

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

---

### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“Efecto de gradientes de oxígeno disuelto sobre el metabolismo aerobio-anaerobio y producción de Trp-LE proinsulina por *Escherichia coli* recombinante, en estudios de escalamiento descendente.”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

I.BQ. Edgar Arnulfo/Sandoval Basurto

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Mor. 2003



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.

*Nunca tendré las palabras suficientes para agradecerles su incondicional apoyo. Mis logros hoy son, sin duda, una extensión de los suyos.*

*Con todo mi cariño y admiración.*

*A mis padres*

*cuyo apoyo, confianza y amor son la causa e inspiración de este logro en mi vida.*

*A mi hermana*

*cuya sonrisa y complicidad me han acompañado a lo largo de mi vida.*

*A Zaira*

*por tu compañía y comprensión. Gracias por todo.*

*A todos mis compañeros y AMIGOS que forman y formaron parte de mi vida.*

Sandoval  
Edger A.  
13 Mayo 2003  
1

3<sup>a</sup> Dirección Gener.  
Fundir en formato  
B.A.S.U. I.T.E.O.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Gracias.....*

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez R. por la oportunidad, confianza y apoyo para la realización de ésta tesis .

A los miembros del Jurado, por la revisión de la tesis y comentarios :

Dr. Mario Soberón Chávez.

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich.

Dr. Sergio Revah Moiseev.

Dr. Antonio de León Rodríguez.

Dr. Enrique Merino Pérez.

Así como también a los integrantes del Comité Tutorial.

Dr. Guillermo Gosset Lagarda.

Dr. Alfredo Ramírez Jimenez.

M.B. José Antonio Rocha Valadéz

A todas las personas que de una u otra manera participaron en esta tesis.

GRACIAS A TODOS.

Agradezco en especial a la Fundación "Sandoval Basurto" por el apoyo brindado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

C

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través de la beca complementaria y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 158928 y los proyectos NC-230 y 33348-B.

①

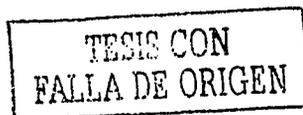
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Indice General

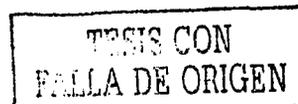
	Página
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	vii
Nomenclatura	viii
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1      Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Capítulo 2      Antecedentes</b>	<b>7</b>
Oxígeno en <i>Escherichia coli</i> .	7
Regulación por oxígeno.	7
Cadenas respiratorias de <i>Escherichia coli</i> .	8
El oxígeno en los bioprocesos.	12
Suministro y consumo de oxígeno.	15
<i>Escherichia coli</i> , vector para la expresión de proteínas recombinantes.	17
Escalamiento.	18
Gradientes ambientales.	19
Escalamiento descendente.	21
Tiempos de mezclado y circulación.	25
Simulación en el escalamiento descendente.	28
Estudios realizados con fluctuaciones de oxígeno.	30
Oscilaciones metabólicas en <i>Escherichia coli</i> .	34
<b>Capítulo 3      Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 4      Materiales y Métodos.</b>	<b>36</b>
Modelo Biológico.	36
Medios de cultivo.	37

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Conservación de la cepa	37
Banco celular.	37
Inóculos.	38
Muestreo.	38
Métodos analíticos.	38
Cuantificación de biomasa y viabilidad.	38
Cuantificación de glucosa.	39
Cuantificación de proteína total por Bradford.	39
Identificación y cuantificación de proteína recombinante.	40
Preparación de las muestras para electroforesis	40
Cuantificación de la proteína recombinante por densitometría	41
Cuantificación de ácidos orgánicos y etanol.	42
Diseño del simulador.	42
Sistema de dos compartimentos.	42
Cultivos constantes y recirculados.	45
Consideraciones matemáticas.	46
<b>Capítulo 5      Resultados y Discusiones.</b>	<b>47</b>
Cultivos a TOD constante.	47
TOD oscilante	59
Caracterización del simulador de dos compartimentos.	59
Resistencia al estrés hidrodinámico.	62
Cultivos a TOD oscilante.	65
Control de oxígeno disuelto.	77
<b>Capítulo 6      Conclusiones.</b>	<b>82</b>
<b>Capítulo 7      Perspectivas.</b>	<b>86</b>
<b>Referencias.</b>	<b>89</b>



<b>Anexos.</b>	96
I.- Curvas estándar de proteína total y ácidos orgánicos.	96
II.- Secuencias de proteínas (anhidrasa carbónica bovina y Trp-LE proinsulina)	99
III.- Cultivos a TOD constante.	100
IV.- Caracterización del sistema doble a 500 y 900 rpm en $R_{anacrobio}$ .	108
V.-Cultivos a TOD oscilante.	109



## Indice de Figuras.

Fig 1.-	Modelo de los reguladores/sensores (Arc y FNR) por medio de O <sub>2</sub> (Adaptada de Unden y Bongaertz, 1997).	8
Fig 2.-	Rutas metabólicas presentes en <i>Escherichia coli</i> direccionadas por oxígeno (Adaptada de Konz et al., 1998 y Lenhinger, 1993a).	13
Fig 3.-	Gradientes de oxígeno disuelto en un tanque de 25 m <sup>3</sup> (Oosterhuis y Kossen, 1984).	21
Fig 4.-	Metodología del escalamiento descendente (Oosterhuis, 1984).	22
Fig 5.-	Diversos subprocesos y orden de magnitud de sus tiempos característicos (Adaptado de Palomares y Ramírez, 2000).	23
Fig 6.-	Diseños de sistemas de uno y dos compartimentos. A. Dos tanques agitados interconectados, B. Tanque agitado y flujo pistón. C. Tanque agitado. D. Biorreactor tipo airlift (De León, 1996).	29
Fig 7.-	Mapa genético del plásmido <i>pWpIA</i> (Olmos et al., 1994)	36
Fig 8.-	Sistema experimental de dos compartimentos	43
Fig 9.-	Vista superior A) y lateral B) de los biorreactores	44
Fig 10.-	Perfil cinético típico de un cultivo a 20 % TOD constante.	48
Fig 11.-	Perfil cinético típico de un cultivo a 0.2 % TOD constante.	51
Fig 12.-	Efecto de la TOD constante sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	52
Fig 13.-	Efecto de la TOD constante sobre el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	54
Fig 14.-	Efecto de la TOD constante sobre el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) y la velocidad específica de producción de ácidos orgánicos ( $q_{ac}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	55
Fig 15.-	Efecto de la TOD constante sobre la concentración (A) y el rendimiento de proteína recombinante ( $Y_{Pr/X}$ ) (B). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	58
Fig 16.-	Caracterización del sistema de 2 compartimentos utilizando agua y una	

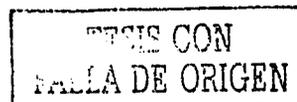
agitación de 500 rpm en $R_{aerobio}$ y 700 rpm en $R_{anaerobio}$ .	61
Fig 17.- Perfil de TOD obtenido al simular un $tc_i$ de 7 s en un cultivo.	61
Fig 18.- Perfil de TOD en un cultivo oscilado a un $tc_i$ de 20 s.	62
Fig 19.- Monitoreo de la viabilidad y del porcentaje de oxígeno en un cultivo recirculado a 20 % TOD constante. UFC/ml (A) y % de apertura de la válvula de oxígeno (B).	64
Fig 20.- Perfiles de TOD en cultivos oscilados a $tc_i$ de 20 (A), 50 (B), 90 (C) y 180 s (D).	66
Fig 21.- Perfil cinético de un cultivo oscilado entre los reactores aerobio y anaerobio a un $tc_i$ de 20 s	68
Fig 22.- Perfil cinético de un cultivo oscilado entre los reactores aerobio y anaerobio a un $tc_i$ de 180 s.	69
Fig 23.- Efecto del $tc_i$ sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	71
Fig 24.- Efecto del $tc_i$ sobre la concentración celular máxima. Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	72
Fig 25.- Efecto del $tc_i$ sobre el consumo específico de glucosa ( $q_g$ )(A) y la velocidad específica de producción de ácidos orgánicos ( $q_{ac}$ ) (B). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	73
Fig 26.- Efecto del $tc_i$ sobre la concentración (A) y rendimiento de proteína recombinante ( $Y_{P/r/x}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.	76
Fig 27.- Perfil típico obtenido al intentar mantener el cultivo a 20% TOD constante con la estrategia inicial del control. Tensión de oxígeno disuelto (A) y porcentaje de flujo de gases establecidos automáticamente por el algoritmo de control.	78
Fig 28.- Perfiles de TOD sin control burbujeado con aire para la cepa recombinante (A) y silvestre (B).	79
Fig 29.- Efecto del medio de cultivo sobre la DO a la que ocurre la perturbación en la TOD en cultivos a 20% TOD constante usando diferentes cepas.	81
Fig 30.- Control a 20 % TOD constante manipulando el tiempo de control ( $tc$ ) al	

momento de la perturbación, indicado en el recuadro. Tensión de oxígeno disuelto (A) y porcentaje de flujo de gases establecidos automáticamente por el algoritmo de control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Índice de Tablas.**

<b>Tabla 1.-</b>	Oxido- reductasas de la cadena respiratoria de <i>Escherichia coli</i> (Adaptada de Uden yBongaetrz, 1997).	9
<b>Tabla 2.-</b>	Clasificación del patrón de expresión de los genes dependientes de FNR (Adaptada de Becker <i>et. al</i> 1996).	10
<b>Tabla 3.-</b>	Productos de fermentación de <i>E.coli</i> bajo condiciones óxicas y anóxicas (Adaptada de Becker <i>et. al</i> 1997).	11
<b>Tabla 4.-</b>	Principales categorías de proteínas recombinantes (Adaptada de Sawers y Jarsch, 1996).	17
<b>Tabla 5.-</b>	Correlaciones de la literatura para determinar tiempos característicos (Serrato, 2002).	24
<b>Tabla 6.-</b>	Análisis de régimen de una fermentación de ácido glucónico de 19 m <sup>3</sup> (Oosterhuis, 1984).	24
<b>Tabla 7.-</b>	Tiempos de mezclado determinados experimentalmente.	26
<b>Tabla 8.-</b>	Estudios realizados en sistemas de un compartimento.	31
<b>Tabla 9.-</b>	Primera dilución de las muestras de fermentación.	39
<b>Tabla 10.-</b>	Tiempo de sonicación de las muestras de fermentación.	39
<b>Tabla 11.-</b>	Segunda dilución de las muestras de fermentación.	40
<b>Tabla 12.-</b>	Parámetros operacionales de los biorreactores en el sistema de dos compartimentos.	44
<b>Tabla 13.-</b>	Tiempos de circulación simulados y flujos de la bomba utilizados.	45
<b>Tabla 14.-</b>	Constantes de Monod típicas para cepas de <i>E. coli</i> cuando O <sub>2</sub> es el sustrato limitante (Adaptada de De León 1996).	53
<b>Tabla 15.-</b>	Comparación entre cultivos control y recirculados.	63



## Nomenclatura

H	Altura de la paleta de los impulsores.	(m)
W	Ancho del impulsor.	(m)
Q <sub>i</sub>	Capacidad de bombeo del impulsor.	(m <sup>3</sup> /s)
k <sub>L,a</sub>	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa.	(h <sup>-1</sup> )
x	Concentración celular.	(g/L)
C <sub>crit</sub>	Concentración crítica de oxígeno.	(mg O <sub>2</sub> /L ó %)
C <sub>L</sub>	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.	(mg O <sub>2</sub> /L)
C <sub>g</sub> *	Concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire.	(mg O <sub>2</sub> /L)
K <sub>O2</sub>	Constante de saturación para oxígeno.	(%)
D <sub>i</sub>	Diámetro del impulsor.	(m)
F	Flujo volumétrico.	(L/min)
O <sub>TR</sub>	"Oxygen transfer rate".	(mg O <sub>2</sub> /L h)
O <sub>UR</sub>	"Oxygen uptake rate".	(mg O <sub>2</sub> /L h)
Y <sub>Pr/X</sub>	Rendimiento de proteína recombinante sobre biomasa.	(g prot. rec/g cél)
Y <sub>X/S</sub>	Rendimiento de células sobre sustrato.	(g cél / g glucosa)
pO <sub>2</sub>	Presión parcial de oxígeno.	mbar
t <sub>c</sub>	Tiempo de control.	(s)
t <sub>ca</sub>	Tiempo característico.	(s)
t <sub>c<sub>i</sub></sub>	Tiempo de circulación.	(s)
t <sub>M</sub>	Tiempo de mezclado.	(s)
N	Velocidad de agitación.	(rpm, s <sup>-1</sup> )
Na	Velocidad de transferencia de oxígeno.	(mg O <sub>2</sub> /L h)
q <sub>ac</sub>	Velocidad específica de producción de ácidos orgánicos.	(g ácido/g cél h)
q <sub>O2</sub>	Velocidad específica de consumo de oxígeno.	(mg O <sub>2</sub> /g cél h)
q <sub>s</sub>	Velocidad específica de consumo de glucosa.	(g glucosa/g cél h)
V	Volumen.	(m <sup>3</sup> )

**Abreviaturas**

Arc	“Aerobic respiratory control”	
DO	Densidad Óptica	
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	
CFD	“Computational Fluid Dynamic”	
FNR	“Fumarate and nitrate reduction”	
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	%

**Letras griegas**

$\rho$	Densidad	(kg/m <sup>3</sup> )
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	(h <sup>-1</sup> )
$\eta$	Viscosidad	(Pa s)
$\pi$	Constante	3.1416

TRABAJE CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

En los cultivos aerobios, el oxígeno disuelto es de vital importancia, sin embargo en grandes volúmenes de producción, el suministro se dificulta, dada su baja solubilidad. Por lo anterior y aunado a las condiciones limitadas de transferencia energética en biorreactores a gran escala, existe una alta probabilidad de que ocurran gradientes de oxígeno disuelto en cultivos a gran escala. De tal forma, en el presente trabajo se diseñó y caracterizó un simulador para gradientes de oxígeno disuelto, compuesto por dos tanques agitados, instrumentados e interconectados por medio una bomba, con la cual se intercambiaba el medio de cultivo entre los dos biorreactores. Uno de los biorreactores (de 350 ml) simuló una zona bien aireada, mientras que el otro (700 ml) fue burbujado con nitrógeno para simular una zona limitante en oxígeno disuelto. Con este sistema se simulaban las zonas bien mezcladas así como deficientes en el mezclado y los tiempos de circulación ( $t_{ci}$ ) mayores a 20 s que pueden presentarse en biorreactores a gran escala.

Al intentar simular  $t_{ci}$  tan cortos como 7 s, la dinámica superó los tiempos de los mecanismos de transferencia de masa y respuesta, debido a que el sistema se equilibró y la TOD fue la misma en ambos biorreactores por lo que no fue posible simular este  $t_{ci}$  de 7 s o menores.

Una limitante para este tipo de sistema, son los altos esfuerzos de corte en el cabezal de la bomba, por lo que dicho comportamiento se evaluó haciendo un cultivo recirculado en un solo biorreactor. Los parámetros macroscópicos cinéticos y estequiométricos no mostraron diferencia significativa con respecto a los cultivos control, por lo que la bacteria toleró perfectamente los esfuerzos de corte generados durante la recirculación.

Se evaluó el efecto del tiempo de circulación ( $t_{ci}$ ) sobre el metabolismo celular de *Escherichia coli* W3110 *trp+ / pWp1A*, así como la producción de la proteína recombinante Trp-LE proinsulina. Los  $t_{ci}$  evaluados fueron: 0, 20, 50, 90, y 180 s, con un gradiente (diferencia entre los biorreactores aerobio y anaerobio) promedio de 9 % de TOD.

TRABAJE CON  
FOLLA DE ORIGEN

# PAGINACION DISCONTINUA

El  $t_{c_i}$  impactó fuertemente la expresión de proteína recombinante reduciendo un ca. 95 % su concentración y un ca. 90 % el rendimiento de la misma en la condición mas extrema (180 s) comparado con cultivos control a TOD constante de 10 % TOD. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) solo disminuyó de  $0.37 \text{ h}^{-1}$  (control) a  $0.28 \text{ h}^{-1}$  para el  $t_{c_i}$  de 180 s, en cambio el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ) se afectó fuertemente dado que se redujo un 70 % con respecto a los cultivos control. El consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) mostró un comportamiento interesante al obtener su valor máximo a  $t_{c_i}$  de 90 s (ca.  $2.66 \text{ g glucosa/g célula h}$ ) y no a 180 s (ca.  $1.5 \text{ g glucosa/g célula h}$ ). Dicho comportamiento se justifica por el súbito incremento en la producción de lactato (ca.  $1 \text{ g lactato/g célula h}$ ) ya que este metabolito contribuye a la reoxidación del NADH. De igual forma la producción específica de ácidos, acético (ca.  $1 \text{ g acético/g célula h}$ ) y fórmico ( $0.45 \text{ g fórmico/g célula h}$ ) fue máxima a  $t_{c_i}$  de 90 s. Esto indica que un  $t_{c_i}$  de 90 s es suficiente para desviar de manera importante el flujo de carbono hacia la fermentación ácido-mixta.

Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos a TOD constante, (0, 0.2, 1, 5, 10, 20 %) para caracterizar el comportamiento cinético del modelo de estudio. La  $\mu$  se ajustó a un perfil tipo Monod, con un valor de  $K_{O_2}$  ca. 1% TOD y una  $\mu_{\max}$  de ( $0.39 \text{ h}^{-1}$ ), el  $Y_{x/s}$  máximo obtenido fue de  $0.4 \text{ g células/g glucosa}$ , sin embargo, conforme disminuyó la TOD hasta 0.2 % este parámetro se redujo un 60 %. Por su parte el consumo específico de glucosa fue máximo (ca.  $1.6 \text{ g glucosa/g célula h}$ ) a 0.2 % TOD y se redujo a  $1 \text{ g glucosa/g célula h}$  al incrementar el TOD por arriba de 5 %.

Los ácidos orgánicos mostraron una fuerte dependencia con la TOD debido a la regulación de la actividad enzimática por el oxígeno dando lugar a la ruta alterna conocida como fermentación ácido-mixta de *E. coli*. A TOD menor de 5% es evidente la aparición de los ácidos succínico, láctico y fórmico. De especial importancia es el comportamiento del fórmico, cuya producción se dispara de  $0.03 \text{ g ácido/g célula h}$  a  $0.31 \text{ g ácido/g célula h}$  a TOD menores a 5 %. A TOD mayor a 5 % el acético se produjo ( $0.33 \text{ g ácido/g célula h}$ ) debido a un "sobreflujo metabólico"; mientras que a TOD menores a 5 % la producción ( $0.52 \text{ g ácido/g célula h}$ ) fue resultado de un efecto combinado de la rutas de sobreflujo y fermentativa. La proteína recombinante disminuyó ca. 80% a valores de TOD menor a 1% con respecto a la proteína producida a TOD 20%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el oxígeno disuelto es de importancia fundamental para el caso específico de la cepa W3110 *trp<sup>+</sup>/pWp/A*. Por lo tanto es imprescindible establecer mejores estrategias para operaciones de escalamiento ascendente y evitar la generación de gradientes de TOD, para que la reproducibilidad de los resultados en ambas escalas sea similar, ya que inclusive pequeñas desviaciones hacia el metabolismo anaerobio puede reducir substancialmente la productividad de la proteína recombinante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Capítulo 1 Introducción

Desde el punto de vista comercial los procesos biotecnológicos y en especial la etapa fermentativa deben minimizar los costos de producción debido al alto porcentaje que representan las etapas de separación y purificación. El obtener rendimientos de producto máximos, alta productividad así como reproducibilidad, son objetivos primordiales que se deben cumplir mediante un buen diseño y operación del biorreactor. Sin embargo, estos objetivos han sido difíciles de alcanzar cuando se cambia de una escala a otra (Bylund *et al.*, 2000).

La eficiencia de los biorreactores industriales es determinada por un gran número de factores que se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que definen las propiedades o características propias de las células y aquellos que controlan el ambiente físico (Guillard *et al.*, 1999). Entre los factores que gobiernan el ambiente físico están, la calidad en el mezclado, así como también los fenómenos de transporte del sistema. No obstante, a medida que los volúmenes de operación aumentan, la imposibilidad de mantener estos factores dentro de intervalos óptimos ocasiona problemas, como por ejemplo la aparición de gradientes de las principales variables ambientales (oxígeno disuelto, pH, glucosa, etc), que afectan la eficiencia del sistema. Los gradientes ambientales se originan principalmente por limitaciones energéticas al no suministrar la potencia necesaria y otras condiciones operativas que serán determinadas por la características propias de las células (Doran, 1993).

Se han identificado gradientes dentro del biorreactor para parámetros tales como: oxígeno disuelto (Ossterhuis y Kossen, 1984), pH (Amanullah *et al.*, 1992) y glucosa (Xu *et al.*, 1999; Bylund *et al.*, 1998) y representan un reto a resolver durante el escalamiento ascendente. Las condiciones de macro y micro heterogeneidad en los biorreactores industriales desencadenan una serie de reacciones metabólicas y fisiológicas, que en algunas ocasiones no son deseables para la integridad del proceso y que llegan a afectar la productividad global, tal y como lo demuestran estudios recientes (Bylund *et al.*, 1998). Específicamente en *Escherichia coli*, siendo el modelo de estudio usado en este trabajo, algunas de las reacciones no deseables son: disminución en la velocidad de crecimiento, la acumulación de metabolitos tóxicos o

inhibitorios (O'Beirne y Hamer, 2000), y para el caso de cepas recombinantes, la inestabilidad de los plásmidos (Ryan y Parulekar, 1991; Namdev *et al.*, 1993).

Las altas concentraciones celulares, así como las altas demandas nutricionales (oxígeno disuelto), son en general características típicas de fermentaciones con *E. coli*. Aunado a esto, se encuentra, la baja solubilidad del oxígeno en medio acuoso, situación que resulta ser un factor limitante para el desarrollo del cultivo cuando no se puede satisfacer la demanda de oxígeno, particularmente si se requiere mantener el oxígeno disuelto por arriba de los valores críticos.

Los criterios de escalamiento ascendente son sistema-específico y por lo tanto es necesario ensayar el "comportamiento" biológico en la fermentación ante circunstancias adversas, como por ejemplo la exposición continua a gradientes, previo a una operación de escalamiento (Amanullah *et al.*, 1992). Una herramienta para estudiar este problema es el escalamiento descendente, concepto que se establece desde los años 70's como una alternativa de mejora en los procesos existentes. Sin embargo, es hasta los años 80's cuando Ossterhuis, (1984) plantea al escalamiento descendente como una metodología semiempírica con la que es posible generar estrategias que simulen a nivel laboratorio las condiciones prevalecientes a gran escala y así obtener información de condiciones que se asemejan a las reales pero sin la necesidad de realizar experimentos a gran escala, lo cual resultaría impráctico y costoso (Palomares y Ramírez, 2000).

