

03088 7
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Estrategias de fermentación
para la producción de β -galactosidasa
de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis***

TESIS

Que para obtener el título de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ

Cuernavaca, Morelos, Junio de 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

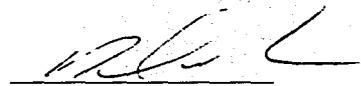
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Jurado designado:

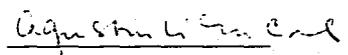
PRESIDENTE: Dr. Rodolfo Quintero Ramírez



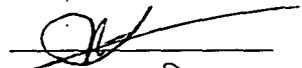
SECRETARIO: Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich



VOCAL: Dr. Agustín López-Munguía Canales



VOCAL: Dra. Mayra de la Torre



VOCAL: Dr. Enrique Merino Pérez



SUPLENTE: Dr. Mario Soberón Chávez



SUPLENTE: Dr. Fernando Valle Baheza



**Este trabajo fue realizado en el
Departamento de Microbiología
Molecular del Instituto de
Biotecnología de la UNAM, bajo la
supervisión de los Drs. Octavio T.
Ramírez R. y Fernando Valle B.**

AGRADECIMIENTOS

A todos los integrantes del jurado por sus valiosos comentarios, sugerencias y aportaciones para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a la Dra. Elizabeth Ponce por su apoyo.

A mi Madre, hermanos y sobrinos, y en especial a mi hermano Mario por su apoyo y confianza.

Especialmente a Maria Elena, Oscar, Mario y el (la) que viene, por darme parte de su vida y tiempo.

**ESTRATEGIAS DE FERMENTACION PARA LA
PRODUCCION DE β -GALACTOSIDASA DE *E. coli* EN *B. subtilis*.**

INDICE

	página
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS.....	vii
PRESENTACION DE LA TESIS.....	viii
I.1 RESUMEN	1
I.2 ABSTRACT	3
II INTRODUCCION.....	4
II.1 <i>Bacillus subtilis</i> como microorganismo huésped para la producción de proteínas recombinantes.....	4
II.2 La enzima β -galactosidasa de <i>E. coli</i>	5
II.3 Hipótesis de trabajo y cultivos alimentados como estrategia de fermentación.....	6
III OBJETIVOS.....	10
IV ANTECEDENTES.....	11
IV.1 Características generales de <i>Bacillus subtilis</i>	11
IV.2 Desarrollo-esporulación.....	13
IV.3 Expresión de β -galactosidasa regulada por la región de control del gene que codifica para la subtilisina	16
IV.4 Diseño de cultivos alimentados exponencialmente	20
IV.5 Medios de cultivo	27
IV.6 Acumulación de ácidos orgánicos	28
IV.7 Cultivos de alta densidad celular	30

V	PRESENTACION DE MANUSCRITOS	31
V.1	Desarrollo del medio mineral y evaluación de la producción de β-galactosidasa.....	31
V.2	Evaluación del efecto de la velocidad de crecimiento sobre la cinética de crecimiento y la producción de β-galactosidasa utilizando cultivos alimentados exponencialmente..	31
V.3	MANUSCRITO: Improvement of culture conditions to overproduce β-galactosidase from <i>Escherichia coli</i> in <i>Bacillus subtilis</i>.....	33
V.4	MANUSCRITO: Hiperproducción de β-galactosidasa de <i>E. coli</i> en <i>B. subtilis</i>.....	40
VI	RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSION GENERAL	55
VI.1	Preparación de un banco de células	56
VI.2	Efecto del medio de cultivo y evaluación de la producción de β-galactosidasa por <i>B. subtilis</i>.....	58
	VI.2.1 Fase de crecimiento exponencial.....	58
	VI.2.2 Fase estacionaria de cultivos lote	59
VI.3	Evaluación del efecto de la velocidad de crecimiento sobre parámetros estequiométricos y producción de β-galactosidasa en <i>B. subtilis</i> utilizando cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa.....	64
	VI.3.1 Evaluación de la etapa de alimentación.....	65
	VI.3.2 Evaluación de la etapa posterior a la alimentación.....	69
VI.4	Comparación de la producción de β-galactosidasa por la cepa de <i>B. subtilis</i> BB804 con otros microorganismos.....	73
VII	CONCLUSIONES Y APORTACIONES	77
VIII	RECOMENDACIONES	81
IX	REFERENCIAS	83

X	APENDICES	89
X.1	Mapa genético de <i>Bacillus subtilis</i> 168	89
X.2	Determinación de peso seco	90
X.3	Determinación de proteína por el método de Lowry	91
X.4	Determinación de actividad de β-galactosidasa por el método modificado de Miller	92
X.5	Determinación de ácidos orgánicos por HPLC	94
X.6	Sistema de fermentación, programa y algoritmos de control	95
X.7	Cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno, velocidad de producción de bióxido de carbono y coeficiente respiratorio	102
X.8	Afinación de parámetros para el control automático del oxígeno disuelto	104
X.9	Diseño del medio mineral suplementado con glucosa	107
X.10	Cinéticas de cultivos lote a nivel fermentador	109
X.11	Resultados de cultivos alimentados exponencialmente	116
	X.11.1 MANUSCRITO: Effect of growth rate on the production of β-galactosidase from <i>Escherichia coli</i> in <i>Bacillus subtilis</i> using glucose-limited exponentially fed-batch cultures	116
	X.11.2 Cinéticas de fermentación de cultivos alimentados exponencialmente	141
X.12	Cinéticas de cultivos lote a nivel fermentador en los cuales se midió el porcentaje de esporas resistentes a calor	150

INDICE DE FIGURAS

Figuras de la tesis:

Figura IV.2.1	Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i>	15
---------------	---	----

Figuras del manuscrito: **Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*:**

Figure 1	One-liter fermenter batch culture in glucose mineral medium.....	36
Figure 2	Shake flask cultures in Schaeffer's and in glucose mineral medium.....	37
Figure 3	Effect of glucose feeding during the stationary phase.	38

Figuras del manuscrito: **Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*:**

Figura 1.	Control de la expresión del gene de la subtilisina de <i>B. subtilis</i>	48
Figura 2.	Estrategia genética y nomenclatura utilizada para la construcción de cepas de <i>B. subtilis</i> productoras de β -galactosidasa.....	49
Figura 3.	Efecto del fondo genético sobre la producción β -galactosidasa. Cinética de producción a nivel matraz en medio Schaeffer.....	51
Figura 4.	Cinéticas de cultivos alimentados exponencialmente. Evaluación a nivel fermentador con medio mineral suplementado con glucosa.	54

Figuras de la tesis, continuación:

Figura V.1.1	Efecto del almacenamiento sobre la actividad específica de β -galactosidasa.....	57
Figura VI.3.1	Resumen de resultados cinéticos obtenidos durante el estado pseudo-estacionario de la fase de alimentación de los cultivos alimentados exponencialmente.....	68
Figura X.1.1	Mapa genético de <i>Bacillus subtilis</i>	89
Figura X.2.1	Curva de peso seco de <i>Bacillus subtilis</i> en función de la densidad óptica medida a 600 nm.....	90
Figura X.5.1	Curvas de calibración para acetato, lactato y propionato.....	95

Figura X.6.1	Sistema de fermentación para cultivos lote y cultivos alimentados exponencialmente.....	96
Figura X.6.2	Perfil predeterminado exponencial.....	100
Figura X.8.1	Diagrama para el control del nivel de oxígeno disuelto en cascada con el control de la velocidad de agitación.....	104
Figura X.8.2	Ciclo de afinación de control PID para el oxígeno disuelto.....	106
Figura X.8.3	Reajuste de parámetros de control PID para el oxígeno disuelto.....	108
Figura X.10.1	Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 11.6 g/L.....	111
Figura X.10.2	Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 11.2 g/L.....	112
Figura X.10.3	Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 25.9 g/L.....	113
Figura X.10.4	Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 30.6 g/L.....	114
Figura X.10.5	Cinética de cultivo con alimentación constante de glucosa durante la fase estacionaria, precedido por un cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 10.9 g/L.....	115

Figuras del manuscrito: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures:

Figure 1.-	Kinetics of an exponentially fed-batch culture at a pre-determined μ of 0.15 h ⁻¹	138
Figure 2.-	Kinetics of an exponentially fed-batch culture at a pre-determined μ of 0.35 h ⁻¹	139
Figure 3.-	Summary of kinetic results obtained during the controlled exponential growth phase of exponentially fed-batch cultures.....	140

Figuras de la tesis, continuación:

Figura X.11.1	Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.35 h ⁻¹	142
Figura X.11.2	Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.35 h ⁻¹	143

Figura X.11.3 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.25 h^{-1}	144
Figura X.11.4 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.173 h^{-1}	145
Figura X.11.5 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.173 h^{-1}	146
Figura X.11.6 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.116 h^{-1}	147
Figura X.11.7 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.116 h^{-1}	148
Figura X.11.8 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.058 h^{-1}	149
Figura X.12.1 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 1.98 g/L	151
Figura X.12.2 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 10.6 g/L	152

INDICE DE TABLAS

Tablas del manuscrito: **Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*:**

Table 1	Effect of initial glucose concentration in mineral medium supplemented with glucose on stoichiometric and kinetic parameters at 1 liter fermenter scale.....	37
---------	--	----

Tablas del manuscrito: **Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*:**

Tabla 1	Composición de los medios de cultivo empleados	50
Tabla 2	Resumen de la evaluación del efecto del fondo genético sobre la producción de β -galactosidasa	52
Tabla 3	Comparación de actividad enzimática obtenida a diferentes tasas de dilución con la cepa BB804.	53

Tablas de la tesis:

Tabla VI.2.1	Resumen de resultados de cultivos lote durante la fase de crecimiento exponencial utilizando el medio mineral suplementado con glucosa	59
Tabla VI.2.2	Resumen de resultados durante la fase estacionaria precedidos por cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.....	60
Tabla VI.3.1	Actividad enzimática máxima de β -galactosidasa obtenida durante la fase estacionaria de cultivos precedidos por una fase de cultivo alimentado exponencialmente	71
Tabla VI.4.1	Niveles de actividad de β -galactosidasa en diversos microorganismos.	74
Tabla VI.4.2	Comparación de actividad volumétrica de β -galactosidasa en cultivos con concentración relativamente elevada de células.	76

Tablas del manuscrito: **Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures:**

Table 1	Enzyme activity obtained during the stationary phase of cultures preceded by an exponential glucose-limited fed-batch phase.....	137
---------	--	-----

PRESENTACION DE LA TESIS

En esta sección, la de presentación de tesis, se describe la forma en que está estructurada la misma. En el capítulo I se presenta un resumen general del trabajo en español e inglés.

En el capítulo II se presenta una introducción al tema de trabajo, los principales antecedentes que dieron origen a éste trabajo y las hipótesis que se plantearon para la realización del mismo. En el capítulo III se presentan el objetivo general y los particulares que se establecieron para el desarrollo del trabajo experimental. En el capítulo IV se presenta una revisión bibliográfica de aspectos fisiológicos de *B. subtilis* y de características de los cultivos alimentados exponencialmente como estrategias de fermentación, discutiéndose en ambos casos los aspectos de relevancia para la realización de la tesis.

En el capítulo V se hace una presentación de los resultados obtenidos, los cuales son mostrados en detalle en tres manuscritos, dos de los cuales, uno publicado y otro aceptado para publicarse, son presentados en esta sección y el tercero, por someterse, es mostrado en el apéndice X.11.

Con el fin de facilitar la lectura y la secuencia de la tesis, en el capítulo VI, el de discusión general, se presentan de manera resumida los resultados reportados en los tres manuscritos antes mencionados, y se hace una discusión general acerca de los mismos.

En el capítulo VII se presentan las principales conclusiones y aportaciones obtenidas en el trabajo. En el capítulo VIII se presentan las sugerencias para trabajos futuros a partir de ideas generadas en el presente trabajo.

En el capítulo IX se muestran la bibliografía citada en las secciones que componen este trabajo, excluyendo las que son presentadas exclusivamente en los manuscritos.

Finalmente, el capítulo de apéndices, presenta el detalle de los materiales y métodos empleados en la parte experimental del trabajo, los cuales son presentados de manera resumida en los manuscritos, así como los resultados de todas las cinéticas de fermentación que fueron resumidas en los tres manuscritos y en la sección de discusión general.

L1 RESUMEN

B. subtilis es una bacteria gram (+) que esporula cuando se agota un nutriente en el medio de cultivo, concomitante con este proceso se presenta la producción de la proteasa alcalina (subtilisina), la cual es codificada por el gene *aprE*. Anteriormente se ha demostrado, en cultivos continuos en medios complejos y en cultivos alimentados limitados por nitrógeno, que la expresión del gene *aprE* es inversamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento. En este trabajo, mediante el uso de cultivos alimentados se evaluó el efecto que tiene la velocidad específica de crecimiento impuesta a *B. subtilis* sobre la producción de β -galactosidasa, cuya expresión está controlada por la región de regulación del gene *aprE*, durante la fase estacionaria. Así mismo, con el propósito de des-reprimir y favorecer la expresión de la β -galactosidasa se planteó imponer un estrés metabólico mediante la utilización de cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa.

Para esto se utilizó una cepa recombinante de *B. subtilis* (la BB804), en la cual el gene *lacZ* de *E. coli* es expresado en cromosoma utilizando la región de control del gene *aprE*. La cepa BB804 contiene dos mutaciones en reguladores pleiotrópicos del proceso de esporulación y de expresión del gene *aprE*, las mutaciones *hpr2* y *degU32(Hy)*, las cuales en conjunto incrementan aproximadamente 40 veces el nivel de expresión de *aprE*. Para realizar la evaluación se diseñó un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa y se utilizaron como estrategias de fermentación cultivos lote y cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa.

Normalmente la expresión del gene *aprE* no está asociada a crecimiento. Sin embargo, la utilización del medio mineral en cultivos lote propició que la producción de la β -galactosidasa se diera parcialmente asociada a crecimiento. La baja frecuencia de esporulación, menor al 1%, durante la fase de crecimiento indica que la formación de esporas resistentes a calor no fue el factor que ocasionó la producción de β -galactosidasa asociada a crecimiento. Además, la utilización del medio mineral con diferentes concentraciones iniciales de glucosa en cultivos lote, permitió incrementar hasta en un 85% la actividad específica de β -galactosidasa, en comparación con la actividad obtenida en medio complejo. Así mismo, al incrementar la concentración inicial de glucosa en cultivos lote de 11 a 26 g/L se logró incrementar dos y tres veces la actividad y productividad volumétrica, respectivamente. Por otro lado, durante las tres primeras horas de la fase estacionaria de los cultivos se presentó lisis celular. Esta lisis se pudo evitar alimentando glucosa durante la fase estacionaria, de acuerdo a un coeficiente de mantenimiento de $0.11 \frac{g_{glc}}{g_{DCW} \cdot h}$. De esta manera se logró duplicar la actividad

volumétrica en ese cultivo, en comparación con un cultivo lote realizado en condiciones similares pero sin alimentar glucosa durante la fase estacionaria.

Para establecer los perfiles predeterminados de alimentación de glucosa para los cultivos alimentados exponencialmente, se diseñó un sistema automático controlado por computadora. Utilizando el medio mineral, se evaluaron velocidades específicas de crecimiento predeterminadas en un intervalo de 0.058 a 0.35 h^{-1} . Los resultados obtenidos durante la fase de crecimiento de los cultivos alimentados exponencialmente muestran que se pudo obtener un estado pseudo-estacionario en la velocidad específica de crecimiento y de glucosa remanente en el medio de cultivo, así como en la acumulación de acetato. El tiempo durante el cual se obtuvo el estado pseudo-estacionario se pudo incrementar de 6 a 46 h conforme la velocidad predeterminada de crecimiento se redujo de 0.35 a 0.058 h^{-1} . Después de ese tiempo, y o obstante de que la glucosa se alimentó en base a los perfiles predeterminados y de que todos los minerales estaban presentes en concentraciones no limitantes, se perdió el control sobre el estado pseudo-estacionario, obteniéndose una reducción en la velocidad específica de crecimiento y una acumulación de glucosa y acetato.

En similitud a los cultivos lote, para los cultivos alimentados mantenidos a una velocidad de crecimiento cercana a 0.4 h^{-1} , se obtuvo producción de β -galactosidasa asociada a crecimiento. Sin embargo, y contrario a lo que se planteó, para los cultivos alimentados llevados a cabo a una velocidad de crecimiento menor a 0.2 h^{-1} , la actividad específica se redujo drásticamente, a valores cercanos a cero, durante la etapa de alimentación. La máxima actividad específica obtenida durante las primeras tres a cinco horas de la fase estacionaria, de cultivos precedidos por velocidades específicas de crecimiento cercanas a la máxima, comparan muy bien con los resultados obtenidos en los cultivos lote. Sin embargo, para los cultivos llevados a cabo a velocidades de crecimiento menores a 0.20 h^{-1} , la producción de β -galactosidasa durante la fase estacionaria del cultivo fue mínima. Los resultados obtenidos indican que la reducción de la velocidad de crecimiento, mediante la limitación por glucosa, suprimen la producción de β -galactosidasa tanto durante la fase de crecimiento exponencial, como durante la fase estacionaria.

En comparación con cultivos lote llevados a cabo en medio complejo, la utilización del medio mineral en cultivos lote con 26 g/L iniciales de glucosa y de cultivos alimentados exponencialmente a una velocidad de crecimiento predeterminada de 0.35 h^{-1} , se logró incrementar alrededor de 2, 16 y 5 veces la actividad específica, la volumétrica y la productividad volumétrica de β -galactosidasa, respectivamente.

1.2 ABSTRACT

B. subtilis is a gram (+) bacterium that sporulates when a nutrient is exhausted in the medium. Also, during the early stages of sporulation the subtilisin gene (*aprE*) is expressed. It has been shown, in continuous cultures with complex medium and in nitrogen-limited fed-batch cultures, that expression of *aprE* gene is inversely proportional to growth rate. In this work the effect of specific growth rate on *aprE* expression during the stationary phase, using fed-batch cultures, was assessed. Furthermore, a metabolic stress was imposed, using glucose-limited exponentially fed-batch cultures, as an attempt to de-repress and increase *aprE* expression during the growth phase.

The mutations *hpr2* and *degU32(Hy)*, which are known to increase *aprE* gene expression around 40-fold, were used in combination with the *lacZ* gene chromosomally integrated under control of the regulatory region of the *aprE* gene in a *B. subtilis* strain designated as BB804.

Normally, *aprE* expression is repressed during vegetative growth. However when BB804 strain was grown in mineral medium supplemented with glucose, β -galactosidase production was partially growth-associated. Sporulation frequencies, lower than 1%, during the growth phase indicates that spore formation was not the factor that induced growth-associated β -galactosidase expression. Compared with the results obtained in complex media up to a 85% increase in specific β -gal activity in mineral medium, supplemented with different initial glucose concentrations, was obtained. A two and three-fold increase in volumetric activity and β -galactosidase productivity was obtained when glucose concentration was varied from 11 to 26 g/L, respectively. In addition, glucose feeding during the stationary phase at $0.11 \frac{g_{glc}}{g_{ocw} h}$, resulted in a two-fold increase in volumetric enzyme activity as cellular lysis was prevented.

Constant μ , in the range of 0.058 to $0.35 h^{-1}$, were maintained using mineral medium and computer-controlled pre-determined glucose feeding profiles. At all growth rates tested, a pseudo-steady state in μ and glucose concentration was obtained. As pre-determined μ was reduced from 0.35 to $0.058 h^{-1}$, pseudo-steady state was maintained from 6 to 46 hours. Moreover, in spite the fact that glucose was fed in accordance with the pre-determined profile and that all other minerals were present at non-limiting concentrations, after such elapsed times, a characteristic sudden decrease in the slope of log of biomass concentration against time and an accumulation of glucose and acetic acid, indicated that control on pseudo-steady state was lost.

For fed-batch cultures maintained at a growth rate close to $0.4 h^{-1}$, specific enzyme activity remained relatively constant during the fed-batch phase. In contrast, for exponentially fed-batch cultures maintained at a μ lower than $0.2 h^{-1}$, specific and volumetric β -galactosidase activity decreased during the fed-batch phase, reaching a value close to zero before glucose feeding was stopped. Maximum β -galactosidase activity, during the stationary phase, was obtained at μ close to $0.4 h^{-1}$, whereas it strongly decreased at values of μ lower than $0.2 h^{-1}$. This suggests that glucose limitation and μ reduction during exponential growth phase, represses β -galactosidase production during the exponential and the stationary phases.

Using batch cultures with 26 g/L of initial glucose concentration or exponentially fed-batch cultures carried out at a μ close to $0.4 h^{-1}$, allowed to obtain about 2, 16 and 5-fold increase in specific, volumetric and volumetric productivity of β -galactosidase activity, respectively, when compared to batch cultures carried out with complex medium.

II INTRODUCCION

II.1 *Bacillus subtilis* como microorganismo huésped para la producción de proteínas recombinantes

Existen varios aspectos que son de especial interés para la producción de enzimas recombinantes utilizando a *B. subtilis* como microorganismo hospedero. En primer lugar, la combinación de técnicas de ingeniería genética y de procesos de fermentación han permitido que varias proteínas heterólogas sean producidas en cantidades que de otra manera hubiese sido imposible obtener con fuentes naturales o microorganismos silvestres (Lee, 1996). En 1989 el mercado mundial de enzimas industriales de gran volumen era de 600 millones de dólares, de los cuales el 33% eran producidas con cepas recombinantes de *B. subtilis* (Arbige y Pitcher, 1989). Además se pronosticaba que para 1995 dicho mercado sería de 1 000 millones de dólares y que la mayoría de las enzimas industriales serían producidas con cepas recombinantes (Gicquiaux, 1990).

Por otro lado, *B. subtilis* es una bacteria gram (+), la cual habita principalmente en el suelo y esporula en un medio ambiente adverso para su crecimiento. Entre los factores que pueden ocasionar que *B. subtilis* esporule se encuentran principalmente: ausencia de algún(nos) nutriente(s) tales como la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo (Schaeffer *et al.*, 1965; Sonenshein, 1989; Nicholson y Setlow, 1990), exposición a radiaciones ultravioleta y acumulación de ciertos factores de esporulación (Grossman y Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993). Concomitante con el inicio de la fase estacionaria o del proceso de esporulación, se presenta la producción de varias enzimas degradativas (Schaeffer, 1965 y 1969; Ferrari *et al.*, 1993), es decir que la producción de dichas enzimas no está asociada al crecimiento y en consecuencia no es constitutiva. De manera que la inducción, que desencadena la producción de las enzimas degradativas, se produce de manera natural sin que se requiera de la adición de un inductor exógeno. Así mismo, esta inducción puede ser controlada de manera muy sencilla, si se ocasiona el agotamiento de algún nutriente en el medio de cultivo.

Entre los genes que codifican para estas enzimas degradativas se encuentra el gene *aprE*, el cual codifica para la proteasa alcalina denominada subtilisina. Dicha enzima es utilizada ampliamente

en la elaboración de detergentes. A nivel industrial se utilizan cepas sobreproductoras que poseen diversas mutaciones que incrementan la expresión del gene *aprE*. Con las cepas y técnicas adecuadas de fermentación, se ha logrado obtener concentraciones de hasta 20 g de subtilisina por litro (Zukowsky, 1992). También es sabido que los sistemas de expresión de proteínas basados en plásmidos en *B. subtilis* ocasionan un incremento en la carga metabólica, reduciendo la velocidad de crecimiento y favoreciendo la selección de variantes no productoras, los cuales crecen a una mayor velocidad de crecimiento y por tanto desplazan a la población productora (Shoham y Demain, 1991; Vyas *et al.*, 1994). Sin embargo, en un sistema en el cual la expresión de dichas proteínas esta codificada por genes integrados en cromosoma, y que además se expresan naturalmente, es decir sin la necesidad de un inductor externo, a partir del inicio de la fase estacionaria del cultivo, se evitan los inconvenientes antes mencionados. Debido a lo anterior la región de control del gene *aprE* puede utilizarse para expresar proteínas heterólogas codificadas cromosomalmente, tales como la β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis* (Ferrari *et al.*, 1993). Además, después de *E. coli* y *S. cerevisiae*, dentro de los microorganismo utilizados a nivel industrial, *B. subtilis* es de los cuales se posee un mayor conocimiento genético y bioquímico.

Otra característica importante para emplear a *B. subtilis* como microorganismo hospedero para la producción de proteínas recombinantes, principalmente en el área de alimentos, es que muchas especies de *Bacillus*, incluyendo *B. subtilis*, no presentan interacciones patogénicas con los humanos o animales (de Boer y Diderichsen, 1991; de Boer *et al.*, 1994), por lo que *B. subtilis* es considerado ampliamente como microorganismo GRAS (Generally Recognized as Safe). Cabe apuntar, que la producción a nivel industrial de la β -galactosidasa se lleva a cabo con especies de levaduras y hongos que también son considerados GRAS (Casas, 1992).

II.2 La enzima β -galactosidasa de *E. coli*

La enzima β -galactosidasa (β -D-galactosidasa galactohidrolasa E.C.3.2.1.23) hidroliza a la lactosa en glucosa y galactosa. La elaboración de derivados de productos destactosados se lleva a cabo mediante la utilización de la β -galactosidasa proveniente de algunas especies de *Kluyveromyces*

y de *Aspergillus*. Los productos deslactosados pueden ser consumidos por personas que presentan intolerancia a la lactosa. Además, debido a que la glucosa y la galactosa son mas dulces, mas solubles y mas fácilmente fermentables que la lactosa, las propiedades de los productos lácteos, subproductos o derivados de la leche deslactosados son mejores desde el punto de vista de procesos para la elaboración de productos alimenticios a base de lácteos (Casas, 1992). La β -galactosidasa de *E. coli* a diferencia de las lactasas obtenidas de hongos, presenta pH y temperatura óptimos que son adecuados para la hidrólisis de lactosa en leche y en suero dulce (6.6-7.5 y 55°C, respectivamente), y a diferencia de las lactasas provenientes de *Kluyveromyces fragilis*, es muy estable a temperaturas mayores a 30°C (Morisi *et al.*, 1972; Nijpels, 1982). Así mismo, el gene que codifica para la enzima β -galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli* ha sido ampliamente utilizado como reportero para estudiar los sistemas genéticos de regulación de enzimas degradativas y de fenómenos de esporulación en *B. subtilis* (Ferrari *et al.*, 1986; Valle y Ferrari, 1989; Perego *et al.*, 1991; Ferrari *et al.*, 1993). Además, la región de control del gene que codifica para la subtilisina ha sido utilizada en nuestro laboratorio como modelo de estudio para la expresión de proteínas homo y heterólogas, así como para estudiar su sistema de regulación (Valle y Ferrari, 1989; Bolaños, 1994; Rincón *et al.*, 1994; Salvador *et al.*, 1994; Olmos *et al.*, 1996; Olmos *et al.*, 1997). En consecuencia, en nuestro laboratorio se han construido cepas de *B. subtilis* que presentan un nivel elevado de producción de β -galactosidasa recombinante, cuya expresión es controlada por la región de regulación del gene *aprE*, codificada cromosomalmente y que no requieren de la adición de inductores exógenos para su expresión (Bolaños, 1994). Es por esto, que en el presente trabajo se decidió utilizar cepas de *B. subtilis* recombinantes, con las características antes mencionadas, para sobreproducir la enzima β -galactosidasa de *E. coli*.

II.3 Hipótesis de trabajo y cultivos alimentados como estrategia de fermentación

Como ya se menciona, la producción de proteínas reguladas por la región de control del gene que codifica para la subtilisina está multirregulada genéticamente en *Bacillus subtilis* y su expresión normalmente se inicia concomitante con el inicio del proceso de esporulación, es decir durante el estadio de transición entre el crecimiento vegetativo y el inicio de la fase estacionaria. Mediante el uso, ya sea de cultivos continuos con medios complejos (Rincón *et al.*, 1994), cultivos lote empleando

fuentes de nutrientes que son metabolizadas lentamente (Hanlon y Hodges, 1981) o mediante técnicas de cultivo alimentado limitadas por nitrógeno (Pierce *et al.*, 1992) en *B. subtilis*, así como en cultivos continuos limitados por glucosa en medios minerales en *B. licheniformes* (Frankena *et al.* 1985), se ha demostrado que la producción de proteasas, de subtilisina y del proceso de esporulación son inversamente proporcionales a la velocidad específica de crecimiento. Es decir que la producción de proteasas y la frecuencia de esporulación se incrementan conforme la velocidad de crecimiento es reducida.

Por otro lado, los cultivos alimentados son una de las estrategias de fermentación mas utilizada a nivel industrial para la obtención de productos asociados y no asociados a crecimiento (Zabriskie y Arcuri, 1986; Arbige y Pitcher, 1989; Fieschko, 1989; Royce, 1992; Yee y Blanch, 1992; Zukowsky, 1992; Arbige *et al.*, 1993; Kleman y Strohl, 1994; Ramírez *et al.*, 1994; Lee, 1996). A continuación se presentan varias características que se consideraron importantes para evaluar la producción de β -galactosidasa en *B. subtilis* utilizando cultivos alimentados. Limitando algún nutriente y alimentándolo de manera exponencial, por ej. la glucosa o la fuente de nitrógeno, se puede controlar la velocidad de crecimiento durante la fase de crecimiento exponencial (Yamanè y Shimizu, 1984, Yee y Blanch, 1992). Además, la limitación de la fuente de carbono y la reducción en la velocidad de crecimiento permite reducir la formación de subproductos inhibitorios tales como los ácidos orgánicos (Yee y Blanch, 1992; Lee, 1996). En el caso específico de *B. subtilis*, el proceso de esporulación *per se* y la acumulación de factores de esporulación (Grossman y Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993), limitan la cantidad de células que se pueden obtener. Además, para obtener la máxima concentración de productos no asociados a crecimiento, se requiere de una etapa del cultivo en fase estacionaria. De manera que para maximizar la producción de células y al mismo tiempo de productos no asociados a crecimiento, los cultivos alimentados exponencialmente permiten por un lado la acumulación de los factores de esporulación y por otro la producción de productos del metabolismo secundario sin la necesidad de contender con estrategias de fermentación que requieren de dos recipientes de fermentación (como sería el caso de cultivos continuos),

Los hechos mencionados en los párrafos anteriores condujeron a plantear algunas hipótesis para favorecer la producción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*, mediante la variación de la velocidad de crecimiento empleando cultivos alimentados limitados por glucosa. En primera instancia, al controlar la velocidad de crecimiento, mediante la limitación por glucosa en cultivos alimentados, se planteo evitar el efecto adverso de la acumulación de ácidos orgánicos e incrementar la cantidad de biomasa disponible al iniciar la fase estacionaria de los cultivos, y de ésta manera favorecer la productividad volumétrica de β -galactosidasa. En segundo término al imponer un estrés metabólico durante la fase de crecimiento exponencial, mediante la limitación por glucosa en cultivos alimentados, se planteo por un lado favorecer la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento vegetativo y en consecuencia al reducir la velocidad de crecimiento des-reprimir la expresión del gene *aprE* durante la fase de crecimiento exponencial. En base a esta hipótesis, también se planteo realizar cultivos de dos etapas. Los cuales consistirían de una primera etapa de alimentación rápida para favorecer un crecimiento rápido y la obtención de una concentración celular elevada, para posteriormente pasar a una etapa de alimentación con crecimiento lento, o nulo, en donde se favoreciera la producción de β -galactosidasa. Finalmente, también estábamos interesados en evaluar si la reducción de la velocidad de crecimiento durante la etapa vegetativa, mediante la limitación por glucosa, tenía un efecto sobre la producción de β -galactosidasa, es decir sobre la expresión del gene *aprE* durante la fase estacionaria del cultivo.

Como es sabido, el conocimiento de la fisiología de cepas recombinantes sobreproductoras, en especial la respuesta que presentan a variaciones en el tipo de medio de cultivo y a la velocidad de crecimiento, son parámetros de importancia en la optimización de fermentaciones (Zabriskie y Arcuri, 1986; Fieschko, 1989). Por lo cual en este estudio, inicialmente se evaluaron algunos parámetros cinéticos, así como la capacidad de síntesis de β -galactosidasa de *B. subtilis* recombinante en cultivos lote. Para este propósito, se diseñó un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa, dado que en este tipo de medios las concentraciones de los nutrientes pueden ser conocidas y controladas. Además, con estos medios de cultivo se puede controlar la velocidad de crecimiento y obtener datos cinéticos relevantes respecto al crecimiento celular, el consumo de sustrato y a la producción del producto deseado en cultivos continuos o cultivos alimentados. Al realizar la evaluación de la producción de β -galactosidasa con *B. subtilis* en cultivos lote empleando el medio

mineral suplementado con glucosa, se esperaba que la expresión del gene *aprE* conservase su regulación y se obtuviera una producción de β -galactosidasa únicamente durante la fase estacionaria del cultivo.

En segundo termino, se decidió evaluar el efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el comportamiento cinético de los cultivos así como sobre la producción de β -galactosidasa utilizando cultivos alimentados exponencialmente. En este caso como ya se mencionó, al imponer un estrés metabólico durante la fase de crecimiento exponencial, mediante la limitación por glucosa en cultivos alimentados, esperábamos favorecer la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento vegetativo y en consecuencia a partir de la reducción de la velocidades de crecimiento des-reprimir la expresión del gene *aprE* durante la fase de crecimiento exponencial

III OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la velocidad de crecimiento de *Bacillus subtilis* sobre la producción de β -galactosidasa de *Escherichia coli*, cuya expresión esta controlada, cromosomalmente, por la región de regulación del gene de la subtilisina (*aprE*), y que además contiene las mutaciones *hpr2* y *degU32(Hy)* en las proteínas reguladoras transcripcionales

PARTICULARES

- 1.- Establecer un medio mineral suplementado con glucosa que permita satisfacer las necesidades nutricionales de *B. subtilis* y controlar los procesos de fermentación mediante la alimentación limitada de la fuente de carbono.
- 2.- Caracterizar la capacidad biosintética de *Bacillus subtilis* para la producción de β -galactosidasa en cultivos lote.
- 3.- Evaluar el efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria, en cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa.

IV ANTECEDENTES

IV.1 Características generales de *Bacillus subtilis*

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son en su mayoría aerobias, Gram (+) y formadoras de esporas. Este género se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, aire y agua, y ha sido explotado de manera extensa por el hombre para la producción de enzimas hidrolíticas (como la subtilisina), antibióticos, insecticidas y productos químicos (Zukowsky, 1992). Particularmente, *B. subtilis* es una bacteria Gram (+), que habita principalmente en el suelo y esporula en un medio ambiente adverso para su crecimiento. *B. subtilis* tiene la habilidad de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Los tiempos de duplicación típicos de *B. subtilis* varían de 20 min a más de una hora cuando es cultivado a 37°C, en medios muy ricos y complejos o en medios minerales, respectivamente (Harwood y Archibald, 1990). Concomitante con las primeras etapas del proceso de esporulación se induce, de manera natural, la producción de enzimas degradativas (Priest, 1977, Schaeffer, 1969). Los sistemas de fermentación en los cuales la producción no está asociada al crecimiento celular, permiten cultivar las células sin efectos adversos sobre el crecimiento debido a la carga metabólica asociada a la producción de proteínas que no son esenciales para el crecimiento celular (p. ej. la β -galactosidasa en *B. subtilis*) o a una presión de selección debido a un marcador molecular (p. ej. la resistencia a un antibiótico). Adicionalmente, en *B. subtilis* la inducción que desencadena la producción de las enzimas degradativas, se produce de manera natural sin que se requiera de la adición de un inductor exógeno. Así mismo, esta inducción puede ser controlada de manera muy sencilla, si se ocasiona el agotamiento de algún nutriente en el medio de cultivo.

Cuando *B. subtilis* es sometido al agotamiento de algún nutriente durante la etapa de transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria del cultivo, se desencadenan una serie de respuestas con un significado fisiológico importante para el desarrollo de este trabajo. Entre estas respuestas se incluyen:

- La des-represión de enzimas requeridas para incrementar las funciones catabólicas, tales como las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Hanson y Cox, 1967; Sonenshein, 1989) y los sistemas enzimáticos de utilización de nitrógeno las cuales incrementan el rango de substratos metabolizables (Fisher y Sonenshein, 1991).

- El desarrollo de quimiótaxis y el desarrollo de flagelo, lo cual facilita el movimiento hacia la búsqueda de nutrientes.

- Activación del fenómeno de competencia, es decir la capacidad de *B. subtilis* de tomar ADN foráneo e incorporarlo a su material genético, lo que le permite reparar ADN u obtener una variación genética y en consecuencia le proporciona un capacidad adicional de sobrevivencia (Dubnau, 1991). Esta propiedad es fácilmente detectada en un cultivo líquido de *B. subtilis*, ya que este coincide con el desarrollo de la quimiótaxis. Esta característica permite aplicar un método de transformación muy sencillo en *B. subtilis* el cual consiste en agregar ADN con la mutación deseada a cultivos de *B. subtilis*, en estado de competencia, y aplicando un método de selección adecuado obtener la cepa con la mutación deseada.

- La producción y excreción de antibióticos, la cual presumiblemente sirve para limitar la competencia de otros microorganismos por los nutrientes presentes en el ambiente. La producción y excreción de varias enzimas hidrolíticas que convierten nutrientes complejos en unidades pequeñas las cuales son fácilmente metabolizables (Priest, 1977).

- La producción de proteasas intracelulares, las cuales incrementan el recambio de proteínas y causan ajustes en el metabolismo celular (Burnet *et al.*, 1986)

En general estas respuestas pueden interpretarse como un mecanismo de *B. subtilis* para evitar la inanición y/o complementar el proceso de desarrollo para lograr eficientemente la sobrevivencia mediante la formación de esporas. Las características que desarrolla *B. subtilis* durante el período de transición, sugieren que potencialmente la atenuación o la disminución de la velocidad de crecimiento, mediante la limitación por algún nutriente, permitiría hasta cierto nivel des-reprimir la producción de las enzimas degradativas (Valle y Ferrari, 1989; Sonenshein, 1989; Pierce *et al.* 1992).

IV.2 Desarrollo-esporulación

El proceso de diferenciación de *B. subtilis* es un proceso fisiológico complejo desde el punto de vista bioquímico y genético. Debido a esta complejidad, el objetivo de este capítulo es proporcionar únicamente información relevante del proceso de desarrollo de *B. subtilis* relacionada con la producción de enzimas degradativas. Una revisión actual del proceso de esporulación en *B. subtilis* puede ser consultada en Errington (1993). Cuando *B. subtilis* es cultivado en un medio rico, el proceso de esporulación se lleva a cabo en aproximadamente 8 horas (Schaeffer *et al* 1965). En consecuencia, el proceso de esporulación, una vez iniciada la fase estacionaria, ha sido dividido en ocho estadios, los cuales están basados en los principales cambios citológicos que ocurren durante la formación de la espora (Kunkel, 1991; figura IV.2.1). La notación t_0 , t_1 , t_2 etc., es utilizada para designar el tiempo en que han ocurrido dichos cambios. De esta manera, t_0 indica el inicio del proceso de esporulación o de la fase estacionaria del cultivo y t_2 indica que han transcurrido 2 horas del inicio de la esporulación. Durante t_2 ocurre la formación del septo en la célula. En general del estadio tres al ocho ocurren el engullimiento, la formación de la corteza y la cubierta, así como la maduración y lisis de la espora. Particularmente, para el objetivo de esta tesis es importante resaltar varios fenómenos que ocurren durante las primeras etapas del proceso de desarrollo.

Durante la etapa vegetativa de crecimiento, *B. subtilis* se divide centralmente para producir dos células idénticas (ver figura IV.2.1). En contraste, durante las primeras etapas del proceso de esporulación, el proceso de septación ocurre asimétricamente, cerca de un polo de la célula. De t_0 a t_2 , ocurren las respuestas adaptativas descritas en la sección anterior (Strauch y Hoch, 1992). Si durante estas etapas se obtiene o añade una cantidad suficiente de los nutrientes agotados, las células de *B. subtilis* reasumen el crecimiento vegetativo, de otra manera el proceso de desarrollo continúa. Durante la transición de t_2 a t_3 , se forma el septo y la célula madre engulle a la pre-espora. El período t_3 generalmente es considerado como el estadio durante el cual el proceso de esporulación ya no puede revertir hacia la formación de células en crecimiento vegetativo. A partir de t_3 la mayor parte de la expresión genética se da por separado, tanto temporal como espacialmente, entre la célula madre y la pre-espora (Losick y Stragier, 1992). Aunque posteriormente a t_3 se enriquezca el medio o se

agreguen los nutrientes agotados, las células no pueden revertir el proceso de esporulación (Fresse *et al.*, 1970).

No obstante que ha sido probado que el proceso de esporulación es independiente de la producción de varias enzimas degradativas, incluyendo la producción de la subtilisina, es decir que no se requiere de la producción de la subtilisina para que las células esporulen (Stahl y Ferrari, 1984), la expresión del gene de la subtilisina, y de otros genes que codifican para enzimas degradativas, se sobrelapa con la expresión de genes que controlan la iniciación del proceso de esporulación (Valle y Ferrari, 1989). El inicio de la expresión del gene *aprE* coincide con el inicio del proceso de desarrollo en *B. subtilis*, y la máxima velocidad de producción de proteínas codificadas por la región de control del gene *aprE* se da de t_0 a t_2 (Ferrari *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1993). Durante este periodo, muchos genes que se expresan durante la fase estacionaria, incluyendo al gene *aprE*, son transcritos por la ARN polimerasa asociada al principal factor sigma de la fase de crecimiento vegetativo, σ^A o σ^{43} (Sonenshein, 1989). Este factor pierde su actividad durante las dos primeras horas de la fase estacionaria. El producto del gene *spoOH*, σ^H (σ^{30}), es necesario para la transcripción de muchos genes que son expresados durante el estadio de transición. σ^H también contribuye, durante t_0 a t_2 a la expresión del gene que codifica para σ^A . Los genes que dependen de σ^H tienen funciones muy diferentes, incluyendo muchas que son necesarias para la esporulación y algunas que no lo son. La mayoría de los genes que se expresan en la fase estacionaria dependen directa o indirectamente de σ^H (Sonenshein, 1989). En medios conteniendo caldo nutritivo σ^H se encuentra en una concentración muy baja durante el crecimiento exponencial y se incrementa de manera substancial durante la primera hora después de que se detiene el crecimiento. Sin embargo, en medio mínimo con glucosa, σ^H se encuentra en un nivel elevado, tanto durante el crecimiento exponencial, como durante la fase estacionaria (Sonenshein, 1989).

