Enzymol.* 11, 267 (1967).
12. Cole, R.D., Sulfitolysis. *Meth Enzymol.* 11, 206 (1967).
13. Yu-cang, D., Yu-shang, Z., Zi-xian, L. and Chen-lu, T., Resynthesis of insulin from its glycyI and phenylalanyl chains. *Scientia Sinica.* 10, 84 (1961).
14. Kroeff, E.P., Owens, R.A., Campbell, E.L. Johnson, R.D. and Marks, H.I., Production scale purification of biosynthetic human insulin by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 461, 45 (1989).