La simulación experimental se ha realizado básicamente en dos tipos de configuraciones: sistemas de uno o dos compartimentos. Ambos diseños se basan en el principio de representar una zona bien mezclada (zona de descarga de los impulsores y cercanas a estos) y una zona con mezclado deficiente (zonas alejadas de los impulsores) y por consiguiente, simular ambientes fluctuantes.

En el presente trabajo se diseñó un simulador de dos compartimentos compuestos de dos tanques agitados. Este tipo de sistemas se han caracterizado por ser de respuesta más rápida con respecto a los de un solo compartimento (Serrato, 2002; De León, 1996), ya que la dinámica de los mismos está en función de la velocidad de recirculación entre ambos

biorreactores, lo que posibilita simular tiempos de circulación cortos ( $t_{ci}$ ) (Ossterhuis y Kossen.,1985).

El arreglo experimental aquí usado, permitió observar la respuesta a gradientes de oxígeno manifestada como cambios metabólicos y fisiológicos de *E. coli* cepa W3110 *trp+ / pWpIA*, modelo que expresa una proteína recombinante como cuerpo de inclusión. El presente estudio permitió conocer con mayor profundidad algunos de los mecanismos celulares utilizados por la bacteria para responder ante fluctuaciones de oxígeno disuelto, así como también, proporcionó elementos necesarios para plantear mejores estrategias de escalamiento tomando en cuenta la importancia potencial del oxígeno disuelto en el desarrollo de la fermentación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

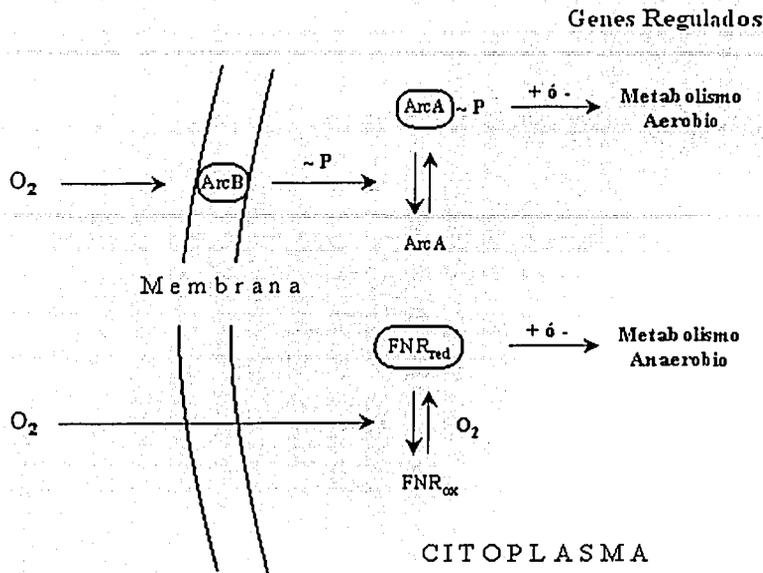
## Capítulo 2 Antecedentes

### Oxígeno en *Escherichia coli*.

El oxígeno es un sustrato fundamental para el crecimiento aerobio, esta molécula participa como aceptor final de electrones en la cadena de transporte electrónico a través de los complejos enzimáticos que participan en las reacciones de oxido-reducción (Lehninger, 1993). La disponibilidad del oxígeno en los microorganismos desencadena cambios a nivel metabólico que afectan las funciones celulares (Li *et al.*, 1991), impactando especialmente el rendimiento energético. Estos cambios en el metabolismo son producto de la actividad de un sistema regulatorio desarrollado por la bacteria para adaptarse a diferentes ambientes (óxicos y anóxicos) (Becker *et al.*, 1997). Por esta dualidad en su comportamiento, *Escherichia coli* es microorganismo clasificado como anaerobio facultativo.

### Regulación por oxígeno.

Desde el punto de vista molecular, el oxígeno ejerce una regulación a nivel transcripcional en *E. coli*, la cual es llevada a cabo principalmente por los reguladores FNR (“fumarate and nitrate reduction”) y el sistema regulatorio de 2 componentes ArcA/ArcB (“aerobic respiratory control”) (Unden *et al.*, 1995). FNR es una proteína citoplasmática la cual es el principal regulador de la respiración anaeróbica (Becker *et al.*, 1996; Unden *et al.*, 1997). La activación e inactivación de esta proteína está relacionada con la oxidación del grupo Fe-S presente en la proteína, por medio de una interacción directa del oxígeno difundido en el citoplasma. Una vez activada, esta proteína posee una región de unión a ADN de secuencia conservada en la cual ejerce su acción (mas adelante se describen los genes regulados por FNR). Por otro lado ArcA/ArcB es el principal sistema regulador del metabolismo aerobio. ArcB es una proteína de señalización unida a la membrana, la cual sufre autofosforilación en condiciones limitantes de oxígeno. El grupo fosforilo es transferido a la proteína ArcA presente en el citoplasma, evento que activa a esta proteína y de manera similar a FNR, contiene un sitio de reconocimiento sobre el ADN donde regula la transcripción. ArcA es un represor transcripcional de al menos 6 genes del ciclo de Krebs (Iuchi *et al.*, 1989) (Figura 1).



**Figura 1.** Modelo para los reguladores y sensores (Arc y FNR) por medio de  $O_2$ . El modelo muestra el estímulo ( $O_2$ ), el sensor (ArcB), el regulador de respuesta (ArcA) y el sensor-regulador citoplasmático FNR. La activación y represión de los genes blanco está dado por + ó -. (Adaptada de Uden y Bongaertz, 1997).

### Cadenas respiratorias de *Escherichia coli*

La regulación impuesta por los reguladores transcripcionales FNR y ArcA/ArcB se ve reflejada como alteraciones metabólicas en la cadena respiratoria, mediante las cuales la bacteria es capaz de generar energía ya sea por respiración o fermentación. La cadena respiratoria de *E. coli* consiste de 15 deshidrogenasas y 10 reductasas terminales u oxidasas las cuales están ligadas a quinonas (ubiquinona, menaquinona y dimetilmenaquinona), este número incluye isoenzimas para algunos de los donadores de electrones ( $H_2$ , formato, NADH y glicerol-3-P) y aceptores ( $O_2$  y nitrato) (Uden y Bongaertz, 1997). Existe un uso preferencial de aceptores de electrones más electropositivos ( $O_2$  sobre nitrato), justificado por el rendimiento energético máximo aportado a la célula.

Tabla 1. Oxido- reductasas de la cadena respiratoria de *Escherichia coli* (Adaptada de Unden y Bongartz, 1997).

Enzima	Par Redox	Genes
<i>Deshidrogenasas primarias (DH)</i>		
Formato DH <sub>N</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>fdhGHI</i>
Formato DH <sub>O</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>fdoGHI</i>
Formato Hidrogeno-Liasa		<i>fdhF, hycA-H</i>
Hidrogenasa 1	H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	<i>hyaABCDEF</i>
Hidrogenasa 2	H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	<i>hybABCDEFG</i>
NADH DH I	NAD <sup>+</sup> /NADH	<i>nuoA-N</i>
NADH DH II	NAD <sup>+</sup> /NADH	<i>ndh</i>
Glicerol 3-P DH <sub>N</sub>	DHAP/Gly-3-P	<i>glpD</i>
Glicerol 3-P DH <sub>O</sub>	DHAP/ Gly-3-P	<i>glpACB</i>
Piruvato oxidasa	Acetato + CO <sub>2</sub> /Piruvato	<i>poxB</i>
D-Lactato DH	Piruvato/ D-Lactato	<i>lld</i>
L-Lactato DH	Piruvato/ L-Lactato	<i>lciD</i>
D- Aminoácido DH	2 – Oxoácido + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /Aminoácido	<i>dada</i>
Glucosa DH	Glucosa/gluconato	<i>gcd</i>
Succinato DH	Succinato/Fumarato	<i>sdhCDAB</i>
<i>Reductasa terminales</i>		
Quinol oxidasa bo3	O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	<i>cyoABCDE</i>
Quinol oxidasa bd	O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	<i>cydAB</i>
Quinol oxidasa III (Cyx)	O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	<i>appBC(= cyxAB)</i>
Nitrato reductasa A	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>narGHJI</i>
Nitrato reductasa Z	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>narZYWV</i>
Nitrato reductasa, periplásmica	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>napFDAGHBC</i>
Nitrito reductasa	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>nrfABCDEFG</i>
DMSO reductasa	DMSO / DMS	<i>dmsABC</i>
TMAO reductasa	TMAO / TMA	<i>torCAD</i>
Fumarato reductasa	Fumarato / succinato	<i>frdABCD</i>

Mediante experimentos en un quimiostato Becker *et al.* (1996) estudiaron los cambios en el patrón de expresión de los genes dependientes de FNR en función de la concentración de oxígeno constante en el medio. Entre los genes caracterizados con genes reporteros estuvieron: *frd-lacZ*, *sdh-lacZ* y *pfl-lacZ* que codifican para las enzimas fumarato reductasa, succinato deshidrogenasa,

y piruvato formato-lias respectivamente. A través de esta caracterización observaron que existen tres regiones de oxígeno disuelto en la que se puede clasificar este patrón de expresión (ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación del patrón de expresión de los genes dependientes de FNR. (Adaptada de Becker *et. al* 1996)

Ruta metabólica	Presión (mbar)	TOD %
Respiración Aerobia	> 5	> 9.2
Respiración Anaerobia	1-5	1.8 - 9.2
Fermentación	< 1	< 1.8

100 % TOD corresponden a 173.2 mbar de pO<sub>2</sub>.

En el crecimiento aerobio, las deshidrogenasas no acopladas son expresadas y utilizadas preferencialmente, sin embargo estas enzimas son incapaces de conservar la energía libre de la reacción redox que genera el gradiente de protones o “fuerza protón motriz”. Para utilizar la energía libre de las reacciones de oxido-reducción catalizadas por las deshidrogenasas, estas enzimas deben acoplarse al movimiento de protones a través de la membrana.

El intervalo de 1-5 mbar de O<sub>2</sub> (1.8-9.2% TOD), donde ocurre la llamada respiración anaerobia, representa el punto de transición entre la aerobiosis y anaerobiosis, momento en que existe una sustitución coordinada de enzimas entre ambas rutas metabólicas (por ejemplo entre succinato deshidrogenasa *sdh* y fumarato reductasa *frd*) (Figura 2). La presencia de un aceptor de electrones diferente de O<sub>2</sub> (nitrato, fumarato), así como el acoplamiento de las deshidrogenasas en estas condiciones energéticamente limitantes son esenciales para el funcionamiento de esta vía. Como se muestra en la Tabla 2, la fermentación comienza a estar presente a valores por debajo de pO<sub>2</sub> menor a 1 mbar (ca. 1.8 % TOD). En el caso de las respiraciones aerobia y anaerobia existe la presencia de un aceptor final de electrones, el cual le permite a la célula generar los equivalentes reductores. No obstante, en la fermentación es necesario producir los metabolitos que acepten estos electrones y permitan producir el poder reductor y así la formación de ATP.

El resultado neto de la oxidación de una mol de glucosa se puede observar en la siguiente ecuación:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



donde se producen 4 moles de ATP, 10 moles de NADH y 2 moles de FADH<sub>2</sub>. Si consideramos que los electrones de las coenzimas reducidas entran a la cadena fosforilativa obtendremos 3 moles de ATP/NADH<sub>2</sub> y 2 moles de ATP/FADH<sub>2</sub> resultando un total de 38 moles ATP por cada mol de glucosa (Lehninger, 1993a). En cambio en la fermentación (producción de láctico o etanol) solo se producen 2 moles de ATP/mol de glucosa, lo que denota la baja condición energética.

Una caracterización de la etapa fermentativa en *E. coli* fue realizada por Becker *et al.*, (1997) al estudiar los productos metabólicos de la fermentación tales como formato, acetato, etanol, lactato y succinato, en función de la pO<sub>2</sub>. Los autores plantean un parámetro que denominan pO<sub>0.5</sub> el cual representa el valor de la pO<sub>2</sub> en el que se reprime-regula la actividad de las enzimas (piruvato formato-liasa y alcohol deshidrogenasa, entre otras) al 50%. En la **Tabla 3** se observan los valores de pO<sub>0.5</sub> así como las concentraciones de los metabolitos. Estos valores se discutirán mas adelante con los obtenidos en este trabajo

**Tabla 3.** Productos de fermentación de *E.coli* bajo condiciones óxicas y anóxicas (Adaptada de Becker *et. al* 1997).

Producto o enzima	Productos (g/l)		pO <sub>0.5</sub> (mbar)	TOD (%)
	Crecimiento Oxico	Crecimiento Anóxico		
Acetato	0.18	0.37	0.3	0.6
Formato	0	0.41	1.0	1.8
Etanol	0	0.15	0.4	0.7
Lactato	0	0.06	0.2	0.4
Succinato	0	0.07	0.2	0.4
Piruvato	---	0	---	---
Piruvato formato-liasa ( <i>pfl</i> )*	---	---	5.0	9.2
Alcohol deshidrogenasa ( <i>adh</i> )*	---	---	0.8	1.5

\* Enzimas de la ruta fermentativa: evaluando su expresión en función de la pO<sub>2</sub>

Un componente importante en la ruta fermentativa es el CO<sub>2</sub>, ya que este metabolito se incorpora junto con fosfoenolpiruvato (PEP) para producir oxalacetato. El oxalacetato es precursor del aminoácido aspartato y por consiguiente componente de las proteínas. Dado que en la fermentación, el ciclo de Krebs se encuentra inactivo (principal productor de CO<sub>2</sub>), el CO<sub>2</sub> debe

TRABAJE CON  
FALLA DE ORIGEN

generarse por alguna ruta alterna por ejemplo, la disociación del fórmico, metabolito presente en la fermentación.

Hasta el momento se han descrito los efectos de concentraciones bajas de oxígeno sobre el metabolismo de *E.coli*, sin embargo es importante señalar que presiones o concentraciones elevadas de oxígeno así como también incrementos súbitos de oxígeno pueden causar estrés oxidativo dentro de las células, el cual conduce a la oxidación de proteínas específicas y secuencias nucleotídicas. No obstante, la bacteria posee mecanismos de acción en contra de especies reactivas de oxígeno (Konz *et al.*, 1998).

Como se mencionó anteriormente, la concentración de oxígeno disuelto (TOD) desempeña un papel importante para el estado fisiológico y/o metabólico de *E. coli*, y dicho estado es de especial interés a nivel bioproceso con cepas recombinantes en las que se requiere altos rendimientos del producto así como la calidad del mismo (por ejemplo pureza, características físicas del cuerpo de inclusión, etc.)

### **El oxígeno en los bioprocesos.**

Un problema encontrado ampliamente a nivel bioproceso con *E. coli* es la formación de ácido acético cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono (O'Beirne y Hamer, 2000). La formación de este compuesto puede originarse a partir de dos vías: la primera de ellas es el llamado "metabolismo de sobreflujo" (Xu *et al.*, 1999; Bylund *et al.*, 1998) representado en el esquema general de la **Figura 2**. El "sobreflujo metabólico", conocido también como "efecto Crabtree bacteriano", ocurre cuando el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) excede la capacidad oxidativa del ciclo de Krebs (TCA), así como también la formación de biomasa a partir de la glucosa consumida (Li *et al.*, 2000). Cabe señalar que bajo estas condiciones la bacteria se encuentra en la etapa de respiración aerobia donde no existe limitación de oxígeno disuelto ni de la fuente de carbono. A su vez, el otro mecanismo donde *E. coli* produce acético es la fermentación ácido-mixta (Xu *et al.*, 1999), sin embargo como se mostró en la **Tabla 3**, esta

TEXTO CON  
FALLA DE ORIGEN

especie no es la única presente en esta condición sino que también existe la formación de láctico, succínico, etanol y fórmico.

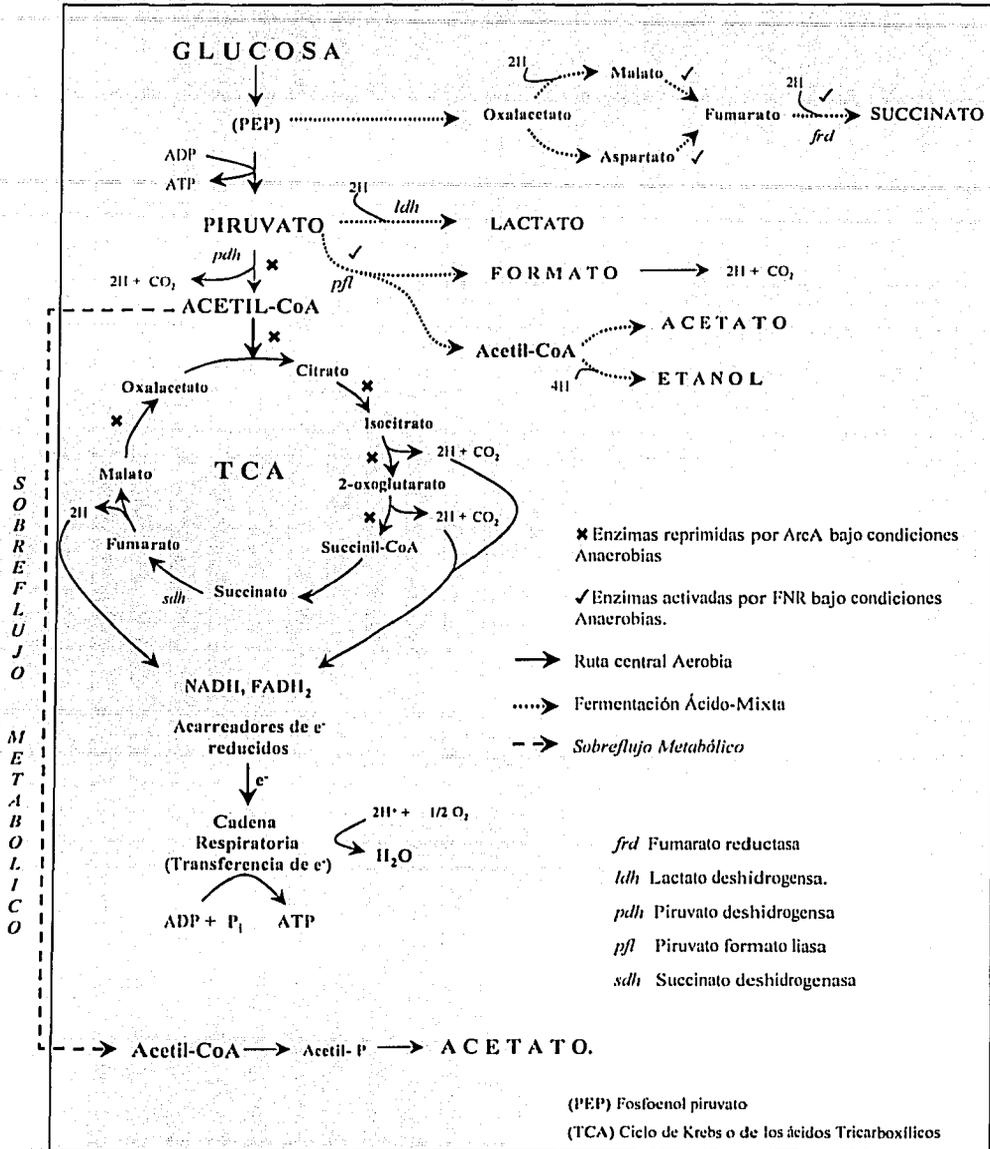


Figura 2.- Rutas metabólicas presentes en *Escherichia coli* direccionadas por oxígeno (Adaptada de Konz et al., 1998; Lehninger, 1993a).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Un efecto perjudicial de estas especies, considerado de mayor importancia que el desvío del carbono, es la toxicidad impuesta a la célula, tal y como lo demostraron Luli y Strohl (1990) al observar inhibición de crecimiento por acetato a concentraciones tan bajas como 30 mg/L, así como también una reducción en la productividad de proteína recombinante.

Uno de los mecanismos hipotéticos planteados para tal efecto es que la sal de acetato no iónica actúa como agente desacoplante para el transporte de protones a través de la membrana citoplasmática y dentro del citoplasma, debilitando así, la fuerza motriz de protones que es esencial para la fosforilación oxidativa y otros procesos endergónicos de la membrana. No obstante Rusell y Diez-Gonzalez (1998) proponen que este efecto inhibitorio resulta de la naturaleza lipofílica débil del ácido la cual le confiere la capacidad de cruzar la membrana, resultando así en una acumulación aniónica en el citoplasma y por ende modificando la homeostasis celular.

O'Beirne y Hamer (2000) encontraron que el crecimiento de *E.coli* cepa W3110 K-12 es inhibido a concentraciones de acetato menores a 1.25 g/L y que existe una utilización secuencial entre glucosa y acético adicionados como mezcla en el medio de cultivo, denotando un crecimiento diáuxico debido al cambio de sustratos. Por otro lado, Landwall y Holme, (1977) encontraron que *E.coli* B soportó hasta 20 g/l de acético sin inhibición, no obstante la inhibición se presentó cuando se combinaron acético, láctico, succínico, etc. y no solo por el acético, lo que denota que el comportamiento es cepa-dependiente con respecto a la inhibición.

El sobreflujo metabólico se presenta principalmente al inicio del cultivo dado que no existen limitaciones nutricionales, este fenómeno puede ser "fácilmente" controlado aplicando la técnica del cultivo alimentado (Liden, 2002; Yamane y Shimizu, 1984). Dicha técnica permite manipular distintos parámetros y de especial interés la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), misma que está directamente relacionada con la actividad metabólica (producción de acético). Majewski y Domach, (1990) establecieron que la velocidad de alimentación crítica es de  $\mu=0.3 \text{ h}^{-1}$ , valor por arriba del cual se comienza a formar acético. En cambio, Suárez y Kilikian (2000) establecieron que aún a  $\mu$  tan baja como  $0.05 \text{ h}^{-1}$  la síntesis de ácido acético no se suprime.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La aparición de las especies mencionadas en un bioproceso es indeseable, ya que finalmente representa una pérdida a nivel energético, donde los esqueletos de carbono procedentes de la glucosa se destinan a la formación de dichas especies que son importantes para la generación de energía necesaria para las funciones básicas de la bacteria, pero que impactan fuertemente el desarrollo del cultivo y resultan en pérdidas de rendimientos de los productos de interés sobre el sustrato.