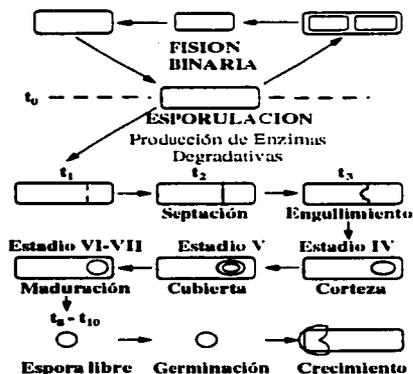


Figura IV.2.1 Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*

En *B. subtilis* ha sido demostrado que la glucosa y otras fuentes de carbono que son metabolizadas rápidamente, inhiben el proceso de esporulación y la producción de subtilisina (Fisher y Sonenshein, 1991). El término represión catabólica de la esporulación (y de producción de subtilisina) por glucosa es utilizado para describir este fenómeno (Marks y Freese, 1987). Este concepto ha sido extendido a la represión de la esporulación y a la producción de subtilisina por nitrógeno, fosfato y azufre. Varios investigadores han demostrado que la deprivación por la fuente de nitrógeno, en condiciones de exceso de carbono en el género *Bacillus*, ocasionan una mayor producción de proteasas, si se compara con la deprivación por la fuente de carbono en condiciones de exceso de nitrógeno (Heineken y O'Connor, 1972; Hanlon y Hogges, 1981; Hanlon *et al.*, 1982). Adicionalmente, existe reportes que demuestran efectos positivos y negativos de la adición de aminoácidos sobre la producción de subtilisina (Fisher y Sonenshein, 1991).

Por otro lado, ha sido demostrado que la producción de subtilisina se incrementa mediante la disminución de la velocidad de crecimiento, ya sea utilizando nutrientes que son metabolizados

lentamente (Hanlon y Hodges, 1981), o mediante el uso de técnicas de cultivo continuo (Wouters y Buysman, 1977). También ha sido demostrado que la frecuencia de esporulación se incrementa conforme la velocidad de crecimiento se reduce (Dawes y Mandelstam, 1970; Dawes y Thornley, 1970). Además, se ha postulado que el estrés energético incrementa la producción de la subtilisina (Frankena *et al.* 1985 y 1986). Así mismo, Rincón *et al.* (1994), utilizando técnicas de cultivo continuo y medios complejos, demostraron que la expresión del gene que codifica para la subtilisina así como la frecuencia de esporulación, se incrementan conforme la velocidad de crecimiento se reduce. A pesar de que las bases moleculares del proceso de regulación de la velocidad de crecimiento sobre la expresión del gene que codifica para la subtilisina no son conocidas, ni han sido estudiadas, resulta claro que se debe aplicar un estrés metabólico sobre *B. subtilis* con el fin de iniciar e incrementar la producción de la subtilisina. Dado que el papel que juega la producción de la subtilisina es tratar de que las células de *B. subtilis* estén en capacidad de utilizar otros substratos y mantenerse en reproducción, es de esperarse una correlación positiva entre la producción de la subtilisina y el estrés nutricional, metabólico o energético.

IV.3 Expresión de β -galactosidasa regulada por la región de control del gene que codifica para la subtilisina

El gene que codifica para la subtilisina (*aprE*) en *B. subtilis* presenta un sistema de regulación compleja (Valle y Ferrari, 1989). En particular existen varias proteínas que actúan como reguladores negativos: Hpr, Sin, Pai y AbrB, y otras como reguladores positivos: DegU, DegR, DegS, SenS y DegQ, de la región de control de la transcripción del gene *aprE*. De manera que mutaciones en estos reguladores, las cuales presentan efectos pleiotrópicos sobre la síntesis de enzimas degradativas y sobre el proceso de esporulación, permiten incrementar o disminuir, según sea el caso, el nivel de expresión del gene *aprE*. En la actualidad esta región de control es una de las mejor estudiadas en *B. subtilis*. Dicho conjunto de reguladores, junto con proteínas reguladoras del proceso de esporulación (codificadas por los genes *spo0*), son los que ocasionan que el gene *aprE* inicie su expresión al final de la fase exponencial de crecimiento, cuando se agota algún nutriente en el medio de cultivo. La mayor expresión de este gene se obtiene durante las primeras horas de la fase estacionaria.

Debido a que las proteínas reguladoras controlan funciones que son expresadas durante el estadio de transición entre la finalización del crecimiento vegetativo y el inicio de la fase estacionaria y del proceso de esporulación, se ha propuesto el término "reguladores del estadio de transición" para referirse a ellos (Strauch y Hoch, 1992). Aunque ninguna de las mutaciones, conocidas a la fecha, en estos reguladores del estadio de transición provoca un defecto significativo en la formación de la espora, existe evidencia de que la expresión de algunos de ellos están bajo el control de reguladores de la esporulación y que, además, pueden controlar por sí mismos algunos genes de la esporulación (Strauch y Hoch, 1992). Por ser de particular interés para el presente trabajo, a continuación se presenta un breve resumen del control que ejercen los reguladores del estadio de transición Hpr y DegU en *B. subtilis*.

Hpr actúa como un regulador negativo (represor) de la expresión de las enzimas degradativas, tales como la subtilisina, la proteasa neutra y la serin-proteasa intracelular. También regula negativamente el fenómeno de competencia, no existe evidencia de que regule la expresión de la α -amilasa y cuando el gene *hpr* está presente en copias múltiples inhibe el proceso de esporulación. Se ha encontrado que el regulador Hpr se une a cuatro regiones separadas del promotor de la subtilisina y se ha propuesto que, junto con los otros reguladores, forma una curvatura el ADN, la cual provoca la formación de una horquilla de represión (Strauch y Hoch, 1992)

DegU actúa como un regulador positivo (activador) de las enzimas degradativas subtilisina, levansacarasa, proteasa neutra y la serin-proteasa intracelular. También regula positivamente el fenómeno de competencia y no existe evidencia de que en su forma nativa regule el proceso de esporulación, ni la síntesis de α -amilasa y la fosfatasa alcalina (Strauch y Hoch, 1992). Al parecer las proteínas reguladoras DegU y DegS forman un sistema de transmisión de señales de dos-componentes. Se ha postulado que DegS es una quinasa que fosforila a la proteína DegU en respuesta a una(s) señal(es) ambiental(es) (Strauch y Hoch, 1996). De manera que cuando la forma fosforilada de DegS se une a una región específica del promotor *aprE* se activa la transcripción del gene.

Por ejemplo, se ha demostrado que la combinación de las mutaciones *hpr2* y *degU32(Hy)* incrementa aproximadamente 40 veces el nivel de expresión del gene *aprE* (Ferrari *et al.*, 1993; Bolaños, 1994). Estas dos mutaciones y la región de control de *aprE* fueron utilizadas en nuestro laboratorio, por Bolaños (1994), para construir cepas productoras de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*. En el caso particular para la cepa utilizada en el presente trabajo, inicialmente Bolaños (1994) construyó un vector de integración denominado paplac2. Dicho plásmido de integración contiene el promotor completo, las señales de regulación y los primeros ocho codones del gene estructural de la subtilisina. Así mismo posee el gene *cat*, el cual codifica para la cloranfenicol-acetiltransferasa. También posee el gene *lacZ* de *E. coli* así como los fragmentos terminales del gene *amy*, el cual codifica para la enzima α -amilasa de *B. subtilis*. De manera que, para evitar problemas de inestabilidad de plásmidos, el vector paplac2 fue integrado, mediante recombinación doble, en el cromosoma de *B. subtilis*, dando como resultado una cepa con interrupción del gene estructural de la α -amilasa, resistente a cloranfenicol y con capacidad para producir la enzima β -galactosidasa. Con fines de comparación sobre la producción de β -galactosidasa, la cepa anterior (BB801) fue considerada como la cepa silvestre.

Posteriormente Bolaños (1994) a otra cepa de *B. subtilis*, la BB82 -la cual tiene suprimido el gene que codifica para la proteasa neutra (Δ prE), que contiene una mutación en el gene que codifica para el regulador negativo Hpr (la mutación *hpr2*, la cual es una mutación sin sentido; Valle y Ferrari, 1989) y es auxótrofa a histidina (*hisA*)- le integró en cromosoma el plásmido paplac2 siguiendo un procedimiento similar al descrito en el párrafo anterior. Con la mutación *hpr2*, en la cepa BB802 Bolaños (1994) logró un incremento de aproximadamente 3 veces en la actividad específica con respecto a la cepa silvestre. Adicionalmente, aprovechando el hecho de que el gene que codifica para la proteína reguladora DegU está muy cercana al gene *hisA* (posiciones en el cromosoma 306° y 298°, respectivamente; ver Apéndice X.1), mediante transducción generalizada Bolaños (1994) transfirió al cromosoma la mutación *degU32(Hy)*. La mutación con pérdida de sentido *degU32(Hy)* consiste en el cambio del aminoácido histidina por leucina en el aminoácido 12 de la proteína DegU (Henner *et al.*, 1988). Esta modificación en la parte amino terminal, incrementa la estabilidad de la forma fosforilada de la proteína DegU (Dahl *et al.*, 1992), y en consecuencia incrementa la producción de proteínas reguladas por el promotor de la subtilisina (Kunst *et al.*, 1974). Finalmente, Bolaños (1994) obtuvo, en

combinación con la mutación *hpr2*, una cepa hiperproductora (denominada BB804: $\Delta aprE$, *hpr2*, *aprE::lacZ*, Cm^R, *degU32(Hy)*), con un incremento de aproximadamente 43 veces en la actividad específica con respecto a la cepa silvestre. Cuando la cepa BB804 fue cultivada a nivel matraz en medio complejo, la actividad específica máxima alcanzada a tres horas de iniciada la fase estacionaria fue de 160 000 unidades de β -galactosidasa por mg de proteína (en este caso una U está definida como la cantidad de enzima que produce 1 nano-mol de ONP por minuto a 28°C y pH de 7). Es por esto que en el presente trabajo se decidió utilizar la cepa de *B. subtilis* BB804 para evaluar la producción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*.

No obstante que la mutación *degU32(Hy)* incrementa importantemente el nivel de expresión del gene *aprE*, tiene efectos pleiotrópicos en *B. subtilis*, de los cuales algunos tienen relevancia para el área de fermentaciones. Por ejemplo, entre los efectos pleiotrópicos que induce la mutación *degU32(Hy)* se encuentran: a) la sobreproducción de subtilisina y otras enzimas degradativas tales como la levansacarasa, la proteasa neutra, la β -glucanasa y la serin-proteasa intracelular; b) defectos en la síntesis de flagelo y del desarrollo de competencia; y c) defectos en la represión catabólica normal de la esporulación por glucosa (Kunst *et al.* 1974; Valle y Ferrari, 1989; Strauch y Hoch, 1992). Mientras que la esporulación de cepas silvestres es reprimida en medios complejos con exceso de glucosa, el efecto pleiotrópico mencionado en el inciso c, ocasiona que las células de *B. subtilis* que contienen la mutación *degU32(Hy)* esporulen en condiciones de exceso de glucosa en medios complejos (Kunst *et al.* 1974; Lepesant *et al.* 1974).

Como es sabido la productividad volumétrica depende de la concentración celular alcanzada y como se mencionó la producción de la β -galactosidasa en la cepa BB804 está reprimida durante la fase de crecimiento exponencial. Estos dos hechos permitieron plantear la utilización de cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa, con el fin de obtener una concentración elevada de células durante la fase de crecimiento exponencial y reducir la carga metabólica, debido a la sobreproducción de proteínas durante el crecimiento, para finalmente maximizar la producción de la β -galactosidasa durante la fase estacionaria. Por otro lado, a nivel industrial y en algunos reportes de la literatura se ha planteado la utilización de cepas asporogénicas para prolongar el tiempo de producción (Pierce *et al.* 1992; Oh *et al.* 1995). Sin embargo, hasta donde se sabe los fenotipos

asporogénicos en cepas de *B. subtilis* reducen drásticamente la expresión del gene *aprE* (Perego *et al.*, 1991; Bolaños *et al.*, 1994; Olmos *et al.*, 1996). A pesar de que la biomasa que se puede obtener en cultivos alimentados limitados por glucosa esta condicionada, debido a que la esporulación no se puede reprimir por glucosa en la cepa BB804, en el presente estudio se decidió trabajar con dicha cepa debido a su característica de sobreproducir la enzima β -galactosidasa.

IV.4 Diseño de cultivos alimentados exponencialmente

Cuando se considera el uso de una cepa de *B. subtilis* para la producción de alguna proteína regulada por la región de regulación del gene *aprE*, es importante recordar que la mayoría de las cepas (silvestres y/o sobreproductoras) únicamente producen subtilisina durante el período de adaptación (estado de transición) entre la fase de crecimiento logarítmico y la fase estacionaria del cultivo, y durante las primeras horas de la fase estacionaria. Desde el punto de vista de producción, esta característica limita la productividad del sistema. Una de las soluciones tradicionales a este problema consiste en realizar rondas de mutagénesis al azar y seleccionar variantes con un mayor nivel de producción (Debabov, 1982). Sin embargo, en nuestro grupo de investigación al igual que otros investigadores (Pierce *et al.*, 1992), preferimos utilizar un procedimiento más sistemático, incorporando, mediante técnicas de biología molecular, mutaciones definidas en el cromosoma de *B. subtilis* y manipular las condiciones ambientales a nivel de fermentador con el fin de incrementar la productividad. En la sección anterior se discutió el uso de cepas mutadas mediante biología molecular, en esta sección se discutirá la implementación de la estrategia de fermentación a través de un cultivo alimentado exponencialmente. Dicha estrategia permite, entre otras propiedades discutidas en esta sección, imponer un estrés nutricional y por ende metabólico, a través de la limitación de nutrientes, sobre las células cultivadas. Esto se logra por medio del control de la velocidad de crecimiento. Además, Pierce *et al.* (1992) han demostrado, utilizando cultivos alimentados y un medio mineral suplementado con glucosa, que la limitación por nitrógeno mineral permite incrementar el tiempo durante el cual se expresan proteínas reguladas por la región de control del gene *aprE* en *B. subtilis*. En consecuencia, en este trabajo preferimos evaluar el efecto de la limitación de la fuente de carbono (específicamente glucosa) sobre la cepa sobreproductora de *B. subtilis* BB804 (descrita en la

sección anterior), debido a que esta limitación permite imponer un estrés nutricional y energético, los cuales potencialmente afectan la expresión del gene que codifica para la subtilisina.

Por otro lado, los procesos de fermentación involucran una interacción compleja entre la célula y su medio ambiente. En general en los procesos de fermentación se desea obtener una cantidad elevada de células, si es posible un crecimiento celular rápido, reducir la formación de subproductos, evitar efectos adversos por la limitación de nutrientes o el exceso de los mismos, etc., para finalmente obtener un rendimiento elevado del producto deseado. El diseño del sistema de control del proceso de fermentación, requiere de la selección de una estrategia que permita manipular el medio ambiente en el fermentador, así como las características fisiológicas del microorganismo, con el fin de afectar el metabolismo celular en aras de obtener la mayor concentración del producto deseado, en el menor tiempo posible. A continuación se presentan las razones por las cuales se seleccionó la estrategia de fermentación de cultivo alimentado exponencialmente para la producción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*. Así mismo, en primera instancia se presentan las bases de diseño para llevar a cabo los cultivos alimentados exponencialmente.

Existen diversos modos de operación de fermentación, entre los tres mas comunes se encuentran los cultivos lote, los cultivos continuos y los cultivos alimentados (Arbige *et al*, 1993). La característica principal de los cultivos lote es que, una vez inoculados, no se lleva a cabo la adición de nutrientes ni la remoción de caldo de fermentación. En los cultivos continuos se realiza una adición continua de medio, así como la remoción continua de caldo de fermentación. En este sentido, los cultivos alimentados (fed-batch cultures) presentan un modo de operación intermedio entre los cultivos lote y los cultivos continuos. En los cultivos alimentados se lleva a cabo una alimentación continua o discontinua de algún(os) nutriente(s), la cual puede efectuarse mediante diferentes perfiles. Sin embargo, a diferencia de los cultivos continuos no existe una corriente de salida continua del caldo de fermentación. Dependiendo de la concentración del substrato adicionado durante el proceso, el volumen en el fermentador puede cambiar o mantenerse aproximadamente constante.

Los cultivos alimentados se han utilizado exitosamente para: contender con mecanismos de regulación celular tales como represión catabólica, inducción para la formación de productos.

inhibición por sustrato o el efecto de glucosa (O'Connor *et al.*, 1992; Modak *et al.*, 1986); para reducir la producción y/o acumulación de metabolitos tóxicos, tales como los ácidos orgánicos (Yee y Blanch, 1992; Lee, 1996); para estudiar el efecto de variables ambientales, en condiciones controladas, sobre la producción de proteínas recombinantes, tales como la velocidad de crecimiento (Ramírez *et al.*, 1994); y para obtener cultivos de alta densidad celular (Riesenberg, 1991; Yee y Blanch, 1992; Kleman y Strohl, 1994, entre otros).

Generalmente los cultivos alimentados se inoculan con células que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial, la cual es mantenida durante un determinado período de tiempo con los nutrientes presentes al inocular el fermentador. Posteriormente a una etapa de cultivo por lote, se pueden aplicar diferentes perfiles de alimentación de nutrientes para evaluar el efecto específico de una variable ambiental. Existen diversas estrategias de operación de los cultivos alimentados. Yamané y Shimizu, 1984; Parulekar y Lim, 1985; y Yee y Blanch, 1992, han revisado en detalle, los diferentes tipos de cultivos alimentados y las características particulares de los mismos. Sin embargo, para controlar la velocidad específica de crecimiento de las células, manteniendo un nivel bajo del nutriente limitante (además de los cultivos continuos) existe un modo de operación denominado cultivo alimentado exponencialmente.

El fundamento principal de los cultivos alimentados exponencialmente es igualar la demanda de nutrientes de los microorganismos, mediante la alimentación de cantidades adecuadas del nutriente limitante (por ej. la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo o azufre). De esta manera, al incrementar de forma exponencial la alimentación, del nutriente limitante, se puede controlar la tasa de dilución y por consiguiente la velocidad de crecimiento. A diferencia de los cultivos continuos y en sentido estricto, en los cultivos alimentados exponencialmente existe un cambio, aunque sea pequeño, del volumen con respecto al tiempo. Dado que el cambio del volumen respecto al tiempo es diferente de cero, no se tiene un estado estacionario en el volumen. Con respecto al cambio del volumen, existen dos casos de cultivos alimentados exponencialmente.

a) Si el cambio del volumen es muy grande y exponencial, la concentración celular puede mantenerse aproximadamente constante respecto al tiempo, de manera que el cambio de la

concentración celular respecto al tiempo es prácticamente igual a cero y se obtiene un estado pseudo-estacionario en la concentración celular (Ramírez *et al.*, 1994). Como consecuencia el cambio de la velocidad de crecimiento respecto al tiempo también es prácticamente cero y en este caso también se obtiene un estado pseudo-estacionario en la velocidad específica de crecimiento, el cual es igual a la tasa con la cual se está diluyendo el medio de cultivo.

b) Si el cambio de volumen no es muy grande, debido a que el sustrato limitante en la alimentación exponencial está muy concentrado, la concentración celular se incrementa exponencialmente respecto al tiempo y no se obtiene un estado pseudo-estacionario en la concentración celular. No obstante, si se logró mantener el incremento exponencial de la concentración celular, la velocidad específica de crecimiento es aproximadamente constante y por tanto consecuencia su cambio respecto al tiempo es cercano a cero y como consecuencia también se obtiene un estado pseudo-estacionario en la velocidad específica de crecimiento. En este caso el valor de la velocidad específica de crecimiento está determinado directamente por el incremento exponencial de la biomasa.

En ambos casos también se obtiene estado pseudo-estacionario respecto a la concentración del sustrato limitante, lo cual permite definir una etapa durante la cual el cultivo está controlado respecto a una velocidad de crecimiento deseada.

En términos prácticos, una estrategia útil y sencilla es seguir un esquema de alimentación predeterminada (es decir, mediante un control de lazo abierto), diseñado para anticipar las necesidades nutricionales. Tales esquemas consisten ya sea en incrementos en escalón de la velocidad de alimentación de nutrientes, con el fin de aproximarse a una demanda exponencial, o bien un flujo de alimentación con un incremento exponencial. Incrementos graduales en la velocidad de alimentación permiten incrementar la concentración celular mediante el abastecimiento de una mayor cantidad de nutrientes. En este caso las células crecen exponencialmente durante un período de tiempo, si la velocidad (tasa) de alimentación del sustrato limitante del crecimiento se incrementa en proporción a la concentración celular. En consecuencia, el método de alimentación exponencial ha sido desarrollado para permitir que las células crezcan a una velocidad específica de crecimiento

constante (Yamané y Shimizu, 1984; Paraluyekar y Lim, 1985; O'Connor *et al.* 1992; Yee y Blanch, 1992; Lee, 1996). Además, con *E. coli* esta técnica también permite reducir la acumulación de productos tales como los ácidos orgánicos, si se controla la velocidad de crecimiento por debajo de un valor crítico (Yee y Blanch, 1992; Lee, 1996).

Las células consumen el carbono (glucosa) como fuente de energía y como sustrato para las reacciones de biosíntesis. De manera que la acumulación del sustrato limitante ($d(SV)/dt$), durante la fase de crecimiento exponencial en un cultivo alimentado, puede ser representado mediante un balance considerando (O'Connor *et al.* 1992): la alimentación de sustrato, el crecimiento celular, la formación de producto y el consumo de energía de mantenimiento para las funciones basales de la célula. Dicho balance está representado por la ecuación (1):

$$(1) \quad \frac{\text{acumulación}}{\frac{d(SV)}{dt}} = \frac{\text{alimentación}}{FS_i} - \frac{\text{crecimiento}}{\frac{\mu}{Y_{x/s}} X_t V} - \frac{\text{producto}}{\frac{Q_p}{Y_{p/s}} X_t V} - \frac{\text{mantenimiento}}{m X_t V}$$

donde:

- S es la concentración del sustrato en el fermentador (g/L)
- V es el volumen en el fermentador (L)
- F es el flujo volumétrico de alimentación de sustrato (L/h)
- S_i es la concentración del sustrato en la solución alimentada (g/L)
- μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- X es la biomasa o concentración celular en base seca (g_{DCW}/L)
- t es el tiempo (h)
- $Y_{x/s}$ es el rendimiento biomasa/sustrato (g células/(g sustrato))
- $Y_{p/s}$ es el rendimiento producto/sustrato (g producto/(g sustrato))
- Q_p es la velocidad específica de formación de producto (g producto/(g células- h))
- m es el coeficiente de mantenimiento (g sustrato/(g células- h))

Considerando la etapa de crecimiento exponencial en condiciones aerobias, se tiene que:

A) El valor típico de rendimiento biomasa substrato es de alrededor de 0.5 g células / g glucosa, si las velocidades específicas de crecimiento son mayores a 0.06 h⁻¹, y dado que el coeficiente de mantenimiento tiene valores típicos alrededor de 0.1 g substrato / g células h, se tiene que:

$$(2) \quad \frac{\mu}{Y_{X/S}} \gg m$$

B) Se sabe que la velocidad de formación de proteínas, reguladas por la región de control del gene *aprE*, en *B. subtilis* durante la fase de crecimiento exponencial es reducida (Sonenshein, 1989; Valle y Ferrari, 1989; Ferrari *et al*, 1993). De manera que:

$$(3) \quad \frac{\mu}{Y_{X/S}} \gg \frac{Q_p}{Y_{P/S}}$$

Así, los términos de mantenimiento y de formación de producto pueden considerarse despreciables en la ecuación (1), para obtener la solución simplificada:

$$(4) \quad \frac{d(VS)}{dt} = FSi - \frac{\mu}{Y_{X/S}} X_1 V$$

Además, si:

- La biomasa se incrementa exponencialmente, es decir que el substrato limitante se alimenta exponencialmente.
- La concentración de substrato en el fermentador se mantiene constante y cercana a cero.
- La concentración de substrato a alimentar es alta, de manera que el volumen en el fermentador sea aproximadamente constante.

Entonces: $d(SV)/dt = 0$. De manera que a partir de la ecuación (4) se tiene:

$$(5) \quad \frac{d(VS)}{dt} = 0 = FS_i - \frac{\mu}{Y_{X/S}} X_t V$$

Reordenando se obtiene:

$$(6) \quad F = \frac{\mu}{S_i Y_{X/S}} X_t V$$

Por otro lado del balance para biomasa se tiene que:

$$(7) \quad \frac{d(XV)}{dt} = \mu X_t V$$

Para el caso en que la velocidad específica de crecimiento es controlada a un valor constante, y sabiendo que a $t = 0$ (es decir cuando se inicia la alimentación), $V = V_0$ y $X_t = X_0$, la ecuación de balance de biomasa (7) se puede integrar y se obtiene:

$$(8) \quad X_t V = X_0 V_0 \exp(\mu t)$$

Sustituyendo (8) en (6) se obtiene la siguiente ecuación:

$$(9) \quad F = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{S_i Y_{X/S}}$$

La cual describe la velocidad de alimentación, en función del tiempo, que permite el crecimiento exponencial con una velocidad específica de crecimiento constante, siempre y cuando el coeficiente de rendimiento biomas/substrato sea constante.

IV.5 Medios de cultivo

En general, hay tres tipos de medio: los definidos, los complejos y los semi-definidos. Los nutrientes en los medios complejos, tales como la peptona, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, caldo nutritivo, etc., varían en composición y calidad, lo cual hace que las fermentaciones con estos medios sean menos reproducibles. Sin embargo, los medios semi-definidos o complejos son utilizados para maximizar el crecimiento y la formación del (los) producto(s). Con el fin de obtener una concentración celular elevada en cultivos bacterianos, es necesario diseñar un medio de cultivo balanceado, que contenga todos los componentes necesarios para el crecimiento celular. En virtud de que las concentraciones de los nutrientes pueden ser conocidas y en consecuencia controladas, los medios definidos generalmente son utilizados para conocer coeficientes estequiométricos, tales como $Y_{x/s}$. Dicho coeficiente puede ser aplicado en la ecuación 9 con el fin de establecer el esquema de alimentación exponencial predeterminada descrito en la sección anterior. Además, el comportamiento del coeficiente $Y_{x/s}$, en función de la velocidad de crecimiento o de otra variable del cultivo, permite advertir si se presentan cambios metabólicos en las condiciones de crecimiento evaluadas (Rodríguez y de la Torre, 1996).

Algunos nutrientes, incluyendo las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, cuando están presentes en el medio de cultivo por arriba de cierta concentración, inhiben el crecimiento celular. Esto explica el hecho por el cual al incrementar la concentración de nutrientes en cultivos lote, no resulta en la obtención de concentraciones celulares elevadas. En el caso de *E. coli* el crecimiento se inhibe cuando la glucosa, el amonio y el fósforo, están por arriba de las siguientes concentraciones: 50, 3 y 10 g/L, respectivamente (Lee *et al.* 1996). Esta es la razón por la cual los cultivos alimentados son iniciados con concentraciones de nutrientes por debajo del nivel inhibitorio y son alimentados a un flujo tal que la velocidad de crecimiento se puede mantener a un valor deseado.

IV.6 Acumulación de ácidos orgánicos

Aún en condiciones aerobias, durante el cultivo de bacterias en presencia de exceso de glucosa se producen ácidos orgánicos. Dichos ácidos orgánicos, y en particular el acético, es producido cuando el flujo de carbono dentro de las vías centrales del metabolismo excede la demanda biosintética y la capacidad de generación de energía dentro de la célula (Holms, 1986; Majewsky y Domach, 1990), o cuando el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y/o la cadena de transporte de electrones se saturan (El-Mansi y Holms, 1989; Han *et al.*, 1992), o bien, como sucede en *B. subtilis*, cuando el ciclo de los ácidos tricarbóxicos no es funcional (Sonenshein, 1989). Concentraciones de ácido acético por arriba de 5 g/L a pH 7, ocasionan una reducción en la velocidad de crecimiento, en el rendimiento de biomasa y la máxima concentración celular obtenida en *E. coli* (Luli y Strohl, 1990; Bech Jensen y Carlsen, 1990; Han *et al.* 1992). Adicionalmente, se ha reportado que el ácido acético tiene un mayor efecto sobre cepas recombinantes en comparación con las no-recombinantes, y que la producción de proteínas recombinantes se reduce significativamente por la acumulación de acetato (Bech Jensen y Carlsen, 1990; MacDonald y Neway, 1990; Shimizu *et al.*, 1992).

En general, la formación de ácido acético depende del medio utilizado, de la velocidad específica de crecimiento y de la cepa utilizada. Por ejemplo, el ácido acético se forma en medios complejos y definidos cuando la velocidad específica de crecimiento excede a 0.2 o 0.35 h⁻¹, respectivamente (Meyer *et al.*, 1984; El-Mansi y Holms, 1989; Paalme *et al.*, 1990). Estudios realizados con diferentes cepas de *E. coli* han demostrado que el ácido acético se produce en un medio definido cuando la velocidad específica de crecimiento es mayor de 0.14 h⁻¹ (Fieschko, 1989). De manera similar, para *B. subtilis* se ha demostrado que en condiciones aerobias, este microorganismo produce acetato, formato, lactato, propionato y acetoina (Snay *et al.*, 1989; Park *et al.* 1992; Cayuela *et al.*, 1993; Vierheller *et al.* 1995). Snay *et al.* (1989) utilizando cultivos continuos mostraron que a concentraciones de glucosa mayores a 10 g/L en la alimentación y/o tasas de dilución mayores a 0.36 h⁻¹, la eficiencia de utilización de glucosa de *B. subtilis* para la formación de biomasa se reduce, debido a una formación elevada de (acetato, formato, lactato, propionato y acetoina). Además, se ha demostrado que el propionato y el acetato reducen considerablemente la velocidad de crecimiento de *B. subtilis* a concentraciones mayores a 1 y 2 g/L, respectivamente (Park *et al.* 1992).

y que el formato a concentraciones de 1.25 g/L es tóxico para el crecimiento celular de *Bacillus subtilis* (Snay *et al.*, 1989).

En el caso particular para *B. subtilis* existen varios aspectos que son comunes para la regulación de los genes que codifican para las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. En general, durante el crecimiento en medios complejos varios genes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos son transcritos a un nivel basal, se dice entonces que el ciclo no es funcional (Sonenshein, 1989). Dichos genes se inducen durante la fase estacionaria de cultivos realizados en medios complejos, es decir cuando algún(os) nutriente(s) ha(n) sido agotado(s) en el medio. Se dice entonces que el ciclo es funcional. Además, si se agrega glucosa durante la fase estacionaria de cultivos realizados en medios complejos, se reprime de nuevo la expresión de varios genes del ciclo. En el caso de medios mínimos la regulación de los genes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos no está bien estudiada. Pero se sabe que algunos genes son inducidos y otros reprimidos durante la fase de crecimiento cuando los medios son suplementados con glucosa y glutamina o glucosa y caseína (Sonenshein, 1989). Para el caso de medios minerales suplementados únicamente con glucosa no se conoce la regulación de los genes que codifican para las enzimas del ciclo, pero es de esperarse que la mayoría, sino es que todos, estén inducidos tanto durante la fase de crecimiento exponencial como durante la fase estacionaria.

En consecuencia, la aplicación de la estrategia de cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa, como se mencionó en la sección IV.4, resulta apropiada para reducir la producción de dichos ácidos en cultivos de *B. subtilis*. Existen otras estrategias que consideran la remoción de ácido acético (y de medio de cultivo) mediante procedimientos de diálisis o mediante filtración y reciclamiento del medio de cultivo. Sin embargo, en estos últimos procesos se desperdician cantidades considerables de nutrientes para su aplicación.

IV.7 Cultivos de alta densidad celular

La alimentación exponencial ha sido utilizada exitosamente para la obtención de cultivos de alta densidad celular de cepas silvestres y recombinantes de *E. coli*. Para este microorganismo la velocidad específica de crecimiento normalmente es mantenida entre 0.1 y 0.3 h⁻¹ con el fin de evitar la formación de ácido acético (Lee, 1996). Se han alcanzado concentraciones de hasta 128 y 148 g en base seca por litro de *E. coli*, utilizando la alimentación exponencial limitada por glucosa y glicerol, respectivamente (Korz *et al.*, 1995).

Como ya ha sido mencionado, los reportes relacionados con la obtención de cultivos de alta densidad celular con cepas de *B. subtilis* son contados (Kai *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1992; Cayuela *et al.*, 1993). Además, en dichos reportes se emplearon cepas esporogénicas y medios complejos, lo cual facilita la obtención de cultivos de alta densidad celular. Sin embargo, se ha demostrado que varias mutaciones que bloquean el proceso de esporulación reducen drásticamente la producción de β-galactosidasa (hasta 16 veces) que se expresa utilizando la región de regulación del gene *aprE* (Ferrari *et al.*, 1986; Perego *et al.*, 1991; Bolaños, 1994; Olmos *et al.*, 1996). En consecuencia en el presente trabajo se decidió trabajar con la cepa esporogénica BB804, debido a su carácter sobreproductor de β-galactosidasa.

A pesar de las ventajas antes mencionadas de los cultivos alimentados, existen algunas limitaciones cuando se pretenden alcanzar concentraciones celulares elevadas. Entre estas se encuentran la acumulación de metabolitos inhibitorios, y la capacidad limitada de transferencia de oxígeno y de disipación de calor del equipo (Lee, 1996). En el caso específico de *B. subtilis*, el proceso de esporulación *per se* y la acumulación de factores de esporulación (Grossman y Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993), limitan la cantidad de células que se pueden obtener. En este sentido, los cultivos alimentados exponencialmente permiten por un lado la acumulación de dichos factores y por otro la producción de productos del metabolismo secundario, sin la necesidad de contender con estrategias de fermentación en dos etapas.

V PRESENTACION DE MANUSCRITOS

V.1 Desarrollo del medio mineral y evaluación de la producción de β -galactosidasa

Detalles del diseño del medio de cultivo, así como la evaluación de la producción de β -galactosidasa en cultivos lote se presentan en los manuscritos: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* (por A. Martínez, O.T. Ramírez y F. Valle), publicado en Appl. Microbiol. Biotechnol. vol. 47, 40-45 (pags. 33-39 de esta tesis); Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis* (pags. 40-54 de esta tesis) en prensa en: Anals de encontro e uso de lactases (Universidade Estadual De Campinas. Campinas, Sp. Brasil.); y en el apéndice X.9 (Diseño del medio mineral suplementado con glucosa).

La estrategia seguida para la construcción de la cepa utilizada en este reporte, así como su evaluación en los medios complejo y mineral, se presentan en detalle en el manuscrito: Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis* (pags. 40-54 de esta tesis) en prensa en: Anals de encontro e uso de lactases (Universidade Estadual De Campinas. Campinas, Sp. Brasil.). Cabe aclarar que la construcción de las cepas fue realizada por el Biólogo Víctor Bolaños como parte de su trabajo para obtener el grado de Maestro en Biotecnología (Bolaños, 1994) y quien suscribe participó, en colaboración con V. Bolaños, para la evaluación de las cepas construidas en medio complejo a nivel matriz.

V.2 Evaluación del efecto de la velocidad de crecimiento sobre la cinética de crecimiento y la producción de β -galactosidasa en cultivos alimentados exponencialmente

El efecto que tiene la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de β -galactosidasa utilizando cultivos alimentados exponencialmente se presentan parcialmente en la segunda parte del manuscrito.: Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis* (pags. 40-

54 de esta tesis) en prensa en: Anals de encontro e uso de lactases (Universidade Estadual De Campinas. Campinas. Sp. Brasil.); y de forma mas detallada en el manuscrito: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures (pags. 117-140 de esta tesis), el cual se someterá a Enzyme and Microbial Technology, y por consiguiente está integrado en la sección 11 de los apéndices.

**V.4 MANUSCRITO: IMPROVEMENT OF CULTURE CONDITIONS TO
OVERPRODUCE β -GALACTOSIDASE FROM *Escherichia coli* IN *Bacillus
subtilis*.**

ORIGINAL PAPER

A. Martínez · O. T. Ramírez · F. Valle

Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*

Received: 18 April 1996 / Received revision: 27 August 1996 / Accepted: 6 September 1996

Abstract The effect of some culture variables in the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* was evaluated. The *lacZ* gene was expressed in *B. subtilis* using the regulatory region of the subtilisin gene *aprE*. The host contained also the *hpr2* and *degU32* mutations, which are known to overexpress the *aprE* gene. We found that, when this overproducing *B. subtilis* strain was grown in mineral medium supplemented with glucose (MMG), β -galactosidase production was partially growth-associated, as 40%–60% of the maximum enzyme activity was produced before the onset of the stationary phase. In contrast, when a complex medium was used, β -galactosidase was produced only at low levels during vegetative growth, whereas it accumulated to high levels during early stationary phase. Compared with the results obtained in complex media, a 20% increase in specific β -galactosidase activity in MMG supplemented with 11.6 g/l glucose was obtained. On the 1-l fermenter scale, a threefold increase in volumetric β -galactosidase activity was obtained when the glucose concentration was varied from 11 g/l to 26 g/l. In addition, glucose feeding during the stationary phase resulted in a twofold increase in volumetric enzyme activity as cellular lysis was prevented. Finally, we showed that oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates can be used for on-line determination of the onset of stationary phase, glucose depletion and biomass concentration.

Introduction

Bacteria belonging to the *Bacillus* genus have been used for the production of industrial enzymes because of their ability to produce and secrete a large number of useful proteins or metabolites (for a recent review see: Zukowski 1992). The commonest bacilli used in industry are *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*. Among them, the best studied from different points of view is *B. subtilis*. Furthermore, because of its GRAS (generally recognized as safe) status, *B. subtilis* is a natural candidate for the production of proteins for the food industry. However, compared with *Escherichia coli* or *S. cerevisiae*, there have been very few reports on the cultivation of recombinant *B. subtilis* at fermenter scale, and on the development of suitable conditions for the production of recombinant proteins. Furthermore, most of the genetically modified *B. subtilis* strains have been evaluated at flask scale where, in contrast to fermenter studies, a strict control on the environmental conditions is not possible.

In this work, we were interested in studying some culture variables, such as the type of medium used, the initial glucose concentration and glucose feeding during stationary phase, to increase the production of β -galactosidase from *E. coli* in *B. subtilis* using batch cultures. For this purpose, we used a strain that carries the *E. coli lacZ* gene under control of the *aprE* promoter from *B. subtilis*, which is a very well characterized regulatory region (Valle and Ferrari 1989; Ferrari et al. 1993). It is well known that, in rich media, this promoter is only expressed during the stationary phase, and that the combination of the *hpr2* and *degU32* (*H_y*) mutations increases its transcriptional level around 40-fold (Ferrari et al. 1986, 1993). For this reason the producing strain used in this work contained both mutations.

A. Martínez · F. Valle (✉)
Dept. de Microbiología Molecular,
Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México,
A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.
Fax: (52 73) 1 2383
e-mail: valle@ibt.unam.mx

O. T. Ramírez
Dept. de Biotecnología, Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Materials and methods

Culture media

A mineral medium supplemented with glucose (MMG) was designed, based on the elementary composition of *B. subtilis* (Dettwiler et al. 1993) and with the mineral salts added to Schaeffer's sporulation medium for *B. subtilis* cultures (Schaeffer et al. 1965). The mineral medium composition was (per liter) 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.52 g K_2HPO_4 , 6.4 g KH_2PO_4 , 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg MnCl_2 , 40 mg CaCl_2 , and 30 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The initial concentration of glucose was varied, and is specified in Results. When cultures reached a concentration of about 6 g/l dry cell weight, all mineral components were added aseptically, as the nitrogen source became limiting in the culture broth at such biomass concentrations. The initial pH was adjusted to 7.0.

Strain and cell bank

The genotype of the strain used in this work, designated BB804, was ΔaprE , $hpr2$, $\text{aprE}::\text{lacZ}$, Cm^r , degC32 (*Hv*), without any auxotrophic requirement. It was constructed in successive steps, starting with strain (ΔaprE , *glyB*, *hisA*), the $hpr2$ and degC32 were introduced by transformation using chromosomal DNAs from strains BB82 (ΔaprE , *hisA*, $hpr2$) and BB17 (ΔaprE , degC32 ; Olmos et al. 1996). We took advantage of the linkage of the $hpr2$ and degC32 to the *glyB* or *hisA* markers respectively. The strain was grown in MMG containing 10 g/l initial glucose, until an absorbance of 5 was reached (about 12 h culture time). This culture was used immediately to prepare frozen vials containing 1.5% (v/v) glycerol. The vials were stored in liquid nitrogen. We have found that these vials give reproducible results even after 24 months of storage (data not shown).

Inocula development and shake-flask cultures

A 1-ml sample of the cell bank was thawed steeply (-20°C , -4°C , room temperature, and 37°C , during 5 min for each step) and added to a 500-ml flask with 100 ml MMG containing 10 g/l initial glucose. Inocula were incubated to middle exponential phase (approx. 12–16 h). When cultures reached a biomass concentration of 1.8 g/l, they were used as inocula. All cultures were initiated with 10% inoculum.

To evaluate β -galactosidase production in shake flasks, cultures were performed in 500-ml shake flasks containing 100 ml Schaeffer's medium or MMG. All flasks were incubated at 37°C and 300 rpm in a C25 Shaker (New Brunswick Inc., New Brunswick, N.J.) when Schaeffer's medium was used, the inoculum was also developed in Schaeffer's medium.

Fermenter cultures

Cultures were carried out in a baffled stirred-tank fermenter, with a working volume of 1 l (total volume 1.6 l; LSL Biolaftite, Inc. Princeton, N.J.) and equipped with a six-blade Rushton turbine. The temperature was controlled at 37°C . The pH was maintained at 7.0 by automatic additions of 2M NaOH during exponential growth, and 0.67 M H_3PO_4 during the stationary phase. Foam was controlled by automatic additions of food-grade silicone. Oxygen partial pressure was measured with a polarographic oxygen probe (Ingold Electrodes, Inc. Wilmington, Mass.) and was controlled above 20% (with respect to air saturation) through a proportional-integral derivative controller by automatic increases of the impeller speed. Proportional-integral derivative parameters were tuned by Ziegler's method (Lim and Lee 1991) and, after some further empirical adjustments, they were set to a proportional band of 90, an integral time of 500 s, a derivative time of 1 s, and a dead band of 5. An initial impeller speed of 600 rpm and a constant air flow rate of

1 vvm were used. Off-gas analysis for oxygen, carbon dioxide and nitrogen were carried out on-line using a MGA-1200 mass spectrometer (Perkin-Elmer, Pomona, Calif.) The oxygen uptake rate and carbon dioxide evolution rate were calculated on-line from a gas balance over the fermenter volume, assuming a constant composition in the inlet air. Mentor software (LSL Biolaftite Inc. Princeton, N.J.) was used for on-line calculation of O_2 uptake and CO_2 evolution rates and data logging at 1-min intervals.

Analytical methods

The cell concentration was measured with a DU-70 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, Calif.) as the absorbance at 600 nm (A_{600}), and converted to dry cell weight per liter according to predetermined calibration data (1 A_{600} unit = 0.35 g/l). Culture samples of 2 ml and 5 ml, from flasks and fermenter respectively, were taken at intervals and centrifuged at 10 100 g for 3 min. Supernatants and pellets were frozen on solid CO_2 and stored at -20°C until the proper determinations were made. The protein concentration was determined on cell pellets by the Lowry method (Lowry et al. 1951). Glucose remaining in the supernatant was measured with a Ektachem DT60 II multiple analyzer (Kodak, Rochester, N.Y.). β -Galactosidase activity was determined at 28°C in the cell pellets by a modification of the method of Miller (Ferrari et al. 1986), using *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) as substrate. One unit of the enzyme activity (Miller unit) was defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 nmol ONPG/min at 28°C . Acetate, propionate, lactate and butanediol levels were determined by HPLC analysis. The separation system consisted of a fast fruit-juice analysis column (7.8×150 mm, Waters, Millipore Corp. Milford, Mass.), packed with sulfonated styrene divinylbenzene resin. Elution was carried out isocratically, using 2.5 mM H_2SO_4 solution as the mobile phase at 40°C , and a flow rate of 1.0 ml/min. The compounds were detected with a 410 refractive-index detector (Waters, Millipore Corp. Milford, Mass.).

Results

Mineral medium evaluation

Most of the reports on the expression of the *aprE* gene have employed Schaeffer complex medium. However, in addition to the high cost of such medium, its use can mask some important effects of the manipulation of different environmental parameters on cell physiology and, in general, on the whole fermentation process. Therefore, for a good control of the environmental and physiological conditions in *B. subtilis* fermentation processes, the use of a defined mineral medium, supplied with a unique carbon source, e.g. glucose (MMG), is highly desirable (Pierce et al. 1992). On this basis, a medium that could provide all the necessary elements to obtain 5 g cells from 10 g glucose was designed (see Materials and methods). With such a composition, the carbon/nitrogen ratio was 5.5 and the limiting nutrient was carbon.

To evaluate β -galactosidase production under controlled conditions (i.e. no oxygen-transfer limitations, and automatic control of pH and dissolved oxygen), the BB804 strain was cultured in MMG supplemented with 11.6 g/l glucose using 1-l batch fermentations. Under these conditions, the specific growth rate during the exponential phase was 0.38 h^{-1} (Fig. 1). From the metabolites determined by HPLC, only acetate and low

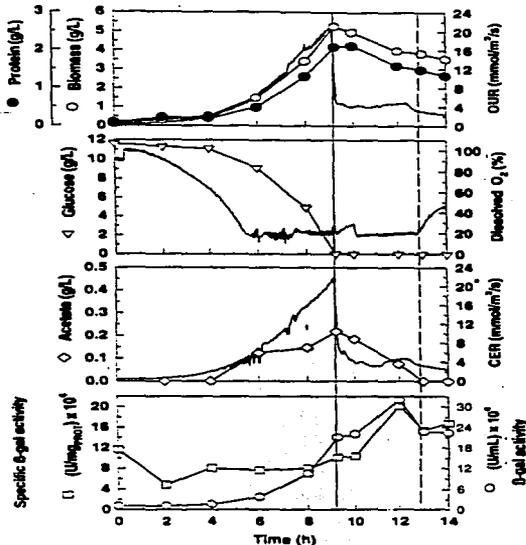


Fig. 1 Batch culture in a 1-l fermenter in glucose mineral medium. Vertical line at 9 h denotes onset of the stationary phase. Dashed line denotes the time of acetate depletion

quantities of propionate were detected (Fig. 1). However, while acetic acid production reached its maximum at the onset of the stationary phase it was consumed later. The end of the exponential growth occurred upon glucose depletion, and corresponded to the onset of acetic acid consumption, and a characteristic sharp decrease in O_2 uptake and CO_2 evolution rates. Such a sharp change was used for the on-line assessment of the stationary-phase onset. After acetate depletion, the O_2 uptake and CO_2 evolution rates steadily decreased, and the oxygen partial pressure increased above 20%.

The β -galactosidase production during exponential growth comprised around 45% of the maximum, which was obtained 3 h after the initiation of the stationary phase (Fig. 1). The maximum specific β -galactosidase activity was 20.1×10^4 U/mg_{protein}. It should be noted that, during the exponential growth phase, the volumetric enzyme activity increased proportionally to biomass concentration. This indicates that, for MMG, enzyme production is partially growth-associated. These results contrast with the well-known behavior of the *aprE* gene, that is, its expression is repressed during

vegetative growth in complex medium (Ferrari et al. 1986, 1993). Furthermore, all fermenter cultures showed a high initial specific β -galactosidase activity as the inocula used, originating from exponential cultures grown in MMG, exhibited a high specific enzyme activity.

In all fermenter studies, a good correlation between cell concentration, O_2 uptake and CO_2 evolution was observed for the exponential growth phase (see Fig. 1). Such a correlation is useful in computerized control strategies, where on-line measurements of biomass can be made without culture sampling. It should be noted that, during the stationary phase, a continuous decrement of biomass was observed (Fig. 1). Since this decrement was also observed at the level of protein measured in cell pellets (see Fig. 1), we attributed it to cellular lysis. This phenomenon was observed during the first 3 h of the stationary phase, with a specific first-order lysis rate of 0.118 h^{-1} , which means that 30% of the cells lysed during this period.

Schaeffer medium evaluation

To corroborate that the *aprE* expression observed during vegetative growth, was not due to a strain property, its behavior was analyzed in Schaeffer's and MMG medium at flask level, and the results are summarized in Fig. 2. Before glucose depletion, two clearly distinctive growth phases were observed for the culture performed with MMG medium at flask scale. During the first 6 h of the culture, a high growth rate of 0.36 h^{-1} was obtained. The second growth phase had a rate of 0.09 h^{-1} . The beginning of this second phase coincided with the onset of propionate production and acetate consumption, which, in turn, were probably caused by oxygen-transfer limitations. In Schaeffer's medium, the BB804 strain produced only negligible quantities of β -galactosidase before the onset of stationary phase and reached its maximum value around 3 h after the initiation of the stationary phase. This behavior is typical for *aprE* expression in complex medium (Ferrari et al. 1986). In turn, for MMG medium, the volumetric activity of β -galactosidase increased early during the exponential phase of the culture. Upon glucose depletion, the specific β -galactosidase activity had already reached 12×10^4 U/mg_{protein}, which corresponded to about 55% of the maximum enzymatic activity obtained at the end of the culture (21×10^4 U/mg_{protein}). Furthermore, the maximum specific β -galactosidase activity obtained in Schaeffer's medium (16×10^4 U/mg_{protein}) was around 20% less than the maximum specific activity obtained with the MMG (see Figs. 1, 2). These results indicate that medium composition seems to be responsible for the observed *aprE* expression during exponential growth.

Effect of initial glucose concentration

In previous experiments with the same strain, and in the presence of initial high concentrations of glucose in

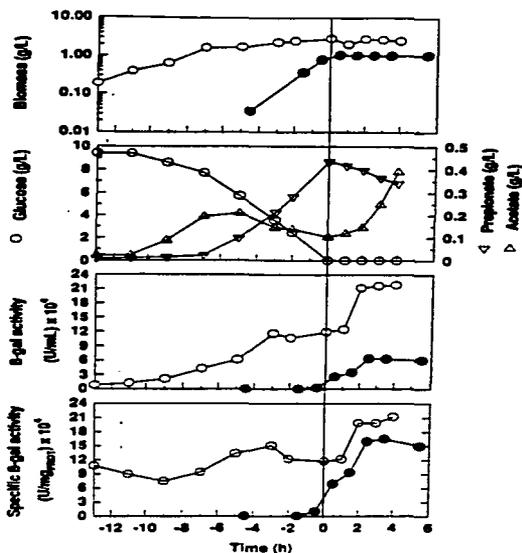


Fig. 2 Shake-flask cultures in Schaeffer's (closed symbols) and in glucose mineral medium (open symbols). Time 0 and vertical line denote the onset of the stationary phase for both cultures

MMG. acetic acid was never produced above 1 g/l (unpublished observations). On this basis, it was decided to evaluate in more detail whether the initial glucose concentration had an effect on *B. subtilis* physiology and β -galactosidase production. To this end, several batch fermentations were performed, and three initial glucose concentrations were tested: 11, 26 and 30 g/l. The results of these experiments are presented in Table 1. As can be seen, in all conditions, the growth rate and cell yield

were essentially the same. Likewise, the specific glucose and oxygen consumption rates remained relatively constant at $0.94 \text{ g glucose (g cell dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $15 \text{ mmol O}_2 \text{ (g cell dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. During exponential growth, cells maintained a constant specific β -galactosidase activity, which was approximately 40%–60% of the maximum activity obtained in the stationary phase (data not shown). Increments in biomass (1.7-fold), and acetic acid production rate (2.5-fold) were observed when the initial glucose concentration was increased from 11 g/l to 30 g/l. However, the maximal β -galactosidase volumetric activity was obtained at an initial glucose concentration of 26 g/l. This value was 3.1-fold higher than that of the culture with 11 g/l of glucose, and 13-fold higher if compared to the culture based on complex medium (see Fig. 2). In this set of experiments, during the first 3 h of the stationary phase, cell lysis was also observed with a specific rate of lysis of 0.08 h^{-1} .

Reduction of cell lysis during the stationary phase

The propensity to autolysis is a well-known property of *B. subtilis*. This is probably due to the combined effect of glucose depletion (Jolliffe et al. 1981) and the presence of monovalent cations (Svarachorn et al. 1989; Tsuchido 1994), originating from the phosphate salts present in the MMG. Moreover, it has been reported that the addition of an oxidizable carbon source to starved and lysing cultures of *B. subtilis* prevents autolysis (Jolliffe et al. 1981). For this reason, glucose was fed at the onset of the stationary stage to obtain the maximum biomass for heterologous protein synthesis, and to prevent cellular lysis. The amount of glucose feed needed to maintain cellular integrity was determined from the specific glucose consumption rate during the stationary phase. Such a value corresponds to the maintenance coefficient, which was $0.11 \text{ g glucose (g cell dry weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Figure 3 shows a culture where, at the onset of the stationary phase, glucose was added according to the calculated maintenance coefficient. As can be seen, no significant lysis was observed, since the cell concentration remained relatively constant at $5.69 \pm 0.66 \text{ g/l}$. Such an effect is more evident if the protein content is considered, as it remained at a constant value of $1.86 \pm 0.12 \text{ g/l}$. In contrast to the cultures without glucose feeding (see Fig. 1), the biomass

Table 1 Effect of initial glucose concentration in mineral medium supplemented with glucose on stoichiometric and kinetic parameters on the 1-l fermenter scale

Initial glucose (g/l)	Specific growth rate ^a (h ⁻¹)	Biomass yield ^a (g Glc/g dry cell wt)	Maximum biomass ^b (g/l)	Specific acetate production rate ^a [mmol (g dry cell wt) ⁻¹ h ⁻¹]	10 ⁻⁴ × Maximum β -Galactosidase activity (U/ml)
11.2	0.44	0.465	5.21	0.33	27
26.9	0.40	0.425	8.96	0.83	84
30.6	0.43	0.468	12.81	0.55	66

^aValues calculated from the exponential-phase data

^bMaximum biomass obtained at the onset of the stationary phase

and protein concentration steadily declined after glucose depletion, from 5.26 to 3.55 g/l and from 2.08 to 1.34 g/l respectively. Growth, glucose consumption, O_2 uptake, CO_2 evolution, dissolved oxygen and β -galactosidase patterns during the exponential growth phase were similar to those of other batch cultures. However, after 17 h of cultivation, the maximum volumetric activity obtained was 53×10^4 U/ml. This level was 96% higher than the one obtained in batch cultures, with a similar initial glucose concentration and without glucose feeding during the stationary phase (see Table 1, line 1). At the end of the culture, the total glucose consumed (i.e. initial concentration plus the amount fed during the stationary phase) was 15.1 g (Fig. 3).

Figure 3 also shows that the O_2 uptake and CO_2 evolution rates sharply decreased after glucose depletion, but partially recovered upon glucose feeding. Upon acetate depletion, at 15 h, both rates decreased and the dissolved oxygen increased steadily. As in batch cultures, the O_2 uptake and CO_2 evolution rates provided a

good indication of biomass concentration during the exponential growth phase.

Discussion

The effect of growth conditions on carbon utilization, organic acid by-product formation and gene expression in *B. subtilis* strains using continuous cultures has been documented recently (Snay et al. 1989; Rincón et al. 1994; Vierheller et al. 1995). Furthermore, the importance of asporogenous mutants for fed-batch and continuous fermentation of *B. subtilis* strains has been reported (Pierce et al. 1992; Oh et al. 1995). In this report, the effect on β -galactosidase production, in a recombinant *B. subtilis* strain, of mineral medium, initial glucose concentration and glucose feeding during the stationary phase, was explored. Compared to a production processes based on complex medium, the use of defined medium supplemented with 26 g/l of glucose, allowed a 13-fold increase in the β -galactosidase volumetric activity. Contrary to what has been observed in other *B. subtilis* strains (Park et al. 1992; Vierheller et al. 1995), in the presence of high glucose concentrations, the BBS04 strain did not produce excessive amounts of acetic acid that could inhibit growth or protein production. This is probably due to the *degU32(Hy)* mutation. It is known that strains carrying this mutation (originally named *sacU^h*), in addition to overexpressing extracellular enzymes, are capable of sporulation in rich medium or in mineral medium containing casein hydrolysate and glucose excess (Kunst et al. 1974).

To our knowledge, this is the first time that the expression of the *aprE* gene has been detected during exponential growth, at such a high level. At this point, no explanation for such a phenomenon is available. However, similar behavior has been observed for the production of the neutral protease in *B. megaterium*. In that case, neutral protease was synthesized throughout the growth cycle in minimal medium while, in complex medium, it was repressed during growth (Priest 1977).

The specific level of β -galactosidase obtained in this work (20.1×10^4 U/mg protein) is 90-, 28- and 2.7-fold higher than the higher levels reported by Pierce et al. (1992), Park et al. (1992), and Ferrari et al. (1986). We consider that these differences are due to the combination of genetic manipulations as well as to variations in culture conditions.

Finally, O_2 uptake and CO_2 evolution kinetics allowed the on-line determination of glucose depletion, the onset of the stationary phase, and biomass estimation during exponential growth. Such behavior could be useful for automating the process and establishing control strategies for substrate feeding during fed-batch cultures.

Acknowledgements The construction of strain BBS04 by V.M. Bolaños is gratefully acknowledged. We would like also to thank E. Ferrari for his numerous suggestions and comments. Financial

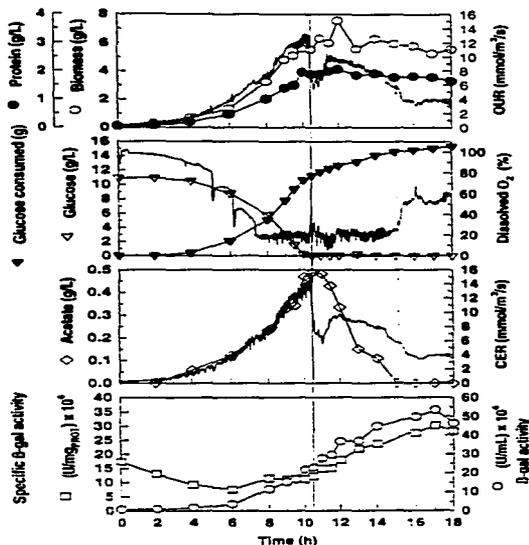


Fig. 3 Effect of glucose feeding during the stationary phase. Initial glucose concentration during batch cultivation, 10.5 g/l. Vertical line at 10.5 h denotes onset of the stationary phase and beginning of glucose feeding at a constant supply rate of 0.11 g Glc (g dry cell weight)⁻¹h⁻¹. Dashed-line denotes the time of acetate depletion

support was from grant IN205994 of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM-México.

References

- Dettwiler B, Dunn IJ, Heinze E, Prenosil JE (1993) A simulation model for the continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation. *Biotechnol Bioeng* 41: 791-800
- Ferrari E, Howard SMH, Hoch JA (1986) Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J Bacteriol* 166: 173-179
- Ferrari E, Jarnagin AS, Schmidt BF (1993) Commercial production of extracellular enzymes. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. ASM, Washington, DC, pp 917-937
- Jolliffe LK, Doyle RJ, Sireips LN (1981) The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25: 753-763
- Kunst F, Pascal M, Lepesant-Kejzlarova J, Lepesant J-A, Billault A, Dedonder R (1974) Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie* 56: 1431-1439
- Lim HC, Lee K-S (1991) Control of bioreactor systems. In: Schügerl K (ed) *Biotechnology, vol 4, Measuring, modelling, and control*. VCH, Weinheim, pp 509-560
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein determination with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Oh MK, Kim BG, Park SH (1995) Importance of spore mutants for fed-batch and continuous fermentation of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 47: 696-702
- Olmos J, Bolaños V, Causey S, Ferrari E, Bolívar F, Valle F (1996) A functional Spo0A is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* 381: 29-31
- Park YS, Kai K, Iijima S, Kobayashi T (1992) Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol Bioeng* 40: 686-696
- Pierce JA, Robertson CR, Leighton TJ (1992) Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog* 8: 211-218
- Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* 41: 711-753
- Rincón CA, Quintero R, Salvador M (1994) Continuous culture to produce recombinant β -galactosidase in *Bacillus subtilis*. In: Galindo E, Ramirez OT (eds) *Advances in bioprocess engineering*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 431-435
- Schaeffer P, Millet J, Aubert J-P (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 54: 704-711
- Snay J, Jeong JW, Ataai MM (1989) Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnol Prog* 5: 63-69
- Svarachorn A, Shinmyo A, Tsuchido T, Takano M (1989) Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 299-304
- Tsuchido T (1994) Induction of cell autolysis of *Bacillus subtilis* with lysophosphatidylcholine. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 106-109
- Valle F, Ferrari E (1989) Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene? In: Smith I, Slepceky RA, Setlow P (eds) *Regulation of prokaryotic development*. ASM, Washington, DC, pp 131-146
- Vierheller C, Goel A, Peterson M, Domach MM, Ataai MM (1995) Sustained and constitutive high levels of protein production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* 47: 520-524
- Zukowski MM (1992) Production of commercially valuable products. In: Doi RH, McGlouglin M (eds) *Biology of bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass, pp 311-337

**V.5 MANUSCRITO: HIPERPRODUCCION DE B-GALACTOSIDASA DE *E. coli*
EN *B. subtilis***

ACEPTADO PARA PUBLICARSE EN: ANALS DE ENCONTRO E USO DE LACTASES.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. CAMPINAS, SP. BRASIL.

HIPERPRODUCCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Escherichia coli* EN *Bacillus subtilis*

Alfredo Martínez¹, Octavio T. Ramírez¹ y Fernando Valle^{1*}
¹Dpto. de Biología Molecular. ²Dpto. de Bioingeniería
Instituto de Biotecnología.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, Mor., 062271, México.

RESUMEN

La enzima lactasa (β -D-galactosidasa galactohidrolasa E.C.3.2.1.23) de *Escherichia coli* ofrece ventajas para su aplicación en alimentos. Sin embargo, debido a que esta bacteria no tiene el estatus GRAS (General Recognized as Safe), la lactasa proveniente de *E. coli* no se utiliza en el procesamiento de alimentos.

Por otra parte, *Bacillus subtilis* tiene un amplio historial como organismo GRAS y recientemente se ha empleado para la producción de proteínas heterólogas. Por esta razón, nuestro grupo decidió evaluar la sobreproducción de lactasa de *E. coli* en *Bacillus subtilis*.

Para lograr esta sobreproducción, se utilizó la región de control del gene *aprE* que codifica para la proteasa subtilisina. Esta región de control ha sido estudiada ampliamente y utilizando las cepas y mutaciones adecuadas, es posible obtener altos niveles de expresión de genes heterólogos. Otra ventaja del uso de este sistema es que no se requiere de la presencia de ningún inductor para la expresión de este gene.

A nivel matraz y utilizando un medio de cultivo complejo, se lograron obtener 160,000 U Miller de β -galactosidasa por mg de proteína. Mediante el diseño de un medio de cultivo mineral y utilizando técnicas de cultivo alimentado, se logró incrementar significativamente la biomasa y el nivel de actividad enzimática. En este trabajo se presentan las estrategias genéticas para obtener una cepa estable de *B. subtilis* sobreproductora, así como las metodologías de fermentación para incrementar la biomasa y la actividad enzimática.

INTRODUCCION

La enzima lactasa se utiliza para disminuir el contenido de lactosa en diversos productos lácteos de la industria alimentaria. Esta aplicación exige que la enzima provenga de un microorganismo generalmente reconocido como seguro (GRAS), o bien que se obtenga por medio de un proceso GRAS. En la actualidad, las enzimas provenientes de *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus niger* son utilizadas para este fin (Nijpels, 1982). Sin embargo, la lactasa de éstos microorganismos no es la más adecuada para algunos

procesos. Esto se debe a que los parámetros óptimos para la lactasa de *A. niger* son: pH de 3.5 a 4.5 y temperatura de 55°C. Para la lactasa de *K. lactis* son pH de 6.5 a 7.0 y temperatura de 37°C. La β -galactosidasa de *E. coli* a diferencia de las lactasas obtenidas de hongos, presenta pH y temperatura óptimos que son adecuados para la hidrólisis de lactosa en leche y en suero dulce (6.6-7.5 y 55°C, respectivamente), y a diferencia de la lactasa proveniente de *Kluyveromyces fragilis*, es muy estable a temperaturas mayores a 30°C (Morisi et al, 1972; Nijpels, 1982). Sin embargo, esta última por provenir de una bacteria no GRAS, no ha sido utilizada en la industria alimentaria.

Una manera de facilitar la aprobación de la lactasa de *E. coli* para su uso en alimentos sería producirla en un organismo GRAS. En este sentido, *B. subtilis* es un sistema interesante ya que es GRAS (de Boer y Diderichsen, 1991) y es utilizado en diversos procesos comerciales (Arbige y Pitcher, 1989). Por otra parte, *B. subtilis* ha demostrado ser un buen sistema para la producción de proteínas heterólogas. En este sentido, se puede decir que la mayor producción de proteínas heterólogas que se obtienen a partir de fermentación, proviene de procesos que utilizan algún miembro del genero *Bacillus* (Arbige y Pitcher, 1989). Este éxito de *Bacillus* se basa en la amplia experiencia acumulada por la industria a través de los años y al gran avance logrado en su manipulación genética (Zukowski y Miller, 1986). Cabe señalar que después de *E. coli* y *Sacharomyces cereviseae*, *B. subtilis* es el microorganismos del cual se posee un mayor conocimiento genético.

ANTECEDENTES

En el presente reporte se utilizó la región de control del gene *aprE* para sobreexpresar el gene *lacZ* de *E. coli*. El gene *aprE* de *B. subtilis* codifica para la enzima subtilisina, la cual es utilizada ampliamente en la elaboración de detergentes. En un proceso de fermentación industrial típico para la producción de esta enzima por fermentación, se usan cepas sobreproductoras con diversas mutaciones, que aumentan la expresión del gene *aprE*. Con estas cepas y técnicas adecuadas de fermentación, ha sido posible obtener concentraciones de alrededor de 20 g por litro de subtilisina (Zukowski, 1992). Debido a lo anterior, diversos grupos han utilizado la región de control del gene *aprE* para sobreproducir proteínas homólogas y heterólogas en *B. subtilis* (Kunts et al, 1974; Zukowski y Miller, 1986; Pierce et al, 1992). Tal interés comercial de este sistema, ha impulsado diversas investigaciones básicas sobre los mecanismos de regulación del gene *aprE*. En la actualidad, esta región de control es la mejor estudiada en *B. subtilis* (Higerd et al, 1971; Ferrari et al, 1986; Ferrari et al, 1988). El gene *aprE* presenta un sistema de regulación complejo (Valle y Ferrari, 1989; Strauch y Hoch, 1993), ya que existen varias proteínas que actúan como reguladores negativos. (Hpr, Sin y AbrE) y otras como reguladores positivos (DegU, DegR, DegS y DegQ,

figura 1). Este conjunto de reguladores ocasiona que en medios de cultivo complejos, el gene *aprE* inicie su expresión al final de la fase exponencial de crecimiento, especialmente en la fase de transición entre el crecimiento exponencial y la fase estacionaria.

Adicionalmente, es conocido que las manipulaciones genéticas realizadas con el fin de sobreproducir proteínas heterólogas frecuentemente inducen efectos pleiotrópicos. De manera que el control del proceso de fermentación no es trivial. Por otro lado, en cultivos de "alta" densidad celular no se logran adecuados niveles de producción y/o productividad de la proteína heteróloga (Park et al, 1992; Yee y Blanch, 1992). Comúnmente, los efectos pleiotrópicos tienen su impacto en diversos parámetros de los procesos de fermentación tales como: los rendimientos biomasa-substrato y producto-substrato, y la conversión del substrato en metabolitos tóxicos como los ácidos orgánicos.

En virtud de lo mencionado, se decidió llevar a cabo un estudio integral, considerando aspectos de ingeniería genética, fisiología microbiana e ingeniería de fermentaciones, con el fin de sobreproducir la enzima β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*.

METODOLOGIA

La estrategia para lograr la sobreproducción de la lactasa de *E. coli*, consistió en construir una fusión transcripcional y traduccional entre la región de control del gene *aprE* y el gene *lacZ* de *E. coli*. Por otra parte, para evitar la inestabilidad de los plásmidos recombinantes (Bailey, 1991; Shoham y Demain, 1991), se decidió integrar el sistema de expresión en el cromosoma de *B. subtilis*. Por último, para aumentar la transcripción a partir de la región de regulación del gene *aprE*, se utilizaron las mutaciones *hpr2* y *degU32(Hy)*.

Para realizar lo anterior, se utilizaron dos cepas parentales, las cuales tienen deletado el gene de la proteasa neutra de *B. subtilis* (gene *nprE*), y cuya diferencia radica en que una de ellas tiene la mutación *hpr2* en el regulador negativo *Hpr*. En primera instancia, en ambas cepas parentales, mediante transformación se realizó la integración en cromosoma del gene *lacZ*. La selección de las transformantes se realizó en cajas Petri conteniendo medio SKim Milk (DIFCO) con cloranfenicol (5 μ g/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Se seleccionaron aquellas colonias capaces de crecer en presencia del antibiótico y que además mostraron coloración azul. Posteriormente, mediante transducción generalizada, se transfirió la mutación *degU32(Hy)*. Estas dos mutaciones (*hpr2* y *degU32(Hy)*) ocasionan la sobreexpresión del gene *aprE* (Ferrari et al, 1993) y en este caso del gene *lacZ*. En la figura 2 se muestra un resumen de la estrategia genética empleada así como la nomenclatura de las cepas.

Los medios de cultivo utilizados se presentan en la tabla 1. La evaluación inicial de la producción de β -galactosidasa en las cepas modificadas genéticamente se llevo a cabo en matraces Fernbach de 2.8 L, con un volumen de operación de 500 mL y utilizando un medio complejo (Schaeffer et al, 1965; Schaeffer, 1969).

La estrategia en el área de la ingeniería de las fermentaciones, fue inicialmente la formulación de un medio mineral suplementado con glucosa como fuente de carbono (Tabla 1). Dicha formulación se realizó en base a la composición celular de *B. subtilis* (Dettwiler et al, 1993), y a los elementos traza utilizados en el medio Schaeffer.

La biomasa se determinó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda 600 nm y se convirtió a peso seco mediante una curva de calibración. La proteína celular se determinó por el método de Lowry et al (1951) y la actividad enzimática mediante el método de Miller modificado (1992), utilizando como sustrato ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido). La actividad enzimática se reporta en unidades Miller, definidas como la cantidad de enzima que produce un nanomol de ONP por minuto a 28°C. La glucosa se determinó mediante un analizador enzimático (Kodak Ektachem DT60 II).

La evaluación de la cepa sobreproductora se realizó en un fermentador BioLafitte controlado automáticamente por computadora. El volumen inicial de operación fue de 1 L, la temperatura se controló a 37°C. El pH se ajustó automáticamente a 7.0, mediante la adición de NaOH 2N o H₃PO₄ 2N. La presión parcial de oxígeno disuelto se mantuvo por arriba del 20% variando la velocidad de agitación. La velocidad inicial de agitación fue de 600 rpm y la aireación de 1 vvm.

Con el objetivo de caracterizar la producción de β -galactosidasa en función de la velocidad específica de crecimiento, se eligió la estrategia de cultivo alimentado exponencialmente. En este tipo de cultivos, la velocidad específica de crecimiento se puede controlar mediante el suministro dosificado de un determinado nutriente. En nuestro caso particular, el sustrato limitante fue la glucosa, la cual se mantuvo a una concentración constante debajo del límite de detección, es decir que se evitó su acumulación. La descripción detallada del cultivo alimentado exponencialmente, utilizado en el presente trabajo, se encuentra descrito en Yee y Blanch (1992). La concentración inicial de glucosa, proveniente del inóculo, fue de aproximadamente 0.6 g/L. A las dos horas de iniciada la fermentación, se inició la alimentación de glucosa concentrada (con concentraciones que variaron de 40 a 500 g/L), mediante una bomba automática (Masterflex) conectada a la computadora. La alimentación de glucosa se detuvo cuando ésta empezó a acumularse en el medio a concentraciones mayores de 1 g/L, indicando el inicio de la fase estacionaria del cultivo. Los cultivos se monitorearon y

controlaron por lo menos 6 horas después de iniciada la fase estacionaria. La velocidad específica de crecimiento se calculo a partir del incremento en la masa celular total tomando en consideración el cambio de volumen durante los cultivos

RESULTADOS Y ANALISIS

Evaluación en Medio Schaeffer.

En la figura 3 se presenta la cinética de producción, para las cuatro cepas de *B. subtilis* productoras de β -galactosidasa, en medio Schaeffer. Así mismo, en la tabla 2 se presenta un resumen de actividad y productividad máxima de β -galactosidasa alcanzada por las mismas cepas. Se observa que la máxima actividad específica se obtuvo entre las 7 y 10 horas de fermentación. Con la mutación *hpr2* (cepa BB802) se produjo un incremento en la actividad específica de aproximadamente 3 veces respecto a la cepa silvestre BB801. Con la mutación *degU32(Hy)* (cepa BB803) se logró un incremento de alrededor de 18 veces en la actividad enzimática, y en conjunción con la mutación *hpr2* (cepa BB804), se obtuvo un incremento de actividad específica de aproximadamente 43 veces (Tabla 2). La actividad y productividad específica máxima obtenidas con la cepa BB804 fueron de 165,000 U/mg_{prot.} y 20,600 U/(mg_{prot.}/h), respectivamente.

Evaluación en medio definido.

En cultivos lote realizados con medio mineral y suplementados con 10 g/L de glucosa inicial, se determinó que la velocidad específica de crecimiento en cultivos lote de la cepa BB804, fue de $0.413 \text{ h}^{-1} \pm 5.08\%$. El rendimiento de biomasa respecto a glucosa consumida fue de $0.451 \frac{\text{g}_{\text{BIOMASA}}}{\text{g}_{\text{GLUCOSA}}} \pm 5.05\%$. Con estos datos cinéticos y conociendo la concentración de glucosa en las soluciones usadas para la alimentación (las cuales variaron entre 40 y 500 g/L de glucosa), fue posible establecer perfiles predeterminados de alimentación de glucosa de acuerdo a Yamanè y Shimizu (1984); y Yee y Blanch (1992).

La figura 4 muestra la cinética de formación de biomasa de la cepa BB804 (panel A), la concentración de glucosa en el medio de fermentación (panel B) y la actividad volumétrica (panel C), obtenidos en cultivos alimentados exponencialmente con velocidades específicas de crecimiento que variaron de 0.069 a 0.362 h^{-1} .

Como puede observarse en la figura 4A la velocidad específica de crecimiento se controló adecuadamente durante la etapa de crecimiento exponencial, de acuerdo a la tasa de dilución predeterminada (Tabla 3). El término de la fase de crecimiento exponencial o la iniciación de la fase estacionaria del cultivo, fue determinada en forma simultánea e independientemente, tomando en consideración dos parámetros distintos: 1) Cuando la biomasa no se incrementaba (figura 4A), aunque todos los nutrientes minerales del cultivo estuviesen en exceso, o bien: 2) Cuando la glucosa

empezaba a acumularse en el medio de cultivo (figura 4B). Ambos parámetros indican un cambio en el metabolismo celular y en consecuencia, una reducción en la velocidad de consumo de glucosa. Al momento de observar consistentemente estas dos características, se suspendió la alimentación de las soluciones de glucosa concentrada. Como consecuencia del intervalo de tasas de dilución estudiadas y de los patrones de comportamiento de las fermentaciones, los tiempos de proceso variaron considerablemente.

Como se muestra en la figura 4C, se observó una fuerte respuesta a la velocidad de crecimiento impuesta al cultivo, lográndose los mayores títulos de actividad enzimática a la mayor velocidades de crecimiento evaluada (0.362 h^{-1}). A velocidades de crecimiento menores de la mitad de la velocidad específica de crecimiento obtenida en cultivos lote, la producción de β -galactosidasa disminuyó considerablemente. De esta manera, en comparación con la actividad volumétrica obtenida con la cepa hiperproductora BB804 en medios complejos, se logró incrementar la actividad volumétrica 5 veces utilizando el medio mineral suplementado con glucosa a una velocidad específica de crecimiento de 0.362 h^{-1} (tabla 3).

En conclusión, los datos presentados en este artículo demuestran que es posible sobreproducir la enzima lactasa de *E. coli* en *B. subtilis*, utilizando un medio químicamente definido y operando cultivos alimentados a una velocidad de crecimiento cercana a la velocidad obtenida en cultivos lote.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al M. en C. Victor Bolaños la construcción de las cepas recombinantes de *B. subtilis*.

REFERENCIAS

- Arbige, M.V., and Pitcher, W.H. 1989. Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends Biotechnol.*, **7**, 330-335.
- Bailey, J.E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252**, 1668-1675.
- de Boer, A.S., and Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1-4.
- Dettwiler, B., Dunn, I.J., Heinze, E., and Prenosil, J.E. 1993. A simulation model for the continuous production of acetoin and butanediol using *Bacillus subtilis* with integrated pervaporation separation. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 791-800.
- Ferrari, E., Howard, S.M.H., and Hoch, J.A. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.*, **156** (1), 173-179.
- Ferrari, E., Henner, D.S., Perego, M., and Hoch, J.A. 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. *J. Bacteriol.*, **170** (1), 289-295.
- Ferrari, E., Jarragin, A.S., and Achmidt, B.F. 1993. Commercial production of extracellular enzymes. In: *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R.L. (Eds.). American Society for microbiology, Washington, USA. pp. 917-937.

- Higerd, T.B., Hoch, J.A., and Spizizen, J. 1971. Hyperprotease-producing mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **112** (2), 1026-1028.
- Kunts, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzlarova, J., Lepesant, J-A., Billault, A., and Dedonder, R. 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie*, **56**, 1481-1489.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 72-74.
- Morisi, F., Pastore, M., and Viglia, A. 1972. Reduction of lactose content of milk by entrapped β -galactosidase. I. Characteristics of β -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, **56** (9), 1123-1127.
- Nijpels, H.H. 1982. Lactases. In: *Developments in food carbohydrate* - 3. Lee, C.K., and Lindley, M.G. (Eds). Applied Science Pub., London. pp. 23-48.
- Park, Y.S., Kai, K., Iijima, S., and Kobayashi, T. 1992. Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 686-696.
- Pierce, J.A., Robertson, C.R. and Leighton, T.J. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.*, **9** (3), 211-218.
- Schaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J-P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **54**, 704-711.
- Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. *Bacteriol. Rev.*, **33** (1), 48-71.
- Shonam, Y., and Demain, A.L. Kinetics of loss of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 927-935.
- Strauch M.A., and Hoch J.A. 1993. Transition-stage regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Mol. Microbiol.*, **7** (3), 337-342.
- Valle, F., and Ferrari, E. 1989. Subtilisin: A redundantly temporally regulated gene? In: *Regulation of prokaryotic development*. Smith, I., Slepecky, R.A., Setlow, P., Eds. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 131-146.
- Yamanè, T., and Shimizu, S. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. In: *Advances in biochemical engineering and biotechnology*. 30, Eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 147-194.
- Yee, L., and Blanch, H.W. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio-Technology*, **10** (12), 1550-1556.
- Zukowski, M.M., and Miller, L. 1986. Hyperproduction of an intracellular heterologous protein in a *sacU* mutant of *Bacillus subtilis*. *Gene*, **46**, 247-255.
- Zukowski, M.M. 1992. Production of commercially valuable products. In: *Biology of Bacilli. Applications to Industry*. Doi, R.H., and McLaughlin, M. (Ed.). Butterworth-Heinemann, USA. pp. 311-337.

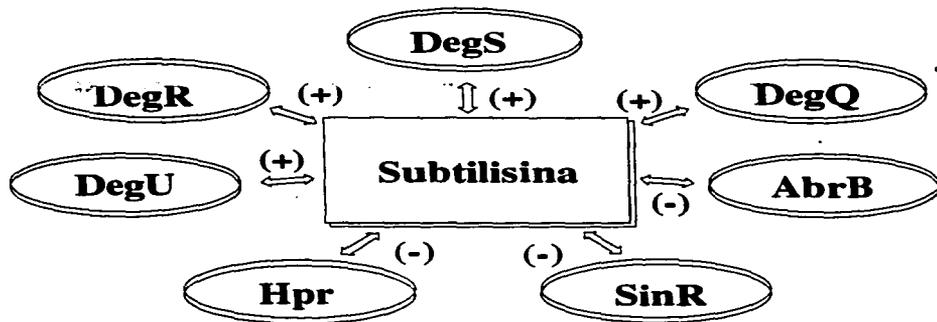


Figura 1. Control de la expresión del gene de la subtilisina de *B. subtilis*.
 (-) Reguidadores negativos. (+) Reguidadores positivos.

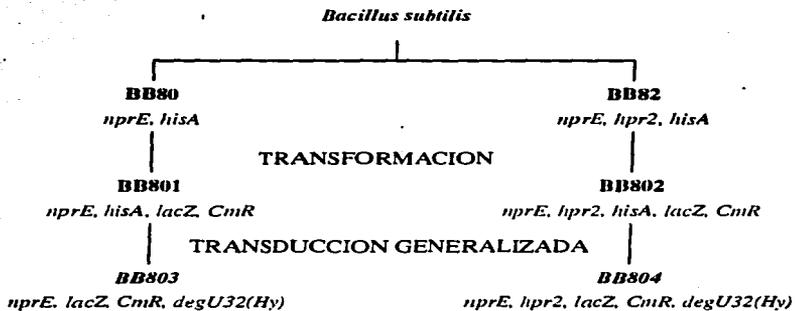


Figura 2. Estrategia genética y nomenclatura utilizada para la construcción de cepas de *B. subtilis* productoras de β -galactosidasa.

► MATRAZ

MEDIO "SCHAEFFER"	[g/L]
CALDO NUTRITIVO	8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.125
KCl	1
Na ₂ SO ₄	0.372
	[mg/L]
MnCl ₂	0.198
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.278

► FERMENTADOR

MEDIO MINERAL	[g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
K ₂ HPO ₄	5.3
KH ₂ PO ₄	6.4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4
	[mg/L]
MnCl ₂	5
CaCl ₂	40
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.