Por otro lado, cuando se alcanzan altas concentraciones celulares las demandas nutricionales (oxígeno) de igual forma aumentan, por lo que existe la necesidad de aumentar el suministro para satisfacer la demanda y mantener un valor de la concentración de oxígeno que no limite el crecimiento y evite el flujo metabólico hacia la fermentación ácido-mixta.

#### Suministro y consumo de oxígeno.

En los cultivos aerobios, las células consumen el oxígeno que esta disuelto en el medio. Para que las moléculas de oxígeno procedentes del gas puedan estar disponibles (disueltas) en el medio de cultivo, deben vencer ciertas barreras difusionales ó en términos generales resistencias al transporte de masa. Esta trayectoria de las moléculas va desde el seno de la burbuja del gas, hasta el sitio de reacción o reconocimiento molecular. Las resistencias a vencer dependen de las condiciones hidrodinámicas, temperatura, actividad celular, fenómenos interfaciales, etc (Bailey y Ollis, 1986). La expresión matemática que representa la velocidad de transferencia de oxígeno esta dado por la ec. 1:

$$OTR = N_A = k_L a (C_g^* - C_L). \quad 1)$$

donde:  $N_A$  es la velocidad de transferencia de oxígeno por unidad de volumen, la cual es a su vez, una función de la fuerza motriz expresada como una diferencia de concentraciones ( $C_g^* - C_L$ ) de oxígeno y el  $k_L a$  ó coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno cuyo significado físico está relacionado con la capacidad del biorreactor para transferir oxígeno.

La velocidad a la cual el oxígeno es consumido por las células en un biorreactor determina la velocidad a la cual debe transferirse del gas al líquido (Doran, 1993). Dicho consumo o demanda está influenciado igualmente por varios factores como son: la especie celular, fase de crecimiento y la fuente de carbono utilizada. Matemáticamente, la velocidad de consumo la podemos expresar de la siguiente forma :

$$OUR = Q_{O_2} = q_{O_2} \cdot x \quad (2)$$

donde:  $Q_{O_2}$  y  $q_{O_2}$  son la velocidad volumétrica y específica de consumo de oxígeno respectivamente y  $x$  la concentración celular.

La velocidad específica de consumo ( $q_{O_2}$ ) depende también de la concentración de oxígeno en el medio ( $C_L$ ), siguiendo por lo general una cinética tipo Monod (Doran, 1998). Este modelo, análogo al de Michaelis Menten, plantea la existencia de un parámetro denominado concentración crítica de oxígeno ( $C_{crit}$ ). La  $C_{crit}$  representa el valor de la concentración de oxígeno por debajo del cual un parámetro en este caso  $q_{O_2}$ , mostrará una dependencia aproximadamente lineal, mientras que a valores mayores de  $C_L$  esta dependencia se pierde alcanzando un máximo asintóticamente.

Asumiendo un estado-estacionario, donde no existe acumulación y combinando las expresiones matemáticas para la transferencia y consumo de oxígeno obtenemos la ecuación global de transferencia de oxígeno (ec. 3), la cual es fundamental para el diseño de un bioproceso.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) - q_{O_2} \cdot x \quad (3)$$

En la ecuación 3 se puede observar que, para que no existan limitaciones de oxígeno, el término que representa a la transferencia de oxígeno u  $OTR$ , debe ser mayor o igual al término de consumo. Finalmente el objetivo es mantener la concentración de oxígeno  $C_L$  por arriba de la  $C_{crit}$  ya que esto garantizará que no existan cambios a nivel metabólico que repercutan negativamente el desarrollo del cultivo. Cabe señalar que dependiendo del modelo de estudio y de la función objetivo a evaluar (velocidad de crecimiento, concentración de biomasa, proteína recombinante, etc) los valores de las  $C_{crit}$  podrán ser diferentes.

***Escherichia coli*, sistema para la producción de proteínas recombinantes.**

La producción de proteínas basada en la tecnología de ADN recombinante ha sido objeto de gran interés industrial dada las posibilidades que representa en cuanto a la reducción de costos de producción (Bylund *et al.*, 2000). Sin duda alguna *E. coli* es y ha sido el principal vector para la expresión de proteínas recombinantes que no requieren modificaciones postraduccionales. Esto se debe a las ventajas inherentes que presenta sobre los otros sistemas de expresión, como son la alta velocidad para crecer, altas concentraciones celulares y de producto, así como medio de cultivo sencillo y barato. Por otro lado, el sistema presenta limitaciones para la expresión entre las que destacan la ineficiente producción de proteínas grandes y la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales (Palomares *et al.*, 2002). En general podemos clasificar a las proteínas recombinantes producidas a nivel industrial en 3 categorías como se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Principales categorías de proteínas recombinantes (Adaptada de Sawers y Jarsch, 1996).

Categoría	Prerrequisitos Cualitativos-Cuantitativos	Aplicación
1	Altos rendimientos Bajo costo Pureza no es un problema principal	Enzimas: ej. proteasas y lipasas para detergentes en polvo. Proteínas para procesamiento de alimentos o suplementos. Biocatalisis, ej. glucosa oxidasa.
2	Alta pureza Bajo costo Los rendimientos son menos críticos que la categoría 1	Enzimas y proteínas para diagnóstico in vivo, ej. colesterol oxidasa, glucosa deshidrogenasa ó penicilina G acilasa.
3	Muy alta calidad (pureza) Proceso compatible con los lineamientos de la FDA	Terapéuticos humanos, ej. activador de plasminógeno de tejido humano, insulina.

Diversos procesos deben considerarse para optimizar la sobre-expresión de proteínas recombinantes, entre los que destacan la estabilidad de los mRNA, la eficiencia de la traducción, la exactitud de la incorporación de aminoácidos, el plegamiento correcto de la proteína, la formación de agregados de proteínas insolubles (cuerpos de inclusión), la susceptibilidad a la proteólisis etc. (Sawers y Jarsch, 1996). Estas son características propias del diseño y construcción del vector (plásmido) así como de la proteína recombinante

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

expresada. A nivel operacional (biorreactor) uno de los parámetros de especial interés es la estabilidad del plásmido, la cual puede ser influenciada fuertemente por la velocidad de crecimiento del hospedero (Ryan y Parulekar, 1990), condiciones de aireación (Namdev *et al.*, 1992), composición del medio, etc.

En general se ha encontrado una relación inversa entre la velocidad de crecimiento y el número de copias del plásmido (Palomares *et al.* 2002) y la concentración de proteína recombinante (Ramírez *et al.*, 1994), aunque no necesariamente un alto número de copias garantizará una expresión adecuada del gene, ya que en algunos casos puede ser desventaja un exceso de material genético heterólogo para la célula (Ramírez *et al.*, 1994). Por lo tanto, debe encontrarse un equilibrio de las condiciones operacionales que por un lado permitan una adecuada amplificación del plásmido, y por el otro la máxima producción de proteína recombinante.

El estrés hidrodinámico es un factor adicional que se suma a la lista de condiciones que pueden afectar la expresión de proteínas recombinantes, la morfología y metabolismo de *E. coli*. Específicamente, en cepas recombinantes existen hipótesis las cuales establecen que la susceptibilidad al estrés aumenta por la expresión de la proteína heteróloga lo que da lugar a que las células presenten procesos de elongamiento e hinchamiento por lo que se sostiene las hace mas susceptibles. Por otro lado, esta bacteria es considerada como un microorganismo "poco susceptible" al estrés hidrodinámico, dada la estructura rígida de la pared celular, producto del entrecruzamiento del péptidoglicano, así como el tamaño mismo de la célula (Joshi *et al.*, 1996).

### Escalamiento

Una etapa fundamental dentro del desarrollo tecnológico de proteínas recombinantes es el *escalamiento* del bioproceso ya que es necesario en la industria biotecnológica para poder llevar al mercado el producto de interés (Galindo, 1996). El escalamiento ascendente, es la operación mediante la cual se traslada de un nivel menor (por ejemplo matraz) a uno mayor

(por ejemplo fermentador), es decir se trata de reproducir los resultados obtenidos a nivel laboratorio en un nivel industrial.

Escalar ascendentemente un bioproceso es una actividad dependiente de la elección de un criterio de escalamiento. Estos criterios son parámetros físicos relacionados con las variables de operación. Generalmente la elección del criterio de escalamiento se hace de manera empírica (Palomares y Ramírez, 2000). Entre los parámetros mas utilizados en el escalamiento ascendente están el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ), la potencia por unidad de volumen ( $P/V$ ) y la velocidad de punta del impulsor ( $ND$ ) (Einsele, 1978).

Un problema inherente al escalamiento ascendente es que únicamente se mantiene una variable constante mientras las demás cambian al pasar de una escala a otra, en otras palabras, existe una interdependencia entre los parámetros de escalamiento. Como consecuencia de tal limitación, el mezclado, la transferencia de masa y de calor, podrían no ser eficientes, por lo que el microorganismo experimentará diferentes microambientes al circular a través del biorreactor.

Los fermentadores a escala laboratorio pueden ser operados con una alta potencia, dado que no existen restricciones a nivel energético ni tampoco mecánico, situación que trae como consecuencia un mezclado ideal del medio de cultivo (en el caso de que el medio de cultivo muestre propiedades reológicas newtonianas) y una alta velocidad de transferencia de masa principalmente. Igualmente los fenómenos de transporte restantes también se desarrollan eficientemente. Una situación contraria se presenta en la escala industrial, en la cual la potencia suministrada al sistema está restringida por razones mecánicas y económicas, causando problemas de mezclado y transferencia de masa.

### Gradientes ambientales

Específicamente, al escalar una fermentación a volúmenes mayores se presentan invariablemente problemas de heterogeneidad y de gradientes en las variables ambientales mas

importantes. Entre las evidencias que sustentan la motivación para este estudio se encuentra lo encontrado por Manfredini *et al.*, (1983) así como Oosterhuis y Kossen, (1984). El primero de estos trabajos efectuó un estudio en un biorreactor de 112 m<sup>3</sup> con el objetivo de obtener una caracterización completa de las concentraciones de oxígeno disuelto y de temperatura a lo largo de los ejes axiales y radiales del biorreactor. El modelo estudiado fue *Streptomyces aureofacies*, cuyos cultivos exhiben características reológicas no newtonianas. Encontraron que en las posiciones de los electrodos evaluadas en el biorreactor no hubo diferencias en las mediciones en la dirección radial, en cambio axialmente existió un gradiente de ca. 40% TOD. El biorreactor fue operado a una potencia de 2.5 kW/m<sup>3</sup> y una velocidad de agitación variable, de 50 hasta 100 rpm, la velocidad de flujo del gas fue mantenida constante en sus experimentos, lo que resultó en un “holdup” de ca. 9%.

Para el caso de lo reportado por Oosterhuis y Kossen, (1984), los autores realizaron mediciones de igual forma de oxígeno disuelto en diferentes puntos o zonas de un biorreactor de 20 m<sup>3</sup>, utilizando simplemente agua. Encontraron que existe una distribución espacial de concentraciones de oxígeno disuelto tal y como se observa en la **Figura 3**. Las condiciones de operación al momento de las mediciones fueron de ca. 158 o 78 rpm constantes, variando la velocidad de aireación, la cual se reportó en unidades arbitrarias. Dichas mediciones fueron realizadas con el objetivo de establecer un modelo con el que se pudiera predecir la distribución espacial de las concentraciones de oxígeno disuelto, así como la capacidad global de transferencia de oxígeno como una función de la velocidad de agitación y el flujo de gas. Las concentraciones encontradas a lo largo del biorreactor variaron desde 22 % TOD hasta valores tan bajos como 3 % TOD, e incluso 0 % TOD en regiones alejadas de las zonas de descarga de los impulsores.

Como se mencionó en secciones anteriores, no solo se han tenido evidencias de la presencia de gradientes de oxígeno disuelto o temperatura, también se han encontrado distribuciones de pH (Amanullah *et al.* 2000), de concentración de sustratos alimentados (Xu *et al.*, 1999), y de dióxido de carbono disuelto (Ozturk, 1996; Garnier *et al.*, 1996), entre otras. Debido a tales gradientes, los microorganismos están sometidos a ambientes fluctuantes a lo largo de su recorrido dentro del biorreactor, pasando de zonas bien mezcladas a zonas mal mezcladas.

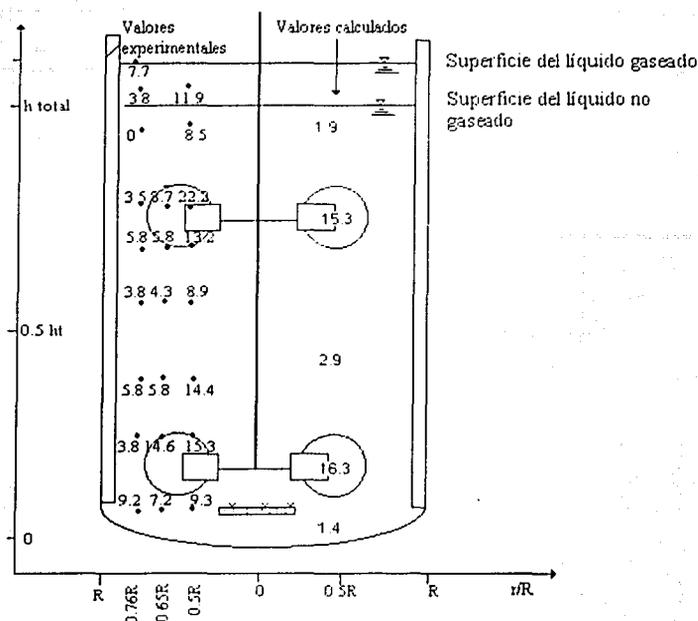


Figura 3. Gradientes de oxígeno disuelto en un tanque de  $25 \text{ m}^3$  (Oosterhuis y Kossen, 1984).

Aunado a estas evidencias experimentales, las cuales han servido como base para otra serie de líneas de investigación, en las que se encuentran los trabajos que predicen la presencia de gradientes a partir de simulación computacional o CFD ("computational fluid dynamics") (Bakker, 2000).

### Escalamiento Descendente

Los cultivos a gran escala de *E. coli* se caracterizan por alcanzar altas concentraciones celulares, resultando en una demanda elevada de  $\text{O}_2$ . Dada las propiedades fisicoquímicas del oxígeno (muy baja solubilidad), la posibilidad de que se generen gradientes de oxígeno es alta. Ante tal situación, la bioingeniería estableció la metodología del escalamiento descendente como una alternativa para hacer frente a la problemática que se genera en torno al

escalamiento ascendente. El concepto de escalamiento descendente (o "scale down" como comúnmente se refiere en inglés), se estableció desde los años 70's como una alternativa de mejora en los procesos existentes. Sin embargo, es hasta los años 80's cuando Oosterhuis, (1984) lo plantea como una metodología semiempírica con la que es posible generar estrategias que simulen a nivel laboratorio las condiciones prevalecientes a gran escala. A través de esta simulación es posible obtener información bajo condiciones que se asemejan a las reales pero sin la necesidad de realizar experimentos a gran escala, lo cual resultaría impráctico y costoso (Palomares y Ramírez, 2000).

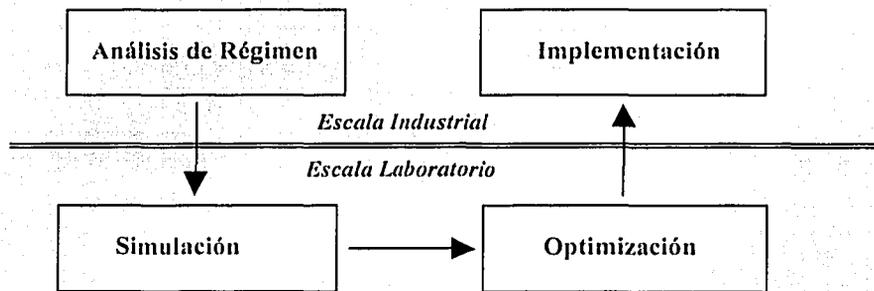


Figura 4.- Metodología del escalamiento descendente (Oosterhuis, 1984).

Como se observa en la **Figura 4** dicha metodología consta de 4 etapas:

1.-*Análisis de régimen.* Esta etapa en particular, como su nombre lo indica, consiste en analizar e identificar los mecanismos limitantes del bioproceso a gran escala mediante la comparación de tiempos característicos ( $t_{ca}$ ). Los  $t_{ca}$  son una medida de la velocidad con que se llevan cabo los diferentes subprocesos, ya sea de los fenómenos biológicos (consumo de oxígeno, adaptación de *E. coli* ante un cambio medio-ambiental, velocidad de crecimiento, etc) o de los fenómenos de transporte (transferencia de masa, calor y *momentum*). Un valor pequeño de  $t_{ca}$  indica un subproceso que se lleva a cabo rápidamente, en cambio un  $t_{ca}$  grande refleja un subproceso lento. Diversos subprocesos y los  $t_{ca}$ , así como su magnitud, pueden observarse en la **Figura 5**.

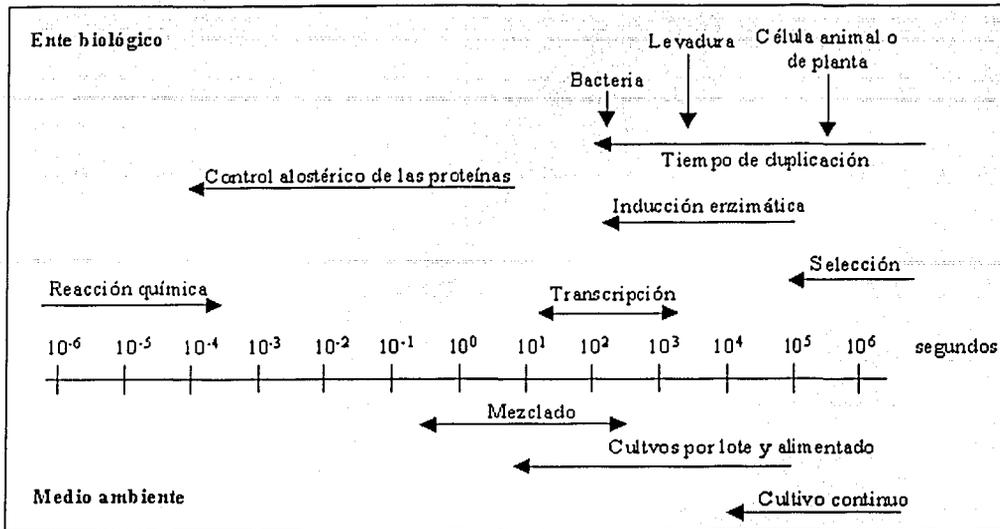


Figura 5.- Diversos subprocesos y orden de magnitud de sus tiempos característicos  
(Adaptado de Palomares y Ramírez, 2000)

Los  $t_{ca}$  pueden ser determinados teóricamente a partir de correlaciones existentes en la literatura o bien ser determinados experimentalmente. La **Tabla 5** muestra algunas de las correlaciones teóricas para tiempos característicos de fenómenos biológicos y de transporte.

Un claro ejemplo de este análisis de régimen es el realizado por Oosterhuis y Kossen (1984) en un biorreactor tipo tanque agitado. Los resultados de tal análisis se muestran en la **Tabla 6**. Las conclusiones más sobresalientes que se derivan de este estudio en particular son:

- Los tiempos característicos para el consumo y transferencia de oxígeno son del mismo orden de magnitud y por lo tanto una limitación puede ocurrir. De igual forma el tiempo de circulación del líquido es del mismo orden que los tiempos de consumo y transferencia de oxígeno por lo que es probable que ocurran gradientes.
- Es poco probable que el crecimiento y el consumo de sustrato afecten el desarrollo del proceso debido a que el orden de magnitud de sus  $t_{ca}$  supera al resto de los  $t_{ca}$  de los demás subprocesos.

Tabla 5.- Correlaciones de la literatura para determinar tiempos característicos (Serrato, 2002).

Tiempo característico	Abreviatura	Correlación	Referencia
Mezclado	$t_M$	$V/2.6ND^3$	Solà y Gòdia, 1994
Mezclado (columna burbujeada)	$t_M$	$L^2/0.36(gD^4v^3)^{1/3}$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Circulación	$t_c$	$t_M/4$	Feijen y Hofmeester, 1991
Transferencia de masa	$t_m$	$1/k_L a$	Feijen y Hofmeester, 1991
Crecimiento	$t_\mu$	$1/\mu$	Solà y Gòdia, 1994
Transferencia de calor	$t_{hr}$	$V\rho C_p/UA$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Difusión	$t_D$	$L^2/D_{eff}$	Solà y Gòdia, 1994
Consumo de oxígeno	$t_{oc}$	$C_{O_2}/q_{O_2} X$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Consumo de sustrato	$t_{sc}$	$C_{s_0}/q_s X$	Sweere <i>et al.</i> , 1987
Residencia del líquido	$\tau$	$V/F$	Solà y Gòdia, 1994
Residencia del gas	$\tau_G$	$\varepsilon(V/F)$	Solà y Gòdia, 1994

Tabla 6. Análisis de régimen de una fermentación de ácido glucónico de 19 m<sup>3</sup> (Oosterhuis, 1984).

Fenómeno físico.	Tiempo (s)
Transferencia de oxígeno	▲ 5.5 (no coalescente)—11.2 (coalescente)
Circulación de líquido	12.3
Transferencia de calor	330 – 650
Fenómeno biológico	
Consumo de oxígeno	♦ 16 (orden cero) -- 0.7 (primer orden)
Crecimiento	1.2 X 10 <sup>-4</sup>
Consumo de sustrato	5.5 X 10 <sup>-4</sup>
Generación de calor	350

▲ El tiempo de transferencia de oxígeno se calculó utilizando dos medios con propiedades diferentes: coalescente y no coalescente.

♦ El tiempo característico de consumo de oxígeno fue calculado a partir de una forma integrada de la ecuación de Michaelis Menten. Por lo tanto, para una cinética de orden cero suponen que  $S \geq K_s$  y primer orden si  $S < K_s$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- De la comparación de los tiempos de generación y transferencia de calor, es posible suponer que la transferencia de calor no será un problema a esta escala y que los gradientes de temperatura no deben presentarse debido a que el  $t_{ca}$  de circulación del líquido es relativamente menor que el tiempo característico de generación de calor.

Otros análisis de régimen se han realizado utilizando distintos modelos biológicos (levaduras, hongos, células animales), como por ejemplo el trabajo publicado por Sweere *et al.*, (1987) con *Saccharomyces cerevisiae* en una columna burbujeada. En dicho trabajo se concluye que existía una alta probabilidad de agotamiento de oxígeno así como también la formación de gradientes. Aunque estudios formales de análisis de régimen para *E. coli* no se encuentran en la literatura, resulta lógico pensar que dada las características inherentes del modelo como es el alto consumo de oxígeno y altas densidades celulares, se presentará la misma problemática que en los dos casos anteriormente descritos.