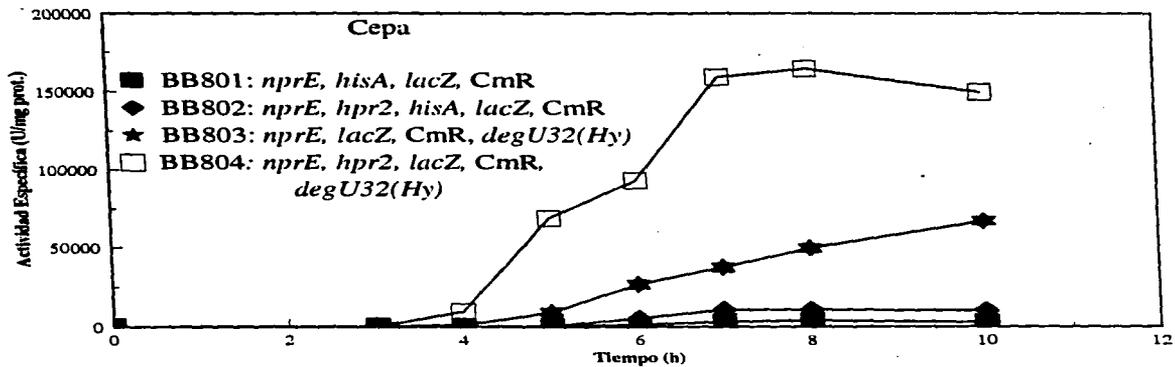


Figura 3. Efecto del fondo genético sobre la producción β -galactosidasa. Cinética de producción a nivel matraz en medio Schaeffer.

CEPA / GENOTIPO <i>Bacillus subtilis</i>	Actividad específica máxima (U/mg^{PROT}) miles	Actividad Relativa Respecto a la Cepa BB801	Productividad Específica U/(mg^{PROT} h) miles
BB801 <i>nprE, hisA, lacZ, CmR</i>	4.0	1	0.5
BB802 <i>nprE, hpr2, hisA, lacZ, CmR</i>	11.2	2.8	1.6
BB803 <i>nprE, lacZ, CmR, degU32(Hy)</i>	67.0	17.7	6.7
BB804 <i>nprE, hpr2, lacZ, CmR, degU32(Hy)</i>	164.8	43.3	20.6

Tabla 2. Resumen de la evaluación del efecto del fondo genético sobre la producción de β -galactosidasa. Evaluación a nivel matraz en medio Schaeffer.

Velocidad Específica de crecimiento experimental (1/h)	Tasa de dilución predeterminada (1/h)	Actividad Específica Máxima (U/mgproteína) Miles	Actividad Total Máxima (U) Millones	Tiempo al cual se obtiene la máxima actividad (h)	*Actividad Relativa
0.362	0.347	192.628	288.956	15	5.02
0.185	0.173	5.113	7.033	26	0.12
0.105	0.116	3.012	15.736	31	0.27
0.069	0.058	6.780	69.244	75	1.20

* Actividad relativa respecto a la actividad total obtenida en medio Schaeffer con la cepa BB804: *nprE-hpr2-lacZ-CmR-degU32(Hy)*. La actividad total (U Miller máximas), considerando 1 L de volumen de fermentación y la cantidad de proteína producida como biomasa en el medio Schaeffer, fue de 57.5 millones de U Miller.

Tabla 3. Comparación de actividad enzimática obtenida a diferentes tasas de dilución con la cepa BB804. Evaluación a nivel fermentador con medio mineral suplementado con glucosa.

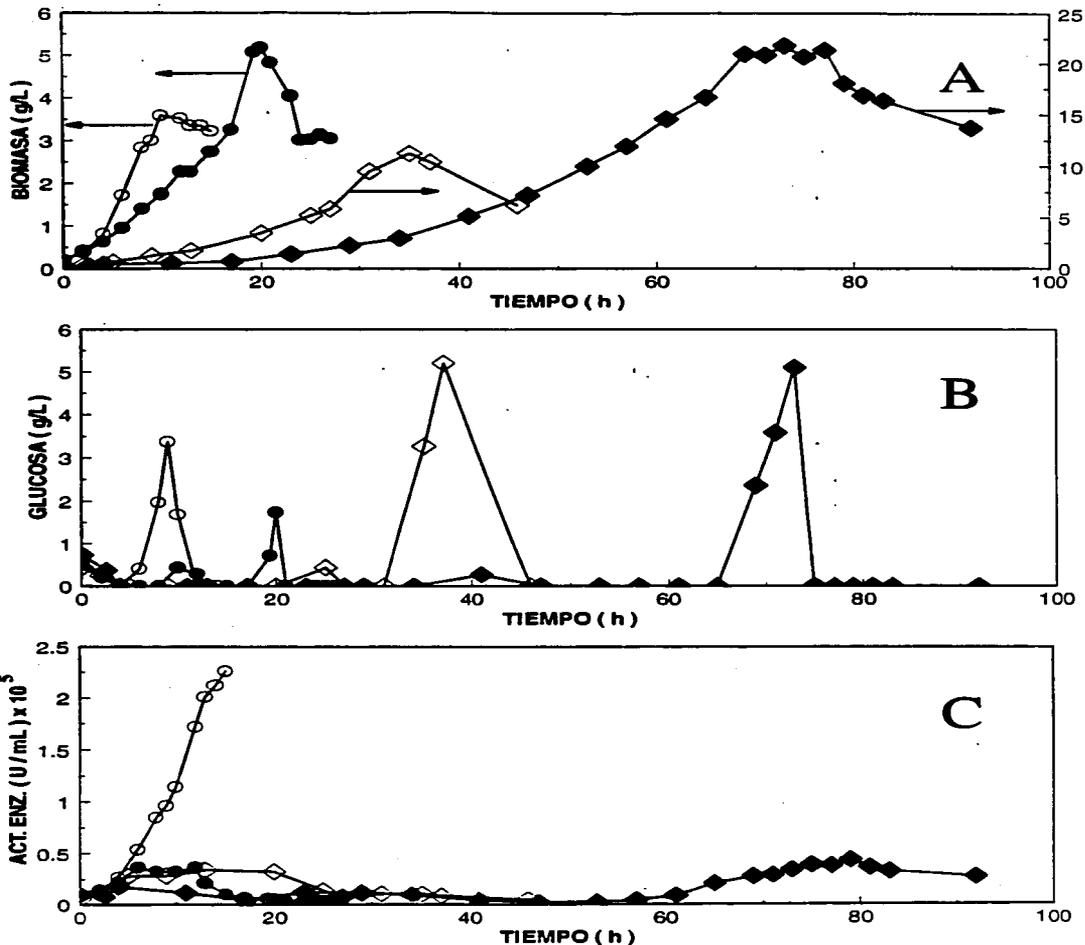


Figura 4. Cinéticas de cultivos alimentados exponencialmente. Evaluación a nivel fermentador con medio mineral suplementado con glucosa. Cepa BB804: *nprE*, *hpr2*, *lacZ*. CmR, *degU(Hy)32*.

Velocidad específica de crecimiento experimental (1/h):

0.362 (○) ; 0.185 (●) ; 0.105 (◇) ; 0.069 (◆).

VI RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSION GENERAL

Aún cuando *B. subtilis* ha sido ampliamente utilizado para la producción industrial de enzimas (Arbige y Pitcher, 1989), y que industrialmente se produce β -galactosidasa proveniente de algunas especies de *Aspergillus* y de levaduras, existe poca información publicada concerniente a la producción de dicha enzima (Bailey y Linko, 1990) y sobre el efecto que tiene la estrategia de alimentación sobre la producción de enzimas en *B. subtilis*. Además, la capacidad de *B. subtilis* para producir dicha enzima prácticamente no ha sido explorada. Mas aún, la revisión de la literatura (Capítulo de Antecedentes de este reporte) muestra que en general se han realizado dos esfuerzos por separado para estudiar la producción de enzimas (principalmente subtilisina) reguladas por la región de control del gene *aprE*. El primero de ellos, el de biología molecular, con énfasis en las relaciones entre la expresión-regulación del gene *aprE* y el proceso de esporulación en *B. subtilis*, donde la construcción de cepas es el objetivo prioritario, pero las condiciones ambientales (medio y condiciones de cultivo) prácticamente no son tomadas en consideración. El segundo de ellos, el de fermentación, donde han sido estudiadas varias estrategias ambientales para estudiar e incrementar la producción de subtilisina, pero donde se utilizan cepas poco caracterizadas, desde el punto de vista de regulación genética del gene *aprE*, y con bajos niveles de producción específica. En particular únicamente los estudios de Pierce *et al* (1992), Rincón *et al* (1994) y Oh *et al* (1995) han considerado ambos aspectos en relación con la producción de proteínas expresadas a través de la región de regulación del gene *aprE*.

Por otro lado, aún cuando las estrategias diseñadas alrededor de la regulación de nitrógeno, azufre o fósforo, a nivel de fermentación no han recibido mucha atención, las estrategias basadas en la adición de la fuente de carbono son rutinarias en *E. coli* y levaduras. Sin embargo, dichas estrategias, basadas en la adición de la fuente de carbono, son contadas y relativamente recientes, para el caso de *B. subtilis* (Kai *et al.* 1992; Park *et al.* 1992; Cayuela *et al.* 1993; Oh *et al.* 1995). El hecho de que varios investigadores hayan reportado que el nivel de producción de proteasas en *Bacillus* se incrementa al mantener una velocidad de crecimiento menor durante la fase de crecimiento exponencial y/o al imponer un estrés metabólico mediante la limitación de algún nutriente, y por lo mencionado en los párrafos anteriores, como parte fundamental de este proyecto se planteó el conocer

la respuesta de una cepa recombinante de *B. subtilis* (de la cual se tiene un conocimiento relativamente amplio del sistema de regulación del gene *aprE* y está especificada como sobreproductora de β -galactosidasa) a la estrategia de cultivo alimentado exponencialmente (donde el control de las condiciones ambientales es fundamental), basada en la alimentación y limitación de la fuente de carbono, en particular por glucosa en medio mineral. A continuación se presenta un resumen y análisis de los resultados obtenidos, en función de los objetivos planteados en la sección III.

VI.1 Preparación de un banco de células

La aparición de variantes con diferente morfología de colonias (Rodríguez, 1995), o con un nivel reducido de producción de proteínas heterólogas, es un fenómeno observado frecuentemente con microorganismos recombinantes. No obstante que las mutaciones están integradas en cromosoma, en nuestro laboratorio se ha observado que después de subcultivar cepas de *B. subtilis*, que contienen las mutaciones *hpr2* y *degU32(Hy)*, se obtienen con una frecuencia variable colonias con una morfología diferente y con un nivel reducido de expresión del gene *aprE* (Valle F. comunicación personal). Para evitar esta fuente de variación, se preparó un banco de viales congelados a partir de la cepa BB804 recién construida (Bolaños, 1994) y evaluada en medio Schaeffer (Wang, 1992). La cepa fue cultivada en el medio mineral (cuya composición está descrita en la sección X.9) suplementado con 10 g/L iniciales de glucosa, hasta alcanzar una densidad óptica de 5, lo cual corresponde a la mitad del crecimiento exponencial en este medio. Se agregó glicerol estéril, como crioprotector, en cantidad suficiente para obtener una concentración igual a 11.5 % (V/V). Los viales se congelaron inmediatamente en hielo seco y fueron almacenados en nitrógeno líquido. Estos viales fueron utilizados como semilla para desarrollar los inóculos a nivel matraz. Para evaluar la calidad de estos viales y determinar si era necesario preparar un nuevo lote, se evaluó la actividad específica de β -galactosidasa que tenían los inóculos cuando llegaban a una densidad óptica de 5. Como puede observarse en la figura V.I.1 durante los primeros 14 meses de almacenamiento, que fue el tiempo durante el cual este banco fue utilizado para los cultivos lote y cultivos alimentados reportados en este trabajo, la cepa se mantuvo estable en cuanto a los niveles de producción de β -

galactosidasa, obteniéndose en promedio una actividad específica de 135, 900 U/mg_{PROT}, con un coeficiente de variación del 19%. No obstante, si se consideran los datos obtenidos en el transcurso de los 36 meses presentados en la figura V.I.1, se obtiene en promedio, 127, 310 U/mg_{PROT} con un coeficiente de variación del 24%, lo cual indica una tendencia a disminuir la actividad específica a partir de los 22 meses de almacenamiento. Mediante una prueba t de Student (suponiendo varianzas desiguales), el promedio de las actividades obtenidas durante los primeros 14 meses fueron comparados con el promedio de las actividades obtenidas de los 22 a los 36 meses. El valor de la t calculada fue mayor que el de t de tablas, para 11 grados de libertad y un nivel de confianza del 99%, lo cual indica que los valores de actividad obtenidos de los 22 a los 36 meses son significativamente menores que los obtenidos durante los primeros 14 meses. En consecuencia, se decidió no seguir utilizando la cepa con fines de investigación después de 22 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido.

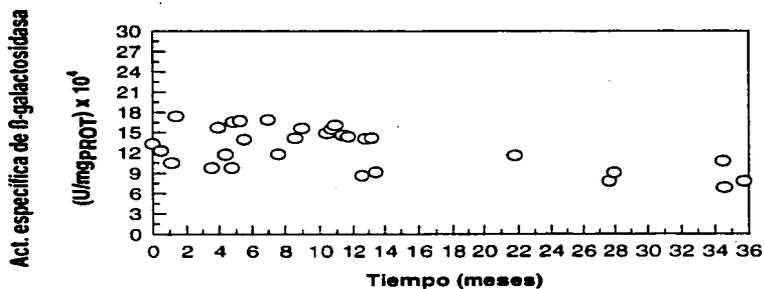


Figura V.I.1 Efecto del almacenamiento sobre la actividad específica de β-galactosidasa. Almacenamiento en N₂ líquido, utilizando glicerol como crioprotector. Cepa de *B. subtilis* BB804.

VI.2 Efecto del medio de cultivo y evaluación de la capacidad de producción de β -galactosidasa por *B. subtilis*

Para llevar a cabo el objetivo principal, planteado en la introducción y en la parte inicial de esta discusión general, en primer lugar se diseñó un medio de cultivo mineral suplementado con glucosa. Con el fin de caracterizar la capacidad de producción de β -galactosidasa por la cepa BB804 de *B. subtilis* recombinante, dicho medio fue evaluado en cultivos lote a nivel fermentador. Así mismo dicha evaluación sirvió para obtener la velocidad específica de crecimiento promedio durante la fase de crecimiento exponencial y el valor del rendimiento biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$) de la cepa BB804 con el medio mineral, el cual es necesario para diseñar los cultivos alimentados exponencialmente de acuerdo a la ecuación 9 (sección IV.4). Los resultados obtenidos, para esta parte del trabajo, son presentados en las figuras del apéndice X.10 de este reporte y en las figuras 1 a 3 del manuscrito: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. Las tablas VI.2.1 y VI.2.2 muestra un resumen de los resultados obtenidos en dichos cultivos lote.

VI.2.1 Fase de crecimiento exponencial

Como se observa en la tabla VI.2.1, se obtuvieron prácticamente los mismos valores en la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento biomasa/substrato, la velocidad específica de consumo de glucosa y la velocidad de consumo de oxígeno, cuando la concentración inicial de glucosa en cultivos lote se varió de 11 a 30 g/L. Además, como era esperado la cantidad de biomasa y la velocidad específica de producción de acetato incrementaron conforme se incremento la concentración inicial de glucosa. Es decir que las concentraciones iniciales de glucosa probadas y la cantidad de acetato producido durante la etapa de crecimiento exponencial no fueron inhibitorias para el crecimiento celular ni afectaron de manera considerable la velocidad de crecimiento, el rendimiento biomasa/substrato y la velocidad específica de consumo de glucosa de la cepa BB804 de *B. subtilis*. Adicionalmente, las cinéticas de cultivo mostradas en el apéndice X.10 de este reporte muestran que la velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de evolución de bióxido de carbono pueden ser

utilizadas para determinar el inicio de la fase estacionaria o agotamiento de la glucosa, así como para estimar la concentración de biomasa durante los cultivos.

Tabla VI.2.1 Resumen de resultados de cultivos lote durante la fase de crecimiento exponencial utilizando el medio mineral suplementado con glucosa

S_0 (g/L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _{DCCW} / g _{GLC})	X_{MAX} (g _{DCCW} /L)	Q_{GLC} (g _{GLC} / (g _{DCCW} -h))	Q_{O_2} (mmol _{O_2} / (g _{DCCW} -h))	Q_{ACET} (mmol _{ACET} / (g _{DCCW} -h))	t h
11.2	0.44	0.465	5.21	0.943	15.31	0.33	8.00
11.6	0.38	0.464	5.26	0.829	14.90	0.28	9.25
25.9	0.40	0.425	8.96	0.947	ND	0.82	11.00
30.6	0.43	0.468	12.81	0.909	14.50	0.85	10.50
Promedio	0.41	0.460		0.908	14.90	0.57	
Coefficiente de Variación (%)	6.68	4.48		6.15	2.72	53.85	

S_0	concentración inicial de glucosa
μ	velocidad específica de crecimiento
$Y_{X/S}$	rendimiento biomasa/substrato
X_{MAX}	biomasa máxima alcanzada al inicio de la fase estacionaria
Q_{GLC}	velocidad específica de consumo de glucosa
Q_{O_2}	velocidad específica de consumo de oxígeno
Q_{ACET}	velocidad específica de producción de acetato
t	tiempo transcurrido desde la inoculación hasta el inicio de la fase estacionaria
ND	no disponible

VI.2.2 Fase estacionaria de cultivos lote

Normalmente la expresión de la subtilisina o de proteínas que están bajo el control de la región de regulación del gene *aprE* no está asociada a crecimiento (Schaeffer *et al.* 1965; Priest. 1977; Ferrari, *et al* 1993). Cuando se empleó el medio de cultivo mineral suplementado con glucosa en cultivos lote se esperaba que la producción de β -galactosidasa no estuviese asociada a crecimiento. Sin embargo, como se muestra en las figuras del apéndice X.10 de este reporte y en las figuras 1 a 3

del manuscrito: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*, así como en el resumen presentado en la tabla VI.2.1, en los cultivos lote se encontró que el medio mineral suplementado con glucosa propicia la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento exponencial.

Tabla VI.2.2 Resumen de resultados durante la fase estacionaria precedidos por cultivos lote a diferentes concentraciones iniciales de glucosa

So (g/L)	AE inicial (U / mg _{PROT})	t (h)	AE máxima (U / mg _{PROT})	Act. Rel. (%)	t _r (h)	AV máxima (U/mL)	Produc- tividad (U / mL-h))	Y _{MÁX} (U / g _{GLC})	k _d (h ⁻¹)
11.2	116 000	4.00	270 600	42.87	11.0	270 000	24 546	24.1 x 10 ⁶	0.118
11.6	100 700	2.75	201 000	50.10	12.0	320 000	26 667	27.6 x 10 ⁶	0.010
25.9	125 000	5.00	296 200	42.20	17.0	840 000	49 412	32.4 x 10 ⁶	0.059
30.6	83 000	3.00	162 500	51.08	13.5	660 000	48 890	21.6 x 10 ⁶	0.113
^a Medio Complejo	9 532	3.00	160 000	5.96	7	63 700	9 100	-----	-----
^b 10.9	120 700	6.50	301 200	40.01	17	533 000	31 352	37.7 x 10 ⁶	-0

So concentración inicial de glucosa
 AE inicial actividad específica al inicio de la fase estacionaria
 AE máxima actividad específica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 t tiempo transcurrido durante la fase estacionaria para alcanzar la AE máxima
 Act. Rel. porcentaje de actividad específica inicial respecto a la actividad máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 t_r tiempo transcurrido desde la inoculación hasta obtener la AE máxima
 AV máxima actividad volumétrica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 Y_{D_{GLC}} rendimiento de máxima actividad de β -galactosidasa respecto a la cantidad de glucosa consumida
 k_d velocidad específica de muerte durante las tres primeras horas de la fase estacionaria
^a evaluación de producción de β -galactosidasa en medio complejo (medio Schaeffer, el cual contiene peptona, hidrolizado de carne, y sales de Mg, Cl, S, Mn y Fe).
^b cultivo lote llevado a cabo en medio mineral, en el cual al agotarse la glucosa (o inicio de la fase estacionaria) se alimento glucosa a una velocidad fija, de acuerdo a un coeficiente de mantenimiento de 0.11 g_{GLC} / (g_{D_{CV}} h). El consumo de glucosa a t_r fue de 15.1 g.

Como se observa alrededor del 40-50% de la máxima actividad enzimática se había acumulado al iniciar la fase estacionaria del cultivo. A manera de comparación la tabla VI.2.2 también muestra los resultados de actividad obtenidos durante la evaluación de la cepa BB804 de *B. subtilis* productora de β -galactosidasa en medio complejo. Como puede observarse en este caso la producción de β -galactosidasa no está asociada a crecimiento. De manera que el efecto observado puede atribuirse al tipo de medio de cultivo y no al fondo genético de la cepa. No obstante la máxima actividad específica de β -galactosidasa en cultivos lote se obtuvo de 3 a 5 horas después del inicio de la fase estacionaria del cultivo (tabla VI.2.2), indicando que en las condiciones evaluadas la producción de β -galactosidasa y la expresión del gene *aprE* están parcialmente asociadas al crecimiento.

En la tabla VI.2.2 también se muestra que la actividad específica de β -galactosidasa fue igual, en el peor de los casos, y hasta un 85% mayor, en el mejor de los casos, en comparación con cultivos realizados en medio complejo. Adicionalmente, se encontró que al variar la concentración inicial de glucosa de 11 a 30 g/L, se obtuvo un incremento de tres y dos veces en la actividad y en la productividad volumétrica, respectivamente. En comparación con el cultivo en medio complejo, se logró incrementar de 4.24 a 13.2 y de 2.7 a 5.4 veces la actividad y la productividad volumétrica, respectivamente, cuando se evaluaron concentraciones iniciales de glucosa de 11 y 26 g/L.

Por otro lado, durante las primeras 3 horas de la fase estacionaria se presentó una lisis celular drástica la cual está representada como la velocidad específica de muerte en la tabla VI.2.2. En otros términos, durante ese periodo de tiempo hasta un 30% de las células se lisaron. Anteriormente se ha reportado que las células de *B. subtilis* presentan una tendencia a lisarse debido, probablemente, a un efecto de agotamiento de la fuente de carbono (Jolliffe *et al.* 1981) y a la presencia de cationes monovalentes (Svarachorn *et al.* 1989; Tsuchido, 1994). Durante la fase estacionario de los cultivos lote el sustrato que se agotó fue la fuente de carbono (glucosa) y debido a las sales presentes en el medio de cultivo se originaron cationes monovalentes. En consecuencia estas condiciones favorecen la lisis celular. Sin embargo, Jolliffe *et al.* (1981) han reportado que la adición de una fuente de carbono previene este fenómeno de lisis. Por tanto se decidió evaluar la adición de glucosa durante la fase estacionaria del cultivo para contender con la lisis celular. La lisis se pudo evitar alimentando

glucosa durante la fase estacionaria de acuerdo a un coeficiente de mantenimiento, el cual fue determinado previamente en un cultivo lote al cual se agrego una concentración elevada de glucosa. Por otro lado, como se menciona en los manuscritos y en la sección X.9 el sulfato de amonio se vuelve limitante cuando se alcanzan concentraciones de biomasa mayores a 6.4 g/L. Cabe aclarar que en este cultivo (figura X.10.5), una vez que se alcanzó una concentración celular mayor de 6 g/L no se agregaron las sales del medio de cultivo, de manera que indirectamente se estableció una fase estacionaria en la cual el sustrato limitante fue la fuente de nitrógeno. Sin embargo, la alimentación de glucosa y la limitación por nitrógeno (en concordancia con los resultados presentados por Pierce *et al* 1992), permitieron evitar la lisis celular y mantener un nivel elevado de actividad enzimática (tabla VI.2.2 y figura X.10.5 y fig. 3 del manuscrito: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*). En consecuencia y debido a una mayor disponibilidad de células, la actividad volumétrica de β -galactosidasa fue aproximadamente del doble cuando se alimentó glucosa durante la fase estacionaria, en comparación con los cultivos lote con aproximadamente 11 g/L iniciales de glucosa.

Debido a que la producción asociada a crecimiento de β -galactosidasa no era esperada, se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de investigar si dicho comportamiento estaba documentado. Sin embargo, únicamente un reporte presentado por Priest (1977) señala que la proteasa neutra en *B. megaterium* es sintetizada durante el crecimiento en medios mínimos, mientras que su síntesis es reprimida en medios complejos durante el crecimiento vegetativo. Muy recientemente otros investigadores (Hewitt y Solomos, 1996) reportaron que la producción de la enzima degradativa α -amilasa en *B. amyloliquefaciens* ocurre simultáneamente con el crecimiento celular en un medio sintético suplementado con lactosa, mientras que su producción ocurre únicamente durante la fase estacionaria en medios complejos. Estos autores postulan que probablemente la síntesis de la enzima es reprimida, mediante un fenómeno de represión catabólica o de bajos niveles de síntesis de ARN mensajero, durante el crecimiento rápido de las células en medios complejos, mientras que tales restricciones no se presentan durante el crecimiento lento en el medio sintético con lactosa.

Por otro lado, también se pensó en que probablemente el medio mineral suplementado con glucosa favoreciera la producción de esporas durante la fase de crecimiento exponencial y en consecuencia se propiciará la producción de β -galactosidasa. Sin embargo, un análisis posterior realizado con cultivos a 2 y 10 g/L iniciales de glucosa (datos presentados en el apéndice X.12), indican que la formación de esporas resistentes a calor no fue el factor que ocasionó la producción de β -galactosidasa asociada a crecimiento. En estos cultivos, los niveles de esporulación durante la fase de crecimiento y durante las primeras 6 horas de la fase estacionaria fueron menores al 1% (Figuras X.12.1 y X.12.2). No obstante en el medio mineral con la cepa BB804 se obtiene una buena frecuencia de esporulación después de 24 de haberse iniciado la fase estacionaria.

En términos de velocidad específica de crecimiento en cultivos lote, en el medio mineral suplementado con glucosa se obtuvo la mitad de la velocidad que se obtiene en medio complejo (en medio Schaeffer la velocidad de crecimiento es de 0.9 h^{-1}). De manera que indirectamente se comprueba la hipótesis de trabajo planteada, es decir que la reducción de la velocidad de crecimiento, en este caso a partir de la composición del medio de cultivo, permite imponer un estrés metabólico y la expresión del gene *aprE* es des-reprimida durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos lote. Probablemente, en las condiciones evaluadas, a decir en un medio de cultivo únicamente con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, las células de *B. subtilis* sienten un ambiente nutricional hasta cierto nivel adverso para su crecimiento, en comparación con un medio complejo y rico. En consecuencia es probable que se expresen genes que no son esenciales durante el crecimiento exponencial, tales como el gene *aprE*, en un intento (tal y como sucede durante el cultivo de *B. subtilis* en medios complejos durante la fase estacionaria) por obtener fuentes alternas de nutrientes. Probablemente también como ocurre en *E. coli* la expresión de algunos genes que se da únicamente durante la fase estacionaria en medios complejos, son parcialmente des-reprimidos durante la fase de crecimiento exponencial cuando se utilizan medios minerales o sintéticos, debido a que el super-enrollamiento del ADN es del doble en medios complejos en comparación con el obtenido en medios minerales (Kusano *et al.*, 1996). También es probable que a nivel transcripcional ocurran algunos cambios que induzcan o favorezcan la expresión del gene *aprE*, tales como la activación de genes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la expresión de σ^H durante la etapa de crecimiento en medios minerales (Sonenshein, 1989).

VL3 Evaluación del efecto de la velocidad de crecimiento sobre parámetros estequiométricos y producción de β -galactosidasa en *B. subtilis* utilizando cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa

Una vez evaluadas las características de crecimiento y la capacidad de producción de β -galactosidasa por la cepa BB804 de *B. subtilis* en el medio de cultivo mineral, se procedió a establecer los cultivos alimentados exponencialmente. Como se planteó en la introducción de esta tesis, en el presente trabajo se realizaron cultivos alimentados exponencialmente con el fin de evaluar cual es el efecto de la velocidad específica de crecimiento (μ) en la producción de β -galactosidasa y de evaluar si la historia de la fermentación (esto es la velocidad de crecimiento "impuesta" a los microorganismos durante la fase de crecimiento exponencial) tiene algún efecto sobre la producción de β -galactosidasa durante la fase estacionaria. Además, debido a que el medio mineral ocasiono que se obtuviera una producción de β -galactosidasa parcialmente asociada a crecimiento, esta característica también permitió evaluar el efecto que tiene la velocidad de crecimiento sobre la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos alimentados.

Mediante un control automático controlado por computadora, cuyo detalle se presenta en el apéndice X.6 (Sistema de fermentación, programa y algoritmos de control) se establecieron perfiles predeterminados de alimentación exponencial, utilizando como sustrato limitante a la glucosa de acuerdo a la ecuación 9. Se evaluaron velocidades de crecimiento predeterminadas, las cuales se variaron de 0.058 a 0.35 h⁻¹. La figura 4 del manuscrito: Hiperproducción de β -galactosidasa de *E. coli* en *B. subtilis*, así como las figuras 1 y 2 del manuscrito: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures, presentan las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa, producción de acetato y producción de β -galactosidasa en algunas de las corridas de fermentación en modo de cultivo alimentado exponencialmente. Adicionalmente, en el apéndice X.11.2 se presentan todas las cinéticas de los cultivos alimentados exponencialmente.

Los cultivos presentados en esas figuras consistieron de varias etapas. La primera una etapa de cultivo lote de 2 horas, en la cual las células crecieron a una velocidad alta con la glucosa proveniente

de los inóculos. Después de 2 horas, o de que la glucosa remanente prácticamente se había consumido, se inició la etapa de alimentación, durante la cual, mediante la limitación por glucosa, la velocidad de crecimiento predeterminada (sección IV.4 diseño de cultivos alimentados exponencialmente y X.6 sistema de fermentación, programa y algoritmos de control) se estableció en un intervalo de 0.058 a 0.35 h⁻¹. Como se presentó en la sección de antecedentes, el control de la velocidad de crecimiento en los cultivos alimentados exponencialmente se establece cuando se alcanza un estado pseudo-estacionario: la concentración de glucosa permanece constante en cero y por tanto la velocidad de crecimiento puede ser controlada a un valor predeterminado. Con el fin de minimizar el cambio de volumen en el reactor y dependiendo del valor de la velocidad de crecimiento a controlar, de la biomasa y de la resolución de la bomba utilizada, la concentración en las soluciones de glucosa que se alimentaron variaron de aproximadamente 30 a 500 g/L. Para prevenir la limitación por otro nutriente diferente a la glucosa, todas las sales del medio de cultivo se adicionaron cuando se alcanzaba un incremento de 6 g/L de células, debido a que a tal incremento la fuente de nitrógeno se vuelve limitante en los cultivos. La tercera etapa fue de nuevo una etapa lote. Esta etapa se presentó después de que se terminó la etapa de alimentación, debido a la pérdida del estado pseudo-estacionario en la concentración de glucosa remanente y en la velocidad de crecimiento, es decir cuando la velocidad de crecimiento decrecía y la glucosa remanente se acumulaba en el medio de cultivo. A continuación se presenta un resumen de los datos obtenidos para los cultivos alimentados exponencialmente. Primeramente se presentan los resultados obtenidos durante la etapa de alimentación y luego los datos obtenidos durante la segunda etapa lote.

VI.3.1 Evaluación de la etapa de alimentación

Como se observa en las figuras mostradas en el apéndice X.11 (cinéticas de fermentación de cultivos alimentados exponencialmente) y en las figuras 1 y 2 del manuscrito *effect of growth rate on the production of β-galactosidase from Escherichia coli in Bacillus subtilis using glucose-limited exponentially fed-batch cultures*, el estado pseudo-estacionario respecto a la velocidad de crecimiento y la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo, se alcanzó prácticamente en todos los cultivos después de haber iniciado la fase de alimentación. Dicho estado pseudo-estacionario consiste

en el incremento exponencial de la concentración celular y en mantener una concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo de prácticamente cero. Adicionalmente, el estado pseudo-estacionario también se ve reflejado en un incremento exponencial de la concentración de proteína intracelular, en la velocidad de consumo de oxígeno y en la de evolución de bióxido de carbono. El estado pseudo-estacionario también se obtuvo en el perfil de consumo exponencial de glucosa, lo cual indica una velocidad específica constante de consumo de glucosa. Por último, como se esperaba la concentración de acetato en el medio de cultivo fue prácticamente de cero durante el estado pseudo-estacionario. Cabe aclarar que con el fin de corregir los cambios ocasionados por el incremento de volumen, la velocidad específica de crecimiento se calculó en base a la cantidad total de biomasa en términos másicos.

Sin embargo, y contrario a lo que se planteó en la hipótesis de trabajo, la actividad específica y la actividad volumétrica de β -galactosidasa decrecieron durante la etapa de alimentación, para los cultivos que se llevaron a cabo a velocidades de crecimiento menores a 0.2 h^{-1} . Es decir con los cultivos en los cuales se provocó un mayor estrés metabólico mediante la limitación por glucosa, llegándose a obtener valores de actividad enzimática de prácticamente cero en comparación con los valores obtenidos para los cultivos lote durante la fase de crecimiento exponencial. Únicamente en los cultivos que se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento mayores a 0.2 h^{-1} , es decir en los cultivos que se obtuvo una concentración de glucosa ligeramente mayor a cero durante el estado pseudo-estacionario, la actividad específica no disminuyó durante la fase de alimentación y la actividad volumétrica se incrementó de manera proporcional a la concentración celular. Estos hechos muestran que la reducción de la velocidad de crecimiento mediante la limitación por glucosa afectan la expresión de la β -galactosidasa, durante la fase de crecimiento, cuando se encuentra bajo el control de la región de regulación del gene *aprE*.

No obstante que todos los minerales estaban presentes en concentraciones no limitantes y de que la glucosa se alimentó en base a los perfiles predeterminados, una repentina y característica disminución en el incremento exponencial de la biomasa, es decir una reducción en la velocidad de crecimiento, así como la acumulación de glucosa y acetato, y una reducción en el incremento

exponencial de la velocidad de consumo de oxígeno y de la evolución de bióxido de carbono, indican que se perdió el estado pseudo-estacionario y el control sobre la velocidad de crecimiento.

La figura VI.3.1 muestra un resumen de los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos durante el estado pseudo-estacionario en la etapa de alimentación. Como se observa la velocidad de crecimiento experimental corresponde muy bien con la velocidad de crecimiento predeterminada que se estableció durante el estado pseudo-estacionario, lo cual indica que los cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa pueden ser utilizados para controlar la velocidad de crecimiento con la cepa BB804 de *B. subtilis*. Por otro lado, como se observa en el panel (a) la velocidad de crecimiento se pudo controlar durante un período de tiempo menor conforme la velocidad de crecimiento predeterminada fue mayor. El estado pseudo-estacionario fue mantenido en un intervalo de 6 a 46 horas conforme la velocidad de crecimiento predeterminada fue reducida de 0.35 a 0.058 h⁻¹. Como se esperaba, la producción de ácidos orgánicos fue menor conforme se redujo la μ (panel b). A μ menores a 0.35 h⁻¹ la producción de ácido acético fue prácticamente nula durante la etapa controlada de crecimiento exponencial, indicando que el efecto de Crabtree fue evitado debido a que la concentración de la glucosa se mantuvo a un valor bajo (Yee y Blanch, 1992). Sin embargo, el rendimiento biomasa/glucosa fue constante únicamente en el intervalo de velocidad de crecimiento de 0.1 a 0.2 h⁻¹. Dicho comportamiento indica que hubo un cambio metabólico por debajo y arriba de tales velocidades (Rodríguez y de la Torre, 1996). Probablemente los altos rendimientos a velocidades de crecimiento mayores a 0.2 h⁻¹ indican que las células acumularon material de reserva. Además, la acumulación de acetato a de velocidades de crecimiento mayores a 0.25 h⁻¹ confirman tal cambio metabólico.

La concentración celular, alcanzada al terminar el estado pseudo-estacionario, se logró incrementar cuando la velocidad de crecimiento fue menor de 0.15 h⁻¹ (panel c). De esta manera, en comparación con los cultivos realizados a velocidades de crecimiento de 0.16 a 0.37 h⁻¹, cuando se controló la velocidad de crecimiento experimental a 0.069 h⁻¹ se obtuvo un incremento de aproximadamente 9 veces en la cantidad total de células generadas.

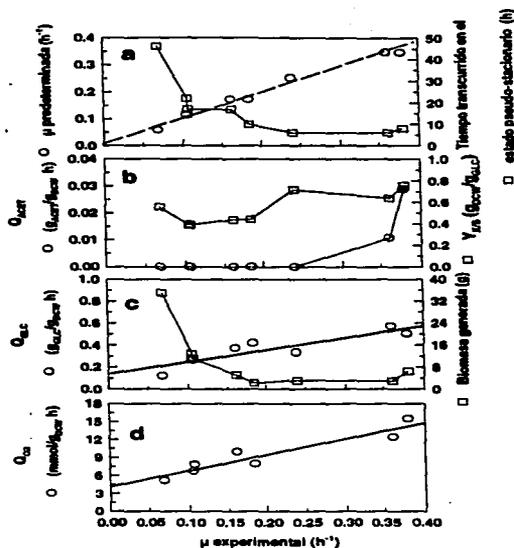


Figura VI.3.1

Resumen de resultados cinéticos obtenidos durante el estado pseudo-estacionario de la fase de alimentación de los cultivos alimentados exponencialmente. μ , Q_{ACET} , Q_{GLC} y Q_{O_2} indican las velocidades específicas de crecimiento, producción de acetato, y de consumo de glucosa y oxígeno, respectivamente.

Las velocidades específicas de consumo de glucosa y de oxígeno presentaron una tendencia aproximadamente lineal con la velocidad de crecimiento (panel c y d). Dicho datos se ajustaron al modelo de Pirt (Pirt, 1975) únicamente para las velocidades a las cuales el rendimiento biomasa/substrato fue constante. Se obtuvo un rendimiento de biomasa respecto a glucosa de $0.55 \text{ g}_{DCW}/\text{g}_{GLC}$ y un coeficiente de mantenimiento de $0.079 \text{ g}_{GLC}/(\text{g}_{DCW} \text{ h})$. En el caso del oxígeno se obtuvo un rendimiento de biomasa respecto a oxígeno de $54.47 \text{ g}_{DCW}/\text{mol}_{O_2}$, y un coeficiente de mantenimiento de $5.53 \text{ mmol}_{O_2}/(\text{g}_{DCW} \text{ h})^{-1}$. En comparación con cepas de *B. licheniformis* y *B.*

thuringiensis (Frankena *et al.*, 1985, Rodríguez y de la Torre, 1996), los coeficientes de mantenimiento obtenidos en el presente trabajo para *B. subtilis* fueron de un 20 a un 80% mayores para la glucosa y 5 veces mayores para el oxígeno. Cabe resaltar que en el intervalo de velocidad de crecimiento de 0.16 a 0.07 h⁻¹, el coeficiente de mantenimiento para glucosa corresponde de un 20 a un 60% de la velocidad específica de consumo de glucosa. Este hecho sugiere que las células tienen poca disponibilidad de glucosa para producir proteínas que no son indispensables para el crecimiento o para generar material de reserva, y probablemente por esto no se canaliza glucosa hacia la producción de β-galactosidasa .

La pérdida del control de la velocidad de crecimiento se puede atribuir en gran parte a la propiedad intrínseca de *B. subtilis* de presentar un programa de desarrollo, que conduce a la formación de esporas en un medio ambiente en el cual se presenta la limitación por algún nutriente. Además, las propiedades pleiotrópicas de las cepas con el genotipo *degU(Hy)*, en especial la de no poder reprimir la esporulación mediante la adición de glucosa, probablemente favorecieron la pérdida de control de la velocidad de crecimiento en los cultivos alimentados y favoreció el desarrollo de la fase estacionaria. En este sentido y con el fin de alcanzar una mayor concentración celular, cabe la posibilidad de utilizar otras cepas con fenotipos hiperproductores (como las presentadas por Ferrari *et al.*, 1986) que no presenten defectos en la represión catabólica de la esporulación por glucosa. La producción de factores de esporulación por *B. subtilis* (Grossman y Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993) puede ser otro factor que favoreció una respuesta en los cultivos hacia la pérdida del control de la velocidad de crecimiento. Desafortunadamente y debido a la complejidad que implicaba, el estudio y control de dichos factores de esporulación no se contempló durante esta tesis. Sin embargo, por los resultados obtenidos, se puede especular que el desarrollo de la fase estacionaria y probablemente la formación de dichos factores es favorecida por altas velocidades de crecimiento.

VI.3.2 Evaluación de la etapa posterior a la alimentación

En las figuras presentadas en la sección VI.3.1 se muestra que después de que se perdía el control sobre el cultivo, se acumulaba glucosa y acetato en el medio. Posteriormente la glucosa era consumida a una velocidad específica menor a la obtenida durante el estado pseudo-estacionario y se

obtenía un incremento en la concentración de acetato. Después de que se agotaba la glucosa en el medio de cultivo, el acetato que se había acumulado anteriormente, en la mayoría de los casos, también era consumido. Lo cual sugiere que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se activo durante dicha etapa. Además, un decremento drástico y característico de los valores de la velocidad de consumo de oxígeno y de evolución de bióxido de carbono permitieron determinar en-linea el agotamiento de la glucosa en el medio. Durante esta etapa de consumo de la glucosa acumulada no se observó algún cambio significativo en la actividad enzimática de los cultivos previamente alimentados.

En el caso de los cultivos llevados a cabo a velocidades de crecimiento cercanas a 0.4 h^{-1} , tal y como sucedió en los cultivos lote, la actividad específica fue prácticamente constante durante la fase de crecimiento exponencial y la máxima actividad enzimática se obtuvo durante las primeras horas de la fase estacionaria. Sin embargo, cuando los cultivos fueron llevados a cabo a velocidades de crecimiento menores a 0.2 h^{-1} , la actividad enzimática disminuyó durante la etapa de alimentación llegando, en la mayoría de las ocasiones, a valores cercanos a cero antes de que se detuviese la alimentación de glucosa o de que se iniciara la fase donde se perdía el control del cultivo. Inesperadamente, para los cultivos realizados a velocidades de crecimiento menores a la máxima, la producción de β -galactosidasa durante la fase posterior a la etapa de alimentación fue prácticamente nula (independientemente de si había o no glucosa y de si todos los minerales estaban presentes durante dicha fase). En la tabla VI.3.1 se presenta un resumen del efecto de la velocidad de crecimiento sobre la máxima actividad obtenida durante la fase estacionaria del cultivo. Como se muestra, la máxima actividad específica se obtuvo a la máxima velocidad de crecimiento, mientras que los niveles de actividad enzimática fueron muy bajos a velocidades de crecimiento menores a 0.2 h^{-1} . La máxima actividad específica, $316\ 200 \text{ U} / \text{mg}_{\text{PROT}}$ obtenida a una velocidad de crecimiento de 0.37 h^{-1} , compara muy bien con los resultados obtenidos para los cultivos lote ($296\ 000 \text{ U} / \text{mg}_{\text{PROT}}$ y 0.41 h^{-1} , respectivamente). A manera de comparación en la tabla VI.3.1 también se presentan la actividad volumétrica, la productividad volumétrica y el rendimiento de actividad enzimática máxima por glucosa consumida hasta la obtención de la actividad máxima. Como se observa todos estos parámetros decrecen conforme la velocidad de crecimiento se redujo.

Como puede observarse y en comparación con el cultivo lote llevado a cabo con una concentración inicial de glucosa de 26 g/L (tabla VI.3.2), el cultivo alimentado exponencialmente realizado a una velocidad específica de crecimiento de 0.38 h⁻¹, presenta prácticamente los mismos valores de actividad específica, actividad volumétrica, productividad volumétrica y rendimiento de actividad respecto a glucosa consumida. Esto se debe a que la estrategia de cultivo alimentado exponencialmente llevados a cabo a velocidades de crecimiento similares a las obtenidas en cultivos lote, son en términos de limitación de nutrientes muy parecidos a los cultivos lote. Es decir que estrictamente no existe una limitación por glucosa en los cultivos alimentado exponencialmente llevados a cabo a velocidades de crecimiento cercanas a la máxima (ver figuras X.11.1 y X.11.2), y que aunque la velocidad de producción de acético se reduce drásticamente en los cultivos alimentados, éste no es un factor que afecte de manera drástica la cantidad de actividad enzimática que se obtiene.

Tabla VI.3.1 Actividad enzimática máxima de β-galactosidasa obtenida durante la fase estacionaria de cultivos precedidos por una fase de cultivo alimentado exponencialmente.

μ (h ⁻¹)	AE máxima (U / mg _{gluc})	AV máxima (U/mL)	Produc- tividad (U/(mL-h))	Y_{max} (U/g _{glc})
0.380	316 200	914 700	41 600	32.9 x 10 ⁶
0.362	192 600	226 100	15 100	27.0 x 10 ⁶
0.240	108 400	124 700	6 400	11.7 x 10 ⁶
0.185	5 100	5 200	200	0.4 x 10 ⁶
0.162	7 100	13 500	500	0.7 x 10 ⁶
0.106	7 300	25 800	700	1.0 x 10 ⁶
0.105	3 000	11 500	300	0.5 x 10 ⁶
0.069	8 400	43 500	500	1.0 x 10 ⁶

μ velocidad específica de crecimiento durante el estado pseudo-estacionario de la fase de alimentación
 AE máxima actividad específica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 AV máxima actividad volumétrica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 Y_{max} rendimiento de máxima actividad de β-galactosidasa respecto a la cantidad de glucosa consumida

Como puede observarse y en comparación con el cultivo lote llevado a cabo con una concentración inicial de glucosa de 26 g/L (tabla VI.3.2), el cultivo alimentado exponencialmente realizado a una velocidad específica de crecimiento de 0.38 h⁻¹, presenta prácticamente los mismos valores de actividad específica, actividad volumétrica, productividad volumétrica y rendimiento de actividad respecto a glucosa consumida. Esto se debe a que la estrategia de cultivo alimentado exponencialmente llevados a cabo a velocidades de crecimiento similares a las obtenidas en cultivos lote, son en términos de limitación de nutrientes muy parecidos a los cultivos lote. Es decir que estrictamente no existe una limitación por glucosa en los cultivos alimentado exponencialmente llevados a cabo a velocidades de crecimiento cercanas a la máxima (ver figuras X.11.1 y X.11.2), y que aunque la velocidad de producción de acético se reduce drásticamente en los cultivos alimentados, éste no es un factor que afecte de manera drástica la cantidad de actividad enzimática que se obtiene.

Tabla VI.3.1 Actividad enzimática máxima de β -galactosidasa obtenida durante la fase estacionaria de cultivos precedidos por una fase de cultivo alimentado exponencialmente.

μ (h ⁻¹)	AE máxima (U / mg _{PROT})	AV máxima (U/mL)	Produc- tividad (U/(mL-h))	Y_{GALIS} (U/g _{GLC})
0.380	316 200	914 700	41 600	32.9 x 10 ⁶
0.362	192 600	226 100	15 100	27.0 x 10 ⁶
0.240	108 400	124 700	6 400	11.7 x 10 ⁶
0.185	5 100	5 200	200	0.4 x 10 ⁶
0.162	7 100	13 500	500	0.7 x 10 ⁶
0.106	7 300	25 800	700	1.0 x 10 ⁶
0.105	3 000	11 500	300	0.5 x 10 ⁶
0.069	8 400	43 500	500	1.0 x 10 ⁶

μ velocidad específica de crecimiento durante el estado pseudo-estacionario de la fase de alimentación
 AE máxima actividad específica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 AV máxima actividad volumétrica máxima alcanzada durante la fase estacionaria
 Y_{GALIS} rendimiento de máxima actividad de β -galactosidasa respecto a la cantidad de glucosa consumida

Adicionalmente, en los cultivos alimentados exponencialmente, cuando terminó la etapa de alimentación y se consumió la glucosa remanente en el medio de cultivo, se presentó lisis celular. Esto trajo como consecuencia que el medio mineral se convirtiera en un medio complejo. No obstante esta conversión del medio, la producción de β -galactosidasa fue prácticamente nula durante la fase estacionaria del cultivo. Mediante la utilización de medios complejos y cultivos continuos se ha mostrado que la formación de esporas y la expresión del gene *aprE* es inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento (Frankena *et al.* 1985; Rincón *et al.* 1994). Dicho comportamiento nos condujo a pensar que en los cultivos alimentados limitados por glucosa, la expresión del gene *aprE* podría ser mayor conforme las velocidades de crecimiento fuesen menores. Sin embargo, los datos presentados en esta sección indican claramente que la reducción de la velocidad de crecimiento, mediante la limitación por glucosa reprime la expresión del gene *aprE* durante las fases de crecimiento y que además tienen el efecto de suprimir la producción de β -galactosidasa durante la fase estacionaria. Desafortunadamente, durante el desarrollo de este trabajo no se considero indispensable la cuantificación de la frecuencia de esporulación. Sin embargo es probable, tal y como esta reportado para cultivos continuos (Dawes y Mandelstam, 1970; Dawes y Thornley, 1970; Rincón *et al.* 1994), que conforme se redujo la velocidad de crecimiento se incremento la frecuencia de esporulación. No obstante, la expresión del gene *aprE* presentó un comportamiento inverso al presentado por Wouters y Buysman (1977) y Rincón *et al.* (1994), es decir que al reducir la velocidad de crecimiento se redujo la actividad de β -galactosidasa. Con el fin de dar una explicación para este fenómeno, a continuación se presentan algunas hipótesis al respecto.

En primer lugar puede especularse que cuando se limitan los cultivos por glucosa, se evita la producción de β -galactosidasa durante la fase de crecimiento exponencial, debido a que el producto de la expresión del gene *aprE*, es decir la subtilisina y en el caso particular la β -galactosidasa no son proteínas indispensables para el crecimiento celular. Así mismo, durante la etapa de crecimiento la formación de material de reserva debe ser muy bajo, debido a la limitación por glucosa, y en consecuencia no permite la canalización de material para la formación de β -galactosidasa durante la fase estacionaria. Estas hipótesis son apoyadas, considerando la elevada contribución del coeficiente de mantenimiento sobre la velocidad específica de consumo de glucosa para las velocidades de crecimiento en el intervalo de 0.07 a 0.16 h⁻¹. Por otro lado es sabido (Burnet *et al.* 1986) que las

proteasas intracelulares de *B. subtilis* son capaces de hidrolizar con una elevada actividad proteásica intracelulares. Además, la actividad de la serin-proteasa intracelular-1 es 2.67 veces mayor cuando *B. subtilis* es cultivado en medios químicamente definidos que en medios complejos (Burnet *et al.*, 1986). Probablemente bajo las condiciones evaluadas en el presente trabajo la velocidad de degradación de la β -galactosidasa, por las proteasas intracelulares, fue mayor que su velocidad de síntesis, de manera que no se observó la acumulación de ésta.

Como se mostró, la limitación de glucosa en los cultivos alimentados exponencialmente suprime prácticamente la acumulación de β -galactosidasa en *B. subtilis*. En base a estos resultados, y a la característica de la cepa de no reprimir la esporulación en presencia de glucosa, sería importante evaluar la respuesta de la cepa recombinante bajo condiciones en las cuales la glucosa no fuese limitante, pero que tampoco estuviese bajo concentraciones elevadas de glucosa. Dicha estrategia puede ser lograda limitando con otro nutriente, por ej. nitrógeno o fósforo, o bien mediante estrategias de control predictivas y/o estableciendo un control de lazo cerrado (Kleman *et al.*, 1991; O'Connor *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1992). Con estas estrategias la concentración de glucosa se puede controlar a niveles bajos para evitar efectos adversos debidos a concentraciones elevadas de glucosa. La medición de glucosa en línea, mediante un analizador automático permitiría establecer el control de lazo cerrado. Los datos obtenidos de velocidades específicas de consumo de oxígeno y glucosa, así como los de producción de bióxido de carbono permitirían establecer un control predictivo.

VI.4 Comparación de la producción de β -galactosidasa por la cepa de *B. subtilis* BB804 con otros microorganismos

Con el fin de comparar los niveles de actividad específica de β -galactosidasa en diversos microorganismos se realizó una recopilación de datos publicados en la literatura. Estos datos se obtuvieron a lo largo del desarrollo del presente trabajo y de una búsqueda en el banco de datos de los Biotechnological Abstracts de Derwent de los años 1982 a 1995. La búsqueda se enfocó a relacionar β -galactosidasa con los siguientes microorganismos: *E. coli*, *B. subtilis*, levaduras y *Aspergillus* (tabla VI.4.1).

Tabla VI.4.1 Niveles de actividad de β -galactosidasa en diversos microorganismos

Microorganismo (a)	Temp. (oC)	pH (-)	Act. Especifica (U/mg prot)	Act. Esp. Relativa	Referencia
<i>B. subtilis</i>	28	7	316,200	1.000	Este trabajo
<i>K. Lactis</i> *	30	ND	177,305	0.561	Gonzalez, 1994
<i>B. subtilis</i>	28	7	160,000	0.506	Bolaños, 1994
<i>E. coli</i>	28	7	99,099	0.313	Chou et al, 1995
<i>E. coli</i>	28	7	72,072	0.228	Chou et al, 1995
<i>E. coli</i>	28	7	72,072	0.228	Kidwell et al, 1996
<i>E. coli</i>	28	7	66,667	0.211	Rinas et al, 1989
<i>E. coli</i>	28	7	56,900	0.180	Shin v Seo, 1990
<i>E. coli</i>	28	7	54,054	0.171	Chou et al, 1995
<i>B. subtilis</i>	28	7	50,000	0.158	Ferrari et al, 1986
<i>E. coli</i> #	70	7	40,000	0.127	Saito et al, 1992
<i>R. Meliloti</i>	28	7	39,279	0.124	Labes et al, 1990
<i>P. Putida</i>	28	7	29,369	0.093	Labes et al, 1990
<i>A. oryzae</i> *	45	4.5	27,300	0.086	Bailev v Linko, 1990
<i>R. Legumin.</i>	28	7	25,045	0.079	Labes et al, 1990
<i>A. niger</i>	28	7	23,300	0.074	Punt et al, 1991
<i>E. coli</i>	28	7	21,622	0.068	Ye et al, 1994
<i>E. coli</i>	28	7	20,470	0.065	Villaverde et al, 1993
<i>E. coli</i>	28	7	20,360	0.064	Labes et al, 1990
<i>P. Pastoris</i>	30	7	20,000	0.063	Tschopp et al 1987
<i>E. coli</i>	28	7	16,353	0.052	Wu v Wood, 1994
<i>B. subtilis</i>	29	7	14,600	0.046	Rincón et al, 1994
<i>E. coli</i> #	10	7	14,300	0.045	Torres et al, 1995
<i>K. fragilis</i> *	37	6.6	13,966	0.044	Sanchez et al, 1980
<i>E. coli</i>	28	7	8,828	0.028	Ye et al, 1994
<i>B. subtilis</i>	55	ND	7,300	0.023	Hirata et al, 1985
<i>B. subtilis</i>	55	ND	7,100	0.022	Park et al, 1992
<i>K. fragilis</i> *,#	40	6.6	6,667	0.021	Casas, 1992
<i>B. subtilis</i>	28	ND	5,700	0.018	Park et al, 1992
<i>B. subtilis</i>	28	7	2,250	0.007	Pierce et al, 1992
<i>E. coli</i>	ND	ND	1,517	0.005	diPasquantonio et al, 1987
<i>E. coli</i>	30	7	541	0.002	Horiuchi et al, 1994
<i>A. oryzae</i> *	60	5	56	0.000	Park et al, 1979

ND Datos no disponibles

oC = grados Centígrados

(a) * Indica que se trata de una cepa silvestre, todas las demás son recombinantes

Indica que se trata de una β -galactosidasa diferente a la de *E. coli*

U/mg equivalen a nano moles de ONP formado por minuto por mg de proteína

La homogenización de unidades se realizó de acuerdo a las siguientes consideraciones y realizando las conversiones adecuadas.

<p>1 U Miller = 1000pL x DO420 / (15 min x DO600) 1000uL = Vol. reacción DO420 = lectura de absorbancia para formación de ONP 15 min = tiempo de reacción DO600 = lectura de DO del cultivo</p>	<p>% de proteína en células de <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i> y Levadura: 60, 37 y 60% respectivamente 1 DO600 = 0.37 g/L de peso seco de <i>E. coli</i> Coef. de extinción molar del ONP = 380 nanomol/(mL x DO420)</p>
---	--

Cabe aclarar que dicha comparación no fue sencilla, debido a que no existe homogeneidad en las condiciones de las determinaciones de actividad enzimática y en la forma de definir las unidades en los reportes consultados. Sin embargo, para realizar una comparación, los datos de actividad fueron homogeneizados respecto a la definición de unidad enzimática. La tabla VI.4.1 muestra un resumen de los datos mas relevantes obtenidos en la recopilación con *E. coli* y *B. subtilis*.

Con fines de comparación en la tabla VI.4.1 también se presentan algunos datos de *Aspergillus*, *Kluyveromyces* y otros microorganismos. Como puede observarse la actividad enzimática alcanzada depende de diversos factores, sin embargo la mayoría de los valores son menores a los reportados por Bolaños (1994) y a los obtenidos en el presente trabajo, para la cepa de *B. subtilis* BB804 con las mutaciones mencionadas anteriormente.

Mediante la utilización de cultivos alimentados actualmente es común obtener concentraciones celulares, de *E. coli* y de levaduras, mayores a 50 gramos de células en base a peso seco por litro (Lee, 1996). Debido a que una gran cantidad de proteínas recombinantes son producidas intracelularmente (como es el caso de la β -galactosidasa producida por *B. subtilis*), la producción y la productividad de los procesos, en la mayoría de los casos, son proporcionales a la concentración final de células en el cultivo. En el caso de *B. subtilis*, son escasos los reportes en los que se ha logrado alcanzar concentraciones celulares elevadas. El caso en el cual se reporta una concentración celular por arriba de los 100 g de células en base a peso seco por litro, se utilizó una cepa asporogénica (Park *et al.*, 1992). Es por esto que se decidió realizar una comparación de resultados de la literatura con los obtenidos en el presente trabajo seleccionando datos presentados en la tabla VI.4.1 y que presentan la característica de reportar una cantidad de biomasa relativamente elevada. Cabe aclarar que en el presente trabajo no se alcanzaron concentraciones celulares mayores a 20 g/L (figura VI.3.1). Sin embargo, la actividad volumétrica de β -galactosidasa alcanzada en cultivos alimentados exponencialmente, a velocidad de crecimientos cercanas a la máxima, es al menos del doble en comparación con los reportes en los cuales se obtiene una elevada actividad volumétrica con concentraciones celulares de hasta 180 g/L (tabla VI.4.2).

Tabla VI.4.2 Comparación de actividad volumétrica de β -galactosidasa en cultivos con concentración relativamente elevada de células

Microorganismo	Act. Esp. (U/mg _{PKOF})	Biomasa (g/L)	Act. Volumétrica (U/mL)	Act. Volumétrica Relativa (b)	Referencia
<i>B. subtilis</i>	316.200	10	914.700	1.00	Este Trabajo
<i>B. subtilis</i>	7.100	65	170.755	0.19	Park et al. 1992
<i>B. subtilis</i>	5.700	184	388.056	0.42	Park et al. 1992
<i>E. coli</i>	72.072	10	432.432	0.47	Chou et al. 1994
<i>E. coli</i>	54.054	22	713.513	0.78	Chou et al. 1994
<i>E. coli</i>	66.667	7	280.001	0.31	Rinas et al. 1989
<i>E. coli</i>	21.622	25	324.330	0.35	Ye et al. 1994
<i>E. coli</i>	8.828	84	444.931	0.49	Ye et al. 1994
<i>E. coli</i>	40.000	22.2	532.800	0.58	Saito et al. 1992
<i>K. fragilis</i>	6.667	9	36.001	0.04	Casas, 1992
<i>K. Lactis</i>	177.305	4.7	500.000	0.55	Gonzalez, 1994

- (a) Cálculos de actividad volumétrica basados en las consideraciones presentadas en la tabla VI.4.1
 (b) Actividad volumétrica relativa a la máxima obtenida en el presente trabajo

Finalmente, con la cepa BB804 se obtienen aproximadamente 160 000 U (mg_{PKOF})⁻¹ con un tiempo de fermentación de 7 h en medio complejo (medio Schaeffer, tabla VI.2.2). Considerando 1 litro de volumen de fermentación y la proteína celular de *B. subtilis* (tabla VI.4.1), se obtiene una actividad volumétrica de 57 500 U mL⁻¹ y una productividad de 8 214 U (mL h)⁻¹. Utilizando la misma cepa, en el presente trabajo se lograron alcanzar 316 000 U (mg_{PKOF})⁻¹, 914 700 U mL⁻¹ y 41 600 U (mL h)⁻¹ de actividad específica, volumétrica y productividad volumétrica, respectivamente (tabla VI.4.2 y tabla VI.3.1). Esto es un incremento de prácticamente 2, 16 y 5 veces en los parámetros mencionados anteriormente, respectivamente, con respecto a los cultivos en matraz y medio rico. Estos incrementos indican la importancia del medio de cultivo y de las condiciones ambientales utilizadas a nivel fermentador.

VII CONCLUSIONES Y APORTACIONES

En resumen, utilizando una cepa recombinante de *B. subtilis* (la BB804), en la cual el gene *lacZ* de *E. coli* es expresado cromosomalmente por la región de control del gene *aprE*, las principales conclusiones y aportaciones que se obtuvieron son:

- 1.- Se diseñó un medio mineral suplementado con glucosa, el cual permite que en cultivos lote se obtenga producción de β -galactosidasa en *B. subtilis* parcialmente asociada a crecimiento.
- 2.- La frecuencia de esporulación que se obtuvo en cultivos lote durante la fase de crecimiento y hasta las primeras seis horas de la fase estacionaria fue menor al 1%. En cultivos realizados con medio complejo se obtuvo únicamente producción de β -galactosidasa no asociada a crecimiento. Estos resultados indican que la expresión del gene *aprE* durante la etapa de crecimiento se debe a un efecto ocasionado por medio de cultivo mineral y no al fondo genético de la cepa utilizada, ni a un efecto mediado por el proceso de esporulación.
- 3.- Se sugiere que la producción de β -galactosidasa parcialmente asociada a crecimiento se puede deber a que las células sienten un medio ambiente limitado en cuanto a fuentes de carbono y nitrógeno complejas, de manera que mediante la reducción de la velocidad de crecimiento, en comparación con medios complejos, se provoca la expresión del gene *aprE* durante la fase de crecimiento como un intento para obtener fuentes alternas de nutrientes.
- 4.- En comparación con el medio complejo (medio Schaeffer), normalmente utilizado para evaluar la expresión del gene *aprE* y la frecuencia de esporulación en *B. subtilis*, se logró incrementar hasta en aproximadamente el doble la actividad específica de β -galactosidasa cuando se utilizó el medio mineral suplementado con glucosa

- 5.- Adicionalmente, en cultivos lote se observó, que se pueden utilizar concentraciones elevadas de glucosa, de hasta 30 g/L, sin detrimento en la velocidad de crecimiento, ni en el rendimiento biomasa / glucosa. En consecuencia, al incrementar la concentración inicial de glucosa de 11 a 26 g/L, se logró incrementar tres y dos veces la actividad y productividad volumétrica de β -galactosidasa, respectivamente.
- 6.- Alimentando glucosa de acuerdo a un coeficiente de mantenimiento de $0.11 \text{ g}_{\text{GLUC}} / (\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h})$, se evitó un fenómeno de lisis drástica durante la fase estacionaria de los cultivos. De esta manera, al mantener integra prácticamente a toda la población durante la fase estacionaria de este cultivo, se consiguió duplicar la actividad volumétrica obtenida en comparación con cultivos lote realizados en condiciones similares, pero en los cuales no se alimento glucosa durante la fase estacionaria.
- 7.- Se diseñó y estableció un sistema de fermentación automatizado para realizar cultivos alimentados exponencialmente. El sistema permite controlar y adquirir datos en línea para monitorear los proceso de fermentación a través de la velocidad de agitación, la temperatura, el pH, el nivel de oxígeno disuelto, así como a partir de la velocidad de consumo de oxígeno y de evolución de bióxido de carbono y del coeficiente respiratorio. El sistema se afinó para controlar automáticamente el nivel de oxígeno disuelto a través de la velocidad de agitación.
- 8.- Mediante la implementación de cultivos alimentados exponencialmente, con perfiles predeterminados de alimentación de glucosa, permitieron obtener un estado pseudo-estacionario respecto a la velocidad específica de crecimiento, a la concentración de glucosa y acetato en el medio de cultivo, así como en el incremento exponencial de la velocidad de consumo de oxígeno y de evolución de bióxido de carbono. Mediante la utilización de los cultivos alimentados, se logró reducir la acumulación de acetato y obtener un incremento en el tiempo de crecimiento exponencial y, en consecuencia en aumentar nueve veces la cantidad másica de células generadas, cuando se redujo la velocidad de crecimiento de 0.37 a 0.058 h^{-1} .

- 9.- El estado pseudo-estacionario se perdió, no obstante que la glucosa fue alimentada de acuerdo a los perfiles predeterminados y de que todos los minerales del medio de cultivo estaban presentes en concentraciones no limitantes. Este comportamiento indica que probablemente el(los) factor(es) de esporulación o los efectos pleiotrópicos de la mutación *degU32(Hy)* limitan el incremento de la biomasa.
- 10.- Contrario a la hipótesis de trabajo planteada, en los cultivos alimentados exponencialmente limitados por glucosa se encontró que, a velocidades específicas de crecimiento menores a la máxima, la actividad de β -galactosidasa se redujo drásticamente durante la etapa de crecimiento exponencial. Este resultado indica que la expresión del gene *aprE* es reducida por la velocidad de crecimiento cuando ésta es controlada mediante la limitación por glucosa.
- 11.- También, contrario a lo que se esperaba, cuando los cultivos alimentados exponencialmente se llevaron a cabo a velocidades de crecimiento menores a la máxima, la producción de β -galactosidasa, fue prácticamente nula durante la etapa posterior a la de alimentación de glucosa. Sin embargo, ha sido reportado que la producción de proteasas y la expresión del gene *aprE*, en cultivos continuos realizados con medios complejos y en cultivos alimentados limitados por nitrógeno, se incrementa conforme la velocidad de crecimiento se reduce. Estas diferencias indican que el tipo de nutriente limitante tiene un efecto sobre la expresión del gene *aprE*, y que evitar la limitación por glucosa es importante para obtener una buena expresión del mismo.
- 12.- Sin embargo, a velocidades de crecimiento cercanas a la velocidad máxima, al igual que en los cultivos lote, se obtuvo una producción de β -galactosidasa parcialmente asociada a crecimiento. Estos hechos sugieren que la limitación por glucosa reprime la expresión del gene *aprE*.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 13.- Utilizando cultivos lote con una concentración inicial de glucosa de 26 g/L, o bien cultivos alimentados exponencialmente realizados a una velocidad de crecimiento cercana a la velocidad máxima, se lograron obtener incrementos de 2, 16 y 5 veces en la actividad específica, en la actividad volumétrica y en la productividad volumétrica de β -galactosidasa, respectivamente, con respecto a los resultados obtenidos en cultivos lote con medios complejos.
- 14.- Finalmente, los datos obtenidos de la velocidad de consumo de oxígeno y de evolución de bióxido de carbono permiten detectar en línea el inicio de la fase estacionaria, el agotamiento de la glucosa y, si se requiriera biomasa durante la fase exponencial.

VIII RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos, para trabajos futuros se recomienda:

- 1.- Evaluar si el efecto de des-represión de genes de enzimas degradativas no asociadas a crecimiento utilizando medios minerales se presenta comúnmente en diferentes fondos genéticos de *Bacillus subtilis*. Así mismo, tratar de discernir si dicho efecto se debe a cambios en la expresión de las proteínas reguladoras u a otra propiedad molecular, tal como el enrollamiento del ADN y/o la expresión de factores sigma.
- 2.- Con el fin de reducir el efecto adverso de la lisis celular durante la fase estacionaria, establecer patrones de alimentación de glucosa durante la fase estacionaria de los cultivos de *B. subtilis*. Complementar está estrategia mediante la construcción de cepas que carezcan de la(s) enzima(s) que favorezcan la lisis celular, tales como la serin-proteasa intracelular (ISP-1).
- 3.- Para incrementar la actividad y la productividad volumétrica de β -galactosidasa, se recomienda emplear medios complejos suplementados con glucosa, de manera que se obtenga una concentración celular elevada, un crecimiento rápido y se minimice el efecto de lisis, debido a la composición compleja del medio.
- 4.- Evaluar la respuesta de la cepa recombinante bajo condiciones en las cuales la glucosa no fuese limitante durante la fase de crecimiento exponencial de cultivos alimentados, pero que tampoco estuviese en concentraciones elevadas. Dicha estrategia puede ser lograda limitando con otro nutriente, por ej. nitrógeno o fósforo, controlando la velocidad de crecimiento mediante la dilución del medio en cultivos alimentados exponencialmente, o bien mediante estrategias de control predictivas y/o estableciendo un control de lazo cerrado. La medición de glucosa en línea, mediante un analizador automático permitiría establecer el control de lazo cerrado. Mientras que los datos obtenidos de velocidades específicas de consumo de oxígeno y glucosa, así como los de evolución de bióxido de carbono permitirían establecer un control predictivo

- 5.- Utilizando cepas con diferentes mutaciones en los reguladores de la expresión del gene *aprE* y realizando la adición de sobrenadantes de cultivos con una frecuencia de esporulación alta, evaluar si la pérdida del estado pseudo-estacionario se debe al fondo genético de la cepa o a la formación de (los) factores de esporulación
- 6.- Mediante la construcción de cepas no productoras de proteasas intracelulares o midiendo la actividad de las mismas y evaluando la acumulación de material de reserva, determinar cual es el parámetro fisiológico que disminuye la producción de β -galactosidasa cuando los cultivos son limitados por glucosa.
- 7.- Con el propósito de lograr concentraciones celulares mayores, utilizar otras cepas sobreproductoras que no presenten los efectos pleiotrópicos de la cepa *degU32(Hy)*, es decir emplear cepas en las que la esporulación se pueda reprimir mediante la adición de glucosa.
- 8.- Realizar cultivos alimentados exponencialmente en medios complejos para evaluar, si la acumulación de metabolitos, tales como los factores de esporulación y el tipo de medio, influyen sobre la cantidad que se puede obtener de biomasa y de β -galactosidasa.
- 9.- En el medio mineral, evaluar si un cambio de velocidad de crecimiento de lento a uno alrededor de la velocidad de crecimiento máxima permite obtener concentraciones celulares elevadas e incrementar la concentración de actividad enzimática.
- 10.- Aprovechando que *B. subtilis* puede crecer hasta temperaturas de 50°C, determinar si variando la velocidad de crecimiento por temperatura, en cultivos lote con el medio mineral suplementado con glucosa, permite incrementar la actividad enzimática de β -galactosidasa.

IX REFERENCIAS

- Arbige, M.V. and Pitcher, W.H. 1989. Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends in Biotechnol.* 7, 330-335
- Arbige, M.V., Bulthuis, B.A., Schultz, J. and Crabh, D. 1993. Fermentation of *Bacillus*. En: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Somenschein, A.L., Hoch, J.A. and Losick R (eds.). ASM, Washington, pp. 871-895
- Bailey, M.J. and Linko, M. 1990. Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *J. Biotechnol.* 16, 57-66.
- Bech-Jensen, E. and Carlsen, S. 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli* expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1-11
- Bolaños, V.M. 1994. Sobreproducción de la enzima β -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP-CCH, Universidad Nacional Autónoma de México
- Burnett, T.J., Shankweiler, G.W., and Hageman, J.H. 1986. Activation of intracellular serine proteinase in *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol.* 165 (1), 139-145
- Cayuela, C., Kai, K., Park, Y.S., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1993. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. *J. Ferment. Bioeng.* 75 (5), 383-386
- Casas, L.T. 1992. Contribución al desarrollo de un proceso para la obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa que pueda ser aplicado en leche y suero dulce de leche. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UACPyP-CCH, Universidad Nacional Autónoma de México
- Chou, C-H, Bennet, G.N. and San, K-Y. 1994. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 952-960
- Chou, C-H, Aristidou, A.A., Meng, S-Y., Bennet, G.N. and San, K-Y. 1995. Characterization of a pH-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 186-192
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technol.* 11, 905-910
- Dahl, M.K., Msadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G. 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 267, 14509-14514
- Dawes, I.W. and Madelstam, J. 1970. Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *J. Bacteriol.* 103 (3), 529-535
- Dawes, I.W. and Thornley, J.H.M. 1970. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *J. Gen. Microbiol.* 62, 49-66
- Debabov, V.G. 1982. The industrial use of bacilli. En: *The molecular biology of the bacilli*, vol. 1. Dubnau, D.A. (ed.). Academic Press, New York, pp. 331-370
- de Boer, A.S. and Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1-4
- de Boer, A.S., Priest, F. and Diderichsen, B. 1994. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 595-598
- diPasquantonio, V.M., Betenbaugh, M.J. and Dhurjati, P. 1987. Improvement of product yields by temperature-shifting of *Escherichia coli* cultures containing plasmid pOU140. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 513-519
- Dubnau, D. 1991. The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5, 11-18.
- El-Mansi, E.M.T. and Holms, W.H. 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2875-2883
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Reviews.* 57 (1), 1-33.

- Ferrari, E., Howard S.M.H. and Hoch J.A. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.* 166 (1), 173-179
- Ferrari, E., Jarnagin, A.S. and Schmidt, B.F. 1993. Commercial production of extracellular enzymes. En: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds.). ASM, Washington, pp. 917-937
- Fieschko, J.C. 1989. Fermentation technology using recombinant microorganisms. En: *Biotechnology* (Vol 7b), Rehm, H.-J. and Redd, G. (eds.). VCH Verlagsgesellschaft, pp. 117-140
- Fisher, S.H. and Sonenshein, A.L. 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 107-135
- Frankena, J., van Verseveld, H.W. and Stouthamer, A.H. 1985. A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 169-176.
- Frankena, J., Konings, G.M., van Verseveld, H.W. and Stouthamer, A.H. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 106-112.
- Freese, E., Klotz, W. and Galliers, E. 1970. Commitment to sporulation and induction of glucose-phosphoenolpyruvate-transferase. *Biochem. Biophys. Acta.* 222, 265-289
- Gicquiaux, Y. 1990. More industrial enzymes. *Biofutur.* 90, 73-75.
- González, M.I. 1994. β -galactosidase production by *Kluyveromyces fragilis* on milk whey: batch versus fed-batch cultures. *Process. Biochem.* 29, 565-568
- Grossman, A.D. and Losick, R. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4369-4373.
- Han, K., Lim, H.C. and Hong, J. 1992. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 663-671
- Hanlon, G.W. and Hodges, N.A. 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J. Bacteriol.* 147 (2), 427-431
- Hanlon, G.W., Hodges, N.A. and Russell, A.D. 1982. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 845-851
- Hanson, R.S. and Cox, D.P. 1967. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid enzymes. *J. Bacteriol.* 93, 1777-1787
- Harwood, C.R. and Archibald, A.R. 1990. Growth, maintenance, and general techniques. En: *Molecular biological methods for Bacillus*. Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 1-26
- Heineken, F.G. and O'Connor, R.J. 1972. Continuous cultures studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and alpha-amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *J. Gen. Microbiol.* 73, 35-44
- Henner, D.J., Ferrari, E., Perego, M. and Hoch, J.A. 1988. Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)*, and *sacQ36(Hy)* mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. *J. Bacteriol.* 170 (1), 296-300
- Hewitt, C.J. and Solomons, G.L. 1996. The production of α -amylase (E.C.3.2.1.1.) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in complex and a totally defined synthetic culture medium. *J. Ind. Microbiol.* 17, 96-99
- Hirata, H., Negro, S. and Okada, H. 1985. High production of thermostable β -galactosidase of *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (6), 1547-1549
- Holms, W.H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control of a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation.* 28, 69-105
- Horiuchi, J., Kumasawa, M., Miyakawa, H., Kishimoto, M. and Momose, H. 1994. Effects of pH on expression and stabilization of beta-galactosidase by recombinant *E. coli* with a thermally-inducible expression system. *Biotechnol. Letters.* 16 (2), 113-118
- Jolliffe, L.K., Doyle, R.J. and Streips, C.N. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* 25, 753-763

- Kai, K., Park, Y.S., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1992. High concentration of *Bacillus subtilis* sporulant strain carrying a recombinant plasmid. *J. Ferment. Bioeng.* 73 (3), 248-250
- Kidwell, J., Kolbachuk, D. and Dennis, D. 1996. High-level expression of *lacZ* under control of the *tac* or *trp* promoter using runaway replication vectors in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 108-114
- Kleman, G.L., Chalmers, J.J., Luli, G.W. and Strohl, W.R. 1991. A predictive and feedback control algorithm maintains a constant glucose concentration in fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4), 910-917
- Kleman, G.L. and Strohl, W.R. 1994. Developments in high cell density and high-productivity microbial fermentation. *Current Opinion, Biotechnol.* 5, 180-186
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A. and Deckwer, W.-D. 1995. Simple fed-batch technique for high-cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39, 59-65
- Kunkel, B. 1991. Compartmentalized gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Trends in Biotechnol.* 7, 167-172
- Kunst, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzarova, J., Lepesant, J.-A., Billault, A. and Dedonder, R. 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie* 56, 1481-1489
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N. and Ishihama, A. 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{32}$ holoenzymes. *J. Biol. Chem.* 271 (4), 1998-2004
- Labes, M., Pühler, A. and Simon, R. 1990. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. *Gene* 89, 37-46
- Lee, S.Y. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol.* 14, 98-105
- Lepesant, J.A., Kunst, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzarova, J., Steinmetz, M. and Dedonder, R. 1976. Specific and pleiotropic regulatory mechanisms in the sucrose system of *Bacillus subtilis*. En: *Microbiology-1976*, Schlessinger, D. (ed.). ASM, Washington D.C. pp. 58-69
- Lim, H.C. and Lee, K.-S. 1991. Control of bioreactor systems. En: *Biotechnology, V. 4 Measuring, Modelling, and Control*. Schügerl, K. (ed.). VCH, Weinheim, Germany. pp. 509-560
- Losick, R. and Stragier, P. 1992. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* 355, 601-604
- Luli, G.W. and Strohl, W.R. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (4), 1004-1011
- MacDonald, H.L. and Neway, J.O. 1990. Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K12. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 640-645
- Majewski, R.A. and Domach, M.M. 1990. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 732-738
- Marks, C.L. and Freese, E. 1987. Aspects of carbohydrate metabolism related to sporulation and germination. En: *Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria*. Reizer, J. and Peterkofsky, A. (eds.). Ellis Harwood Limited, Chichester, England. pp. 295-332
- Meyer, H.-P., Leist, C. and Fiechter, 1984. Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media. *J. Biotechnol.* 1, 355-358.
- Modak, J.M., Lim, H.C. and Tayeb, Y.J. 1986. General characteristics of optimal feed rate profiles for various fed-batch fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1396-1407
- Morisi, F., Pastore, M. and Viglia, A. 1972. Reduction of lactose content of milk by entrapped β -galactosidase. I. Characteristics of β -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 56 (9), 1123-1127
- Nicholson, W.L. and Setlow, P. 1990. Sporulation, germination and Outgrowth. En: *Molecular biology methods for Bacillus*. Harwood C.R. and Cutting, S.M. (eds.). John Wiley & Sons Ltd. Great Britain, pp. 391-450
- Nijpels, H.H. 1982. Lactases. En: *Developments in food carbohydrate - 3*. Lee, C.K. and Lindley, M.G. (eds). Applied Science Pub. London. pp. 23-47
- O'Connor, G.M., Sanchez-Riera, F. and Cooney, C.L. 1992. Design and evaluation of control strategies for high cell density fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 293-304

- Oh, M.K., Kim, B.G. and Park, S.H. 1995. Importance of spore mutants for fed-batch and continuous fermentation of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 696-702.
- Olmos, J., Bolaños, V., Causey, S., Ferrari, E., Bolívar, F. and Valle, F. 1996. A functional Spo0A is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* 381, 29-31
- Olmos, J. de Anda, R., Ferrari, E., Bolívar, F. and Valle, F. 1997. Effects of the *sinK* and *degU32(Hy)* mutations on the regulation of the *aprE* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 253, 562-567
- Pauline, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vannatalu, K. and Vilu, R. 1990. Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 312-319
- Park, Y.K., De Santi, M.S.S. and Pastore, G.M. 1979. Production and characterization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.
- Park, Y.S., Kii, K., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1992. Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 686-696.
- Parulekar, S.J. and Lim, H.C. 1985. Modeling, optimization and control of semi-batch bioreactors. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 32, 207-258
- Perego, M., Wu, J.-J., Spiegelman, G.B. and Hoch, J.A. 1991. Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Gene.* 100, 207-212
- Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blakwell Scientific Publications. London, U.K.
- Pierce, J.A., Robertson, C.R. and Leighton T.J. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 8 (3), 211-218
- Piggot, P.J., Amjad, M., Wu, J.-J., Sandoval, H., and Castro, J. 1990. Genetic and physical maps of *Bacillus subtilis* 168. En: Molecular biology methods for *Bacillus*. Harwood C.R. and Cutting, S.M. (eds.). John Wiley & Sons Ltd. Great Britain. pp. 493-540
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41 (3), 711-753
- Punt, P.J., Zegers, N.D., Busscher, M., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A.M.J.J. 1991. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene. *J. Biotechnol.* 17, 19-34
- Ramfrez, O.T., Zamora, R., Quintero, R. and A. López-Munguía. 1994. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 895-903.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schuman, K., Veith, G., Zuber, G. and Knore, W.A. 1990. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 77-82
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knore, W.A., Polh, H-D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A. and Decker, W-D. 1991. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20, 17-28
- Riesenberg, D. 1991. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion Biotechnol.* 2, 280-284
- Rinas, U., Kracke-Helm, H-A. and Schögerl, K. 1989. Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 163-167
- Rincón, C.A., Quintero, R. and Salvador, M. 1994. Continuous culture to produce recombinant β -galactosidase in *Bacillus subtilis*. 1994. En: Advances in Bioprocess Engineering. Galindo, E. and Ramfrez, O.T. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 431-435.
- Rodríguez, H. 1995. Colony switching in an alpha-amylase-producing strain of *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol.* 15, 112-115
- Rodríguez, M. and de la Torre, M. 1996. Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 546-550
- Royce, P.N. 1992. A need to refocus research in the operation of fermenters? *Trends in Biotechnol.* 10, 232-234

- Suito, T., Kato, K., Mueda, S., Suzuki, T., Shiba, S., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1992. Overproduction of thermostable β -galactosidase in *Escherichia coli* its purification and molecular structure. *J. Ferment. Bioeng.* 74 (1), 12-16
- Salvador, M., Quintero, R. and Valle, F. 1994. Overproduction of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Asia Pacific J. Mol. Biol. and Biotechnol.* 2(2), 119-126
- Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J-P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 704-711
- Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and endotoxins. *Bacteriol. Rev.* 33 (1), 48-71
- Shoham, Y. and Demain, A.L. 1991. Kinetics of loss of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 927-935
- Shin, P.K. and Seo, J-H. 1990. Analysis of *E. coli phoA-lacZ* fusion gene expression inserted into multicopy plasmid and host cell's chromosome. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1097-1104
- Shimizu, M., Iijima, S. and Kobayashi, T. 1992. Production of insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* by cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 163-168
- Snay, J., Jeong, J.W. and Atsai, M.M. 1989. Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnol. Progress.* 5 (2), 63-69
- Sonenshein, A.L. 1989. Metabolic regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. En: Regulation of prokaryotic development. Structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination. Smith I., Slepceky R.A. and Setlow P. (eds.). ASM, Washington, D.C. pp: 109-130
- Stahl, M.L. and Ferrari, E. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an in vitro-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 158, 411-418
- Strauch, M.A. and Hoch, J.A. 1992. Control of postexponential gene expression by transition state regulators. En: Biology of Bacilli: Applications to industry. Doi, R.H. and McGloughlin, M. (eds.). Butterworth-Heinemann MA, USA. pp. 105-121
- Svarachorn, A., Shimmyo, A., Tsuchido, T. and Takano, M. 1989. Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 299-304
- Torres, M.J. and Lee, B.H. 1995. Cloning and expression of β -galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88 into *Escherichia coli*. *Biotechnol. Letters.* 17 (2), 123-128
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. and Gingeras, T.R. 1987. Expression of the *lacZ* gene from two metanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic. Acids, Res.* 15 (9), 3859-3876
- Tsuchido, T. 1994. Induction of cell autolysis of *Bacillus subtilis* with lysophosphatidylcholine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 106-109
- Valle, F. and Ferrari, E. 1989. Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene? En: Regulation of prokaryotic development. Structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination. Smith I., Slepceky R.A. and Setlow P. (eds.). ASM, Washington, D.C. pp: 131-146
- Vierheller, C., Goel, A., Peterson, M., Domach, M.M. and Atsai, M.M. 1995. Sustained and constitutive high levels of protein production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 520-524
- Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E. and Cubarsi, R. 1993. Fine regulation of *cl857*-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (10), 3485-3487.
- Vyas, V.V., Gupta, S. and Sharma, P. 1994. Stability of a recombinant shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 240-246
- Waldburger, C., Gonzalez, D. and Chambliss, G.H.. 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175: 6321-6327
- Wang, L-F. 1992. Appendix 2: Standard Bacillus media. En: Biology of bacilli: applications to industry. Doi R.H. and McGloughlin M. (eds.). Butterworth-Heinemann. E.U.A. pp: 351
- Wu, K. and Wood, T.K. 1994. Evaluation of the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 912-921
- Wouters, J.T.M. and Buysman, P.J. 1977. Production of some exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis* 749/C in chemostat cultures. *FEMS Letters.* 1, 109-112.