2.- *Simulación*. El mecanismo identificado como limitante del proceso en escala industrial se simula a nivel laboratorio. Es necesario señalar que la condición fundamental para llevar a cabo la simulación es que los tiempos característicos seleccionados deben ser constantes en ambas escalas.

3.- *Optimización y modelamiento*. En esta etapa se observa la respuesta del microorganismo en diversas condiciones que permitan generar modelos que describan de forma mas clara la dinámica microbiana. En esta etapa se seleccionan las mejores condiciones que lleven a optimizar la función objetivo.

4.- *Aplicación*. La etapa final del método de escalamiento descendente es la implementación de las condiciones optimizadas a los procesos de escala industrial.

#### **Tiempos de mezclado y circulación.**

Anteriormente se describió que una de las principales causas por la que los biorreactores

industriales son considerados como sistemas heterogéneos es por la ineficiencia en la operación de mezclado. Un parámetro útil para evaluar la eficiencia de esta operación es el tiempo de mezclado ( $t_M$ ), definido como el tiempo necesario para alcanzar un cierto grado de homogeneidad en el medio, generalmente cuando se alcanza un porcentaje  $\geq$  al 90% de la respuesta final (Doran, 1998). La metodología aplicada para la estimación experimental del tiempo de mezclado se basa en la inyección de trazadores como ácidos, bases, colorantes etc. y mediante sensores o electrodos se monitorea la concentración de dicho trazador en determinadas zonas del biorreactor. Sin embargo, algunos de los trazadores no pueden utilizarse para mediciones *in situ* por el daño que puede causar al microorganismo. Li *et al.*, (1990) desarrollaron un técnica para la medición del tiempo de mezclado *in situ* utilizando NADH y riboflavina como trazadores en cultivos de *Candida utilis*. El monitoreo se realizó mediante electrodos de fluorometría. A su vez, Pedersen *et al.*, (1994) emplearon un isótopo radiactivo ( $^{113m}\text{In}$ ) en fermentaciones de *Aspergillus oryzae* monitoreando la radiactividad emitida por el trazador en diferentes puntos del tanque. En la **Tabla 7** se muestra algunos valores de tiempos de mezclado determinados experimentalmente.

**Tabla 7.-** Tiempos de mezclado determinados experimentalmente.

Configuración	Volumen	Método utilizado	Valor estimado	Referencia
Tanque Agitado $\text{H}_2\text{O}$	15 L	Isótopo Radiactivo	> 5 s	Pedersen et al. 1994
Tanque Agitado <i>Candida utilis</i>	180 L	Fluorometría pH	12 s $\sigma$ 15-20% 12 s	Li et al. 1990
Tanque Agitado <i>Penicillium</i>	2.5 $\text{m}^3$ 80 $\text{m}^3$ 160 $\text{m}^3$	Isótopo Radiactivo	10 – 70 s	Jansen et al. 1978
Tanque Agitado $\text{H}_2\text{O}$	10.5 L	-----	8 s ( $t_c$ ) 2 s	Mukatata et al. 1980.

$\sigma$  Desviación estándar de la medición.

Otro parámetro que está íntimamente relacionado con el  $t_M$  es el tiempo de circulación ( $t_c$ ). El  $t_c$  es importante en el estudio de condiciones fluctuantes dado que provee un estimado del tiempo promedio que tarda una célula en circular a través de diferentes regiones del biorreactor y por lo tanto es un indicador del tiempo promedio en que un microorganismo permanece en diferentes condiciones de reacción a lo largo de su recorrido. Evidentemente la consideración de un solo tiempo de circulación en un tanque agitado es una aproximación conceptual, ya que

diferentes elementos del fluido que salen de la región de los impulsores seguirán diferentes trayectorias, resultando en diferentes tiempos de circulación. Es decir, existirá una distribución de tiempos de circulación (DTC). Esta distribución estará caracterizada por un tiempo de circulación promedio así como una desviación estándar.

Diversas correlaciones han sido propuestas para estimar tiempos de mezclado y circulación. Una de ellas relaciona ambos parámetros como se muestra en la siguiente ecuación:

$$tc_i = \frac{tM}{4} \quad (3)$$

esta correlación fue propuesta para un tanque agitado de geometría estándar y usando un medio de una sola fase (Doran, 1998; Luyben, 1993).

Anderson *et al.* (1982) reportaron para tanques agitados una correlación para tiempos de circulación, los cuales pueden ser estimados en función de la capacidad de bombeo de los impulsores ( $Q_i$ ) así como de las propiedades reológicas del fluido. La capacidad de bombeo fue estimada mediante la correlación de Norwood y Metzner para turbinas Rushton estándar de acuerdo a:

$$Q_i = 1.98 \times 10^{-2} N D_i^2 W \left[ \frac{D_i^{0.4}}{\eta} \right]^{0.5} (1-q^2)^{0.5} \quad (4)$$

donde:

$q$  = relación entre la velocidad angular de la punta del impulsor y la velocidad angular del impulsor.

El  $tc_i$  es estimado como la relación entre el volumen del tanque y la capacidad de bombeo de los impulsores:

$$tc_i = \frac{V}{Q_i} \quad (5)$$

A su vez, Sweere *et al.*, (1987) formularon una correlación para el  $tc_i$  en función de las dimensiones del tanque así como de la velocidad de agitación:

$$tc_i = \frac{V}{2H\pi^2 ND_i^2} \quad (6)$$

Para el caso específico del sistema de dos compartimentos Oosterhuis y Kossen (1985) propusieron una ecuación que relaciona el volumen de ambos sistemas y el flujo de intercambio entre ambos biorreactores, tal y como lo muestra la siguiente ecuación:

$$t_{c_i} = \frac{V_1 + V_2}{F} \dots\dots\dots(7)$$

### Simulación en el Escalamiento Descendente.

El interés del presente trabajo se centra en la etapa de simulación, misma que se basa en representar las variables espaciales (gradientes de oxígeno disuelto) mediante oscilaciones temporales (tiempo de circulación promedio).

Los simuladores para gradientes de TOD y algunas otras variables se clasifican en dos grupos: simuladores de un compartimento y dos compartimentos. El fundamento de ambos diseños está basado en la suposición de la existencia de dos zonas dentro del biorreactor:

- a) Una zona homogénea o de “micromezclado” donde se llevan a cabo procesos a nivel de torbellinos terminales (o “*eddies*”) controlados por la turbulencia del tanque de acuerdo a la hipótesis de Kolmogorov, así como también mecanismos de difusión molecular (Guillard y Trägårdh, 1993).
- b) Una zona “macromezclada”, controlada por el flujo convectivo dirigido por los impulsores. En esta zona pueden ocurrir condiciones limitantes cuando existe una combinación de factores como son el alto consumo de oxígeno por el cultivo y un alto  $t_{c_i}$  y/o baja transferencia de masa.

Los simuladores de un compartimento consisten de un tanque agitado o bien un reactor tipo *airlift* (Figura 6). La simulación de fluctuaciones de gas disuelto (oxígeno) en este tipo de modelos se lleva a cabo por medio de cambios, ya sea aleatorios como el que genera el método Monte Carlo (Namdev *et al.*, 1982; Yegneswaran y Gray, 1991), sinusoidales (De León, 1996; Serrato, 2002; Trujillo-Roldán, 2001), o cuadrados, en los gases de entrada. Tales cambios dan lugar a que cada punto de la curva o perfil describa un cambio en la presión y por lo tanto en la

concentración del gas disuelto como una función de tiempo. De ahí que cada punto representa una zona diferente en el biorreactor ó un elemento discretizado de un cultivo en su circulación a través de las regiones de micro y macromezclado.

Una desventaja de este tipo de configuración es su lenta respuesta dinámica (Palomares y Ramírez, 2000), especialmente en cultivos bacterianos en los que los tiempos característicos que limitan el proceso son muy cortos, situación que complica su simulación. Tal dinámica está regida principalmente por los fenómenos de transferencia (adsorción y/o desorción del gas para alcanzar un período determinado) así como retrasos hidráulicos (por ejemplo en la tubería del gas) o mecánicos (por ejemplo en los actuadores como válvulas o controladores de flujo másico).

Los simuladores de dos compartimentos, como lo denota su nombre, consisten de dos tanques agitados o la combinación de un tanque agitado y un reactor tipo pistón (Figura 6).

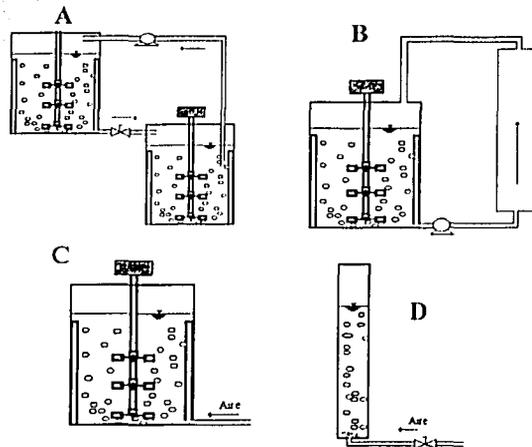


Figura 6.- Diseños de sistemas de uno y dos compartimentos. A. Dos tanques agitados interconectados, B. Tanque agitado y flujo pistón. C. Tanque agitado. D. Biorreactor tipo *airlift* (De León, 1996).

Los simuladores de dos compartimentos representan una alternativa para superar los problemas antes mencionados de los sistemas de un compartimento ya que la respuesta dinámica es mas rápida por ser función de la velocidad de recirculación entre ambos reactores (Oosterhuis y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Kossen, 1985). Tal configuración no solamente da lugar a la simulación de tiempos de circulación cortos sino que también a diversas distribuciones de tiempos de circulación, resultando en una aproximación más real a lo encontrado en reactores industriales. Un esquema particular para simular gradientes de oxígeno disuelto consiste en suministrar aire a uno de los reactores para representar la región bien mezclada, mientras el otro se mantiene en condiciones anaerobias mediante burbujeo de nitrógeno para simular zonas muertas.

Entre las desventajas de este tipo de sistemas están que las oscilaciones se dan como cambios escalonados debido a que se genera un perfil cuadrado. Otro aspecto importante es que el microorganismo puede experimentar altos esfuerzos de corte en los circuitos de recirculación, además que se requiere doble equipo comparado con los sistemas de un compartimento.

#### Estudios realizados con fluctuaciones de oxígeno

En la **Tabla 8** se presentan algunos de los trabajos reportados en la literatura que usan sistemas de un compartimento en diferentes modelos biológicos. Específicamente estudios con *E. coli* recombinante podemos destacar lo publicado por Namdev *et al.*, (1993) quienes utilizando la cepa DH5a/pUC19 la cual expresa  $\beta$ -galactosidasa y emplearon el método Monte Carlo cuyo algoritmo estaba programado para simular tiempos de circulación de 8 a 44 s. Encontraron que el plásmido no fue susceptible a inestabilidad segregacional bajo las condiciones probadas comparado con sus experimentos con aireación continua. El crecimiento, rendimiento celular y consumo de glucosa fue equivalente en todos los experimentos. Aunque los rendimientos y actividad de la proteína fueron similares, el número de copias del plásmido fue el doble en aireación continua sugiriendo que las condiciones de TOD pudieron afectar la replicación del plásmido.

De León (1996) diseñó y caracterizó un simulador de gradientes de oxígeno disuelto manipulado por un algoritmo de control PID el cual incluye una subrutina de *setpoint* variable (onda cuadrada o sinusoidal). El microorganismo utilizado fue la cepa *E. coli* JM101/pA102 productora de la enzima penicilino acilasa, dicha proteína requiere un procesamiento

postraducciona que involucra una translocación a periplasma para su posterior excreción al medio de cultivo (Ramírez *et al.*, 1994). El efecto de las oscilaciones se evaluó variando el eje de oscilación de 0.5 hasta 35 % TOD y amplitudes de 0.5 hasta 5% TOD, manteniendo el periodo constante a 400 s. Las oscilaciones de TOD mostraron que al aumentar el eje de 0.5 a 35%, la velocidad de crecimiento y el rendimiento celular incrementaron de 0.17 a 0.38 h<sup>-1</sup> y de 0.25 a 0.55 g/g respectivamente. En cambio la actividad específica de la enzima disminuyó de 0.17 a 0.09 U/g cel.

Tabla 8.- Estudios realizados en sistemas de un compartimento.

Método	Condiciones	Organismo	Resultados	Referencia
Fluctuaciones de presión parcial del gas en un tanque agitado.	E= 30 % TOD A= 7 % Ω = 120 s	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Reducción en un 30% de la vel. esp. de producción de penicilina	Vardar y Lilly, 1982.
Fluctuaciones de presión total en una columna burbujeada.	Presiones 1 a 6 atm Ω = 60 s - 600 s	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Al aumentar la TOD de 10 a 70 ppm el rendimiento celular y la vel. esp de crecimiento disminuyeron ca. 70%.	Kataoka <i>et al.</i> 1986
Cambios de flujo de gases (O <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> ) a la entrada de una biorreactor agitado, controlados por un algoritmo PID de control retroalimentado.	E= 35% TOD A= 25 % Ω = 160 s	<i>Aspergillus niger</i>	La producción de ác. glucónico se afectó hasta los 200 s de periodo.	Träger <i>et al.</i> 1991.
	E= 10% TOD A= 10 % Ω = 300, 600 y 1200 s	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Las oscilaciones no afectaron los rendimientos, ni el crecimiento, no obstante la act. específica de β-galactosidasa se redujo un 30%.	Cortés, 1995
	E= 3% TOD A= 3 % Ω = 1200, 2000 y 4000 s.	<i>Azotobacter vinelandi</i>	La amplitud evaluada determinó el peso molecular del alginato producido. La oscilación no afectó la cinética de crecimiento.	Trujillo-Roldán, 1999

E= Eje de oscilación, A=amplitud, Ω= periodo

Los estudios con sistemas de dos compartimentos han sido descritos en varias publicaciones en los cuales se evalúan los gradientes de TOD. Cabe mencionar que uno de los trabajos que anteceden este estudio es el realizado por Oosterhuis y Kossen (1985) dentro del contexto del escalamiento descendente. El sistema desarrollado consistía de dos tanques agitados, conectados por una bomba. Los volúmenes de trabajo fueron de 1.6 y 0.6 L. El biorreactor de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

menor volumen era mantenido por agitación a 20% TOD mientras que el de mayor volumen se gaseaba con nitrógeno hasta que bajara a 5 % de TOD antes de inocular. El modelo utilizado fue *Gluconobacter oxydans*. Los tiempos de circulación evaluados fueron desde 20 s hasta 120 s. Los resultados obtenidos mostraron que la producción de ácido glucónico se ve afectada conforme aumenta el  $t_{c_i}$ , reduciéndose un ca. 50%. Por lo tanto, concluyen que el tiempo de residencia en el compartimento aireado es importante así como el flujo del líquido que va del compartimento bien aireado al mal aireado ya que determina la cantidad de oxígeno que es transportada y la concentración actual en esa parte del sistema.

Amanullah *et al.* (1992) utilizaron un sistema muy similar al descrito anteriormente, los tiempos de circulación evaluados fueron entre 15 - 300 s. *Bacillus subtilis* fue utilizado como modelo de estudio debido a que presenta una respuesta interesante ante cambios de oxígeno disuelto, acetoína (Ac) se produce a niveles por arriba de 150 ppb mientras que butanodiol (Bu) se produce por debajo de 80 ppb. De tal forma que la relación Ac/Bu depende del suministro de oxígeno y puede ser usada como una medida del estado metabólico del microorganismo. Los resultados obtenidos mostraron que la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) disminuyen con un incremento en el tiempo de residencia en la zona estática, mientras que la velocidad de producción de Ac es máxima y no se produce Bu cuando el tiempo de residencia en el componente limitado por oxígeno es nulo.

Sweere *et al.* (1988b) utilizando levadura de panificación encontraron que el rendimiento celular disminuyó y la formación de ácido acético aumentó al incrementar el tiempo de circulación evaluado.

Los trabajos anteriormente descritos son hasta el momento los únicos que han sido publicado para el caso de sistemas de dos tanques agitados para simular gradientes de oxígeno. No obstante la combinación de tanque agitado con reactor tipo pistón utilizando *Escherichia coli* ha proporcionado información muy interesante sobre la respuesta metabólica de la bacteria.

Xu *et al.* (1999) estudiaron la dinámica de respuesta de un reactor de flujo pistón sin aireación encontrando que las células producen acético y fórmico dentro de un tiempo de exposición de

pocos segundos (54 s) bajo condiciones limitantes de oxígeno. Aunado a esto observaron que existe una reasimilación del 99.6% del láctico producido, 96.7% del acético producido y 90% del fórmico producido al regresar a la condición anaerobia. El 10% remanente del formato producido sirve como un buen indicador de la existencia de zonas limitantes de oxígeno en el biorreactor.

Hewitt *et al.* (2000) demostraron mediante citometría de flujo que un ambiente cambiante con respecto a la concentración de sustrato (glucosa y TOD) tiene un profundo efecto en la fisiología celular y en la viabilidad de la biomasa. Existe un cambio considerable en la viabilidad celular (del 20%), caracterizada por una despolarización y permeabilidad de la membrana celular. En este trabajo en particular encuentran que el porcentaje de biomasa viable incrementa con una disminución de la calidad del mezclado, dicho resultado puede ser debido a que una proporción de las células expuestas a condiciones limitantes, inducen respuestas regulatorias a estrés (por ejemplo la producción de moléculas de señalización, ppGpp ó cAMP) fenómeno conocido como “respuesta estricta”. Dicho fenómeno da lugar a la inhibición de la replicación de ADN, una síntesis estable de rRNA y por lo tanto a la producción de enzimas de estrés. Además, la actividad glicolítica y la síntesis de componentes estructurales son reducidos permitiendo a que esta proporción de células, también llamadas células “inactivas” sobrevivan en periodos de limitación de nutrientes.

Bylund *et al.* (2000) evaluaron los gradientes de glucosa en la producción de hormona de crecimiento humana (hGH) por *E. coli* recombinante, encontrando que las limitaciones de oxígeno en presencia de alta glucosa resultaron preferentemente en la formación de fórmico sobre la de ácido acético. Estas condiciones posiblemente redujeron la cantidad de proteasas que degradan el producto, por lo que la degradación del monómero rhGH disminuyó en el experimento donde se simularon los gradientes. El fórmico tuvo una relación directa con el ADN liberado al medio debido a la lisis celular (Castan y Enfors S.-O., 2001).

### Oscilaciones metabólicas en *Escherichia coli*.

El comportamiento anormal de una ruta regulatoria puede ser el resultado de las llamadas oscilaciones metabólicas, las cuales han sido reportadas para diferentes modelos biológicos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* y *Klebsiella pneumoniae*. Para el caso específico de *Escherichia coli* recombinante, Swartz (1995), demostró que dichas oscilaciones en el oxígeno disuelto son el resultado de cambios en la utilización de oxidasas terminales presentes en la cadena respiratoria, como lo es el pasar de citocromo oxidasa *o* (condiciones aerobias) a citocromo oxidasa *d* (condiciones anaerobias). En cambio, Weber y Kaiser (2000) reportaron que oscilaciones en la velocidad de consumo de oxígeno en un quimiostato fueron debidas a una acumulación repetida de metilglicoxal seguida de una adición de glucosa en exceso. Asimismo, Andersen *et al.* (2001) demuestran que una regulación incorrecta de la biosíntesis de isoleucina trae como consecuencia un fenómeno que denominan toxicidad por valina, encontrando que el comportamiento oscilatorio de la concentración de valina en el medio está directamente relacionada con las oscilaciones de oxígeno disuelto. Para dar explicación a dicho fenómeno, los autores suponen que en periodos de síntesis activa de proteína y por lo tanto de utilización de aminoácidos, la mayor parte de los intermediarios de carbono provenientes de la glucosa se incorporan como proteína, lo que reduce el consumo de oxígeno debido a la baja demanda para oxidar completamente la glucosa, esta reducción en el consumo da lugar a un aumento de la TOD. Sin embargo cuando algún aminoácido llega a ser limitante, la glucosa se oxida por lo que el consumo de oxígeno aumenta y la TOD disminuye, dando lugar al comportamiento oscilatorio.

Con base en los antecedentes descritos en el presente estudio, los cuales mostraron la importancia del oxígeno disuelto en la fisiología y el metabolismo de *Escherichia coli*, se planteó la siguiente "hipótesis". *Las condiciones fluctuantes de TOD, afectarán el metabolismo central y la productividad de Trp-LE proinsulina en E. coli recombinante. Las condiciones fluctuantes de TOD representan los gradientes de TOD que pueden presentarse en biorreactores de gran escala y que se pueden simular en una sistema modelo de escalamiento descendente de dos compartimentos.*

El desarrollar y aplicar estudios de escalamiento descendente constituye una actividad tecnológica importante y útil que permite predecir el comportamiento de distintos modelos biológicos en fermentadores de gran escala, en donde la experimentación es virtualmente imposible de realizar debido a los altos costos y/o inaccesibilidad de los equipos industriales.

## Capítulo 3 Objetivos

### Objetivo General

Estudiar el efecto de condiciones oscilantes de oxígeno disuelto en un sistema de dos compartimentos para simular gradientes espaciales presentes a gran escala utilizando como modelo de estudio *Escherichia coli* recombinante para la producción de la proteína Trp-LE proinsulina.

### Objetivos Específicos

Generar una estrategia de control de oxígeno disuelto para cultivos de la cepa W3110 *trp* + *pWplA* dadas sus características fisiológicas y/o metabólicas.

Diseñar y caracterizar un sistema de dos compartimentos interconectados, compuesto de dos tanques agitados, para simular gradientes de oxígeno disuelto que pueden presentarse en biorreactores de gran escala.

Estudiar el efecto de la tensión de oxígeno disuelto constante (0, 0.2, 1, 5, 10 y 20 % TOD) sobre la cinética de producción de Trp-LE proinsulina, consumo de glucosa y producción de ácidos orgánicos y etanol en cultivos por lote.