Yamanè, T. and Shimizu, S. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 30, 147-194.

Ye, K., Jin, S. and Shimizu, K. 1994. Fuzzy neural network for the control of high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* 77 (6), 663-673

Yee, L. and Blanch, H.W. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *BioTechnology* 10, 1550-1556

Zabriskie, D.W. and Arcuri, E.J. 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 706-717

Zukowsky, M.M. 1992. Production of commercially valuable products. In: *Biology of bacilli: applications to industry*. Doi R.H. and McGloughlin M. (eds.). Butterworth-Heinemann, E.U.A. pp:311-337

X APENDICES

En esta sección se presentan con un mayor detalle aspectos metodológicos y resultados presentados de manera muy resumida en los manuscritos.

X.1 Mapa genético de *Bacillus subtilis*

Con el fin de complementar la información referente a la construcción de la cepa BB804, realizada por Bolaños (1994), en la figura X.1.1 se muestra el mapa genético de *B. subtilis* 168. En dicha figura están resaltados con un pequeño marco los genes relevantes empleados para la construcción de la cepa BB804.

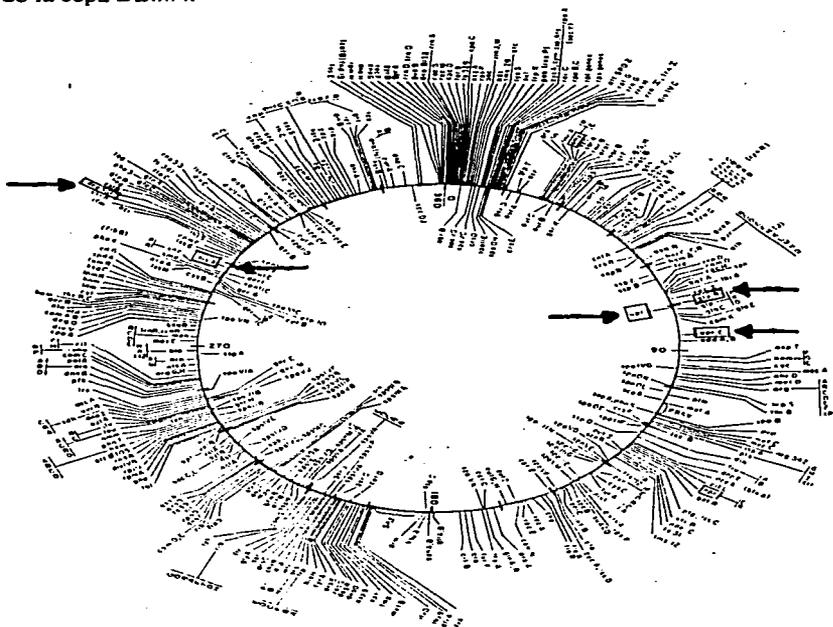


Fig. X.1.1 Mapa genético de *Bacillus subtilis* 168 (Piggot *et al.* 1990). Los pequeños recuadros muestran los genes que codifican para: las enzimas alfa-amilasa (*amyE*), proteasa alcalina (*aprE*) y proteasa neutra (*nprE*); los aminoácidos glicina (*glyB*) e histidina (*hisA*); y para las proteínas reguladoras del promotor de la subtilisina DegU (*degU*) y Hpr (*hpr*).

X.2 Determinación de peso seco

Secar, por 24 h a 65 °C y en vacío, membranas de teflón con un corte nominal de 0.22 µm (dos membranas por cada muestra). Colocar las membranas en un desecador y pesarlás en balanza analítica. Tomar muestras de 100 mL, por duplicado, de un cultivo cuando la densidad óptica a 600 nm sea aproximadamente de: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.7. Filtrar con vacío los 100 mL de medio utilizando las membranas de teflón. Secar las membranas con las células a 65 °C y en vacío por 24 horas. Pesar las membranas con las células secas. Por diferencia de peso y de acuerdo al volumen de la muestra calcular la concentración celular en g/L. Relacionar por medio de una regresión lineal las lecturas de densidad óptica con el peso seco determinado. A manera de ejemplo, la figura X.2.1 muestra una curva de calibración que se obtuvo para la estimación del peso seco (DCW por sus siglas en inglés) a partir de mediciones de densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro DU-70 de Beckman. Como puede observarse una unidad de densidad óptica equivale a 0.35 g/L de células en base seca.

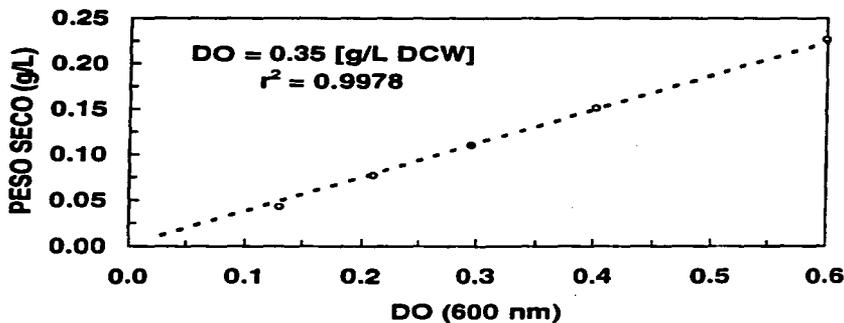


Fig. X.2.1

Curva de peso seco de *Bacillus subtilis* en función de la densidad óptica medida a 600 nm.

X.3 Determinación de proteína por el método de Lowry

Este método está basado en la formación de un compuesto colorido a partir de residuos de aminoácidos aromáticos proveniente de la hidrólisis alcalina de proteína celular.

Preparar las siguientes soluciones

- REACTIVO A** $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% y Tartrato de Na-K al 1%. Antes de realizar las determinaciones, mezclar (en la cantidad necesaria) 1:1 las dos soluciones anteriores.
- REACTIVO B** Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N. Disolver 20 g de Carbonato de Sodio y 4 g de Hidróxido de Sodio en 1 L de agua.
- REACTIVO C** A 49 mL de Reactivo B agregar 1 mL de Reactivo A.
- REACTIVO D** Solución 1:1 de Reactivo de folin y agua.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Tomar una muestra de 1 mL del caldo de fermentación en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Centrifugar por 3 minutos a 12 000 rpm. Separar el sobrenadante del paquete celular. Congelar las muestras en hielo seco. Si las muestras no son analizadas inmediatamente almacenarlas en congelador.
- 2.- Resuspender la pasta celular en 1 mL de agua destilada.
- 3.- En un tubo de ensayo colocar 1 mL de Reactivo C y agregar 200 μL de muestra. Mezclar y dejar reposar por 10 min. Agregar 100 μL del Reactivo D. Mezclar y dejar reposar por 30 min. Leer el color producido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. Leer contra blanco de reactivos. Para esto utilizar 200 μL de Agua destilada procesada de igual manera que la muestra. Realizar cada determinación por duplicado.

ELABORACION DE CURVA PATRON

A partir de una solución patrón de albúmina bovina de 1 mg/mL, preparar las siguientes concentraciones de albúmina en agua destilada: 0.00, 0.025, 0.50, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.30 mg/mL. Procesar las muestras de acuerdo al procedimiento antes descrito. Relacionar por medio de una regresión lineal las lecturas de densidad óptica con la concentración de albúmina de referencia.

X.4 Determinación de actividad de β -galactosidasa por el método modificado de Miller

El método se basa en la formación de un compuesto colorido, el ONP, a partir de la hidrólisis específica del ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) por medio de la enzima β -galactosidasa, de acuerdo a Ferrari *et al* (1986).

Preparar las siguientes soluciones

LISOZIMA 10 mg/mL	Disolver 10 mg de lisozima en 1 mL de agua destilada. Mantener la solución en refrigeración. No utilizar la solución después de 1 día.
ONPG 4.5 mg/mL	Disolver 45 mg de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) en 10 mL de agua destilada. Preparar la solución el día del ensayo. Proteger de la luz.
Na_2CO_3 1.2 M.	Disolver 12.72 g de Na_2CO_3 (M=105.993) en 100 mL de agua destilada.
TRITON X100 10%.	Solución al 10% V/V de Tritón en agua destilada.
AMORTIGUADOR Z.	Na_2HPO_4 0.06 M; NaH_2PO_4 0.04 M; KCl 0.01 M; MgSO_4 0.001M; β -Mercaptoetanol 0.05M (Adicionar el β -Mercaptoetanol antes del ensayo).

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Tomar una muestra de 1 mL del caldo de fermentación en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Centrifugar por 3 min. a 12 000 rpm. Separar el sobrenadante del paquete celular. Congelar las muestras en hielo seco. Si las muestras no son analizadas inmediatamente almacenarlas en congelador.
- 2.- Resuspender la pasta celular en 1 mL de amortiguador Z.
- 3.- Tomar 20 μL de muestra y agregar 710 μL de amortiguador Z. Preparar, al mismo tiempo, un blanco que contenga 730 μL de amortiguador Z y procesarlo junto con las muestras. Procesar las muestras por duplicado.
- 4.- Agregar 10 μL de la solución de lisozima y mezclar perfectamente. Incubar los tubos 5 min. a 37°C en baño de agua.
- 5.- Retirar los tubos del baño y agregar 10 μL de la solución de Tritón al 10%.
- 6.- Agregar 100 μL de la solución de ONPG. Cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
- 7.- Transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28°C por exactamente 15 min.

- 8.- Agregar 150 μL de la solución de Na_2CO_3 para detener la reacción.
- 9.- Leer la absorbancia a 420 nm contra el blanco. Si la muestra tiene una actividad muy elevada, de manera que las lecturas de densidad óptica sean mayores a 0.7, preparar una dilución apropiada de la muestra y procesarla de nuevo, a partir del paso No. 3, para realizar la determinación de actividad.

La actividad volumétrica en U/mL a 28°C se calcula de la siguiente manera:

$$AV = \frac{\overline{DO} \times 380 \times V_T \times \text{Dil.}}{t \times V_M}$$

Donde:

- AV = Actividad volumétrica [U/mL] o [nmoles de ONP formado / (min. mL)]
- \overline{DO} = Densidad óptica promedio a 420 nm [Abs.]
- 380 = Recíproco del coeficiente de extinción molar del ONP [nmol de ONP / (mL Abs.)]
- V_T = Volumen total de la reacción (1 mL)
- Dil. = factor de dilución de la muestra
- t = tiempo de reacción para la formación de ONP (15 min)
- V_M = Volumen de muestra utilizado en la reacción (20 μL)

La actividad específica ($\text{U}/\text{mg}_{\text{PROT}}$, es decir: nmoles de ONP formado / (min mg_{PROT})) se calcula dividiendo la actividad volumétrica (U/mL) entre la proteína determinada ($\text{mg}_{\text{PROT}} / \text{mL}$) para la misma muestra.

X.5 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC

Nota: Todo el material utilizado para preparar las soluciones debe estar perfectamente limpio y enjuagado abundantemente con agua grado bi-distilada.

- 1.- Preparar ácido sulfúrico 5 mM con agua grado bi-distilada recién recolectada. Filtrar la solución con membrana de 0.25 μm . Degasar el amortiguador haciendo fluir helio grado cromatográfico durante 15 min.
- 2.- Tomar una muestra de 1 mL del caldo de fermentación en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Centrifugar por 3 min. a 12 000 rpm. Separar el sobrenadante del paquete celular. Congelar el sobrenadante en hielo seco. Almacenar las muestras en congelador.
- 3.- Una vez que las muestras de sobrenadante van a ser analizadas por HPLC, descongelar las muestras y centrifugarlas de nuevo por 20 minutos a 10 000 "g". Tomar 0.5 mL del sobrenadante (tener mucho cuidado de no tomar partes del paquete celular ni "nata" que se forma en la parte superior de algunas muestras de fermentación) y colocarlos en los viales especiales para el autoinyector. Identificar las muestras y colocarlas en el autoinyector (Waters 717).
- 4.- Inyectar las muestras automáticamente con la ayuda del autoinyector y del módulo programable para el suministro de solventes (Modelo 590 de Waters). Todo el sistema se configuró para que sea controlado por el software para cromatografía de Waters denominado Maxima 820.
- 5.- La temperatura de la columna se controla a 60°C. El sistema de separación está constituido por una pre-columna (Ionpak pre-column, 6x50 mm de Waters) y por una columna de separación (fast fruit juice column, 7.8 x 150 mm de Waters) empacadas con una resina sulfonada de estireno-divinilbenceno. La elución se llevo a cabo isocráticamente utilizando H_2SO_4 como fase móvil a 40°C y utilizando un flujo de 1 mL/min. Los compuestos fueron detectados con un refractómetro diferencial (Waters 410) a una sensibilidad de 256.
- 6.- Preparación de curvas de calibración. Disolver en agua la cantidad suficiente de los compuestos a determinar en una concentración de 5 g/L. Realizar diluciones, y mezclarlas con las otras soluciones de los compuestos que se vayan a determinar, para tener concentraciones de 0.02 a 1 g/L. La columna fue calibrada con soluciones patrón de lactato, acetato y propionato. Dichos compuestos fueron analizadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para las muestras. Los tiempos de elución para los compuestos mencionados anteriormente fueron: 16.33, 13.86 y 18.97 minutos, respectivamente.

La figura X.5.1 muestra las curvas de calibración que se obtuvieron para la estimación de lactato, acetato y propionato a partir del análisis realizado por HPLC.

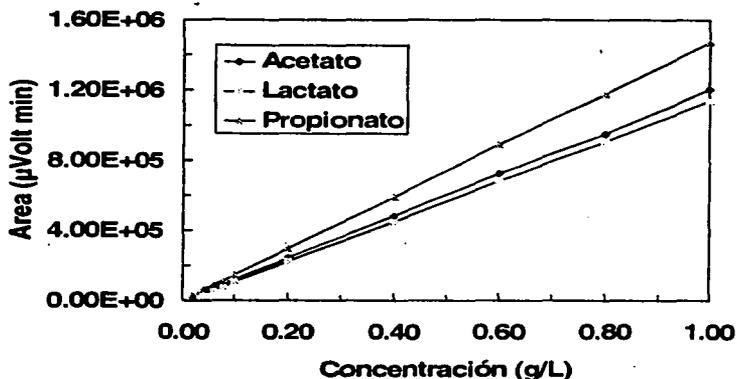


Figura X.5.1 Curvas de calibración para acetato, lactato y propionato.

X.6 Sistema de fermentación, programa y algoritmos de control

El equipo de fermentación utilizado en el presente trabajo, así como la instrumentación auxiliar para monitorear y controlar las fermentaciones se muestran esquemáticamente en la figura X.6.1. Se utilizó una jarra de fermentación equipada con 4 mamparas, de un fermentador Biofflo de la compañía New Brunswick, con un volumen nominal de 1.6 L. Dicha jarra fue adaptada al amplificador-controlador "Maestro" de la compañía Biolafitte, este equipo permite controlar dos fermentadores al mismo tiempo. El aire se suministró por medio de un aspersor de orificio colocado debajo de un agitador de turbina de 6 paletas planas. La presión de entrada de aire se reguló, con la ayuda de un regulador de presión, a 1 kg/cm², y el flujo de aire se controló manualmente mediante un rotámetro y se suministró de manera estéril con un filtro absoluto de

0.22 μm . Para medir y controlar algunas variables físico-químicas, el fermentador se instrumentó con sensores de pH (Ingold), oxígeno disuelto (Ingold), temperatura, conductividad (para el control de espuma) y velocidad de agitación. Las variables antes mencionadas fueron amplificadas y controladas por medio del amplificador-controlador Maestro. La espuma fue eliminada mediante la adición automática de silicón grado alimenticio al 10% (Dow-Corning). El pH se controló automáticamente, durante la fase de crecimiento exponencial, mediante la adición de NaOH 2 M y durante la fase estacionaria, mediante la adición de H_3PO_4 0.67 M. La temperatura se controló automáticamente a 37°C, mediante el suministro de agua a temperatura ambiente a través de la chaqueta metálica del fermentador y de suministro de calor por medio de una parrilla de calentamiento colocada en la base del fermentador. El pH, la espuma y la temperatura se controlaron mediante controles del tipo apagado/encendido.

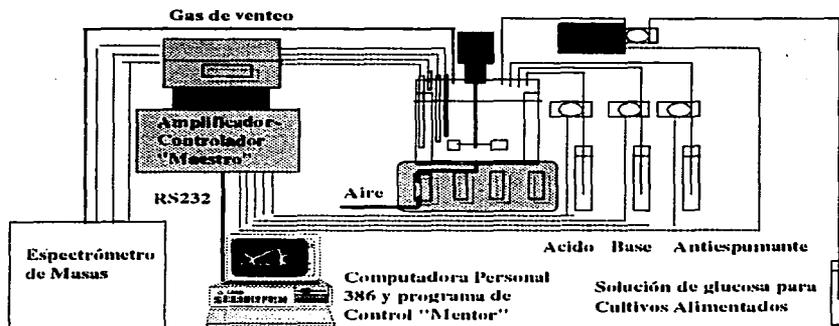


Figura X.6.1 Sistema de fermentación para cultivos lote y cultivos alimentados exponencialmente.

La velocidad de agitación inicialmente se controló a 600 rpm y cuando el nivel de oxígeno disuelto bajo del 20% se estableció un control en cascada para incrementar y disminuir de manera automática la velocidad de agitación, con el fin de mantener el nivel de oxígeno disuelto al 20%. Cuando la actividad metabólica de las células disminuía, debido principalmente al agotamiento de glucosa, la velocidad de agitación se mantuvo a 600 rpm y en consecuencia el oxígeno disuelto incremento a valores mayores al 20%. El oxígeno disuelto se controló mediante un control proporcional-integral-derivativo, utilizando los siguientes parámetros: una banda proporcional de 90, un tiempo integral de 50 s y un tiempo derivativo de 1 s.

La concentración de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno se analizó en el gas de venteo del fermentador mediante un espectrómetro de masas (Mass gas analyzer, MGA2000, Perkin Elmer). El gas que se suministró al espectrómetro de masas se acondicionó para eliminar el vapor de agua y las partículas sólidas menores a 0.22 μm . Esto se realizó conectando un condensador, refrigerado con agua a temperatura ambiente, un filtro absoluto de 0.22 μm y una trampa de humedad (RT 100A, Savant). El espectrómetro de masas cuenta con salidas analógicas(0-10 VDC) para cada uno de los gases medidos, de manera que éstas fueron transmitidas al controlador Maestro.

Los valores de pH, temperatura, conductividad (para el control del nivel de espuma), oxígeno disuelto, velocidad de agitación, así como la concentración de los gases de venteo fueron transmitidos, por medio de una interfase RS232, del amplificador-controlador Maestro a una computadora personal 386. Las señales recibidas por la computadora fueron analizadas mediante el programa denominado Mentor de la compañía Biolafitte. La velocidad de consumo de oxígeno, de producción de dióxido de carbono y del coeficiente respiratorio también fueron calculados, durante el transcurso de las fermentaciones, mediante el programa Mentor. Con la ayuda del programa Mentor se realizó el almacenamiento de las variables antes mencionadas de acuerdo al siguiente algoritmo:

START / FINISH PROCESS

Elapsed Time: 0	Profile Time: 0	Time: 9:30
Start Date: 29 SEP 94	Finish Date:	Plant: 2
Start Time: 10:00:00	Finish Time:	Sequence: 4
Batch Number: 69	Product: B. subtilis	Page: 1
Operator: LSL-BIOLAFITTE	Status: Fermenting: Finished	

Step	Action	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	SAFE								
2	LOGGINON	02S01	02T01	02D01	02A01	02L01			
3	LOGGINON	02X01	02C01	02N01	02OUR	02CER	02RQU		
4	GOTO	2							
5	END								

donde: ••

- SAFE es un comando que indica que todas las variables, en este caso de planta 2 son puestas en un estado de manera que si el valor de la variable controlada rebasa ciertos limites el control deja de funcionar. Por ejemplo si el pH pasa de un valor el control de pH deja de funcionar
- P1 a P8 se refiere a los parámetros asignados a las acciones programadas.
- 02S01, 01T01 son códigos asignados a cada una de las variables. En este código 02 se refiere a la jarra de fermentación No. 2 y las tres letras o números restantes son asignados por el operador. S01 = velocidad de agitación. T01 = temperatura. D01 = oxígeno disuelto, A01 = pH. L01 = conductividad. X01 = oxígeno gaseoso. C01 = bióxido de carbono gaseoso. N01 = nitrógeno gaseoso. OUR = velocidad de consumo de oxígeno. CER = velocidad de evolución de bióxido de carbono y RQU = coeficiente respiratorio.
- LOGGINON es el comando que utiliza el programa Mentor para almacenar datos con una frecuencia de 1 minuto.
- GOTO 2 es un comando que indica que repita el paso No. 2
- END indica el termino del algoritmo.

En el caso de los cultivos alimentados se utilizó una bomba peristáltica de velocidad variable (Masterflex de Cole-Parmer). Dicha bomba puede ser controlada de manera remota

mediante una señal analógica de 4 a 20 mA. La única señal analógica que presenta el sistema Maestro es el de la velocidad de agitación del motor. La velocidad de agitación, en el sistema Maestro, es controlada por medio de una señal analógica de 0 a 1 VDC. Considerando lo antes mencionado y tomando ventaja de que el sistema Maestro puede controlar dos fermentadores al mismo tiempo, se construyó un dispositivo electrónico para convertir la señal analógica del control de velocidad de 0 a 1 V a la señal analógica, de 4 a 20 mA, de la bomba peristáltica. De esta manera, con el controlador-amplificador Maestro y el programa Mentor se puede controlar de manera automática la velocidad de rotación de la bomba peristáltica. Para llevar a cabo este control se utilizó el siguiente algoritmo en el programa Mentor:

START / FINISH PROCESS

Elapsed Time: 0	Profile Time: 0	Time: 11:00
Start Date: 29 SEP 94	Finish Date:	Plant: 1
Start Time: 12:00:00	Finish Time:	Sequence: 10
Batch Number: 69	Product: B. subtilis	Page: 1
Operator: LSL-BIOLAFITTE	Status: Fermenting Finished	

Step	Action	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	SAFE								
2	ALARMON	01S01							
3	PROFILE	01S01 21							
4	CONTRLON	01S01 300	310	350	500	600			
5	MAESTCON	01S01 ON							
6	LOGGINON	01S01							
4	GOTO	6							
5	END								

donde:

- **ALARMON** es un comando que permite establecer límites (superior e inferior), para mostrar una alarma si son rebasados.
- **PROFILE** indica que se aplicará un perfil preestablecido, en este caso particular en No. 21 sobre la variable 01S01. Como se mencionó anteriormente, el control sobre la velocidad (01S01) de agitación de uno de los controladores del amplificador-controlador Maestro se utilizó para controlar de manera automática la velocidad de rotación, y en consecuencia el flujo suministrado por medio de la bomba de alimentación de las soluciones de glucosa.

- CONTRLON y MAESTCON son dos comandos que se utilizan combinados. La acción de ambos permiten controlar el funcionamiento de una variable (01S01) desde el programa Mentor. Es decir poner a funcionar la bomba, establecer límites inferior (300) y superior (600), así como puntos de control, inferior (310), intermedio (350) y superior (500). En este caso los números 300, 310, 350, 500 y 600 indican la velocidad relativa que se aplicaría al control de velocidad de agitación, es decir a la velocidad de rotación de la bomba peristáltica.

A manera de ejemplo la figura X.6.2 muestra un perfil exponencial aplicado, en mL/min o rpm, a un cultivo alimentado en función del tiempo de alimentación. En dicha figura se muestran las primeras 11 horas de alimentación de la corrida de fermentación mostrada en las figuras 1, del manuscrito Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponential fed-batch cultures, y X.11.4, del apéndice X.11: Cinéticas de fermentación de cultivos alimentados exponencialmente.

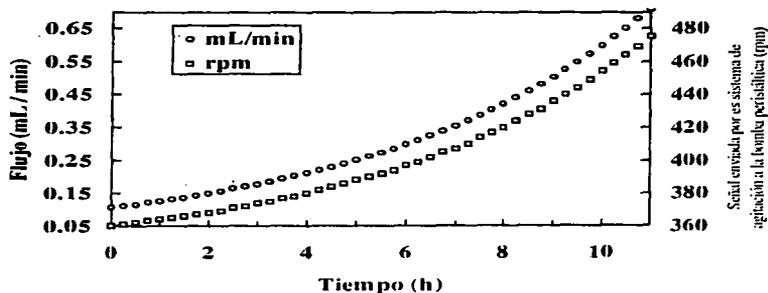


Figura X.6.2 Perfil predeterminado exponencial. Los parámetros utilizados para diseñar el perfil predeterminado de acuerdo a la ecuación:

$$F = (\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)) / (S_1 Y_{N/S}) \quad \text{fueron:}$$

$$\mu = 0.1733 \text{ h}^{-1}; X_0 = 0.4 \text{ g/L}; V_0 = 1 \text{ L}; S_1 = 27.4 \text{ g/L}; Y_{N/S} = 0.4 \text{ g/g}$$

Como se muestra en la figura X.6.2, la variación del flujo de la bomba se programó para variar en intervalos de 15 minutos. En cada corrida de fermentación, en modo de cultivo alimentado exponencialmente, la bomba de alimentación de glucosa (fig. X.6.1) se calibró previamente, midiendo los flujos (mediante cronómetro y probeta), que se obtienen al variar la velocidad de rotación de la bomba a través de la señal. En todas las corridas de fermentación se utilizó un cabezal del No. 13 y manguera de silicón, también del calibre 13, de la compañía Cole Parmer. La curva de calibración obtenida, con un coeficiente de correlación de 0.9988, para el perfil mostrado en la figura X.6.2 fue:

$$\text{Flujo de la bomba (mL/min)} = \text{rpm} \times 0.005234 - 1.77813$$

donde:

rpm representa la señal, de velocidad de agitación del motor del fermentador No. 1 del amplificador-controlador Maestro, que envía el programa Mentor por medio del perfil predeterminado.

Cabe aclarar que debido a que se establecieron perfiles de alimentación predeterminados, la bomba de alimentación se podría haber controlado de manera independiente con otra computadora. Sin embargo, se consideró conveniente controlarla de la manera antes descrita, para poder aplicar a futuro un control de lazo cerrado para la alimentación del (los) nutriente(s).

Debido a limitación de espacio y principalmente a que el que suscribe no lo considera conveniente, detalles adicionales sobre la operación y funcionamiento del amplificador-controlador Maestro y el programa de control Mentor no son descritos en el presente reporte. Información adicional y detallada puede ser consultada en los manuales de operación del controlador y programa.

X.7 Cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno, velocidad de evolución de bióxido de carbono y coeficiente respiratorio

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la velocidad de evolución de bióxido de carbono (CER), fueron calculados en-linea mientras se realizaban las corridas de fermentación por medio del programa Mentor. Se estableció un balance gaseoso sobre el fermentador y el OUR y el CER se calcularon tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- La composición del aire, es decir la concentración del oxígeno, bióxido de carbono y nitrógeno gaseosos, a la entrada del fermentador, fue medida antes de iniciar las corridas de fermentación.
- El volumen de cultivo en el fermentador fue calculado, manualmente, en función de: volumen inicial; de las adiciones de ácido, base, antiespumante y, en su caso de la(s) solución(es) de glucosa; y del volumen retirado al tomar las muestras. De esta manera el volumen de operación fue actualizado en el programa Mentor. En algunos cultivos alimentados la cantidad de ácido, base, antiespumante y glucosa adicionados fue excesiva, en función de la capacidad nominal del fermentador (1.6 L). En consecuencia fue necesario drenar un volumen considerable de caldo de fermentación. En estos casos el volumen de operación también fue actualizado en el programa Mentor.
- El rotámetro que se utilizó para suministrar el aire a la entrada del fermentador se calibró mediante el desplazamiento de agua utilizando una probeta invertida.

La velocidad de transferencia de oxígeno se cálculo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$X.7.a \quad OTR = \frac{\dot{Q}_a}{V} \frac{16666.7}{V_m} \left[O_{2IN} - O_{2OUT} \left(\frac{N_{2IN}}{N_{2OUT}} \right) \right]$$

donde:

OTR = velocidad de transferencia de oxígeno (mmol de oxígeno / (m³ s))

- Q_G = flujo volumétrico del aire (L / min)
 V = volumen de operación en el fermentador (L)
 V_m = volumen molar (22.4 L/mol)
 O_{2IN} = fracción de oxígeno presente en el aire a la entrada del fermentador (-)
 O_{2OUT} = fracción de oxígeno presente en el gas de salida del fermentador (-)
 N_{2IN} = fracción de nitrógeno presente en el aire a la entrada del fermentador (-)
 N_{2OUT} = fracción de nitrógeno presente en el gas de salida del fermentador (-)
 16666.7 = factor de conversión de mol / (L min) a mmol / (m³ s)

La velocidad de consumo de oxígeno se calculó de acuerdo a la siguiente ec:

$$X.7.b \quad OUR = OTR - \frac{d(O_2D)}{dt}$$

donde:

- OTR = velocidad de consumo de oxígeno (mmol de oxígeno / (m³ s))
 $d(O_2D)/dt$ = cambio del nivel de oxígeno disuelto respecto al tiempo

En los cultivos realizados en esta tesis el nivel de variación del oxígeno disuelto respecto al tiempo no fue significativo, de manera que se puede establecer $OUR = OTR$.

Finalmente, la velocidad de evolución de bióxido de carbono se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$X.7.c \quad CER = \frac{Q_G}{V} \frac{16666.7}{V_m} \left[CO_{2OUT} \left(\frac{N_{2IN}}{N_{2OUT}} \right) - CO_{2IN} \right]$$

donde:

- CER = velocidad de evolución de bióxido de carbono (mmol de CO₂ / (m³ s))
 CO_{2IN} = fracción de CO₂ presente en el aire a la entrada del fermentador (-)

$CO_{2,out}$ = fracción de CO_2 presente en el gas de salida del fermentador (-)

El coeficiente respiratorio (RQ en moles de CO_2 consumido entre moles de O_2 consumido), que es la relación entre la velocidad de evolución de bióxido de carbono y la velocidad de consumo de oxígeno, se calculó dividiendo el CER entre el OUR.

X.8 Afinación de parámetros para el control automático del oxígeno disuelto

Para realizar el control automático del oxígeno disuelto, el amplificador-controlador Maestro permite utilizar un control en cascada a través de la velocidad de agitación. El diagrama mostrado en la figura X.8.1 ilustra como se lleva a cabo dicho control:

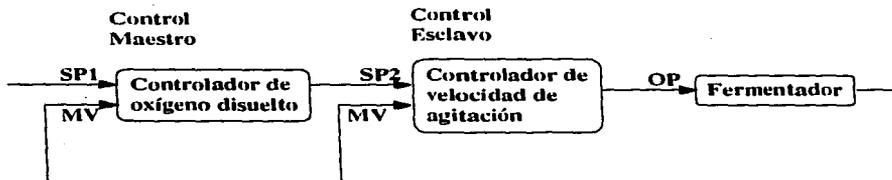


Figura X.8.1 Diagrama para el control del nivel de oxígeno disuelto en cascada con el control de la velocidad de agitación.

En este esquema el controlador calcula el error (E) sustrayendo el valor medido (MV) del punto de control No. 1 (SP1) en el controlador de oxígeno disuelto. El controlador realiza un cálculo sobre un ciclo de control del tipo Proporcional-Integral-Derivativo (PID) y genera una señal de salida. Esta señal de salida es enviada al controlador de la velocidad de agitación, generándose un nuevo punto de control (SP2). Se genera una señal de salida analógica (OP) la cual es enviada a la tarjeta de control de la velocidad de agitación, la cual incrementa o

disminuye la velocidad de agitación con el propósito de mantener un valor constante de SPI. Para generar la señal de salida, el control PID del amplificador-controlador Maestro utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Señal de salida} = \frac{100}{P(RH-RL)} \times E + \frac{100}{P(RH-RL)I} \times \int E dt + \frac{100 D}{P(RH-RL)I} \times \frac{dE}{dt}$$

donde:

- E es el error (valor del punto de control - valor medido)
- t es el tiempo
- P es la banda proporcional
- I es el tiempo integral
- D es el tiempo derivativo
- RH es el valor máximo de la variable a controlar
- RL es el valor mínimo de la variable a controlar

El ciclo de control PID se afinó de acuerdo al método de ciclo cerrado de Ziegler y Nichols (Lim and Lee, 1991), siguiendo las instrucciones indicadas en el manual proporcionado por Biolafitte (LSL Mentor, Mentor Concepts, 1989, pp. 15):

- 1.- Colocar el valor de 0.5 a la constante P.
Colocar el valor de 0 a la constante I.
Colocar el valor de 0 a la constante D.
Colocar el valor deseado en el punto de control del nivel de oxígeno disuelto (20%).
Poner a funcionar el controlador y registrar los datos.
- 2.- Observar el comportamiento de la variable a afinar (% de oxígeno disuelto). Las mediciones deben oscilar alrededor del punto de control. Permitir que ocurran varias oscilaciones y graficar las mediciones en función del tiempo.
- 3.- A partir del gráfico obtenido calcular los siguientes parámetros iniciales:
 $P = (\text{Tamaño de la oscilación} / (RH - RL)) \times 100\%$
 $I = \text{Período del ciclo en segundos}$

$$D = (\text{Período del ciclo en segundos}) / (500)$$

La máxima velocidad de adquisición de datos del programa Mentor es de 1 min. de manera que para realizar la afinación del control PID no resulta conveniente utilizar el registro de datos por medio del programa mencionado. En consecuencia, para afinar los parámetros PID del control de oxígeno disuelto, a un nivel del 20%, los datos se registraron cada segundo con la ayuda de una impresora de matriz de puntos. La figura X.8.2 muestra las mediciones obtenidas para el % de oxígeno disuelto, en función del tiempo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Tales mediciones fueron obtenidas en un cultivo por lote de la cepa de *Bacillus subtilis* 804, utilizando para ésto el medio mineral suplementado con 10 g/L iniciales de glucosa. Los datos fueron obtenidos durante la etapa de crecimiento exponencial, cuando se tenía una concentración celular de aproximadamente 2 g/L.

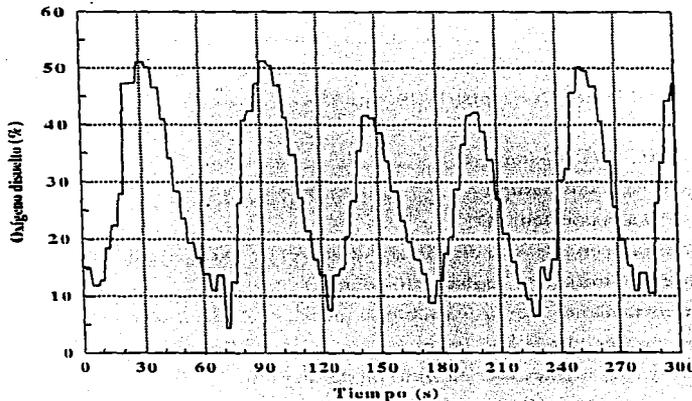


Figura X.8.2 Ciclo de afinación de control PID para el oxígeno disuelto. Para mayores detalles consultar el texto de la sección X.8.

De acuerdo a la figura X.8.2 los valores iniciales que se obtuvieron para los parámetros PID fueron: $P = 50\%$; $I = 60$ s; $D = 0.12$ s (en términos prácticos este valor es igual a cero). Sin embargo, al emplear directamente tales valores en una corrida de fermentación (figura X.8.3), en condiciones similares a las descritas para la figura X.8.2, las variaciones en el control del oxígeno disuelto eran muy grandes. En esa misma corrida se decidió re-ajustar de manera empírica los parámetros antes mencionados. Riesenber *et al* (1990) reporta valores de P iguales a 50 y 90%, para fermentaciones de *E. coli*, en fermentadores de 30 y 450L, respectivamente, por esta razón se decidió probar un valor de $P = 90\%$. Sin embargo como se observa en la figura X.8.3, con el fin de estabilizar rápidamente el nivel de oxígeno disuelto, se requiere de un valor de $I > 0$ Como se muestra en la figura X.8.3 los parámetros con los cuales se obtiene un control del oxígeno disuelto sin grandes variaciones son: $P = 90\%$; $I = 500$ s; $D = 0$ s. En una fermentación posterior se observó que a concentraciones celulares mayores a 2 g/L al aplicar los parámetros PID antes definidos el nivel de oxígeno disuelto no se estabilizaba rápidamente, este comportamiento se corrigió ajustando el valor de $D = 1$ s. En consecuencia, para las corridas de fermentación reportadas en este trabajo el oxígeno disuelto se controló mediante un control proporcional-integral-derivativo, utilizando los siguientes parámetros: una banda proporcional de 90, un tiempo integral de 500 s y un tiempo derivativo de 1 s. No obstante, como puede observarse en varias corridas de fermentación en la sección X.11, el control de oxígeno disuelto presenta grandes variaciones. Estas variaciones se deben principalmente a que el control se desestabiliza cuando se agrega antiespumante, y a que cuando el los cultivos que se alcanzan concentraciones celulares mayores a 10 g/L, los parámetros antes afinados no resultan del todo adecuados y la amplitud de las oscilaciones en el control se amplifican.

X.9 Diseño del medio mineral suplementado con glucosa

Con el propósito de evaluar la respuesta fisiológica y la producción de β -galactosidasa a variaciones en la velocidad de crecimiento, en la cepa de *Bacillus subtilis* 804, se diseñó un medio mineral conteniendo únicamente una fuente metabolizable de carbono (glucosa) y una de nitrógeno (sulfato de amonio).

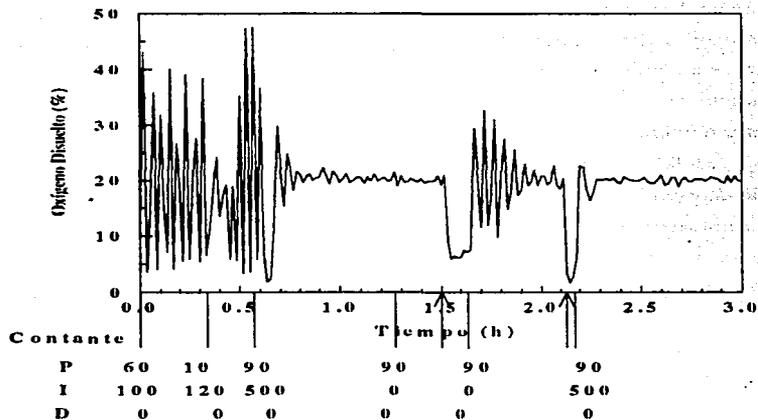


Figura X.8.3 Reajuste de parámetros de control PID para el oxígeno disuelto. Las líneas verticales indican el tiempo al cual se cambiaron las constantes de acuerdo a la tabla inferior. Las flechas indican el tiempo al cual el controlador se apagó con el fin de inducir una perturbación. Consultar el texto para detalles adicionales.

Considerando que utilizando medios minerales con glucosa se obtiene un rendimiento aproximado de 0.6 g de biomasa / g de glucosa (Frankena *et al.*, 1985; Snay *et al.*, 1989), inicialmente se decidió elaborar el medio con 10g/L de glucosa para obtener alrededor de 5 g/L de biomasa en base seca. Valores alrededor de esta densidad celular se consideraron convenientes para obtener material para realizar análisis de las muestras de fermentación y para evitar, en la medida de lo posible, limitaciones por transferencia de oxígeno en el fermentador. Para que el medio estuviese

limitado por glucosa, se utilizó una relación C/N de 5.5. De manera que la concentración de sulfato de amonio en el medio de fermentación es de 4 g/L y se vuelve limitante cuando se alcanzan concentraciones de biomasa mayores a 6.4 g/L. Así mismo, para proporcionar un poder amortiguante, a un pH=7, el medio de cultivo se complementó con fosfatos a una concentración molar de 0.07 (5.32 y 6.4 g/L de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , respectivamente). Finalmente, el medio se suplementó con las sales adicionadas al medio de cultivo Schaeffer (Wang, 1992), las cuales se agregan en el siguiente orden y en cantidad suficiente para obtener las siguientes concentraciones en mg/L: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 400; $MnCl_2$ 5; $CaCl_2$ 40; y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 30.