Evaluar el efecto del tiempo de circulación (7, 20, 50, 90 y 180 s) en el sistema desarrollado, sobre los mismos parámetros cinéticos evaluados en los cultivos constantes, estableciendo condiciones constantes de TOD menores a 1 % para el biorreactor anaerobio y de ca. 10% para el biorreactor aerobio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Capítulo 4 Materiales y Métodos

### Modelo Biológico

El estudio fue llevado a cabo con la cepa *Escherichia coli* W3110 *trp*<sup>+</sup> la cual fue transformada con el plásmido *pWpIA* de 4755 bps (Figura 7). Este plásmido contiene un gene que le confiere resistencia a tetraciclina y los genes estructurales del promotor de *trp* (*trp*-L y *trp*-E) siendo el Trp-LE una proteína de fusión que se inserta con el objetivo de proteger a la proteína de interés de la proteólisis intracelular. Esta proteína esta fusionada con el gene de proinsulina. La expresión de la proteína (Trp-LE proinsulina) esta regulada bajo el promotor *trp*, al cual se le eliminó el fragmento que corresponde a la atenuación, permitiendo que la represión por triptofano sea el único mecanismo de control del promotor (Olmos *et al.*, 1994). Las cepas W3110 *trp*<sup>-</sup> y W3110 (*wt*) fueron utilizadas en los experimentos para comparar el comportamiento de ceses transitorios en el consumo de oxígeno que ocurrían en algunas fases del cultivo.

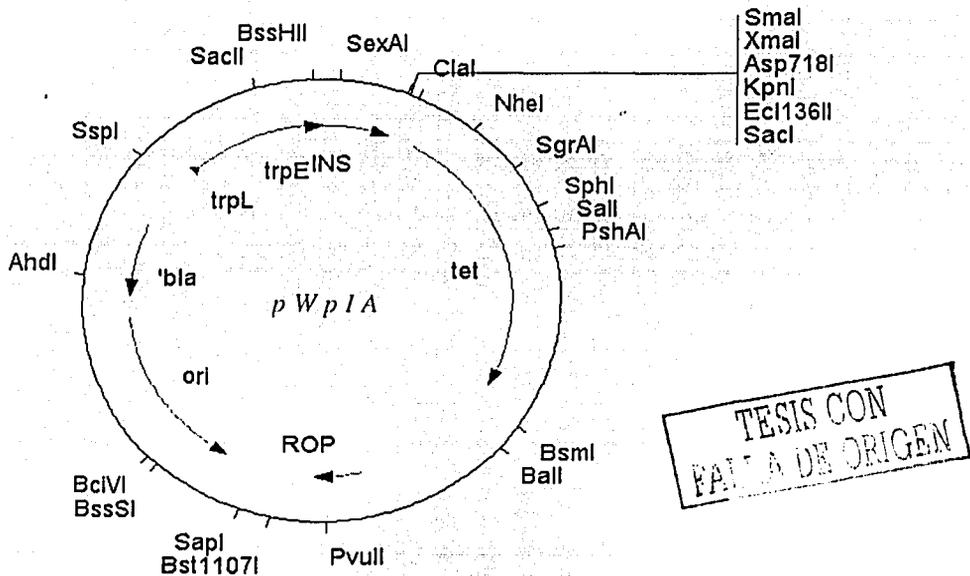


Figura 7.- Mapa genético del plásmido *pWpIA* (Olmos *et al.*, 1994)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Medios de cultivo.**

El medio de cultivo utilizado para los estudios en biorreactor contenía (por kilogramo de agua desionizada):  $K_2HPO_4$ , 3 g;  $Na_2HPO_4$ , 3 g; extracto de levadura, 5 g;  $(NH_4)_2HPO_4$ , 17 g; glucosa, 10 g;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 2 g; tetraciclina, 30 mg y sales traza 2 ml cuya composición contenía (por kilogramo de agua desionizada):  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 1 g;  $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$ , 1 g;  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ , 2 g;  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ , 27 g;  $ZnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 2 g;  $H_3BO_3$ , 0.5 g;  $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ , 2 g; HCl concentrado 100 ml.

El medio de cultivo utilizado para los inóculos contenía (por kilogramo de agua desionizada):  $K_2HPO_4$ , 3 g;  $Na_2HPO_4$ , 3 g; extracto de levadura, 5 g;  $(NH_4)_2HPO_4$ , 1.7 g; glucosa, 2 g;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 2 g; tetraciclina, 30 mg. La glucosa y el  $MgSO_4$  fueron esterilizados por separado, mientras que las sales traza y la tetraciclina fueron esterilizadas por filtración con membrana de 0.22  $\mu m$  de diámetro de poro. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 7.4 con NaOH 10 N previo a la esterilización por autoclave, la cual tuvo una duración de 20 minutos a 120°C.

Para el banco celular de trabajo, así como para la cuenta de viabilidad (UFC/ml) se utilizó medio Luria el cual contenía (por kilogramo de agua desionizada): NaCl, 10 g; bacto-triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; y tetraciclina 30 mg. Para el caso de las UFC/ml se adicionó además, bacto-agar, 15 g.

### **Conservación de la cepa.**

#### **Banco celular**

Una vez que la cepa silvestre fue transformada con el plásmido, se inocularon cajas petri en medio Luria, incubadas a 37°C para asegurar la inserción del plásmido por parte del hospedero. Posteriormente se tomó una colonia y se propagó en medio Luria líquido por ca. 5 h hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de ca. 1, leída a 600 nm e incubadas a 300 rpm y 37°C. A

partir de este cultivo se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ l y se colocaron en tubos de conservación de 2 ml, más 500  $\mu$ l de una solución de glicerol al 50%. Inmediatamente se congelaron los tubos y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$

### **Inóculos**

El contenido total de un criovial de conservación (ca. 1 ml), previamente descongelado, fue vertido en un volumen equivalente al 10% del volumen total a utilizarse en el experimento, siendo matraces Erlenmeyer de 250 ml para los cultivos a TOD constante y de 500 ml para los cultivos a TOD oscilante. Los matraces se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 300 rpm hasta alcanzar una DO de ca. 3.5 para su posterior inoculación al biorreactor.

### **Muestreo**

Se tomaron muestras de 2 a 3 ml de las cuales se retiró una alícuota de 1 ml que se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de glucosa y los perfiles de ácidos orgánicos y etanol. El resto de la muestra original se destinó para los análisis de proteína total y proteína recombinante.

### **Métodos Analíticos.**

#### **Cuantificación de biomasa y viabilidad.**

El crecimiento celular fue monitoreado como densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) y su conversión a peso seco (g/L) se realizó correlacionando con un factor (0.32) anteriormente calculado. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se obtuvieron mediante diluciones exponenciales en solución salina y siembra en cajas petri con agar y medio Luria.

**Cuantificación de glucosa.**

La cuantificación de glucosa se realizó mediante un multianalizador enzimático YSI modelo 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Spring Instrument Co. Inc).

**Cuantificación de proteína total por Bradford.**

Las muestras de fermentación se prepararon de acuerdo al siguiente protocolo:

1.- Se realizó un primer lavado con solución isotónica NaCl 0.85%, de acuerdo a la **Tabla 9**.

**Tabla 9.-** Primera dilución de las muestras de fermentación.

DO (Muestra)	Dilución	Vol. Sol. Isotónica(μl)	Vol. Muestra (μl)
0 a 2	Sin Dilución	0	300
> 2	1/10	270	30

Una vez que se resuspendieron las muestras, se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante. Nuevamente se realizó un segundo lavado con solución isotónica siguiendo el mismo protocolo. Una vez descartado el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en agua desionizada. La siguiente etapa fue el rompimiento celular mediante sonicación a 30% de amplitud en un sonicador (Vibracell, Sonics & Material Inc). El tiempo de sonicación estuvo en función de la densidad celular como se observa en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.-** Tiempo de sonicación de las muestras de fermentación

DO (Muestra)	Tiempo (s)
0 a 5	1 pulso de 5
> 2	2 pulsos de 7
> 40 a 120	2 pulsos de 10

Después de sonicar las muestras, se realizó una segunda dilución previa a la adición del reactivo de Bradford de acuerdo a la **Tabla 11**.

Tabla 11.- Segunda dilución de las muestras de fermentación

DO (Muestra)	Dilución	Vol. ( $\mu$ l) NaCl 150 mM	Vol. ( $\mu$ l) (Muestra)	Dilución Final
0 a 2	Sin Dilución	0	100	1 / 10
> 2 - 15	Sin Dilución	270	100	1 / 100

Después de la segunda dilución se adicionó 0.9 ml del reactivo Bradford a cada muestra. El tiempo de reacción fue de 5 minutos, inmediatamente después de este tiempo las muestras leyeron a 595 nm. Una vez obtenidos los valores de absorbancia se calcularon las concentraciones de proteína de acuerdo a una curva estándar generada con albúmina bovina (anexo I).

Nota: Es importante señalar que todos los valores de proteína total que se reportan en este trabajo son referidos a albúmina bovina como estándar relativo, por lo que tales valores involucran un cierto grado de incertidumbre dadas las limitaciones del método como lo son: composición de la proteína estándar utilizada (Rosenberg *et al.*, 1996), para el caso de la albúmina, esta proteína está caracterizada por tener una alta capacidad de unión al colorante así como la incapacidad del método para detectar proteínas con peso molecular mayor a 3-5 kDa (Eastwood *et al.*, 1995).

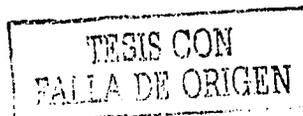
### Identificación y cuantificación de proteína recombinante.

La separación e identificación de las proteínas contenidas en las muestras de fermentación fue hecha mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%.

#### *Preparación de las muestras para electroforesis*

A partir de las muestras de la fermentación se tomó un volumen necesario para procesar el mismo número de células en cada muestra, esto se realizó de la siguiente forma:

$$\text{Volumen de muestra (ml)} = 0.3 / \text{DO (600 nm)}$$



El valor de 0.3 es un número determinado anteriormente, con el cual se asegura una resolución aceptable en el gel (SDS-PAGE) de la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

Los volúmenes correspondientes de cada una de las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 min y se retiró el sobrenadante, posteriormente se resuspendieron las células en 25  $\mu$ l de agua desionizada mas 25  $\mu$ l de buffer Laemli 2X. Las muestras se sonicaron con 2 pulsos de 7 segundos cada uno, usando el mismo equipo descrito en la sección anterior. La etapa final del protocolo, establece que es necesario hervir las muestras durante 5 min, sin embargo en experimentos preclimares no se observó diferencia entre muestras sin hervir y hervidas, por lo que los geles se realizaron sin hervir las muestras.

#### *Cuantificación de la proteína recombinante por densitometría.*

La cuantificación de la proteína recombinante se realizó mediante densitometría por medio del programa NIH image. Este programa permite comparar el *área* delimitada por la proteína de interés en cada uno de los carriles en una imagen digitalizada (píxeles) del gel, así como también la *intensidad* de dicha área. El producto de *área* • *intensidad* es el factor mediante el cual se correlacionó la concentración conocida del estándar de cuantificación, así como el de las muestras de cuya concentración de proteína recombinante se desconocía. Se utilizó como estándar de cuantificación una proteína de concentración conocida (anhidrasa carbónica bovina) (Amersham Pharmacia Biotech), cuyo peso molecular (ca.28.5 KDa) es muy similar a la proteína recombinante (ca. 28.1 KDa), así como también el porcentaje de aminoácidos de cadena lateral catiónica (por ejemplo, lisina y arginina) que interactúan con la cadena sulfonada aniónica del colorante (Coomassie Brilliant Blue R-250) (Eastwood *et al.*, 1995). Los porcentajes de tales aminoácidos calculados de la secuencia para cada proteína, fueron 10.5 % para el Trp-LE proinsulina y 9.2 % para la anhidrasa carbónica bovina. La secuencia de las proteínas se muestran en el **anexo II**.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Cuantificación de ácidos orgánicos y etanol.

La cuantificación de ácidos orgánicos y etanol se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) usando una columna de intercambio iónico (7.8 x 300 mm AMINEX-BIORAD, 125-0140) a 50°C, acoplada a dos detectores conectados en serie, fotoarreglo de diodos (WATERS, 996) y un refractómetro diferencial (WATERS 410). El detector de fotoarreglo de diodos permitió cuantificar y verificar la pureza de los picos separados. La cuantificación fue realizada extrayendo el cromatograma a 210 nm. El refractómetro se usó debido a que existen reportes en la literatura donde es utilizado para detectar glucosa, acetato y etanol. Sin embargo en ambos detectores fue posible cuantificar los estándares, así como las muestras de la fermentación. Como estándares se utilizaron los ácidos succínico, láctico, fórmico y acético de concentración conocida, con los cuales se generaron las curvas mostradas en el **anexo I** y mediante las cuales se obtuvieron la concentración de los ácidos orgánicos en las muestras al correlacionarlas con el área de las curvas estándar. Los ácidos orgánicos fueron separados usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvil a un flujo constante de 0.5 ml/min. Tal y como se describió en los antecedentes, el etanol es otro subproducto importante de la fermentación, sin embargo no se detectó en ninguna de las muestras.

### Diseño del simulador.

#### Sistema de dos compartimentos

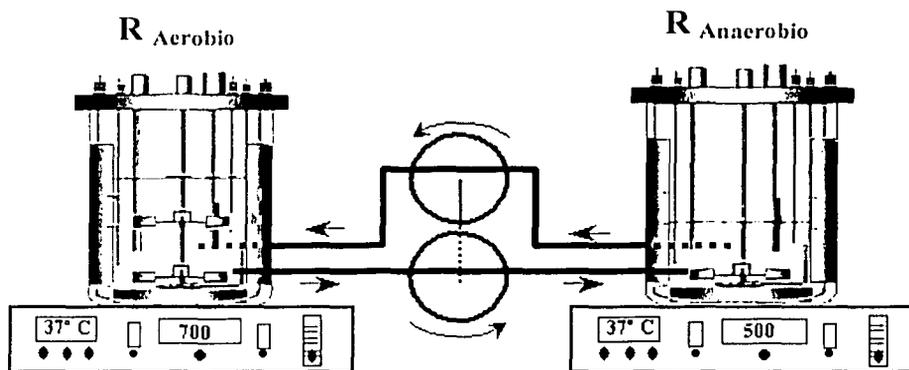
El simulador está compuesto por dos tanques agitados Virtis, uno aerobio ( $R_{\text{aerobio}}$ ) y uno anaerobio ( $R_{\text{anaerobio}}$ ) (Gardiner, NY), instrumentados e interconectados por medio de una bomba peristáltica (Masterflex mod. 7592-40), doble cabezal tipo "easy load" (Masterflex, mod 77601-10) y tubería de neopreno (Masterflex 06402-82). Este tipo de tubería presenta una permeabilidad a oxígeno de 200 cc x cm/cm<sup>2</sup> s cm Hg, un diámetro interno de 12.7 mm y un flujo de operación máximo de 13 LPM (Cole Parmer, 2000) (**Figura 8**). Los volúmenes de operación utilizados en ambos biorreactores fueron de ca 350 ( $R_{\text{aerobio}}$ ) y 700 ml ( $R_{\text{anaerobio}}$ )

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

respectivamente y un volumen muerto en la tubería de ca 50 ml. El esquema del arreglo experimental se muestra en la **Figura 8**.

Cada uno de los biorreactores fue equipado con dos turbinas Rushton ( $D_i/D = 0.5$ ) de seis paletas planas, la aireación fue mediante burbujeo, sin embargo el tipo de difusor fue diferente para cada biorreactor. En  $R_{\text{aerobio}}$  se empleó un difusor de punta de 5 orificios de ca. 1 mm de diámetro, mientras que  $R_{\text{anaerobio}}$  fue aireado con 2 difusores de tipo sinterizado.

Por medio de la bomba fue posible manipular el flujo en el sistema, dando lugar a la simulación de los tiempos de circulación del cultivo ( $t_{c_i}$ ).



**Figura 8.-** Sistema experimental de dos compartimentos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El diseño de entradas y salidas por donde se intercambió el medio de cultivo fue mediante la adaptación de dos conectores por cada jarra con un espaciado de  $180^\circ$  y a una altura de 3 cm con respecto al fondo del tanque como se muestra en la **Figura 9**.

El biorreactor  $R_{\text{aerobio}}$ , el cual simuló la zona bien mezclada, se conectó a un sistema de control y adquisición de datos. Dicho sistema consiste de una computadora Macintosh II VX, la cual recibe las señales amplificadas provenientes de los electrodos de TOD y pH vía una tarjeta de interfase MacADIOS A/D & D/A. Los valores de los porcentajes de los flujos de gases, la TOD

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y el pH fueron almacenadas en el disco duro, controlados y mostrados en línea usando un programa escrito en Microsoft QuickBasic mediante un algoritmo retroalimentado de tipo proporcional-integral-derivativo (PID) el cual manipula la apertura de los controladores de flujo másico para  $O_2$  y  $N_2$  para mantener la TOD en un valor constante. Por otro lado, al biorreactor  $R_{anaerobio}$  solo se le burbujó nitrógeno y solo se adquirió la respuesta del electrodo de TOD, lo que dio lugar a la simulación de una zona mal mezclada. El control del pH fue mediante una subrutina automática de “prendido/apagado” ejecutada por el amplificador de pH. El valor del pH fue ajustado a 7.3 con NaOH 2 N para todos los cultivos. El sistema fue inoculado con 10% (v/v) del volumen final.

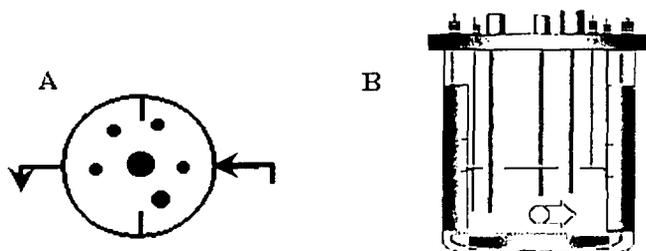


Figura 9.- Vistas superior A) y lateral B) de los fermentadores.

Las condiciones de operación de los biorreactores fueron:

Tabla 12.- Parámetros operacionales de los biorreactores en el sistema de 2 compartimentos.

Parámetro	Biorreactor $R_{aerobio}$	Biorreactor $R_{anaerobio}$
Agitación (rpm)	500 constantes	600 – 750 variable
Aireación (vvm)	1	1 – 1.5
T (°C)	37	37
Gases	Oxígeno / Nitrógeno	Nitrógeno

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los tiempos de circulación simulados en el sistema de dos compartimentos, así como también el flujo aproximado al cual fue operada la bomba se muestran en la **Tabla 13**. Estos flujos fueron calculados según la **ecuación 7**.

**Tabla 13.-** Tiempos de circulación simulados y flujos de la bomba utilizados.

$t_{c_j}$	Flujo (L/min)
7	9.43
20	3.3
50	1.32
90	0.73
180	0.36

El flujo fue calculado en función del volumen utilizado

Para mantener los volúmenes constantes en cada uno de los biorreactores se adaptaron abrazaderas de precisión en la tubería de salida de los biorreactores con la finalidad de regular el flujo y así poder establecer los volúmenes deseados.

La adición de antiespumante al medio, fue realizada de forma manual según lo demandaba el cultivo. La frecuencia y el volumen en la toma de muestra fue descrita anteriormente, sin embargo el muestreo en el sistema de dos compartimentos fue realizado en el compartimento aerobio.

### Cultivos Constantes y Recirculados

Los cultivos a TOD constante (0, 0.2, 1, 5, 10 y 20 %), fueron realizados en un solo biorreactor ( $R_{aerobio}$ ), el cual se conectó al sistema de control y adquisición de datos con los mismos parámetros operacionales tal y como se mostró en la **Tabla 12**. El volumen de trabajo para estos cultivos fue de 500 ml.

Para el caso de los cultivos recirculados realizados para probar el efecto del estrés hidrodinámico generado en los cabezales de las bombas, se adaptó un segmento (ca. 65 cm) de tubería que unía los conectores (**Figura 9**) del biorreactor  $R_{aerobio}$ . De forma tal que el medio de cultivo controlado a 20 % TOD, se hacía recircular continuamente al mismo biorreactor después

de pasar por el cabezal de la bomba. La condición ensayada en este sistema fue la que simularía un  $t_c$  de 5 s, siendo ésta la condición más drástica (flujo 6 L/min) a las que se someterían las células.

### Consideraciones matemáticas

*Determinación de la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo de glucosa y velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos.*

Los cálculos que se muestran en el presente estudio se realizaron utilizando la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). La  $\mu$  fue determinada en la fase de crecimiento exponencial, donde:

$$\frac{dX_T}{dt} = (\mu) X_T$$

Integrando:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t$$

donde X y  $X_0$  son la concentración de células totales al tiempo t y al inicio del cultivo, respectivamente. La  $\mu$  se calculó a través de la regresión lineal obtenida de la gráfica de  $\ln(X/X_0)$  contra tiempo.

Los coeficientes metabólicos de glucosa y ácidos orgánicos se determinaron mediante la ecuación:

$$q_i = \frac{\mu}{Y}$$

donde Y es el rendimiento de células totales con respecto al metabolito de interés, y se calculó como la pendiente de la regresión lineal (en fase exponencial de crecimiento) entre la concentración de células totales y el metabolito "i".

## Capítulo 5 Resultados y Discusiones

Los resultados del presente estudio serán mostrados, comenzando con el análisis de los cultivos control a TOD constante. Posteriormente se mostrará la caracterización del sistema de dos compartimentos así como la evaluación de una de las limitaciones potenciales de los sistemas de dos compartimentos como lo es, los esfuerzos de corte encontrados en los cabezales de la bomba y tuberías de recirculación del medio. Una vez abordados estos puntos, se mostrarán y analizarán los resultados del efecto de las oscilaciones sobre las cinéticas de crecimiento, producción de proteína recombinante, y la respuesta metabólica de las células. Finalmente se hará una breve descripción del comportamiento peculiar encontrado en nuestro modelo de estudio con respecto a ceses transitorios en el consumo de oxígeno

### Cultivos a TOD constante.

Los cultivos a TOD constante se llevaron a cabo con el objetivo de evaluar el comportamiento cinético del modelo biológico de estudio en función de la TOD. Tal comportamiento se ajustó a un modelo matemático tipo Monod con el que se obtuvo un valor estimado de la constante de saturación para TOD ( $K_{O_2}$ ). Para estos cultivos a TOD constante, se calcularon diversos parámetros cinéticos (rendimientos, velocidades específicas de consumo y producción, etc.) con los cuales fue posible establecer la base comparativa contra los cultivos oscilados en el sistema de dos compartimentos. Los valores de TOD evaluados fueron: 0, 0.2, 1, 5, 10 y 20 % TOD. En la **Figura 10** se muestra el perfil cinético típico de un cultivo a 20 % TOD. Los resultados para cada uno de los cultivos realizados a TOD constantes se encuentran en el **anexo III**. En la **Figura 10-A** se presenta el control de oxígeno disuelto y pH. Nótese que, la TOD presentó perturbaciones en la etapa exponencial temprana. Este comportamiento se describirá posteriormente en la sección de control de la TOD. Para el caso del pH se controló a ca. 7.3, sin embargo se observa una pequeña elevación entre las 6 y 7 horas del cultivo. Este comportamiento fue muy frecuente en los cultivos restantes (**anexo III**) debido a que se trató de minimizar la adición de antiespumante al medio dando lugar a una acumulación de una capa de espuma en todo el espacio de cabeza del biorreactor, situación que evitaba que la base (NaOH

2N) llegara directamente al medio de cultivo. La elevación subsecuente del pH es señal del agotamiento de la glucosa así como el consumo de acetato alrededor de las 9 horas.