El medio de cultivo base se prepara disolviendo el sulfato de amonio y sales de fósforo en la cantidad correspondiente de agua destilada. Se ajusta el pH=7 con sosa concentrada y se esteriliza durante 15 minutos. Se preparan y se esterilizan por separado soluciones patrón de las demás sales, y se adicionan en el orden mencionado en el párrafo anterior al medio de cultivo base frío. La solución patrón de glucosa se prepara y esteriliza por separado. Dependiendo del tipo de cultivo a realizar (lote o lote alimentado) la glucosa se adiciona desde el inicio en la concentración deseada, o se alimenta de acuerdo a los perfiles de alimentación antes descritos.

X.10 Cinéticas de cultivos lote a nivel fermentador

En las siguientes páginas se presentan las cinéticas de fermentación para todos los cultivos lote, a nivel fermentador, reportados en el manuscrito: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. Debido a que la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) en el medio de cultivo se vuelve limitante a una concentración celular de 6 g/L, en algunos de estos cultivos hubo necesidad de agregar, de nuevo y en condiciones asépticas, todas las sales del medio de cultivo. El tiempo al cual se realizaron dichas adiciones están indicadas mediante flechas dobles.

En resumen en las figuras se presentan los siguientes parámetros:

Primer panel: crecimiento celular (Biomass), proteína intracelular (Protein) y velocidad de consumo de oxígeno (OUR).

Segundo panel: glucosa remanente en el medio de cultivo (Glucose) y nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Dissolved O₂).

Tercer panel: producción de acetato (Acetate), velocidad de evolución de CO₂ (CER) y coeficiente respiratorio (RQ).

Cuarto panel: actividad específica (Specific β -gal activity) y volumétrica (β -gal activity) de β -galactosidasa intracelular.

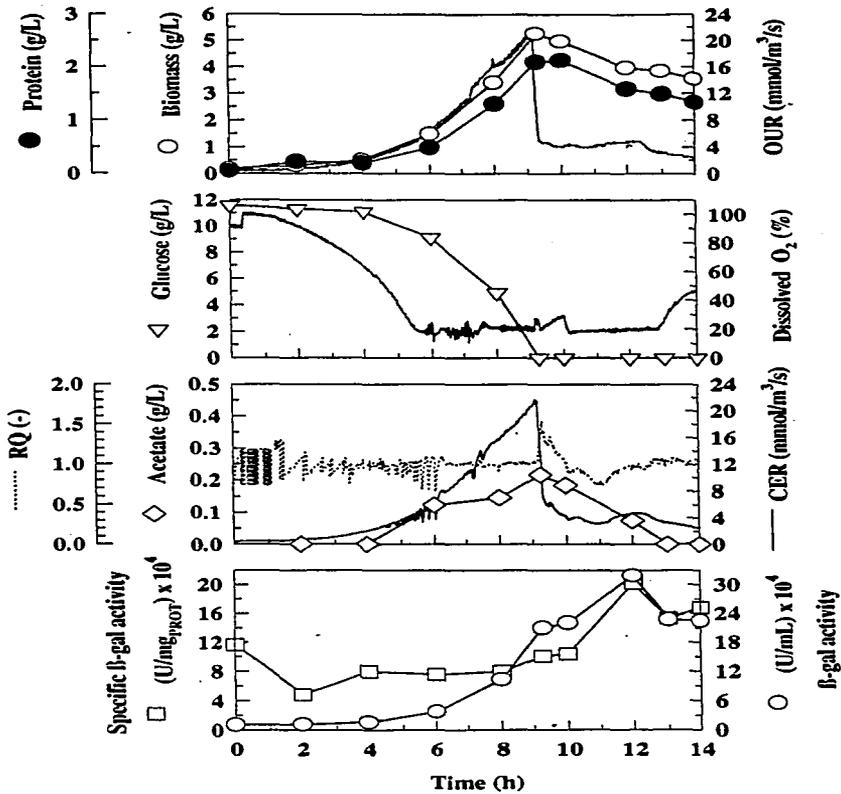


Figura X.10.1 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 11.6 g/L.

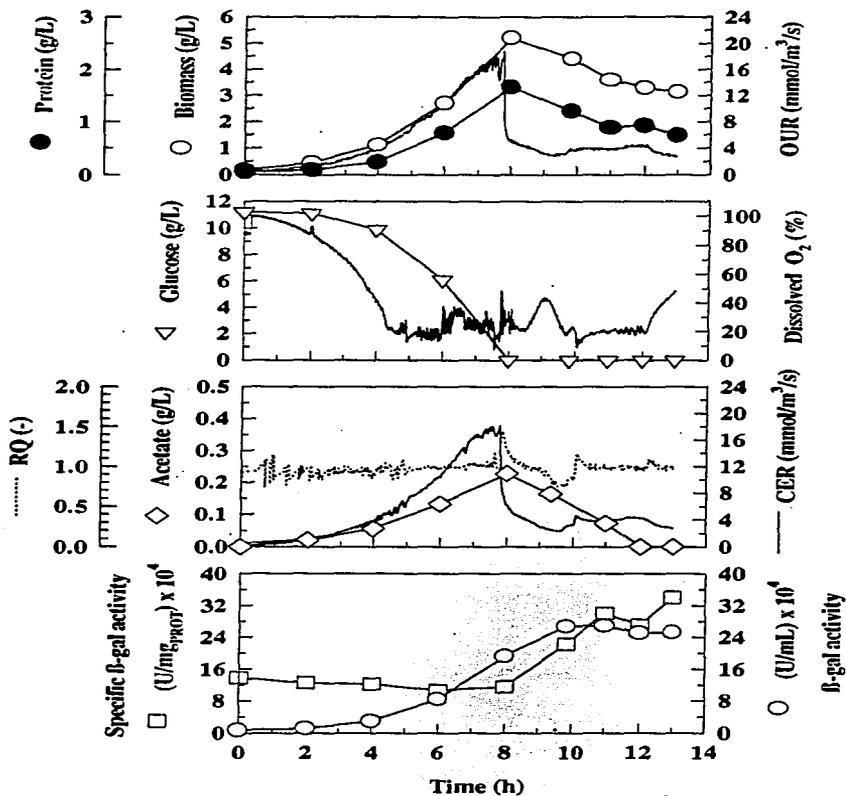


Figura X.10.2 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 11.2 g/L.

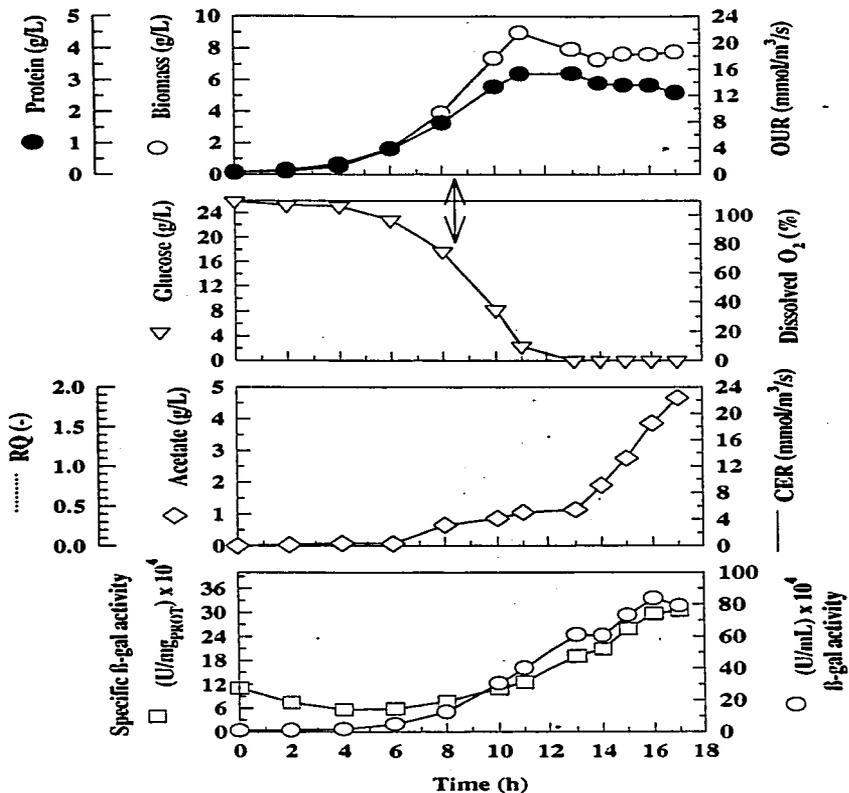


Figura X.10.3 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 25.9 g/L.

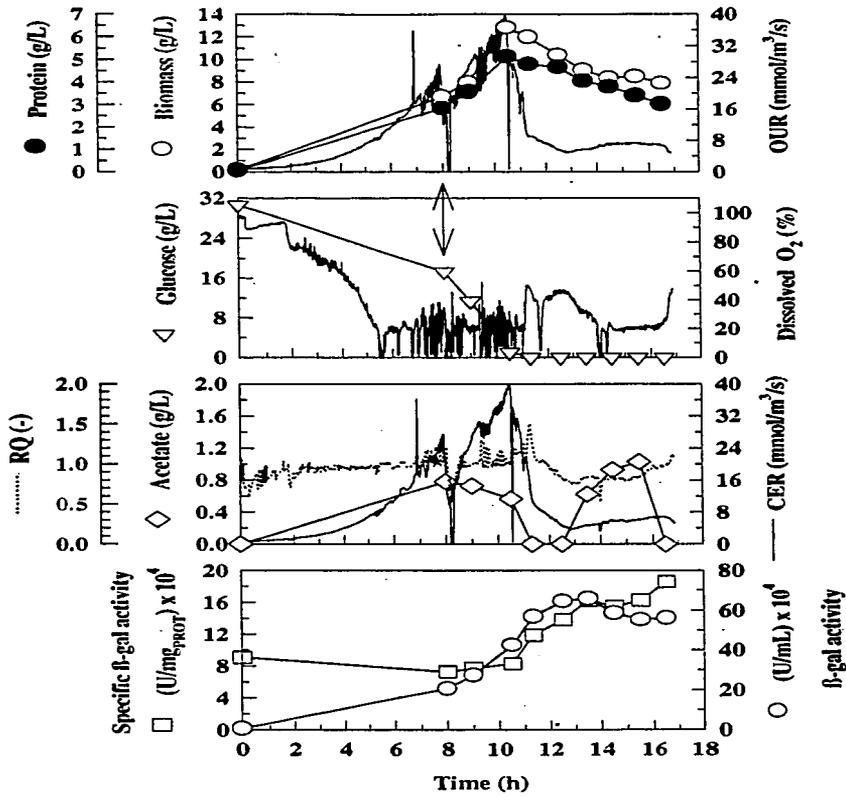


Figura X.10.4 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 30.6 g/L.

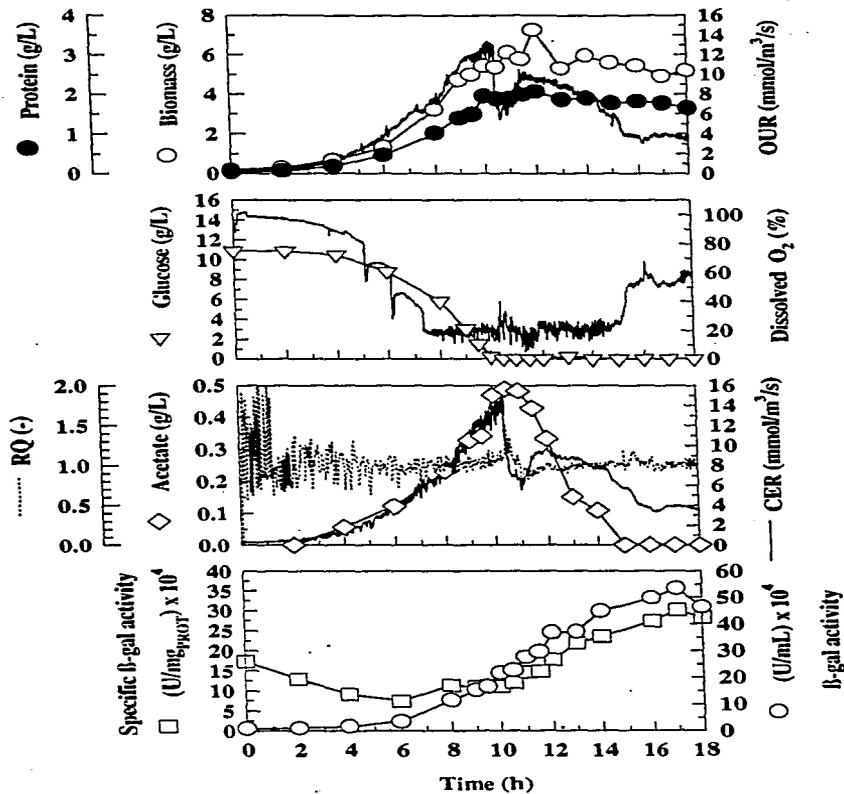


Figura X.10.5 Cinética de cultivo con alimentación constante de glucosa durante la fase estacionaria, precedido por un cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 10.9 g/L.

X.11 Resultados de cultivos alimentados exponencialmente

X.11.1 MANUSCRITO: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures

El efecto que tuvo la velocidad específica de crecimiento sobre la producción de β -galactosidasa utilizando cultivos alimentados exponencialmente se presentan en el manuscrito: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures (pags. 117- 140 de esta tesis), el cual se someterá a Enzyme and Microbial Technology, y por consiguiente está integrado en esta sección.

Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures.

ALFREDO MARTINEZ¹, OCTAVIO T. RAMIREZ², AND FERNANDO VALLE^{1*}

¹Departamento de Microbiología Molecular. ²Departamento de Bioingeniería.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

A. P. 510-3, Cuernavaca, Morelos. 62271, México

Correspondent footnote:

*Corresponding author

FERNANDO VALLE

Departamento de Microbiología Molecular.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

A. P. 510-3, Cuernavaca, Morelos. 62271, México

Phone: (52-73) 29-1648

Fax: (52-73) 17-2388

E-mail: valle@ibt.unam.mx

ABSTRACT

The effect of specific growth rate (μ), using glucose-limited exponentially fed-batch cultures, on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* was assessed. The mutations *hpr2* and *degU32(Hy)*, which are known to overexpress the subtilisin (*aprE*) gene, were used in combination with the *lacZ* gene chromosomally integrated under control of the regulatory region of the *aprE* gene. Constant μ , in the range of 0.058 to 0.35 h^{-1} , were maintained using mineral media and computer-controlled pre-determined glucose feeding profiles. At all growth rates tested, a pseudo-steady state in μ was obtained. As pre-determined μ was reduced from 0.35 to 0.058 h^{-1} , pseudo-steady state was maintained from 9 to 46 hours. However after such elapsed times, a characteristic sudden decrease in the slope of log of biomass concentration against time and an accumulation of glucose and acetic acid, indicated that control on μ was lost. Moreover, commitment to the stationary phase was irreversible, in spite the fact that glucose was fed in accordance with the pre-determined profile and that all other minerals were present at non-limiting concentrations. Reduction of μ resulted in a decrease of accumulated acetate and a 4-fold increase in maximum biomass concentration. For cultures maintained at a growth rate close to the maximum, specific enzyme activity remained relatively constant during the fed-batch phase. In contrast, for cultures maintained at a μ lower than 0.2 h^{-1} , specific and volumetric β -galactosidase activity decreased during the fed-batch phase, reaching a value close to zero before glucose feeding was stopped. Maximum β -galactosidase activity, during the stationary phase, was obtained at the maximum μ , whereas it strongly decreased at lower values of μ . This suggests that glucose limitation and μ reduction during exponential growth phase, represses β -galactosidase production during the exponential and the stationary phases.

INTRODUCTION

Due to its capability to produce and secrete large amounts of proteins and to its GRAS status (de Boer and Diderichsen, 1991), *Bacillus subtilis* is commonly used as a host for the industrial production of enzymes (Arbige and Pitcher, 1989). Several expression systems have been used for such a purpose. One of the best described in the literature is based on the use of the regulatory region of the *aprE* gene (Ferrari et al., 1993). This gene codes for the alkaline protease subtilisin, and its expression is regulated through a very complex network (Valle and Ferrari, 1989; Ferrari et al., 1993). As a model to study the effect of different fermentation variables on protein production in recombinant *B. subtilis* strains, the production of β -galactosidase from *E. coli*, using the *aprE* regulatory region to express the *lacZ* gene has been used (Pierce et al., 1992; Rincon et al., 1994; Martinez et al., 1997). However, despite of the large amount of data on the basic aspects of *aprE* regulation, the information of the effect of specific growth rate (μ), fermentation conditions and the behavior during fermentation of overproducing *B. subtilis* recombinant strains, is scarce (Pierce et al., 1992; Rincón et al., 1994; Oh et al., 1995).

Particularly for *B. subtilis* cultures the appearance of asporogenic and non-producer mutants can limit the utility of chemostats (Dawes and Mandelstam, 1970; Heineken and O'Connor, 1972). Furthermore, it has been found that the sporulation process in *B. subtilis* is triggered by the accumulation of sporulation factors (Grossmann and Losick, 1988; Waldburger et al., 1993). Thus in order to obtain the maximum production of recombinant proteins associated to the sporulation process, as is the case for the *aprE* gene, a very low dilution rate or a strategy of two-stage continuous cultures could be required. However, in contrast to chemostats, in exponentially fed-batch cultures

(EFBC) all cellular products are accumulated in the culture broth, the stationary stage can be easily induced through nutrient depletion, and it can be operated at or above the maximum specific growth rate without washing-out the culture. Furthermore, EFBC have been used to obtain high-cell-density and high-productivity cultures (Yamanè and Shimizu, 1984; Yee and Blanch, 1992; Riesenber *et al.*, 1990), and have been shown to be a powerful experimental tool to assess the effect of growth rate on heterologous protein production (Ramírez *et al.*, 1994). Therefore, in this work we evaluated if a controlled growth rate during exponential growth phase, have an effect on β -galactosidase production during the vegetative and stationary phases, using glucose-limited EFBC.

MATERIALS AND METHODS

Culture medium and strain. A mineral media, reported elsewhere (Martínez *et al.*, 1997), was used in this study. All cultures had an initial glucose concentration that ranged between 0.4 to 0.6 g/L. Such an initial glucose concentration was due to carry-over from inocula. Two h after inoculation, a glucose concentrated solution, ranging in the various experiments from 40 to 500 g/L, was added aseptically according to a pre-determined profile described below. To prevent nitrogen-source and other nutrient limitations, all the mineral salts were added again when biomass reached 6 g_{DCW}/L, as the nitrogen source becomes limiting at such biomass concentration. The strain used in this study was a *B. subtilis* with the *lacZ* gene from *E. coli* under the control of the *aprE* regulatory region, integrated into the chromosome. The strain also has the *hpr2* and *degU32(Hy)* mutations, which are known to cause *aprE* overexpression (Ferrari *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 1996).

Fed-batch cultures. A 1.6-liter fermenter, operated at 37 °C and sparged with 1 lpm of air, was maintained at a constant pH of 7.0 and at a dissolved oxygen concentration above 20% of air saturation. After an initial batch phase of 2 h, the fed-batch operation was initiated. The fed-batch scheme was implemented using a computer controlled open-loop with a pre-determined exponentially increasing feeding profile. It is important to point out that in an EFBC, upon reaching a quasi-steady state, the glucose concentration remains constant and close to zero, and the specific growth rate (μ) can then be controlled at a constant and pre-determined value. Hence, glucose flow rate (F) profiles were established according to the following equation (Yamanè and Shimizu, 1984, and Yee and Blanch, 1992):

$$F = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{Y_{x/s} S_i} \quad (1)$$

where S_i is the substrate concentration in the inlet stream, V_0 and X_0 are the volume and biomass at the initiation of the fed-batch phase, t is the elapsed time of the fed-batch phase, and $Y_{x/s}$ is the cell yield on glucose. This equation shows that EFBC can be employed for controlling μ at a pre-determined or desired value, simply by selecting the limiting substrate flow rate and knowing the cell yield, initial volume and cell concentration. According to the measured V_0 and X_0 , and the desired μ , an S_i was chosen based on the minimum resolution flow rate of the feeding pump used (Masterflex, Cole-Parmer, Barrington, IL). Thus, the lowest μ tested, corresponded to the lowest S_i used. In the experiments at low μ , after a high biomass concentration was reached, a shift to a higher S_i and lower F was performed. Such a strategy was used to avoid large volume increases. In all cultures, V_0 was 1 liter and $Y_{x/s}$ was taken as a constant value of $0.4 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{g}_{\text{GLUC}}$ as determined elsewhere (Martínez *et al.*, 1997). Experimental μ was calculated from total cell mass by taking into account the volume change during the cultures.

Analytical methods. Oxygen uptake rate (OUR) and carbon dioxide evolution rate (CER) were determined from a gas phase balance and using a Perkin Elmer mass spectrometer (MGA, Pomona, CA). Intracellular protein was measured by the Lowry method and cell concentration was determined first as an OD measurement. This value was converted to dry cell weight using a standard curve. Glucose and organic acids in the supernatant were determined in an enzymatic analyzer (Ektachem

DT60 II, Kodak, Rochester, NY), and by HPLC, respectively. Intracellular β -galactosidase activity was determined by a modification of the method of Miller (Ferrari *et al.*, 1986). One enzymatic activity unit is defined as the amount of enzyme hydrolyzing 1 nanomol of *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) per minute at 28 °C.

A detailed description of cell bank, inocula development, fermenter operating conditions, computerized control systems, and description of all analytical methods can be found elsewhere (Martínez *et al.*, 1997).

RESULTS

To assess the effect of specific growth rate (μ) on β -galactosidase production and on the relevant kinetic and stoichiometric parameters, initially EFBC of *B. subtilis* were conducted at relatively high and lower values of μ . The typical behaviors of EFBC operated at μ close to half and close to the μ obtained during exponential growth of batch cultures (0.42 h^{-1} ; Martínez *et al.*, 1996), are summarized in Figs. 1 and 2, respectively. The fed-batch phase can be identified in Figs. 1a and 2a from the culture time when glucose mass flow rate profiles increased exponentially.

Fed-batch phase culture evaluation. For the culture maintained at a pre-determined μ of 0.17 h^{-1} , a pseudo-steady state was rapidly reached after initiation of the fed-batch phase, as observed from a controlled exponential increase in biomass concentration (Fig. 1a), and a glucose concentration close to zero (Fig. 1b). Moreover, the profile of consumed glucose showed an exponential increase (Figs. 1b), which closely followed the increase in biomass concentration. This indicates that constant specific glucose consumption rates were obtained during the fed-batch phase. A characteristic sudden decrease in the slope of log of biomass concentration against time (Fig. 1a), and an accumulation of glucose and acetic acid (Figs. 1b and 1c), indicated that control on μ was lost after 10 h under the pseudo-steady state, even though glucose was fed in accordance to the pre-determined profile and that all other minerals were present in the culture medium. The specific and volumetric β -galactosidase activities, obtained for the culture maintained at a pre-determined μ of 0.17 h^{-1} , decreased during the fed-batch phase, reaching a value close to zero before glucose feeding was stopped (Fig. 1d).

For the culture at pre-determined μ of 0.35h^{-1} , cells grew exponentially, but glucose accumulated constantly from the beginning of the fed-batch phase (Fig. 2a and 2b). A pseudo-steady state in biomass increase (*i.e.* in μ) and in acetate accumulation was obtained. However, in comparison with the culture carried at a pre-determined μ of 0.35h^{-1} , control on μ was lost in a shorter period of time (10 and 8 h of elapsed time under pseudo-steady state conditions, respectively). Acetate began to accumulate 2 h after that control on μ was lost (Fig. 2c). In contrast to the behavior observed for the culture conducted at a pre-determined μ of 0.17h^{-1} , for the culture at a pre-determined μ of 0.35h^{-1} , specific enzyme activity during the fed-batch phase remained relatively constant at $95\text{ kU/mg}_{\text{PROT}}$ (Fig. 2d). In turn, volumetric enzyme activity increased exponentially, from 10.5 to 232 kU/mL , following the increase in biomass concentration. A relatively constant respiratory quotient (equal to 1; data not shown), was observed during the fed-batch phase of both EFBC.

Post-fed-batch phase culture evaluation. After a consistent glucose accumulation and a decrease in μ were observed, glucose feeding was stopped in EFBC. The cultures were then maintained in a second batch phase which was terminated 5 to 6 h after the residual glucose from the fed-batch phase had been depleted. After glucose feeding was stopped, metabolic activity was still detected as a consumption of residual glucose (Fig 1b and 2b), production of acetic acid (fig 1c and 2c), and a finite positive OUR and CER values (data not shown). It should be noted that during the second batch phase of both cultures a severe cellular lysis occurred after glucose depletion. Cellular lysis was measured as decrements in dry cellular weight and protein in cell pellets (Fig. 1a and 2a), and yielded an average specific lysis rate of $7.5 \times 10^{-2}\text{ h}^{-1}$ (assuming first order decay kinetics).

For the culture maintained at pre-determined μ of 0.17 h^{-1} , neither specific nor volumetric activity increased during the post-fed-batch phase (Fig. 1d). In contrast, for the culture maintained at a pre-determined μ of 0.35 h^{-1} , an important increase in specific and volumetric activity, compared to the activity reached at the end of the fed-batch phase, was observed (Fig. 2d). Accordingly, specific β -galactosidase activity increased 3-fold to a final value of $311 \text{ kU/mg}_{\text{wet}}$, while the volumetric activity increased 4-fold to a maximum value of 910 kU/mL . Such enzyme activity values, compare well with the activity obtained in batch cultures for the same strain and culture medium (Martínez *et al.*, 1997).

Effect of growth rate on β -galactosidase and stoichiometric and kinetic parameters. To assess the effect of μ on the physiological behavior of *B. subtilis*, the kinetic and stoichiometric parameters were evaluated in glucose-limited EFBC, operated at a broad range of pre-determined μ values ranging from 0.058 to 0.35 h^{-1} . In all cultures below growth rates of 0.2 h^{-1} , attainment of pseudo-steady state was reached within less than 3 h of initiating substrate feeding. A summary of the kinetic and stoichiometric variables obtained during the exponential growth stage of EFBC is shown in Fig. 3. In such cultures, a pseudosteady-state -with respect to μ , glucose and acetate concentration- was attained. As seen in Fig. 3a, the experimental μ closely matched the pre-determined μ , where the dashed-line corresponds to the ideal case. Such results indicate that EFBC can be used to control growth rate at a preselected value, even with microorganisms as *B. subtilis* that present a differentiation process when exposed to suboptimal growth conditions. Figure 3a also shows that control on μ was lost in a larger elapsed time as μ was decreased, *i.e.* from 6 to 46 hours as predetermined μ was reduced from 0.35 to 0.058 h^{-1} . In fed-batch cultures, the Crabtree effect can be suppressed if the carbon source

concentration is maintained at a low value (Yee and Blanch, 1992). This can be observed in Fig. 3b. for the EFBC controlled at a μ below 0.25 h^{-1} , where acetate production during pseudosteady-state was drastically reduced (see also Figs. 1c and 2c). However, biomass yield on glucose was constant only for a narrow range of μ (i.e. from 0.1 to 0.2 h^{-1}). Such behaviour indicates a metabolic shift above and below such μ . As a consequence of the reduced acetate production, the maximum biomass generated under the pseudosteady-state, increased (Fig. 3c) with decreasing μ . Accordingly, in comparison with EFBC at μ above 0.15 h^{-1} , about a 6 to 10-fold increase in biomass generated was observed, when EFBC was performed at a pre-determined μ of 0.058 h^{-1} . In Fig. 3c and 3d it can also be seen that specific glucose consumption rate (Q_{GLUC}) and specific oxygen uptake rate (Q_{O_2}), during pseudosteady-state, increased with increasing μ (Fig. 3c and 3d, respectively). Due to the metabolic shift, only the data that correspond to a constant biomass yield was adjusted to the Pirt model (Fig. 3c and 3d). The yield and the maintenance coefficient on glucose were $0.55 \text{ g}_{DCW}/\text{g}_{GLUC}$ and $0.079 \text{ g}_{GLUC}/\text{g}_{DCW} \text{ h}$, respectively. Meanwhile, the yield and the maintenance coefficient on oxygen were $54.47 \text{ g}_{DCW}/\text{mol}_{O_2}$ and $5.53 \text{ mmol}_{O_2}/\text{g}_{DCW} \text{ h}$, respectively. Yield and maintenance coefficient values on glucosa are larger (from 20 to 25%, and from 20 to 80%, respectively) than that reported for other *Bacillus* species (Frankena *et al.*, 1985, Rodríguez y de la Torre, 1996). Furthermore, maintenance value on oxygen is 5-fold larger than values reported for *B. licheniformis* and for *B. thuringiensis* (Frankena *et al.*, 1985, Rodríguez y de la Torre, 1996). In the range of μ of 0.16 to 0.07 h^{-1} , the maintenance coefficient on glucose account from 20 to 60% of specific glucose consumption, respectively. As the respiratory quotient remained relatively constant at a value of 1, during pseudo-

steady state, the specific carbon dioxide evolution rate closely followed the specific oxygen consumption rate (data not shown).

β -galactosidase production was evaluated in order to assess if the way in which the culture was conducted (*i.e.* growth rate during exponential growth, glucose limitation, and by-product accumulation), has an effect on *apvE* expression during the stationary phase. A summary of the effect of μ on maximum β -galactosidase activity obtained during stationary phase, is shown in table 1. As seen, the highest specific enzyme activity was obtained at the highest growth rate, whereas it sharply decreased as μ decreased below 0.35 h^{-1} . We have previously shown that in batch cultures, the maximum specific enzyme activity, and maximum specific growth rate obtained were around $300 \text{ kU/mg}_{\text{PROT}}$ and 0.42 h^{-1} (Martinez *et al.*, 1997), respectively. Such values compared very well with the EFBC results obtained at predetermined μ of 0.35 h^{-1} . Three additional parameters can be calculated which yield important process information, namely, the volumetric enzyme activity (VA), the volumetric enzyme productivity (P), and the maximum enzyme activity obtained per total glucose consumed (Y_{US}). The latter parameter indicates the conversion efficiency of the limiting substrate on the product of interest, and should be a target variable to optimize in a commercial processes. As seen in Table 1, VA, P and Y_{US} , evaluated during stationary phase, followed the same trend as the specific enzyme activity with respect to μ . That is, a sharp decrease in all the parameters evaluated was observed as μ decreased.

DISCUSSION

It has been well documented that μ is one of the most fundamental variables for many recombinant and wild-type microbial cultures (Yee and Blanch, 1992; Ramirez, et al., 1994; Lee, 1996). Nevertheless, there are still only few studies assessing the effect of μ on *B. subtilis* physiology and on recombinant proteins regulated by the subtilisin promoter. In the case of *B. subtilis* physiology, reduction of μ has been shown to decrease the formation of toxic organic acids in chemostats (Snay *et al.*, 1989; Vierheller *et al.*, 1995), and to prevent plasmid instability in batch cultures (Shoham and Demain, 1990). Reduction of μ has also been shown to increase the production of plasmid encoded proteins, either in continuous (Meyer and Fiechter, 1985) or fed-batch cultures (Lee and Parulekar, 1993). Other reports using *B. subtilis* have shown that the nature of the limiting substrate can determine the kind of degradative enzyme produced (Heineken and O'Connor, 1972). Furthermore, for fed-batch cultures, the concentration of the limiting substrate can also affect the amount of protein encoded by plasmids, as demonstrated by Park *et al.* (1992) and Cayuela *et al.* (1993).

In the case of recombinant protein production regulated by the subtilisin promoter, it has been shown that spore formation and expression of *aprE* gene are inversely proportional to growth rate in *B. subtilis* (Rincón *et al.*, 1994). The use of asporogenic *B. subtilis* strains (Oh *et al.*, 1995) and a reduced μ in nitrogen-limited fed-batch cultures has been shown to prolong the production time and hence increase the production of proteins chromosomally coded by *aprE* gene (Pierce *et al.*, 199; Oh *et al.*, 1995). Moreover, in glucose-limited chemostat cultures and using mineral medium protease production decreases when μ increases in *B. licheniformis* (Frankena *et al.*, 1985).

In this work the utility of glucose-limited fed-batch cultures was explored as an experimental tool to characterize the effect of growth rate on the physiology of a *hpr2, degU32(Hy), aprE::lacZ* recombinant *B. subtilis* during vegetative and stationary phases. The experimental procedure followed, based on the glucose-limited EFBC, allowed the attainment of a controlled pseudostationary-state with respect to μ and glucose concentration. When pre-determined μ was decreased below 0.25 h^{-1} , during the controlled pseudosteady-state, acetate formation was abolished. In spite of the fact that all minerals were present in the culture broth and that glucose was fed in accordance with the pre-determined exponential profile, control of μ was lost. This behavior implies that another physiological constraint, such as differentiation factor(s), might be limiting the increase of biomass concentration of sporogenic *B. subtilis*. The effect of differentiation factor(s) are dependent on cell density (Grosman and Losick, 1988; Waldburger *et al.*, 1993), and probably, as suggested by the data obtained in this work, on growth rate when controlled by glucose limitation. In addition, fed-batch cultures of *B. subtilis* asporogenic mutants in complex medium, with plasmid encoded proteins have resulted in very high cell densities (Park *et al.*, 1992; Cayuela *et al.*, 1993). Accordingly asporogenic mutants could be useful to improve the quantity of biomass obtained and to prevent the differentiation process during EFBC. However, it is known that several mutations that block the sporulation processes drastically reduce the quantity of heterologous proteins encoded by the regulatory region of *aprE* gene (Ferrari *et al.*, 1986; Perego *et al.*, 1991; Olmos *et al.*, 1996). Therefore, in this study we decided to conduct the characterization of an overproducer sporogenic *B. subtilis* strain.

Normally, during stationary phase of *B. subtilis* batch cultures, *aprE* expression and protease production rate becomes maximal (Ferrari *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1997). In the present work, glucose-limited EFBC were used to evaluate if a controlled growth rate during exponential growth phase could have an effect on β -galactosidase production during the stationary phase. As was shown, very consistent low β -galactosidase activities were obtained during the exponential growth and stationary phases of glucose-limited EFBC at μ below 0.2 h⁻¹. Such data showed that the efficiency of *aprE* gene transcription is affected by μ when it is controlled by glucose-limitation. It has been widely reported that *aprE* gene expression is derepressed in the stationary phase during cultivation of *B. subtilis* in complex medium (Ferrari *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1993). In this study, we found that the production of β -galactosidase, *i.e.* *aprE* expression, is repressed in the stationary phase of cultures preceded by glucose-limited EFBC even though a complex medium exists due to cell lysis. As mentioned above, protease production and *aprE* expression in continuous cultures using complex medium increases as μ is reduced (Rincón *et al.*, 1994). This difference suggests that, as for *B. licheniformis* (Hanlon and Hodges, 1981), the kind of nutrient limitation has a different effect on *aprE* gene expression. Furthermore, our data also shows that preventing glucose limitation is important to obtain production of β -galactosidase (or to avoid repression of *aprE* gene) in the glucose-mineral medium. Evaluation of the effect of limitation by of another nutrient (for instance nitrogen or phosphorus), and maintaining a low level of glucose concentration using fed-batch cultures, on the physiology of the recombinant *B. subtilis* strain used, remains to be studied.

The enzyme activity data from EFBC suggest that μ is not the unique factor that affects β -galactosidase production. Protein degradation by intracellular serine proteinase is an intrinsic process during the stationary stage of *B. subtilis* cultures in complex or chemically defined media (Burnet *et al.*, 1986). Probably, a high level of β -galactosidase degradation occurs in EFBC performed at μ below 0.2 h^{-1} and no β -galactosidase accumulation was detected. Moreover, probably under glucose limitation, as suggested by the large maintenance coefficient, glucose was mainly used for primary metabolism (i.e. for cellular growth) and hence the formation of secondary metabolites and storage material was reduced. Therefore no material was available for β -galactosidase formation.

REFERENCES

1. **Arbige, M.V., and W.H. Pitcher.** 1989. Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends. Biotechnol.* **7**:330-335.
2. **Burnet, T.J., Shankweiler, G.W., and Hageman, J.H.** 1986. Activation of intracellular serine proteinase in *Bacillus subtilis* cells during sporulation. *J. Bacteriol.* **165**: 139-145
3. **Cayuela, C., K. Kai, Y.S. Park, S. Iijima, and T. Kobayashi.** 1993. Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 383-386.
4. **Dawes, I.W., and J. Mandelstam.** 1970. Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous culture. *J. Bacteriol.* **103**: 529-535.
5. **de Boer, A.S., and B. Diderichsen.** 1991 On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**:1-4
6. **Ferrari, E., S.M.H. Howard, J.A. Hoch.** 1986 Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J Bacteriol* **166**: 173-179
7. **Ferrari, E., A.S. Jarnagin, B.F. Schmidt.** 1993. Commercial production of extracellular enzymes. p. 917-937. In: Sonenshein, A.L., J.A. Hoch, and R. Losick (eds) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics 1993. American Society for Microbiology. Washington D.C.
8. **Frankena, J., H.W. van Verseveld, and A.H. Stouthamer.** 1985. A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 169-176.
9. **Grossman, A.D., and R. Losick.** 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4369-4373.
10. **Hanlon, G.W., and N.A. Hodges.** 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J. Bacteriol.* **147**: 427-431.
11. **Heineken, F.G., and R.J. O'Connor.** 1972. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *J. Gen. Microb.* **73**: 35-44.

12. **Lee, J., and S.J. Parulekar.** 1993. Enhanced production of α -amylase in fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* TN106[pAT5]. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1142-1150.
13. **Lee, S.Y.** 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol.* **14**: 98-105
14. **Martínez, A., O.T. Ramírez, and F. Valle.** 1967. Improvement of culture conditions to overproduce the β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 40-45
15. **Meyer, H-P., and A. Fiechter.** 1985. Production of cloned human leukocyte interferon by *Bacillus subtilis*: optimal production is connected with restrained growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 503-507.
16. **Oh, M.K., B.G. Kim, and S.H. Park.** 1995. Importance of spore mutants for fed-batch and continuous fermentation of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 696-702.
17. **Olmos, J., V. Bolaños, S. Causey, E. Ferrari, F. Bolívar, and F. Valle.** 1996. A functional Spo0A is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters.* **381**: 29-31.
18. **Park, Y.S., K. Kai, S. Iijima, and T. Kobayashi.** 1992. Enhanced β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 686-696.
19. **Perego, M., J.-J. Wu, G.B. Spiegelman, and J.A. Hoch.** 1991. Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Gene* **100**: 207-212.
20. **Pierce, J.A., C.R. Robertson, and T.J. Leighton.** 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* **8**: 211-218.
21. **Ramírez, O.T., R. Zamora, R. Quintero, and A. López-Munguía.** 1994. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 895-903.
22. **Rincón, C.A., R. Quintero, and M. Salvador.** 1994. Continuous culture to produce recombinant β -galactosidase in *Bacillus subtilis*, p. 431-435. *In*: Galindo, E. and O.T. Ramírez (eds.) *Advances in Bioprocess Engineering 1994*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands..