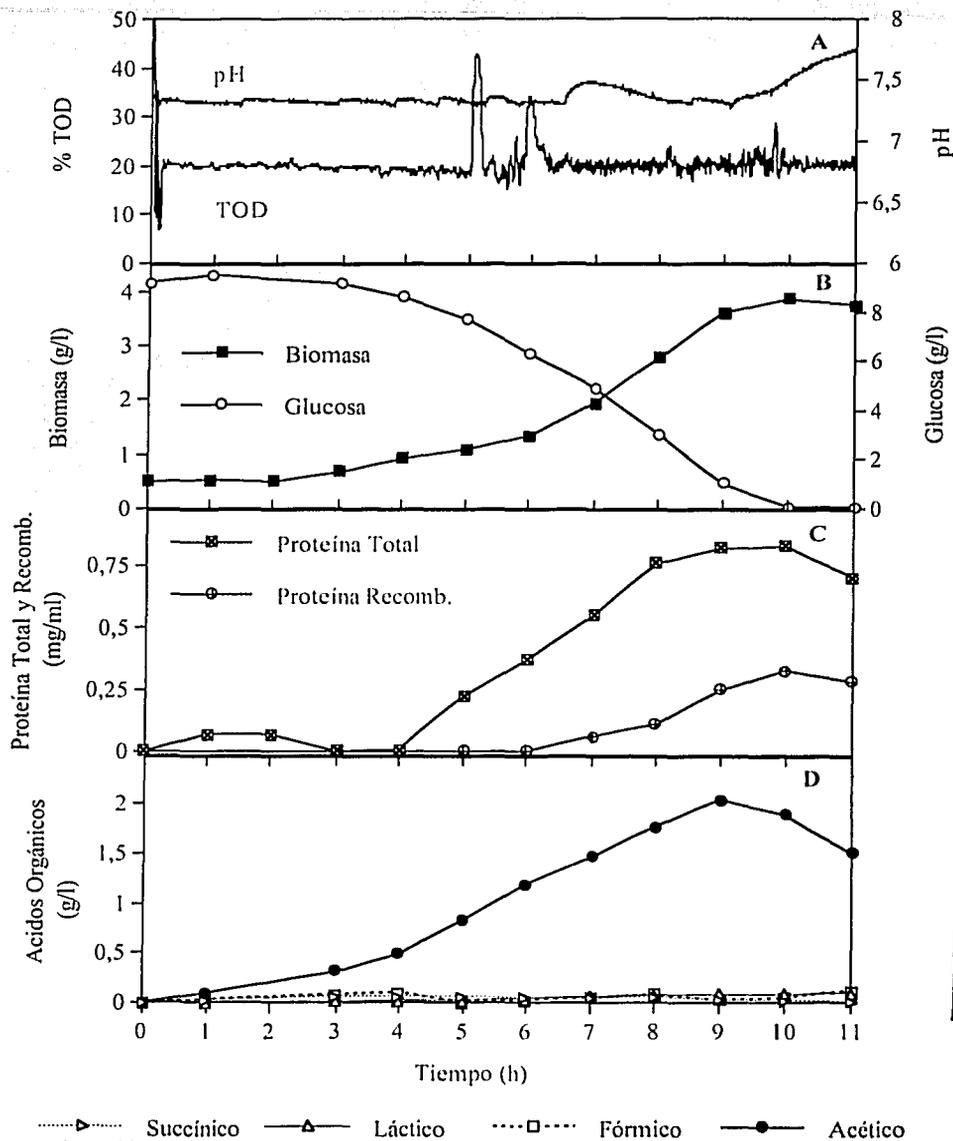


Figura 10.- Perfil cinético típico de un cultivo a 20 % TOD constante.

La **Figura 10-B** muestra la cinética de crecimiento. La fase lag de los cultivos sin limitaciones de TOD fue de ca. 2 h, al término de la fase exponencial se alcanzó una concentración celular máxima de 3.8 g/L, mientras que la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu$  máx) fue de 0.37 h<sup>-1</sup>. En la misma figura se muestra la concentración de glucosa la cual se agota alrededor de la hora 9 del cultivo. La velocidad específica de consumo máxima de glucosa estimada fue de ca. 0.85 g glucosa/g célula h en la fase exponencial del cultivo.

En lo que respecta a la producción de proteína total y recombinante las concentraciones máximas alcanzados fueron ca. 0.83 mg/ml y 0.32 mg/ml, respectivamente (**Figura 10-C**). Ambos máximos se obtuvieron alrededor de las 9 h, sin embargo la producción de proteína recombinante se inicia alrededor de las 6 h de cultivo, momento en el cual la concentración de triptofano debió agotarse. Aunque no se realizaron mediciones de triptofano lo anterior se puede suponer ya que en el vector empleado, la expresión del gen heterólogo se induce al agotarse el triptofano. Después de las 10 h se notó una ligera disminución de la proteína recombinante debido posiblemente a proteólisis intracelular (Shen, 1984).

Si consideramos la composición molecular promedio de *Escherichia coli*, la proteína ocupa un ca. 55 % el peso seco de la misma (Neidhardt *et al.*, 1996), por lo que al comparar los datos en la **Figura 10-C**, se observa que el máximo obtenido de proteína total solo es un ca. 23 % del valor de biomasa a las 9 horas del cultivo (**Figura 10-B**). Esta discrepancia en los porcentajes puede atribuirse a la nota referida en la sección de Materiales y Métodos ya que si observamos la curva estándar realizada con IgG (**anexo I**) la ecuación por la cual se correlaciona la absorbancia resulta ca. el doble que con BSA, dado lo anterior estos valores de proteína total son relativos dependiendo del estándar utilizado. Una ecuación que integra ambas concentraciones de proteínas estándar se muestra en el **anexo I**. De tal forma, los datos referidos a IgG muestran que el % de proteína total fluctuó entre 45 y 50 %, intervalo consistente con el comúnmente reportado (Neidhardt *et al.*, 1996).

Los ácidos orgánicos cuantificados (succínico, láctico, fórmico y acético), se muestran en la **Figura 10-D**. Las cuatro especies fueron detectadas en cultivos a 20 % TOD, sin embargo la especie que se encontró en mayor proporción tal y como muestra la **Figura 10-D** fue el acético. La producción para el resto de los ácidos cuantificados fue prácticamente nula, comportamiento que coincide con lo reportado por Becker *et al.* (1997). El acético encontrado es producto del llamado “sobreflujo metabólico” en condiciones no limitantes de TOD (Xu *et al.*, 1999). Al momento del agotamiento de la glucosa (9 h) el ácido acético llega a su máxima concentración para después ser consumido por la células. Este comportamiento ha sido descrito anteriormente (Xu *et al.*, 1999), aunque a diferencia de otros reportes (O’Beirne y Hamer, 2000) no existió aumento en la concentración de biomasa.

En la **Figura 11** se muestra una cinética típica a 0.2 %, siendo la condición a TOD constante más limitante donde existió crecimiento. Entre las diferencias más relevantes de la cinética a 0.2 % TOD con la de 20 % TOD (**Figura 10**) se encuentran las siguientes: la fase lag duró ca. 17 h, la concentración celular solo alcanzó 1.33 g/L y la  $\mu$  máxima fue de 0.18 h<sup>-1</sup> (**Figura 11-B**). En cuanto al perfil de glucosa se observa que en la fase lag (0 – 17 h) existe una ligera caída de ca. 2 g/L en la concentración indicativo del estado latente del cultivo y de un consumo de fuente de carbono destinado a energía de mantenimiento. La producción de proteína recombinante, como se observa en la **Figura 11-C** fue prácticamente nula. En cuanto a la producción de ácidos orgánicos (**Figura 11-D**) fue posible detectar las cuatro especies anteriormente mencionadas en cantidades considerables, predominando los ácidos acético y fórmico cuyas concentraciones máximas fueron ca. 2.8 g/L. Tal resultado muestra claramente el desvío del flujo metabólico como respuesta de la condición de limitación de oxígeno a la que fueron sometidas las células. El resto de los cultivos a TOD constante se muestran en el **anexo III**.

Para el cultivo a 0.2 % TOD existió la necesidad de realizar cambios operacionales como por ejemplo, el uso de aire en lugar de O<sub>2</sub> para mantener el control de la TOD a un valor. Este cambio fue necesario debido a limitaciones del controlador de flujo másico. La agitación fue disminuída a 300 rpm para reducir la dispersión de gas.

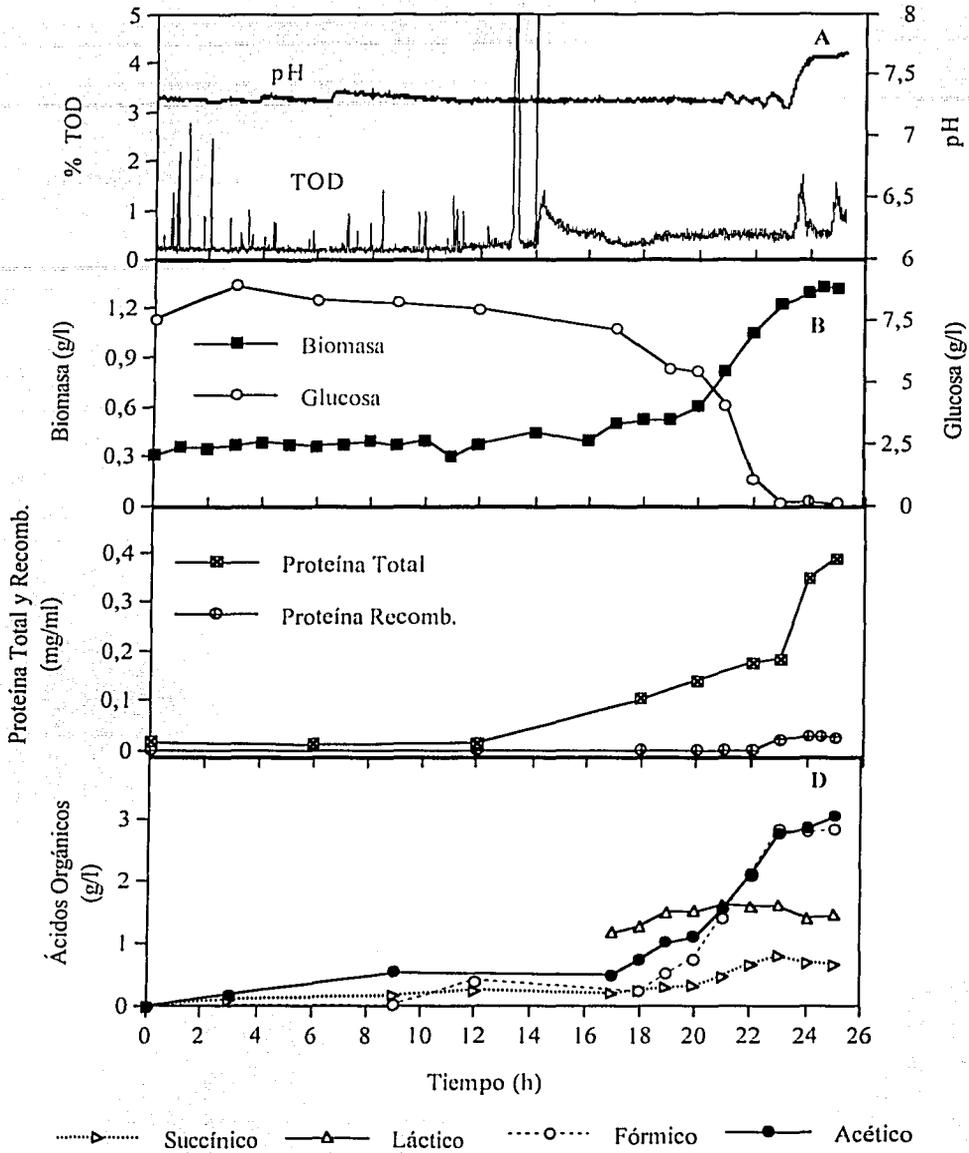
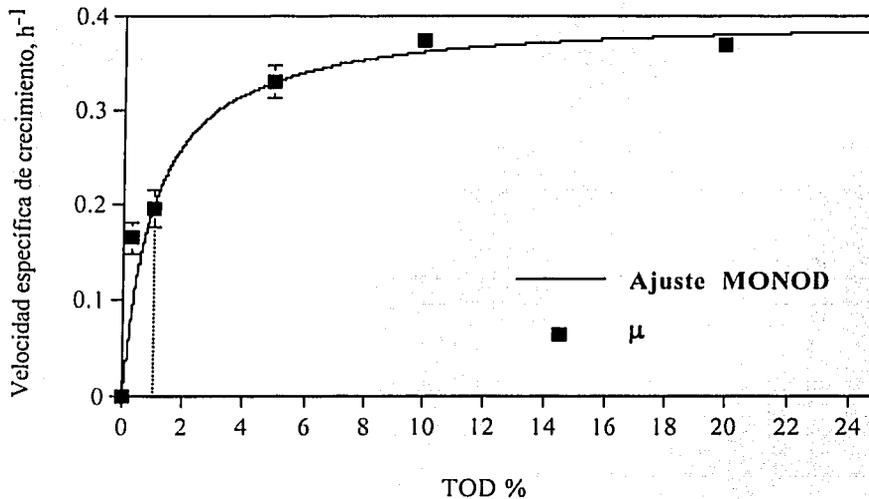


Figura 11 .- Perfil cinético típico de un cultivo a 0.2 % TOD constante.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la **Figura 12** se observa la dependencia de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) con respecto a la TOD constante. Los puntos mostrados se obtuvieron del promedio de experimentos por duplicado, a los que se les ajustó un modelo tipo Monod. Del ajuste se obtuvieron las siguientes constantes:  $\mu$  máx.  $0.39 \text{ h}^{-1}$  y  $K_{O_2}$  1 % TOD. Por analogía con la cinética de Michaelis –Menten el valor de  $\mu$  máx es aproximadamente al valor de  $\mu$  cuando el sustrato (en este caso TOD) es ca.  $10 K_{O_2}$  (Doran 1999). Considerando lo anterior, en la **Figura 12** se muestra como a TOD menores a 10 % la  $\mu$  comienza a ser una fuerte función de la TOD. Un resultado interesante es la ausencia de crecimiento en condiciones de anaerobiosis (0 % TOD). Por un lado se conoce que *E. coli* es un organismo facultativo capaz de crecer tanto en ambientes aerobios como anaerobios, sin embargo, la incapacidad observada para crecer a 0 % TOD, puede atribuirse a la falta de selenio en el medio de cultivo (Lester y De Moss, 1971), la ausencia de un aceptor de electrones diferente de  $O_2$ , así como una regulación anormal por parte de la proteína FNR (Unden y Bongaertz, 1997). Resultados similares fueron obtenidos por De León (1996) con la cepa JM101/ pPa102 productora de penicilino acilasa recombinante.



**Figura 12.** - Efecto de la TOD constante sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La **Tabla 14** muestra una comparación de distintos estudios en los cuales se estimaron las constantes de Monod para diferentes cepas de *E. coli* cuando el oxígeno es el sustrato limitante.

**Tabla 14.** Constantes de Monod típicas para cepas de *E. coli* cuando O<sub>2</sub> es el sustrato limitante (Adaptada de De León 1996).

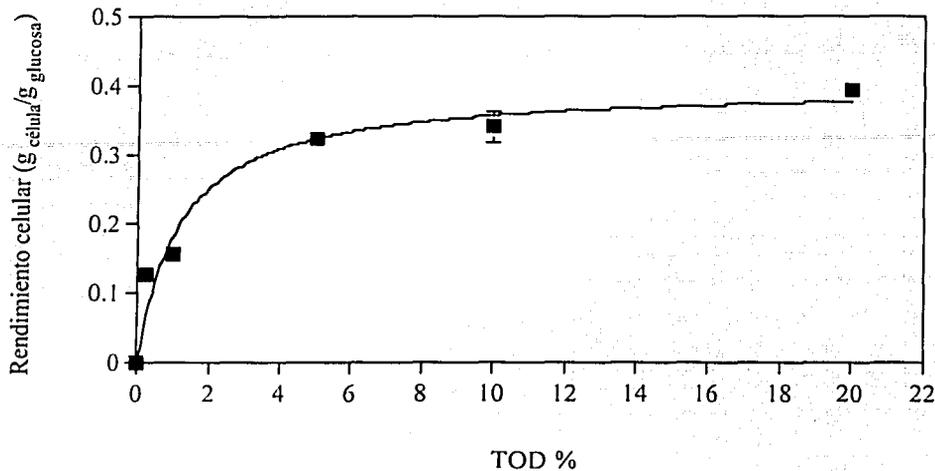
Cepa	$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	K <sub>O<sub>2</sub></sub> (ppm)	Medio de cultivo	Referencia
W3110 (pWp1A)	0.37	0.058	Glucosa/Sales/Ext.Levadura	Este trabajo
JM101 (pPA102)	0.38	0.043	Glucosa/ Sales	De León. (1996)
TB-1(pUC19)	0.49	0.038	Luria	Li <i>et al.</i> , (1992)
B/r-ATCC12407	1.01	0.013	Glucosa/Sales	Chen <i>et al.</i> (1985)

Como se observa en la **Tabla 14** la cepa utilizada por Chen *et al.* (1985) presenta el mayor valor de  $\mu$  máx , lo cual podría explicarse debido que se trata de una cepa silvestre (*wt*) cuyo crecimiento no está afectado por la presencia de algún plásmido, como lo es en el resto de los casos de la tabla. Igualmente, la composición del medio de cultivo puede ser un factor determinante de la menor dependencia de O<sub>2</sub> reflejado en el bajo valor de K<sub>O<sub>2</sub></sub>

El efecto de la TOD sobre el rendimiento  $Y_{x/s}$  (g cét/g glucosa) se presenta en la **Figura 13**, la cual muestra que se alcanza un rendimiento máximo de ca. 0.4. A medida que disminuye la TOD el rendimiento se ve fuertemente afectado dadas las restricciones energéticas, tal y como se discutirá mas adelante.

Con respecto al valor máximo alcanzado, Gosset *et al.* (1993), utilizando la cepa (W3110 trp -) pero con un plásmido diferente, obtienen un  $Y_{x/s}$  de ca. 0.21 g cét/g glucosa. Esta diferencia puede estar determinada por un número de factores adicionales tales como medio y condiciones de cultivo. Por ejemplo, Da Silva y Bailey (1986) estimaron que los rendimientos teóricos máximos para *E. coli* recombinante eran de 0.42 g cét/g glucosa y 0.64 g cét/g glucosa para proteínas secretadas al medio de cultivo y retenidas intracelularmente, respectivamente. La diferencia en rendimientos se debe al costo energético del transporte de la proteína. Cabe señalar que para obtener dichos valores los autores establecieron una serie de suposiciones que no

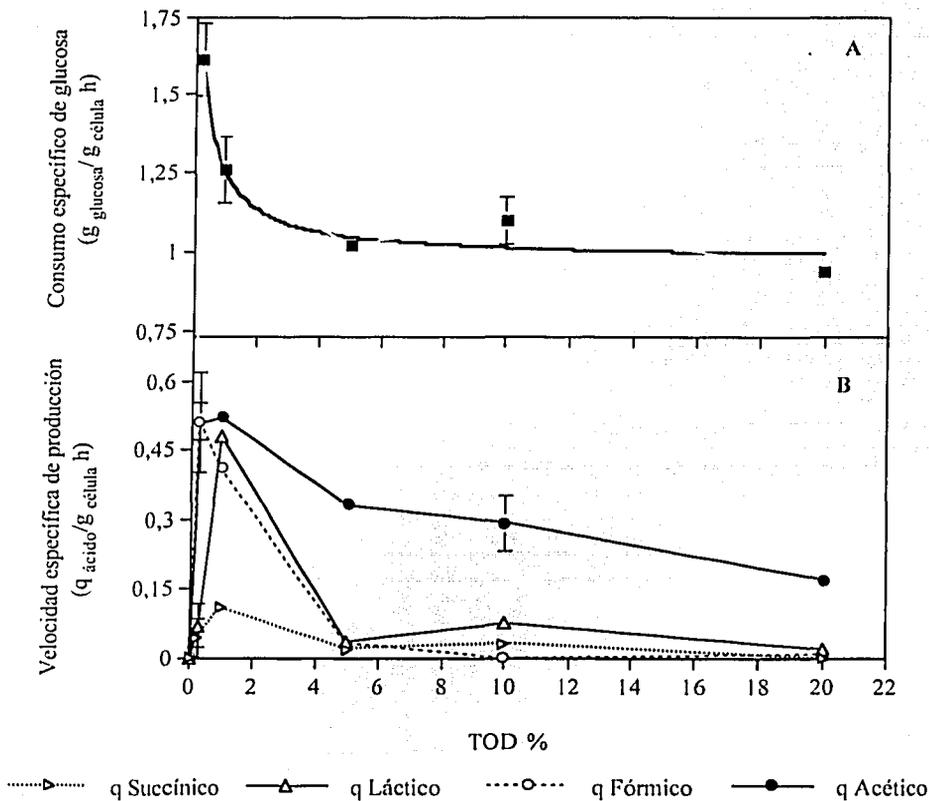
necesariamente se ajustan para nuestro caso, ya que el rendimiento es un parámetro estequiométrico dependiente de la cepa, tal y como la mayoría de los parámetros cinéticos.



**Figura 13** .- Efecto de la TOD constante sobre el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

Como se mencionó en el capítulo 2, el metabolismo de *Escherichia coli* se encuentra fuertemente regulado por el oxígeno disuelto presente en el medio, en especial los complejos enzimáticos regulados transcripcionalmente responsables de la direccionalidad del flujo de carbono en la vía glicolítica. Dicha regulación se puede interpretar en términos energéticos. En la **Figura 14-A** se muestra el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) en la fase exponencial. En condiciones no limitantes de oxígeno disuelto mayores a 5 % TOD, el ( $q_s$ ) se mantiene constante alrededor de 1 g glucosa/g célula-h, no obstante a medida que se hace mas restrictiva la disponibilidad de oxígeno, el consumo aumenta hasta un valor máximo de ca. 1.6. g glucosa/g célula-h. El aumento del  $q_s$  se debe a la diferencia entre los rendimientos energéticos, tal y como se mostró en la ecuación para la oxidación completa de glucosa que produce 38 ATP /mol, mientras que en fermentación solo se producen 4 ATP/mol. El valor máximo obtenido en estos cultivos, se encuentra dentro de los valores calculados por Lin *et al.* (2000), quien reportó un máximo de ca. 1.86 g glucosa/g célula-h para la cepa W3110.

En la **Figura 14-B** se muestra la velocidad específica de producción de los ácidos orgánicos anteriormente mencionados. En términos generales en la **Figura 14-B** se muestra la baja eficiencia en la utilización de la fuente de carbono desde el punto de vista de un bioproceso para la región de TOD menor a 5 % debido a que es en esta región donde los perfiles de las velocidades específicas de producción aumentan conforme disminuye la TOD. Además que la presencia de estos ácidos no es deseada dado los efectos fisiológicos que causan a la célula. La aparición de estos ácidos es el resultado de la respuesta metabólica por parte de la célula ante las limitaciones de TOD impuestas.



**Figura 14 .-** Efecto de la TOD constante sobre el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) y la velocidad específica de producción de ácidos orgánicos ( $q_{ac}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es más grande que la barra. Los valores de  $q_s$  y  $q_{ac}$  a TOD 0% fueron 0.

A valores de TOD no limitantes la velocidad de producción específica de ácidos ( $q_{\text{ácidos}} \text{ g ácido/g célula-h}$ ) láctico, succínico y fórmico es prácticamente nula dado que la célula no tiene la necesidad de generar equivalentes reductores y energía por vías alternas que no sea por vía glicolítica y cadena respiratoria. Sin embargo, en condiciones limitantes de TOD y dada la regulación impuesta por el regulador transcripcional ArcA (**Figura 2**), la activación de enzimas como la piruvato formato-liasa (*pfl*) se hace evidente llegando a tener una  $q_{\text{fórmico}}$  de ca. 0.5 g ácido/g célula-h. El perfil obtenido para la producción de fórmico es muy similar al reportado por Becker *et al.* (1997) quienes compararon los valores de  $pO_{0.5}$  para la expresión del gen *pfl* a 5 mbar (9.2 % TOD) y la síntesis de formato a 1 mbar / 1.8 % TOD (**Tabla 3**), encontrando que el valor de la  $pO_{0.5}$  para la expresión de la piruvato formato-liasa supera en un factor de 5, la  $pO_{0.5}$  para la formación del fórmico. Es decir, existe expresión del gen mucho antes de que la actividad de la enzima sea máxima o en su caso el valor medio ( $pO_{0.5}$ ). En nuestro caso el valor estimado de  $pO_{0.5}$  obtenido a partir de un ajuste de tipo hipérbola inversa a los datos de la concentración de fórmico, fue de ca. 1.7 % TOD. La discrepancia anterior puede explicarse debido a que la enzima requiere una modificación postraducciona l y su activación e inactivación está directamente relacionada por la presencia del oxígeno (Knappe *et al.*, 1984). Dado lo anterior, podemos sugerir que en nuestro caso también existió expresión de la enzima piruvato formato-liasa antes de que su actividad haya sido máxima.

La producción de acético sigue una tendencia de incremento a medida que disminuye el TOD. A niveles de 20 % TOD, la generación de este metabolito se debe al “sobreflujo metabólico” (**Figura 2**), es decir la velocidad con la que se incorpora la glucosa a la vía excede la capacidad oxidativa del TCA dando lugar a que el acetyl-CoA producido por la piruvato deshidrogenasa sea convertido a acético. Sin embargo, en condiciones anaerobias, Arc es represor transcripcional de la piruvato deshidrogenasa (*pdh*), mientras que FNR es activador de la piruvato formato-liasa (*pfl*) resultando en la formación de fórmico así como también de acético, reacciones dentro de la llamada “fermentación ácido-mixta”. Como se mencionó anteriormente, la enzima piruvato formato-liasa presentó una  $pO_{0.5}$  de ca. 1.7 % TOD por lo que se puede suponer que si la generación de acético por esta vía es dependiente de dicha enzima y no existe producción de fórmico a valores de TOD por arriba de 5 % (**Figura 14-B**) el acético presente en este rango es generado exclusivamente por el “sobreflujo metabólico”.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

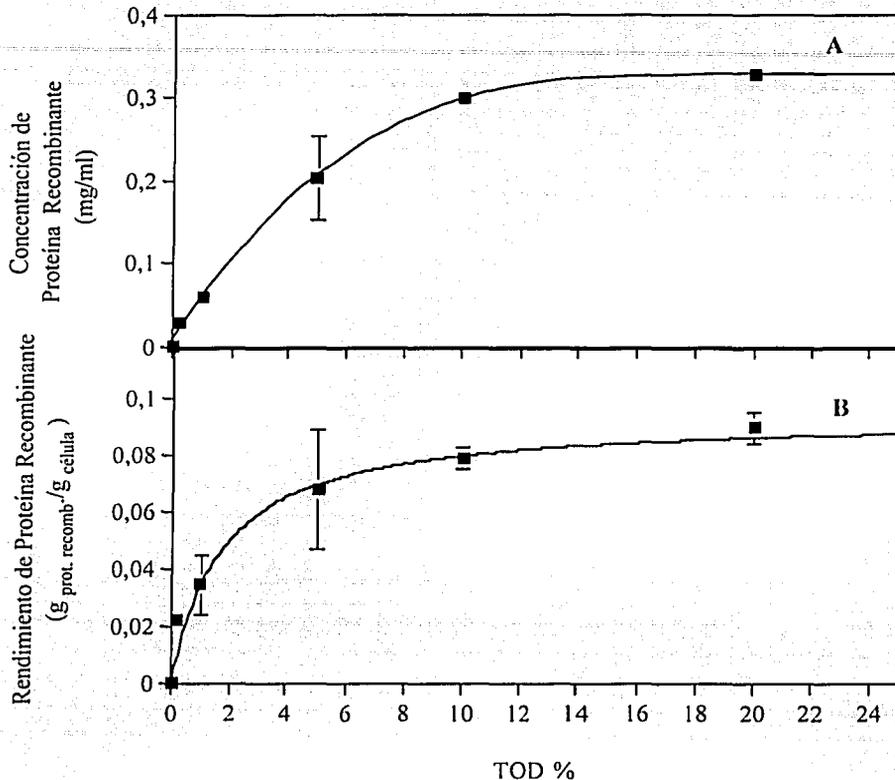
El lactato puede llegar a ser un producto terminal alternativo importante en mutantes que son severamente alteradas en la respiración aerobia. Tal fue el caso de la mutante en (*ubiA*) al crecer aeróbicamente (Becker *et al.* 1996). UbiA es una quinona la cual es esencial en el crecimiento aerobio. Esta mutante, al crecer aeróbicamente produjo grandes cantidades de lactato a partir de glucosa, el acetato y CO<sub>2</sub> fueron productos minoritarios. Pareciera ser que la oxidación de piruvato es fuertemente reducida y que la mutante tiende a crecer por fermentación láctica, sin embargo esto no ocurrió en nuestro caso ya que la producción de este metabolito fue nula excepto a 1 % de TOD.

En la **Figura 15-A** se muestra la concentración de proteína recombinante la cual alcanzó un máximo de ca. 0.32 mg/ml a 20 % de TOD, a valores de TOD menores a 10% la concentración disminuye severamente a diferencia del rendimiento proteína recombinante con respecto a biomasa  $Y_{Prts}$  (g  $P_{prot. rec}$  / g célula) (**Figura 15-B**) resultó de igual forma ser fuertemente dependiente de la TOD. Los datos se ajustaron aceptablemente a un perfil de tipo hiperbólico. El valor máximo alcanzado fue de ca. 0.09 g  $prot. rec$  / g célula en condiciones no limitantes de oxígeno (20 % TOD) y a medida que la TOD disminuye hasta ca. 5 % TOD este parámetro solo se redujo un 20 %. El efecto mas drástico se observó por debajo de 5 % de TOD, llegando a 0 g  $prot. rec$  / g célula a 0 % TOD.

La **Figura 15-B** indica que el efecto observado en el rendimiento de proteína recombinante con respecto a biomasa fue debido a la TOD. Sin embargo es necesario señalar que en la reducción de la concentración de proteína recombinante (**Figura 15-A**) con respecto a la TOD, la concentración de triptofano en el medio juega un papel fundamental en la expresión de proteína recombinante. Dado lo anterior podemos sugerir que esta disminución en la concentración de proteína recombinante pudo haber sido el resultado de 2 situaciones: a) que la TOD haya ejercido efecto únicamente sobre la concentración celular y que dicha concentración no haya agotado o consumido completamente el triptofano en el medio, ya que esta molécula actúa como represor de la expresión y/o b) que haya sido un problema de expresión por célula como tal, suponiendo que los niveles de triptofano en todas las condiciones evaluadas permitían la expresión de la proteína recombinante. Este problema en la reducción de expresión y/o concentración celular, pudo haber sido debido a los efectos fisiológicos causados por los ácidos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

orgánicos presentes en el medio en condiciones limitantes de TOD constantes, tal y como lo demostraron Luli y Strohl (1990), al observar inhibición de crecimiento por acetato a concentraciones tan bajas como 30 mg/L, así como también una reducción en la productividad de proteína recombinante.



**Figura 15** .- Efecto del TOD constante sobre la concentración (A) y el rendimiento de proteína recombinante ( $Y_{p/r/x}$ ) (B). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

Estos resultados contrastan con lo obtenido por De León (1996), el cual encuentra que en condiciones limitantes de oxígeno (0.2 % TOD) la actividad específica de la enzima recombinante penicilino acilasa fue máxima (ca. 0.165 U/mg<sub>cel</sub>) mientras que en condiciones no limitantes (> 5 % TOD) la actividad se reduce un 80%. Por su parte Unutmaz *et al.* (1997)

usando la cepa JM109/M190A productora de una proteasa  $\alpha$ -lítica observaron un incremento de 50 a 750 U/L al reducir la TOD de valores mayores a 30 % a valores cercanos a 0 % en cultivos por lote.

Una explicación mas general de la reducción en la producción de la proteína recombinante recae en argumentos de energética. Como se observa en la **Figura 15**, a TOD menor a 5 % el rendimiento de proteína recombinante cae drásticamente, rango de TOD que coincide con el inicio de la actividad de la piruvato formato-liasas (*pf*), en otras palabras es un periodo en donde existe un sustitución coordinada entre las enzimas de la respiración aerobia y anaerobia e incluso de la fermentación. Bajo tal situación la célula necesita generar poder reductor y en su caso otro aceptor de electrones con el cual genere energía que utilizará para sus funciones. Dada la baja eficiencia energética de las rutas empleadas a TOD menor a 5%, la célula utilizará preferencialmente el ATP formado para funciones esenciales sobre aquellas que representen una carga genética extra.

## TOD OSCILANTE

### Caracterización del simulador de dos compartimentos.

El diseño del sistema de dos compartimentos se realizó con el objetivo de poder simular tiempos de circulación cortos ( $tc_i \leq 5$  s). A continuación se discutirán algunos de los detalles que fueron fundamentales para el diseño del sistema.

Tal y como muestra la (ecuación 7) el  $tc_i$  es función del volumen y el flujo, por lo que los volúmenes de 350 y 700 ml fueron seleccionados con base a la capacidad máxima de la bomba disponible (13 L/min) para obtener un  $tc_i$  de 5 s. La relación de los volúmenes de los biorreactores aerobio y anaerobio ( $V_{Aerobio}/V_{Anaerobio}$ ) fue mantenida constante en todos los experimentos en un valor de ca. 0.52. Oosterhuis y Kossen (1985) utilizaron relaciones de  $V_{Aerobio}/V_{Anaerobio}$  desde 0.14 hasta 0.43, mientras que Amanullah *et al.* (1993) emplearon dos valores (0.25 y 0.43).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los biorreactores se conectaron por medio de una tubería de neopreno, dicho material fue seleccionado debido a que en experimentos preliminares se observó una alta transferencia de oxígeno por la tubería de silicón, lo que dificultaba eliminar el  $O_2$  del  $R_{anaerobio}$ . El diseño de las entradas y salidas de cada biorreactor (**Figura 9**) tuvo la finalidad de reducir el volumen muerto del sistema. Con respecto a los difusores utilizados en los biorreactores su elección fue para aumentar el  $k_{La}$  de desorción en el compartimento burbujeado con nitrógeno ( $R_{anaerobio}$ ). Con el difusor sinterizado se obtenían burbujas de diámetro menor que con el difusor de punta usado en el  $R_{aerobio}$ , lo que resultaba en un incremento del área interfacial y por ende un aumento de la respuesta dinámica del sistema.

La caracterización del sistema consistió en determinar el gradiente máximo que se podía alcanzar al recircular el medio de cultivo. Inicialmente dicha evaluación se efectuó con agua como medio modelo. Como se resumió en la (**Tabla 12**) la agitación utilizada en el  $R_{aerobio}$ , fue mantenida constante a 500 rpm, en cambio la del  $R_{anaerobio}$  se manipuló en un intervalo desde 500 a 900 rpm.

La **Figura 16** muestra los perfiles generados de TOD en cada uno de los biorreactores agitados, usando 700 rpm en  $R_{anaerobio}$ , dicha agitación fue seleccionada como un promedio para los experimentos con recirculación. Esta agitación, permitió encontrar un equilibrio entre la cantidad de espuma formada en el  $R_{anaerobio}$  y una desorción aceptable del oxígeno. Para el caso de la simulación de un  $t_{ci}$  de 50 s, se alcanzó un gradiente final de ca. 9 % TOD mientras que para los  $t_{ci}$  de 20 y 5 s los gradientes fueron de ca. 7 y 5.3 % TOD respectivamente. Los resultados obtenidos establecen una clara tendencia, a medida que se disminuye el  $t_{ci}$  simulado, el gradiente obtenido se reduce. Perfiles similares fueron obtenidos a 500 y 900 rpm los cuales se presentan en el **anexo IV**. Estos resultados sugerían que el uso de este sistema probablemente no sería óptimo para simular  $t_{ci}$  tan cortos como 5 s, ya que el gradiente obtenido era muy pequeño. Por lo que, se decidió probar el sistema con células esperando que el consumo de oxígeno en el  $R_{anaerobio}$  ayudara a la desorción del oxígeno. Es interesante que los perfiles de ambos biorreactores (aerobio y anaerobio) para las distintas condiciones sean paralelos lo que indica una fuerte interdependencia entre ambos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

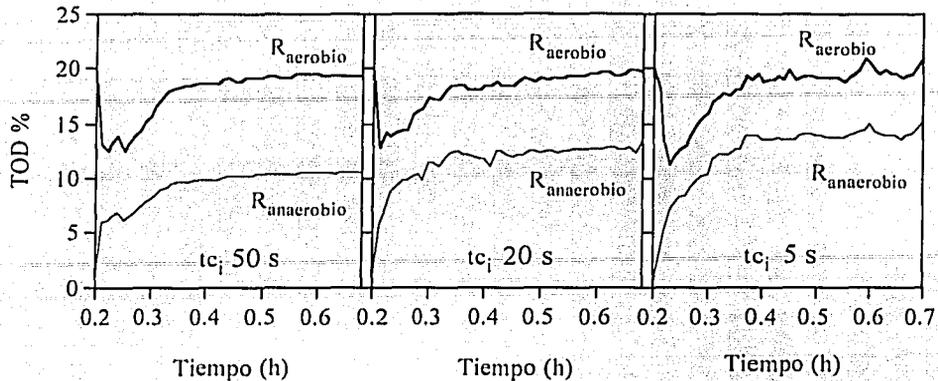


Figura 16 .- Caracterización del sistema de 2 compartimentos utilizando agua y agitación de 500 rpm en  $R_{aerobio}$  y 700 rpm en  $R_{anaerobio}$ .

En la Figura 17 se muestra el perfil obtenido al intentar simular un  $tc_i$  de 7 s en un cultivo. Desde el inicio de la cinética el sistema se equilibró y permaneció de la misma forma a lo largo de todo el cultivo dada la alta velocidad de recirculación. Nótese que existen partes en la gráfica en donde el valor de TOD es mayor en el  $R_{anaerobio}$  al que se le burbujeó  $N_2$ , que el  $R_{aerobio}$  al que se le suministraba oxígeno. Esto se debe a que la dinámica del bombeo supera el tiempo del mecanismo de transferencia, así como el tiempo de respuesta de los electrodos de TOD. Aunado a esto, existieron problemas operacionales para controlar los volúmenes constantes en cada biorreactor.

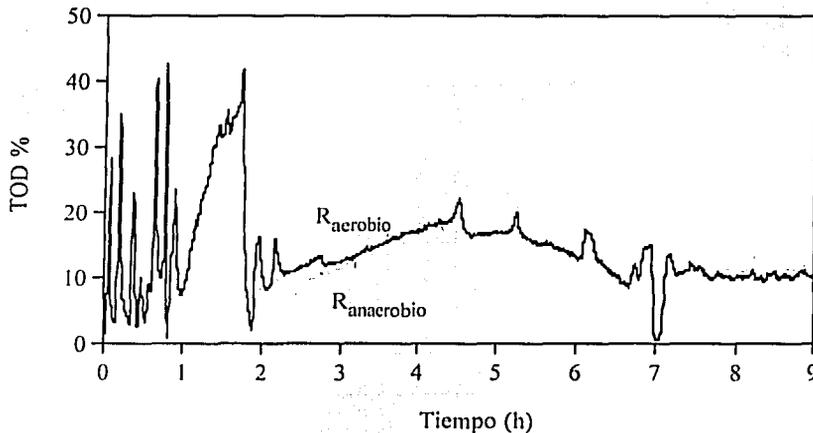


Figura 17 .- Perfil de TOD obtenido al simular un  $tc_i$  de 7 s en un cultivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la Figura 18 se muestra un perfil típico de un cultivo oscilado a  $t_{ci}$  de 20 s en el cual se observa el gradiente máximo alcanzable en dos situaciones diferentes.

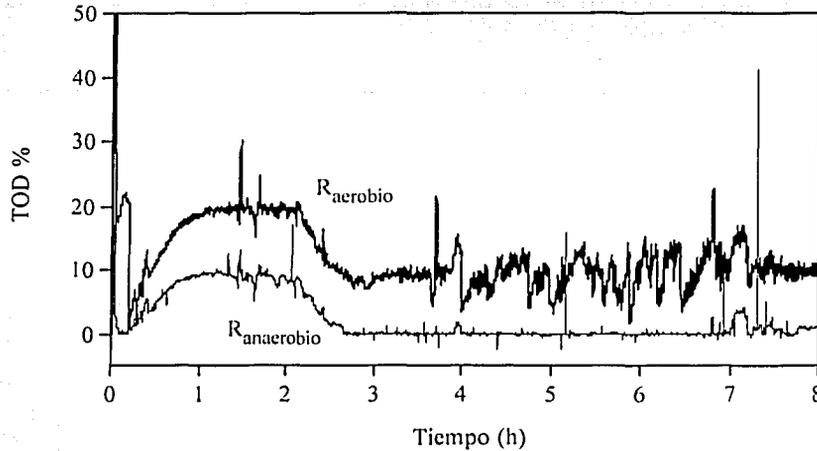


Figura 18 .- Perfil de TOD en un cultivo oscilado a un  $t_{ci}$  de 20 s.

Al inicio del cultivo el *setpoint* del  $R_{aerobio}$  fue fijado a 20% de TOD mientras que el  $R_{anaerobio}$  solo se burbujeó  $N_2$ , al término de la primera hora del cultivo el sistema llega a un estado “estacionario” con respecto al TOD observándose un gradiente de ca. 9 % TOD. Sin embargo, al cambiar el *setpoint* en  $R_{aerobio}$  a 10 % TOD, nuevamente se obtuvo el mismo gradiente aunque ahora,  $R_{anaerobio}$  se encontraba en la zona deseada de limitación de oxígeno. Este resultado demuestra claramente la utilidad del sistema diseñado para ciertas condiciones operativas particulares.

#### Resistencia al estrés hidrodinámico

La siguiente etapa fue determinar si el estrés hidrodinámico generado por la recirculación a través de los cabezales de la bomba era perjudicial para el modelo biológico. Los cultivos recirculados se hicieron por duplicado, tal y como se describió en el capítulo 4, el tiempo de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

circulación ( $t_c$ ) simulado fue de 5 s, siendo este tiempo el menor  $t_c$  propuesto inicialmente y por consiguiente el mayor estrés hidrodinámico al que estarían sometidas las células. Dado el volumen utilizado y de acuerdo a la ecuación 7, la velocidad de recirculación (F) fue de 6 L/min. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Comparación entre cultivos control y recirculados.

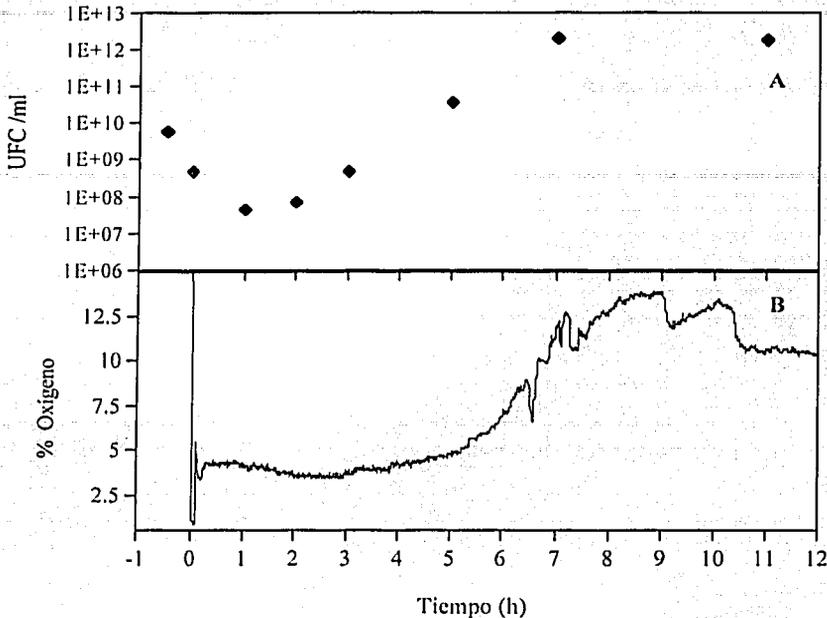
Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomasa $\text{máx.}$ ( $\text{g/L}$ )	$Y_{\text{X/S}}$ ( $\text{g cee/g gluc}$ )	Prot. Rec. ( $\text{mg/ml}$ )
Control 20% TOD	$0.37 \pm 0.05$	$3.65 \pm 0.15$	$0.37 \pm 0.05$	$0.30 \pm 0.2$
Recirculado 20% TOD	$0.37 \pm 0.06$	$3.7 \pm 0.02$	$0.36 \pm 0.02$	$0.285 \pm 0.05$

Las datos mostrados son el promedio de dos experimentos y  $\pm$  el intervalo definido por los valores experimentales.