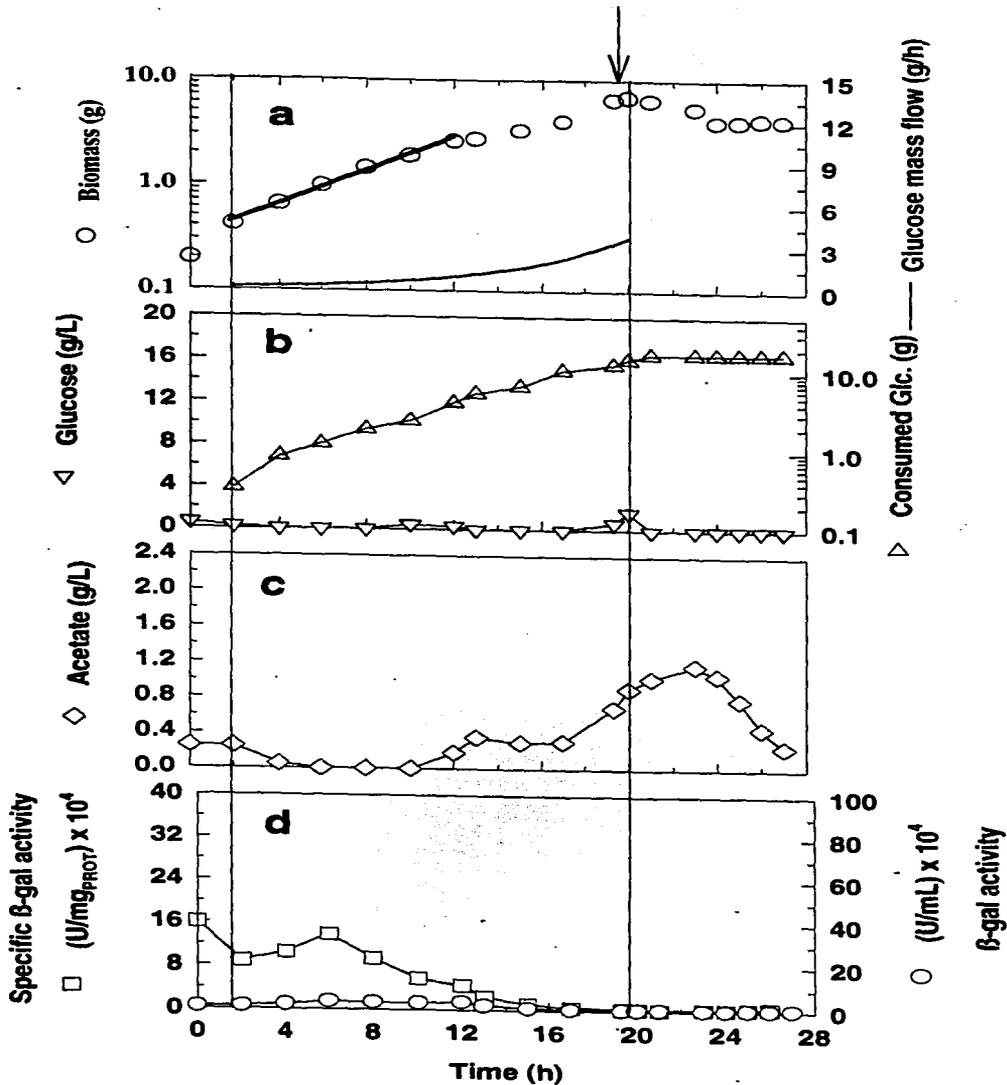
23. **Riesenberg, D., K. Menzel, V. Schulz, K. Schumann, G. Veith, G. Zuber, and W.A. Knorre.** 1990. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 77-82.
24. **Shoham, Y., and A.L. Demain.** 1990. Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 330-336.
25. **Snay, J., J.W. Jeong, and M.M. Atani.** 1989. Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnol. Prog.* **5**: 63-69.
26. **Valle, F., and E. Ferrari.** 1989. Subtilisin: A redundantly temporally regulated gene?. p. 131-146. *In*: Smith, I., R.A. Slepecky, and P. Setlow (eds.) Regulation of prokaryotic development 1989. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
27. **Vierheller, C., A. Goel, M. Peterson, M.M. Domach, M.M. Atani.** 1995. Sustained and constitutive high levels of protein production in continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 520-524.
28. **Waldburger, C., D. Gonzalez, and G.H. Chambliss.** 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 6321-6327.
29. **Yamanè, T., and S. Shimizu.** 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. p. 147-194. *In*: Advances in biochemical engineering and biotechnology. **30**, 1984. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
30. **Yee, L., and H.W. Blanch.** 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio-Technology.* **10**: 1550-1556.
31. **Zukowski M.M.** 1992 Production of commercially valuable products. p. 311-337. *In*: Doi, R.H., and M. McGlouglin (eds) Biology of bacilli: Applications to industry 1992. Butterworth-Heinemann, MA USA.

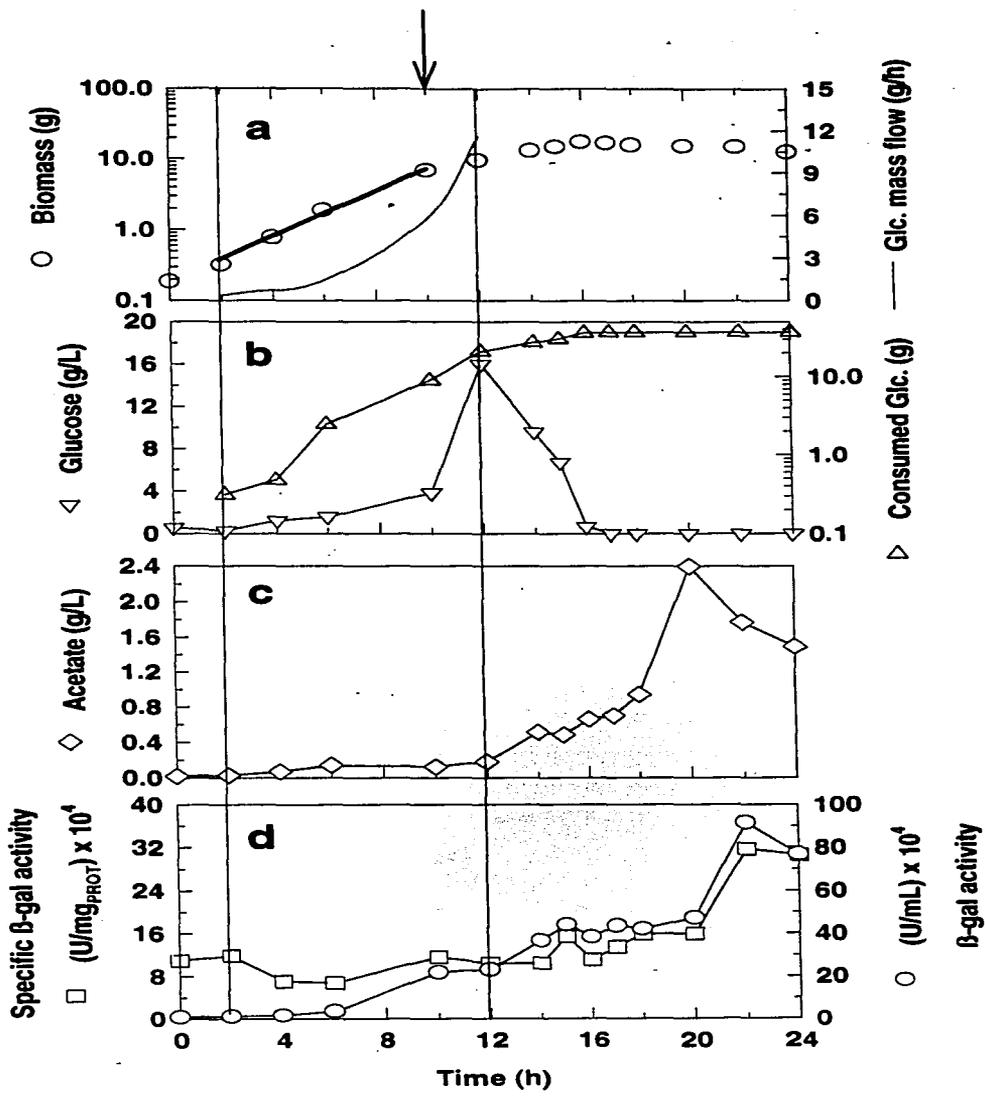
Figure legends.

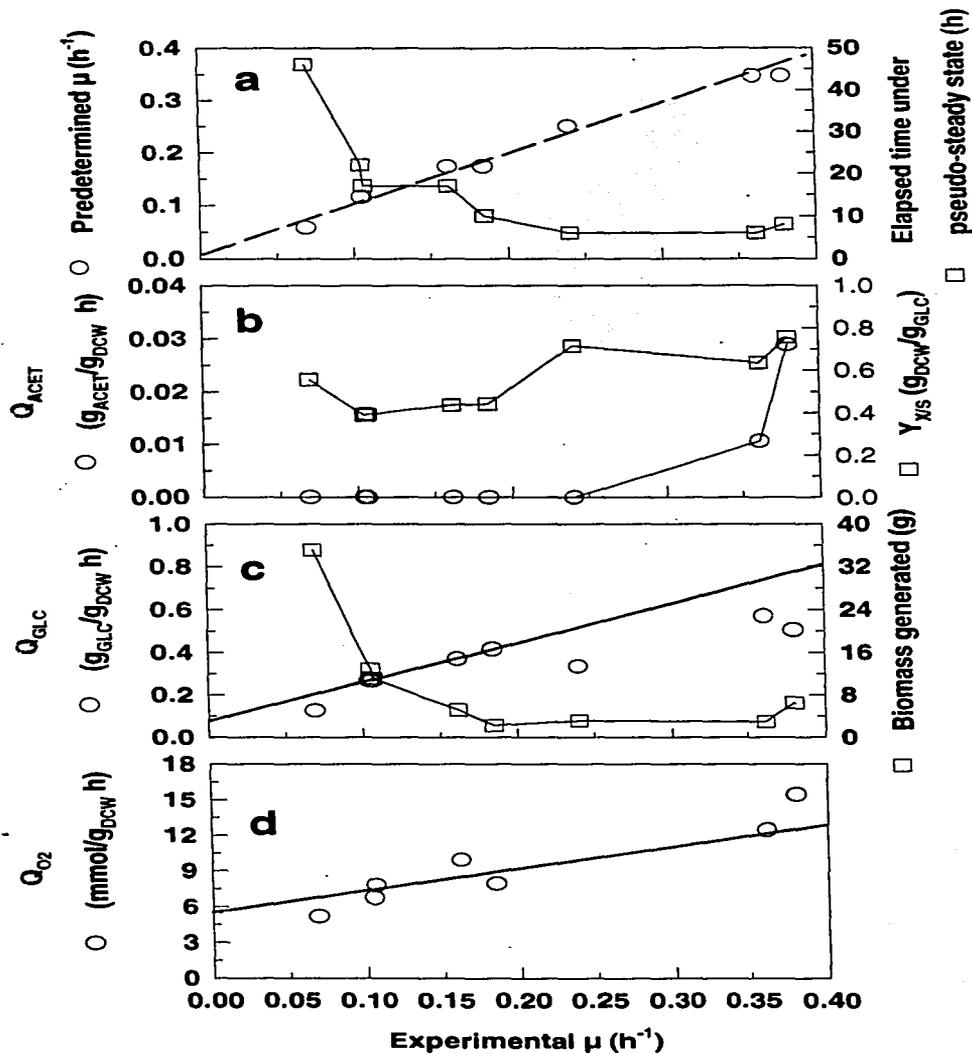
- Figure 1.- Kinetics of an exponentially fed-batch culture at a pre-determined μ of 0.173 h^{-1} . Vertical lines indicate beginning and end of glucose feeding, according to the pre-determined profile. Arrow shows time of addition of all salts to avoid limitation of minerals. The wide line on biomass data indicate the elapsed time under pseudo-steady state. Experimentally obtained μ during exponential growth was 0.185 h^{-1} .
- Figure 2.- Kinetics of an exponentially fed-batch culture at a pre-determined μ of 0.35 h^{-1} . Vertical lines indicate beginning and end of glucose feeding, according to the pre-determined profile. Arrow shows time of addition of all salts to avoid limitation of minerals. The wide line on biomass data indicate the elapsed time under pseudo-steady state. Experimentally obtained μ during exponential growth was 0.38 h^{-1} .
- Figure 3.- Summary of kinetic results obtained during the controlled exponential growth phase of exponentially fed-batch cultures. μ , Q_{ACET} , Q_{GLC} and Q_{O_2} denotes specific rates for growth, acetate production, and glucose and oxygen consumption, respectively.

Table 1. Enzyme activity obtained during the stationary phase of cultures preceded by an exponential glucose-limited fed-batch phase. μ denotes the experimental specific growth rate obtained during the pseudo-steady state of the exponential growth phase.

Maximum β -galactosidase activity during stationary phase				
μ (h ⁻¹)	Specific (kU/mg _{PROT})	Volumetric (kU/mL)	Productivity (kU / mL h)	Yield on glucose (MU/g _{GLC})
0.380	316.2	914.7	41.6	32.9
0.362	192.6	226.1	15.1	27.0
0.240	108.4	124.7	6.4	11.7
0.185	5.1	5.2	0.2	0.4
0.162	7.1	13.5	0.5	0.7
0.106	7.3	25.8	0.7	1.0
0.105	3.0	11.5	0.3	0.5
0.069	8.4	43.5	0.5	1.0







X.11.2 Cinéticas de fermentación de cultivos alimentados exponencialmente

En las siguientes páginas se presentan las cinéticas de fermentación para todos los cultivos alimentados reportados en el manuscrito: Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures. Debido a que la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) en el medio de cultivo se vuelve limitante a una concentración celular de 6 g/L, en algunos de estos cultivos hubo necesidad de agregar, de nuevo y en condiciones asépticas, todas las sales del medio de cultivo. El tiempo al cual se realizaron dichas adiciones están indicadas mediante flechas dobles. Las líneas verticales continuas indican el inicio y finalización de la alimentación de la glucosa de acuerdo a los perfiles predeterminados. La línea horizontal acotada indica el periodo de tiempo durante el cual se obtuvo el estado pseudo-estacionario respecto a la velocidad de crecimiento predeterminada.

En resumen en las figuras se presentan los siguientes parámetros:

Primer panel: concentración celular (Biomass), proteína intracelular (Protein) y velocidad de consumo de oxígeno (OUR).

Segundo panel: biomasa en términos másicos (Biomass), volumen en el reactor (V) y velocidad específica de crecimiento (μ) obtenida en los intervalos muestreados, la cual fue calculada a partir de biomasa en términos másicos. En este panel la línea continua gruesa trazada sobre los datos de biomasa indica el periodo durante el cual se obtuvo el estado pseudo-estacionario.

Tercer panel: glucosa remanente en el medio de cultivo (Glucose), glucosa consumida (Consumed Glc.) y nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Dissolved O_2).

Cuarto panel: producción de acetato (Acetate), velocidad de evolución de CO_2 (CER) y coeficiente respiratorio (RQ).

Quinto panel: actividad específica (Specific β -gal activity) y volumétrica (β -gal activity) de β -galactosidasa intracelular.

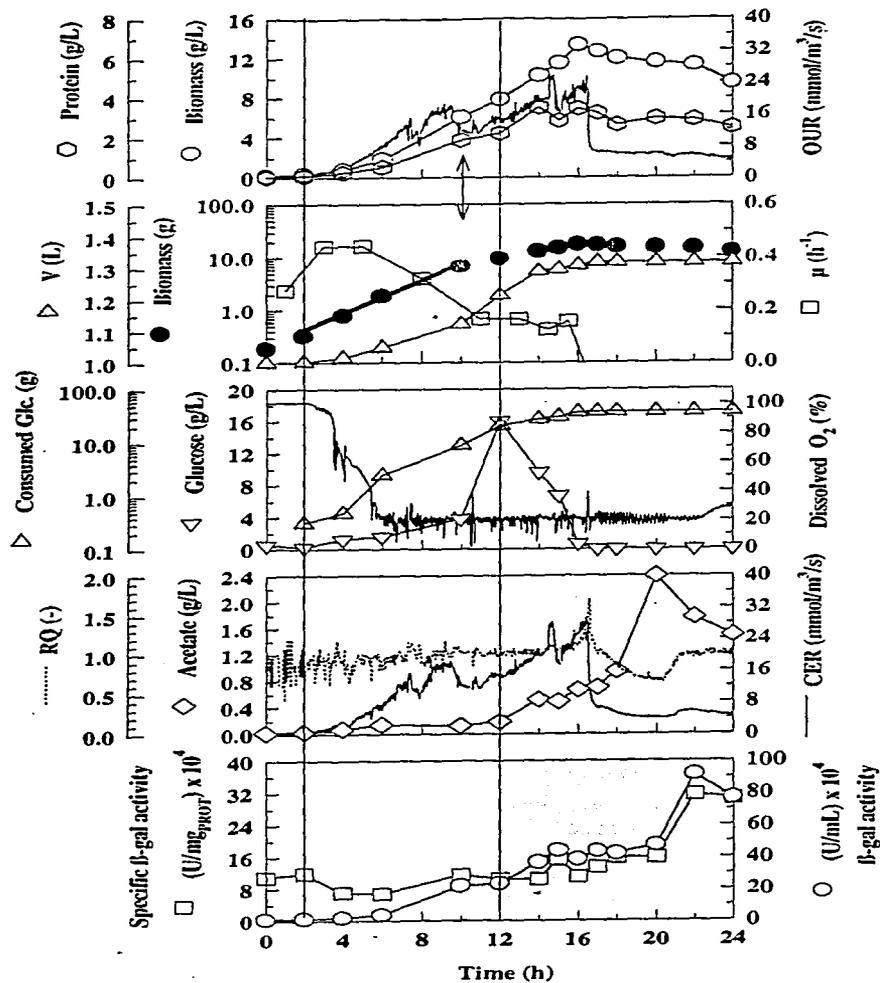


Figura X.11.1 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.35 h⁻¹. μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.38 h⁻¹.

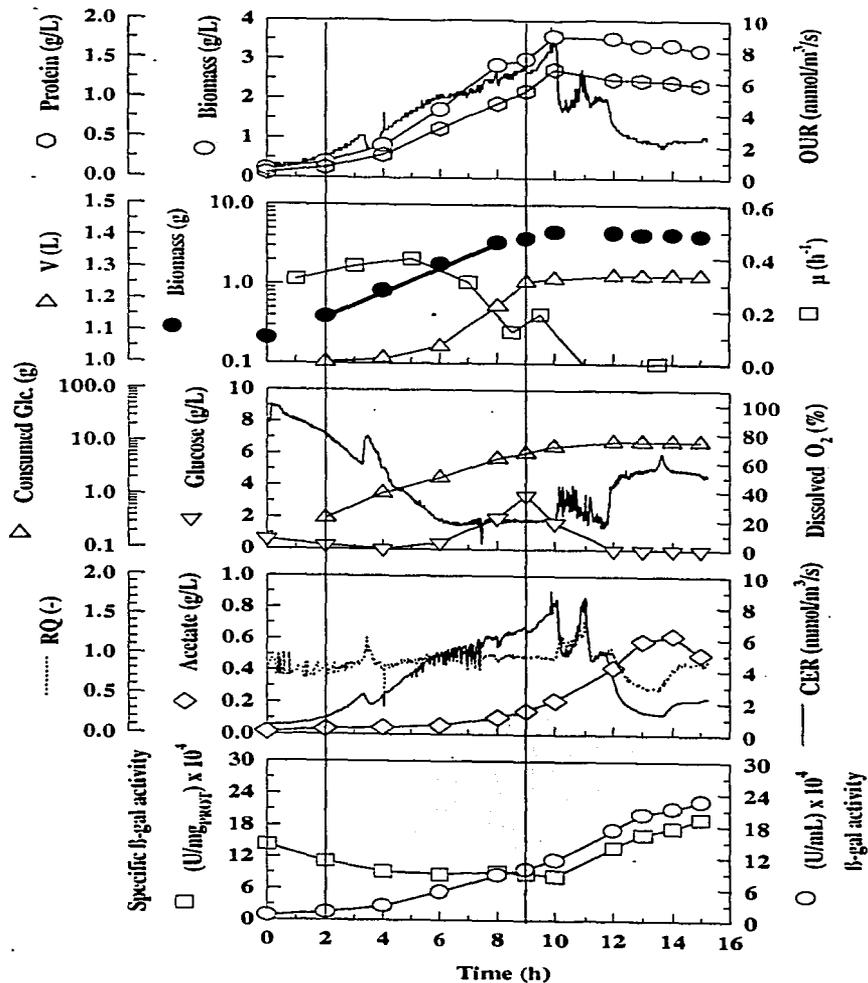


Figura X.11.2 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.35 h^{-1} , μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.362 h^{-1} .

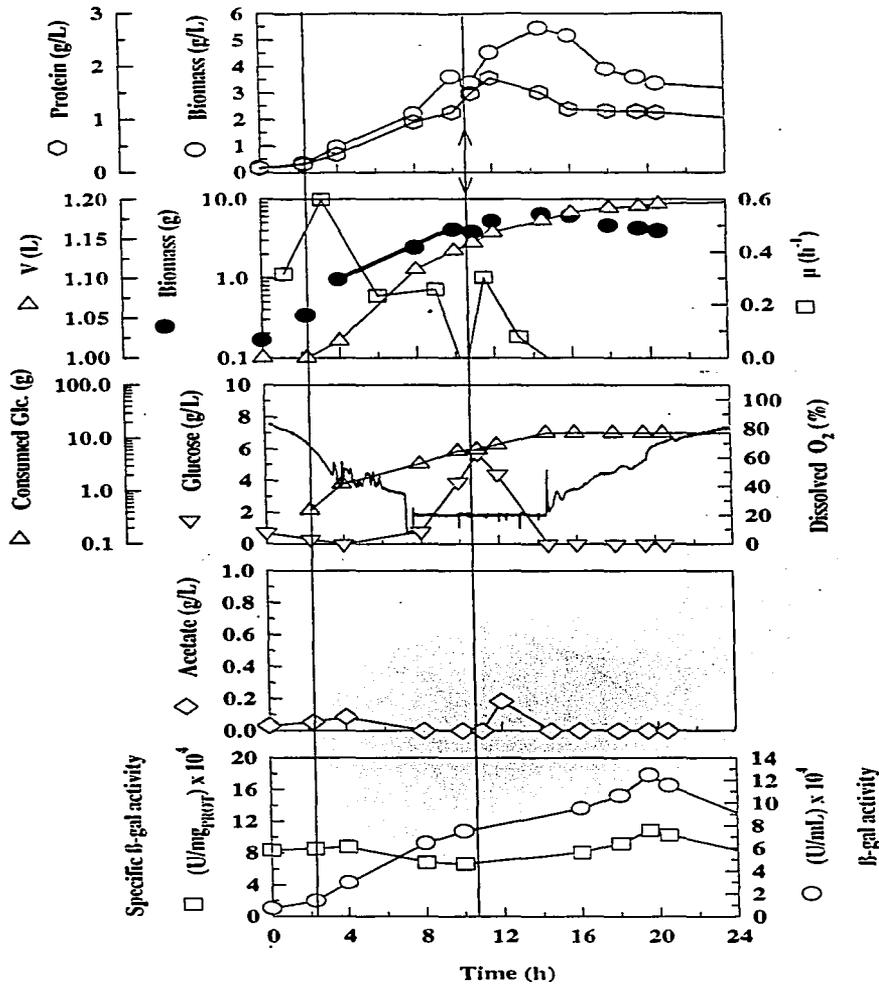


Figura X.11.3 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.25 h^{-1} . μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.24 h^{-1} .

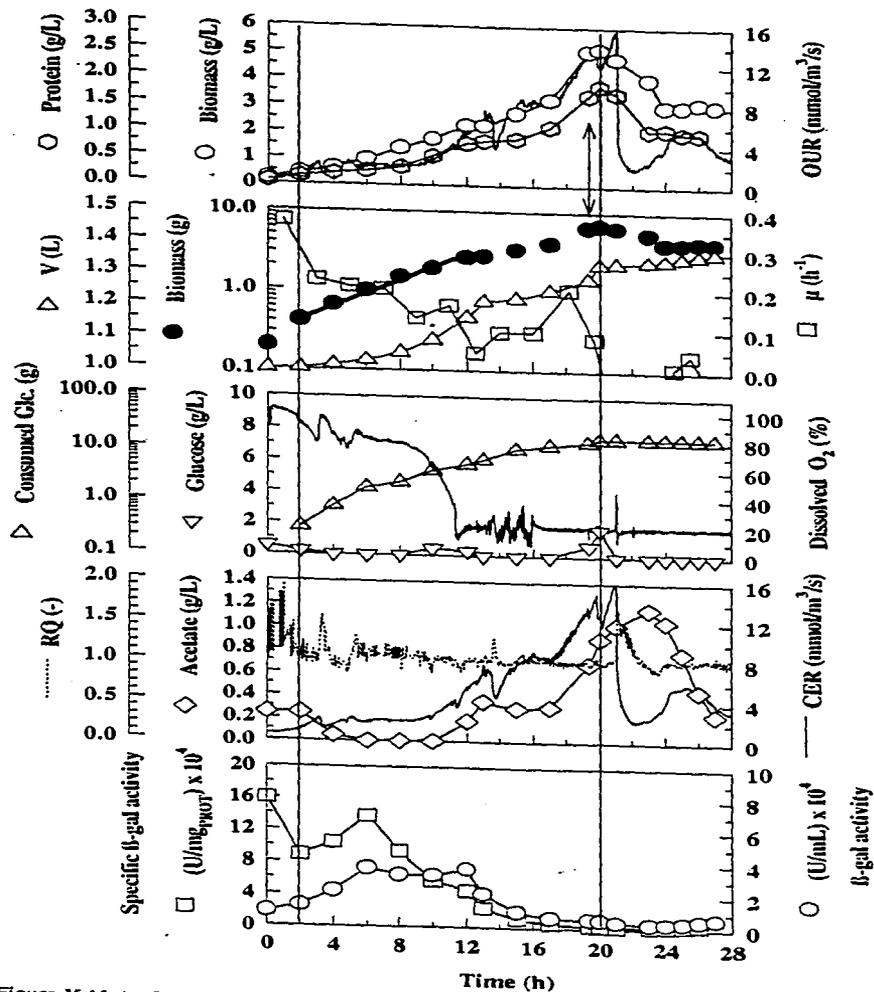


Figura X.11.4 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.173 h^{-1} . μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.185 h^{-1} .

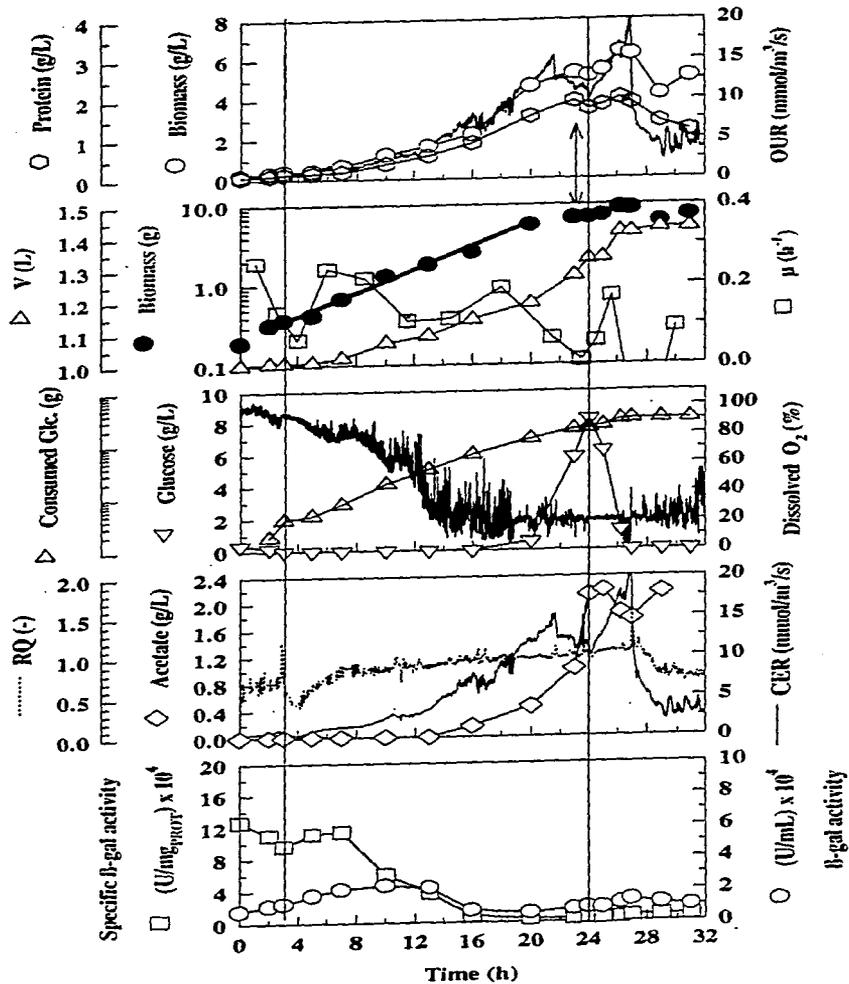


Figura X.11.5 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.173 h^{-1} . μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.162 h^{-1} .

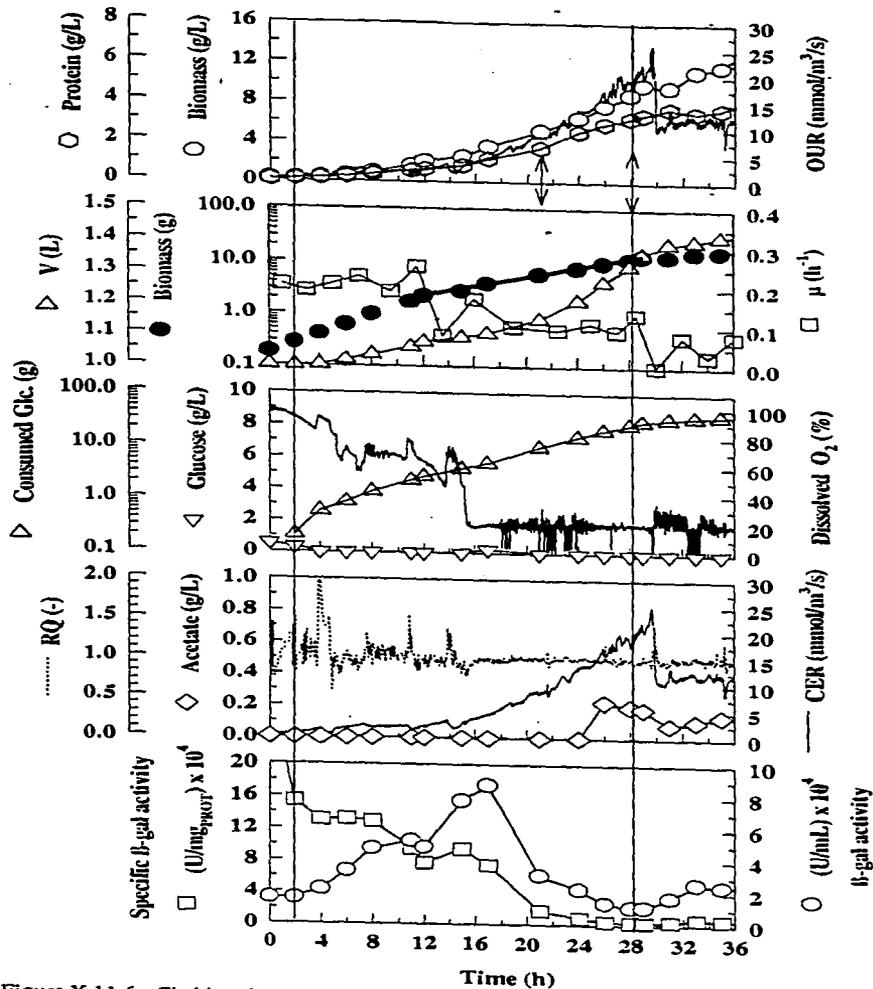


Figura X.11.6 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.116 h^{-1} . μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.106 h^{-1} .

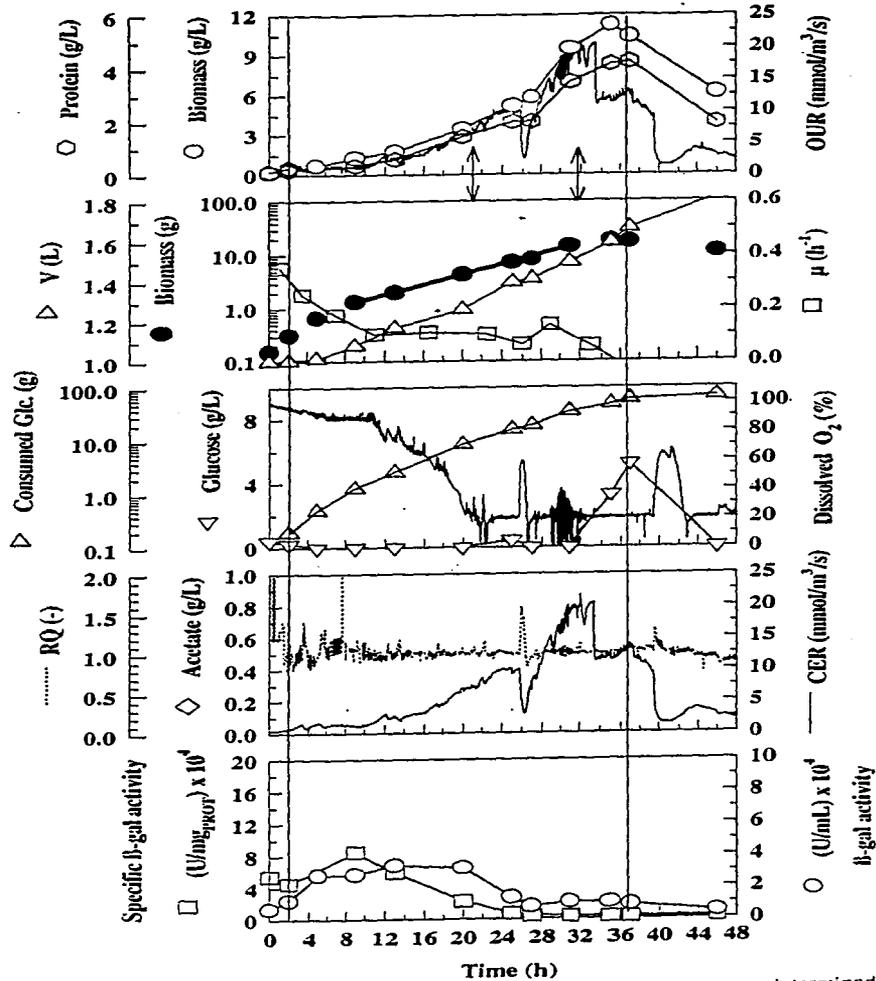


Figura X.11.7 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.116 h^{-1} . μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.105 h^{-1} .

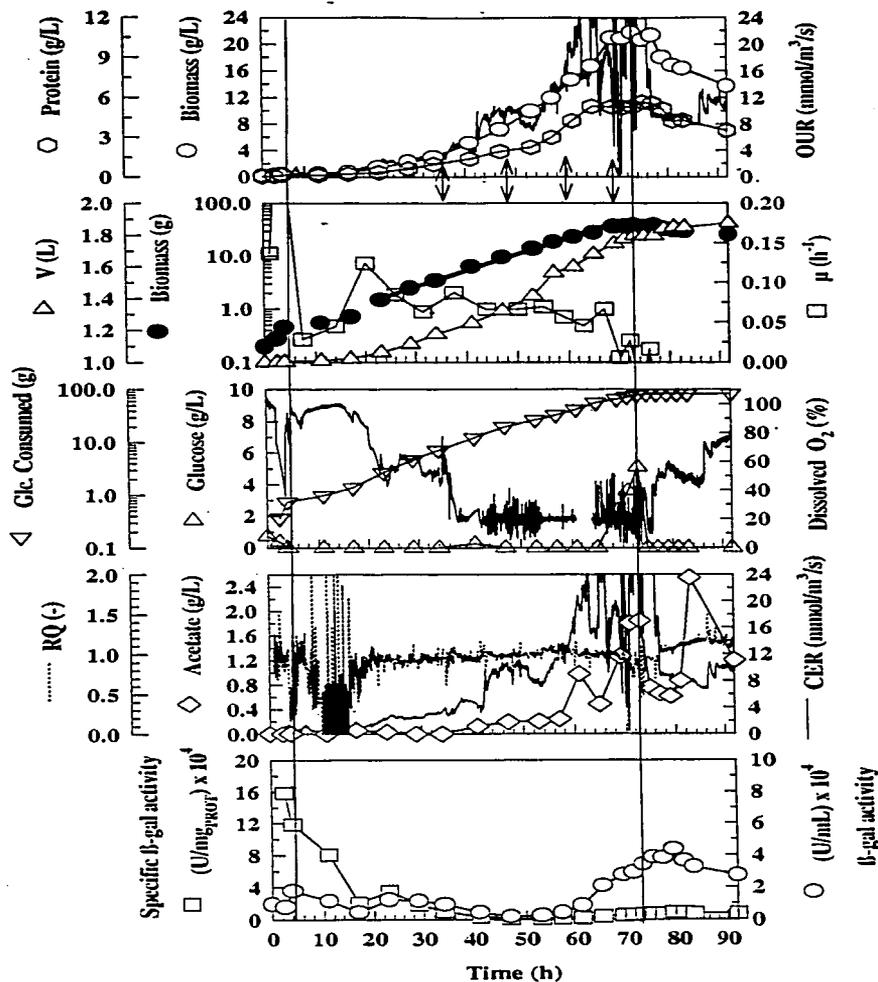


Figura X.11.8 Cinética de cultivo alimentado exponencialmente con una μ predeterminada de 0.058 h^{-1} , μ experimental obtenida durante la fase de crecimiento exponencial controlada 0.069 h^{-1} .

X.12 Cinéticas de cultivos lote a nivel fermentador en los cuales se cuantificó el porcentaje de esporas resistentes a calor

En las siguientes páginas se presentan las cinéticas de fermentación para todos cultivos lote, a nivel fermentador, en los cuales se cuantificó la formación de esporas resistentes a calor.

En resumen en las figuras se presentan los siguientes parámetros:

Primer panel: crecimiento celular (Biomass), proteína intracelular (Protein) y velocidad de consumo de oxígeno (OUR).

Segundo panel: glucosa remanente en el medio de cultivo (Glucose) y nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (Dissolved O₂).

Tercer panel: producción de acetato (Acetate), velocidad de evolución de CO₂ (CER) y coeficiente respiratorio (RQ).

Cuarto panel: actividad específica (Specific β -gal activity) y volumétrica (β -gal activity) de β -galactosidasa intracelular, y frecuencia de esporulación (Sporulation).

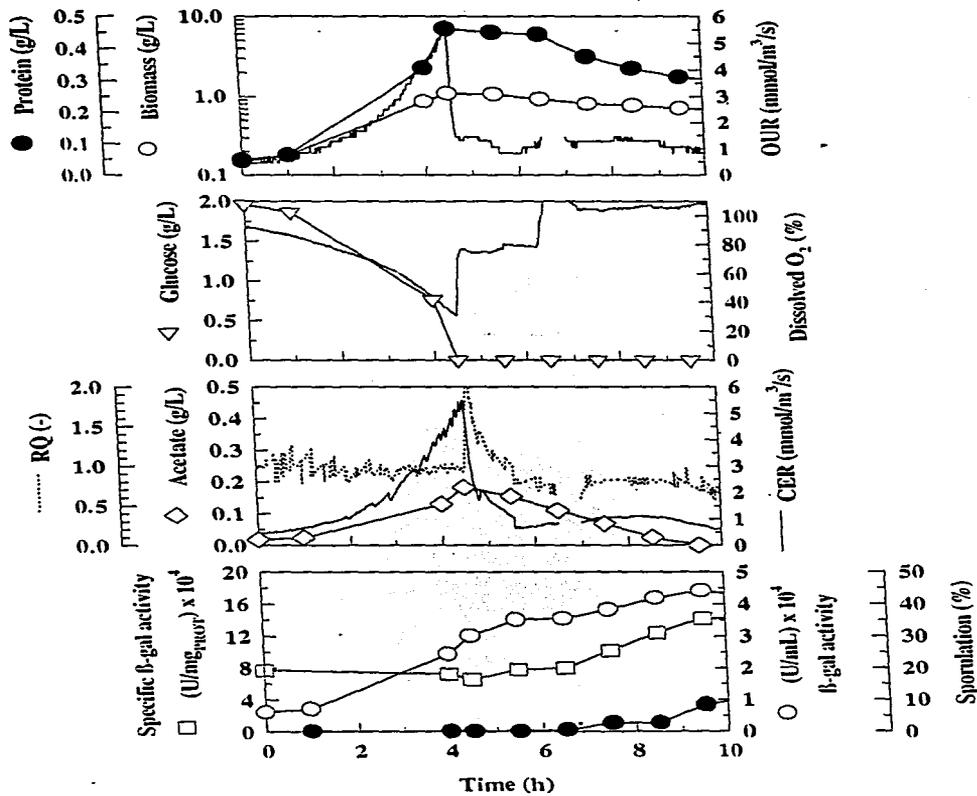


Figura X.12.1 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosa de 1.98 g/L.

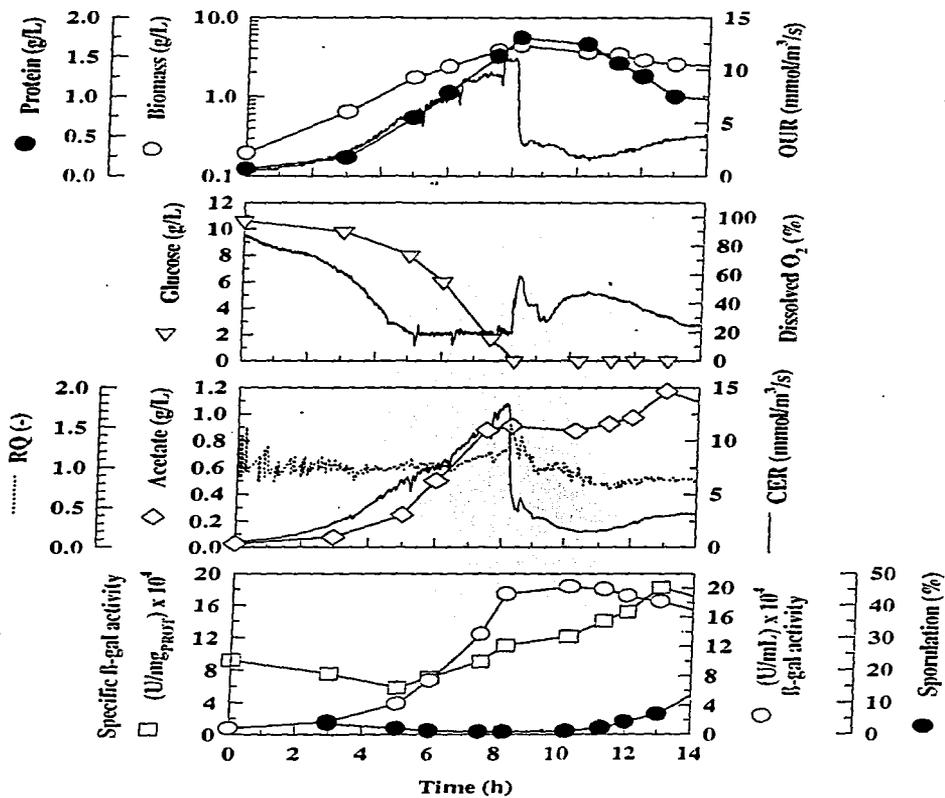


Figura X.12.2 Cinética de cultivo lote con una concentración inicial de glucosá de 10.6 g/L.