Como se muestra en la **Tabla 15** no existieron diferencias evidentes entre ambos cultivos en cuanto a los parámetros macroscópicos calculados como la velocidad específica de crecimiento, concentración de biomasa, proteína recombinante y rendimiento de células sobre glucosa. Sin embargo, tal y como se observa en la **Figura 19**, la viabilidad del cultivo disminuyó al inocular el reactor y comenzar la recirculación de ca.  $6 \times 10^9$  UFC/ml (tiempo = -1, en la **Figura 19-A**) alcanzando un mínimo de ca.  $4.5 \times 10^6$  UFC/ml. Esto concuerda con una ligera pendiente negativa del porcentaje de oxígeno en las 3 primeras horas del cultivo (**Figura 19-B**) este comportamiento fue similar en el duplicado del experimento. Para el caso de cultivos sin recircular, en la fase lag el porcentaje de oxígeno se mantiene constante y no muestra una caída, por lo que puede inferirse que el número de células no se vió afectado. A pesar de esta pérdida en la viabilidad en el cultivo, las células tienen la capacidad de adaptarse a tal ambiente llegando a un máximo de ca.  $1.2 \times 10^{12}$  UFC/ml y, mas importantemente, generando la misma biomasa y expresando la misma cantidad de proteína recombinante comparada con los cultivos a 20 % TOD constates (**Tabla 13**).

Es importante señalar que los cálculos para la velocidad específica de crecimiento se realizaron considerando las células totales, por lo que, aunque la viabilidad disminuyó al inicio en el

cultivo recirculado, su  $\mu$  fue la misma en fase exponencial una vez que las células se adaptaron a dicha condición de estrés.



**Figura 19** .- Monitoreo de la viabilidad y del porcentaje de oxígeno en un cultivo recirculado a 20 % TOD constante. UFC/ml (A) y % de apertura de la válvula de oxígeno (B).

Los resultados obtenidos mostraron que el efecto de tal estrés fue nulo en cuanto a los parámetros macroscópicos calculados, datos que concuerdan con lo reportado por Qoronfleh, (1999) para una cepa de *E. coli* recombinante. Dicho autor demostró que el aumento del rendimiento de proteína recombinante (p24Gag derivada de HIV-1) fue debido a un efecto directo del oxígeno disuelto y no a un estrés hidrodinámico con respecto a cultivos realizados a una mayor agitación, tal afirmación la sustentó al realizar un cultivo en el que controló la TOD burbujando aire enriquecido con oxígeno, en lugar de agitación. Lo anterior contrasta con los datos publicados por Lange *et. al.*, (2001) el cual nunca recuperó la viabilidad perdida en una cepa silvestre (*wt*) de *E. coli*, al someterla a estrés hidrodinámico. Tal estrés fue generado haciendo pasar las células a través de varios capilares de diferentes diámetros, donde la intensidad máxima del esfuerzo de corte fue generada por el flujo del fluido como una función

radial. La conclusión interesante fue que *E.coli* resultó mas susceptible que *Saccharomyces cerevisiae* ante el estrés, debido a que la capa de peptidoglicano (ca.  $2 \times 10^{-9}$  m) es menor que la de pared de la levadura compuesta de glucano y manano.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son una evidencia mas de que la susceptibilidad de una cepa recombinante, en este caso *E. coli* W3110/*pWpIA* en condiciones de estrés hidrodinámico, no pierde la capacidad de sintetizar la proteína híbrida aún cuando la viabilidad en un inicio se ve disminuída.

### Cultivos a TOD oscilante

A partir de la caracterización del sistema, se estableció que el valor del *setpoint* para el biorreactor que simularía la zona bien aireada debería ser 10% de TOD, y según la caracterización a TOD constante (**Figura 12**) se estaría dentro de una zona no limitante para el crecimiento. Dado lo anterior se realizaron cultivos simulando un  $t_{c_i}$  de 20, 50, 90 y 180 s, los cuales se realizaron por duplicado. Las condiciones de cultivo restantes (pH, medio de cultivo, temperatura, etc) fueron las mismas que en los cultivos a TOD constante.

Los perfiles de TOD para cada biorreactor en los cultivos oscilados a 20, 50, 90 y 180 s, se muestran en la **Figura 20**. Tal y como se observó en la caracterización con agua, el gradiente obtenido se reduce conforme disminuye el  $t_{c_i}$ . Los gradientes promedio se calcularon a partir del gradiente puntual entre los biorreactores a lo largo de la cinética y los valores obtenidos fueron 5.8, 9.8, 8.0 y 12.3 % TOD para los cultivos presentados en la **Figura 20**. A su vez el control de TOD alcanzado en  $R_{\text{aerobio}}$  se mejora al aumentar el  $t_{c_i}$ , ya que la dinámica del sistema es menor. Es importante resaltar que el presente trabajo es el único hasta la fecha que reporta los perfiles de TOD generados para cada uno de sus componentes en un sistema de dos compartimentos. Esto permite establecer los intervalos de tolerancia del modelo con respecto a la función objetivo evaluada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

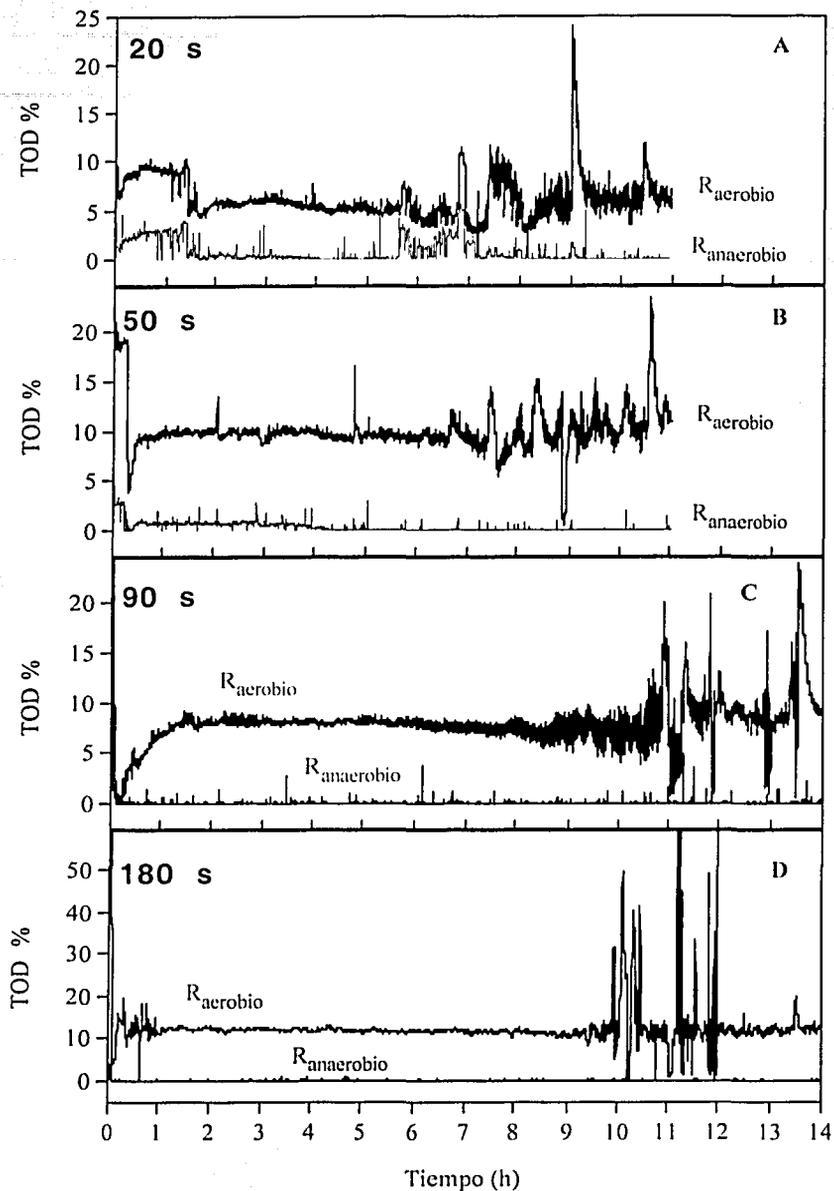


Figura 20.- Perfiles de TOD en cultivos oscilados a  $t_c$  de 20 (A), 50 (B), 90 (C) y 180 s (D).

Las perturbaciones en los perfiles pueden atribuirse a varias situaciones. Fue un reto mantener los volúmenes constantes de cada biorreactor ya que en ocasiones la succión/descarga de la bomba se desequilibraba, dando lugar a alteraciones en los volúmenes. Otra complicación fueron los pulsos de antiespumante y por último los ceses transitorios en la respiración que se describirán posteriormente. Otra diferencia con respecto a los diversos  $t_{c_i}$  ensayados, es el tiempo de duración de la cinética. A  $t_{c_i}$  de 20 y 50 s, el tiempo de cultivo fue de ca. 11 h mientras que para  $t_{c_i}$  de 90 y 180 s fue de 14 h. Esto es debido a que al aumentar el  $t_{c_i}$ , el periodo de adaptación (fase lag) se incrementó.

Los perfiles cinéticos para cultivos oscilados a  $t_{c_i}$  de 20 y 180 s se muestran en las **Figuras 21 y 22**. Estas dos cinéticas se eligieron ya que fueron las condiciones extremas evaluadas e ilustran el comportamiento típico de los cultivos recirculados, además que se pueden apreciar diferencias importantes en los parámetros cinéticos, las cuales se discutirán mas adelante. El resto de los perfiles cinéticos para los cultivos oscilados se encuentran en el **anexo V**. En ambas figuras se observan los perfiles de TOD anteriormente discutidos y el control de pH, cuyo valor se mantuvo constante a lo largo del cultivo hasta el agotamiento de la glucosa, cuando incrementa constantemente en la mayoría de los casos.

Con respecto al crecimiento, se observa que para un  $t_{c_i}$  de 20 s, se alcanza una concentración celular máxima de 3.5 g/L (**Figura 21-B**) en cambio para el cultivo de 180 s solo se alcanzó 2.1 g/L (**Figura 22-B**). Las velocidades de crecimiento para cada uno de los cultivos fueron 0.35 y 0.27  $h^{-1}$  respectivamente. Es importante señalar que en el cultivo a  $t_{c_i}$  de 180 s el muestreo se realizó en ambos biorreactores y la cuantificación de biomasa, glucosa y ácidos fue la misma en cada punto de la cinética. Por tal razón se decidió solo muestrear en uno de los reactores ( $R_{aerobio}$ ). En el panel C de ambas figuras se muestra la concentración de proteína total y recombinante, se puede notar que en la condición mas severa (180 s), la concentración de proteína recombinante se reduce un 93%, mientras que a un  $t_{c_i}$  de 20 s solo es un 25% menor con respecto al cultivo control (10 % TOD constante). Este comportamiento se discutirá mas adelante.

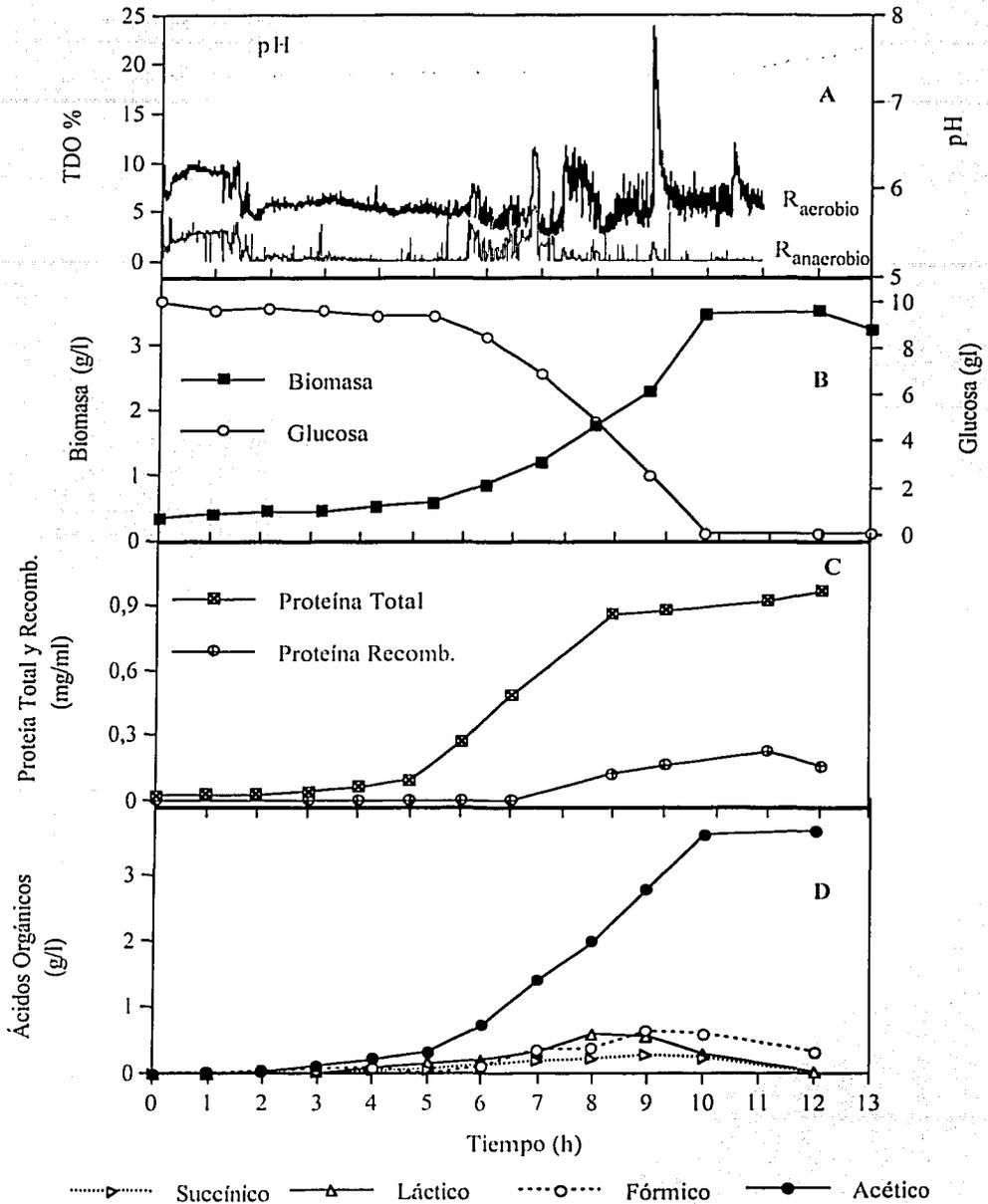


Figura 21 .- Perfil cinético de un cultivo oscilado entre los reactores aerobio y anaerobio a un  $t_c$  de 20 s

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

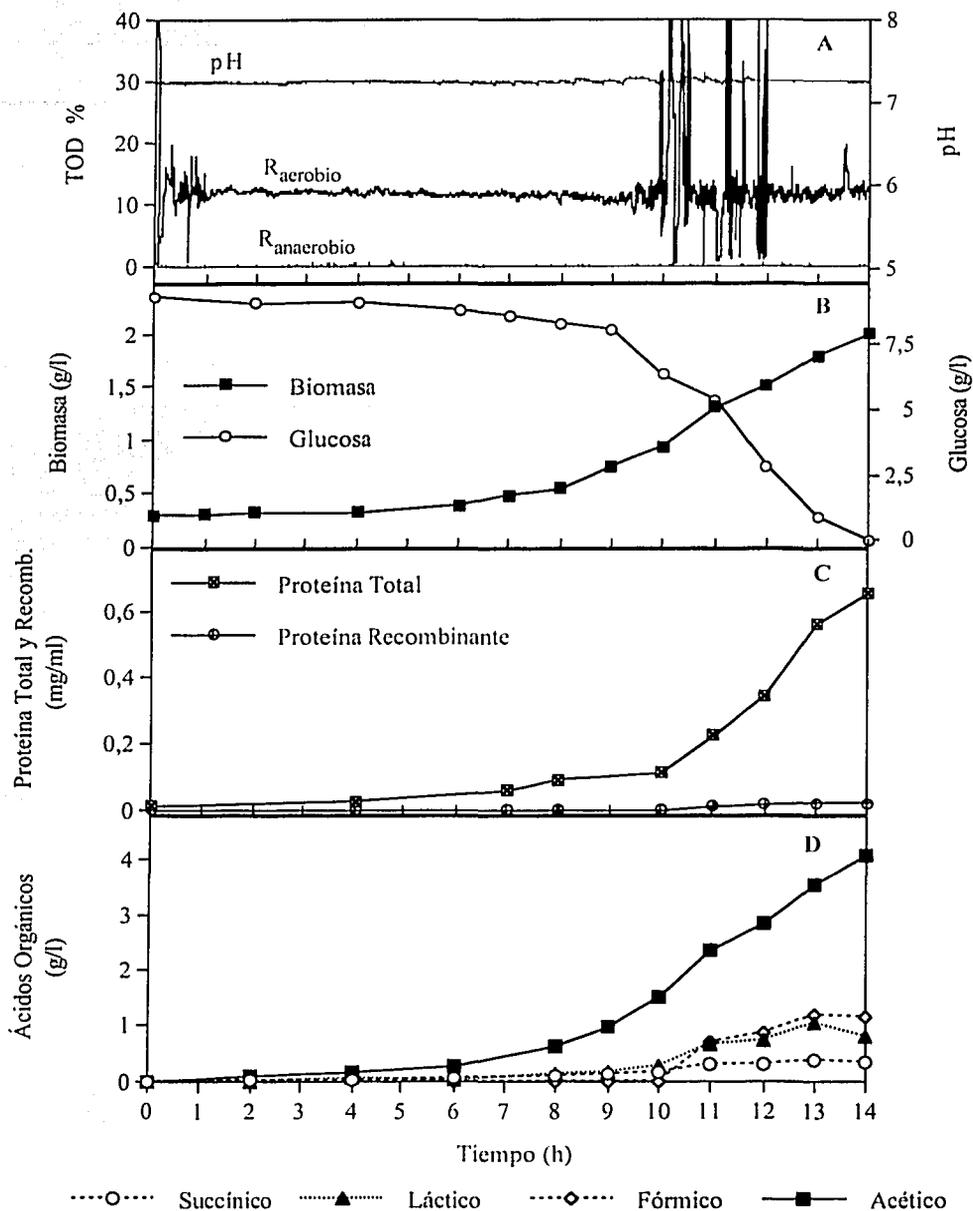


Figura 22.- Perfil cinético de un cultivo oscilado entre los reactores aerobio y anaerobio a un  $t_c$  de 180 s.

TESIS CON  
FALSO  
FRENTE

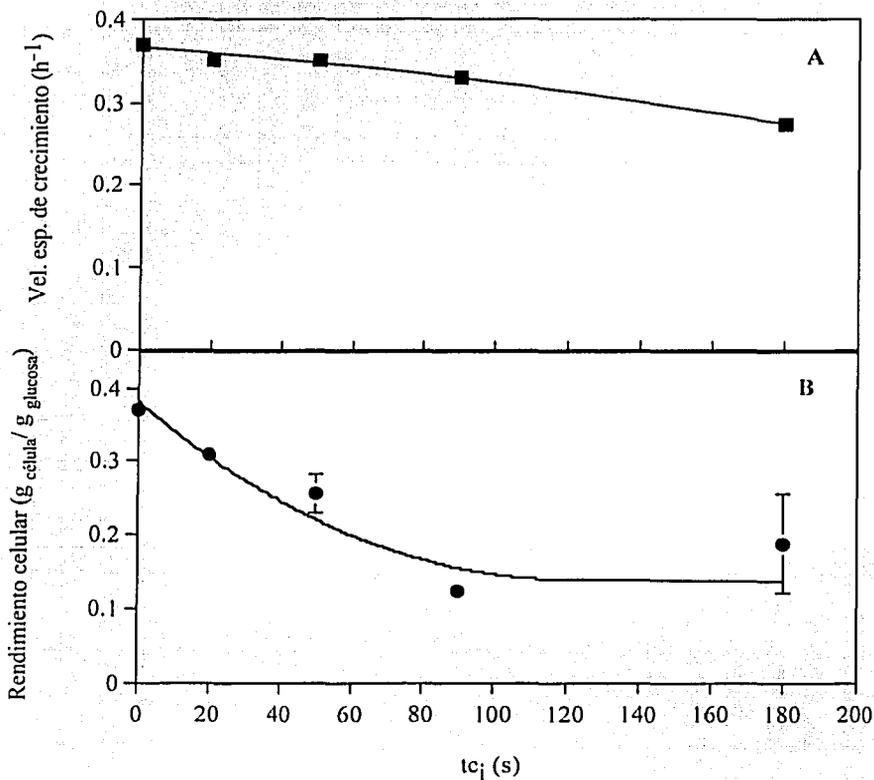
La producción de ácidos orgánicos para cada cultivo se muestra en el panel D de las Figuras 21 y 22. El ácido acético es el principal metabolito en ambos cultivos, y su perfil resultó estar asociado al crecimiento. En el cultivo a  $t_c$  de 20 s se alcanza una concentración máxima de este subproducto de ca. 3.5 g/L (Figura 21-D), en cambio el máximo para el cultivo a  $t_c$  de 180 s fue de ca. 4 g/L (Figura 22-D). En los cultivos control a 10% TOD, la concentración volumétrica máxima obtenida de ácido acético fue de ca. 2.7 g/L. A 10 % de TOD se considera que el oxígeno no es limitante para el crecimiento y que el ácido acético producido se debió al “sobreflujo metabólico”.

Por lo tanto, el ácido acético formado por arriba de 2.7 g/L en los cultivos oscilados se debe al tránsito de las células por el compartimento anaerobio, lo que da lugar al desvío metabólico hacia la fermentación ácido-mixta. Para el caso de los ácidos láctico y fórmico, se alcanzaron valores de ca. 1 g/L para el cultivo de 180 s mientras que para el de  $t_c$  de 20 s la concentración solo alcanzó ca. 0.5 g/L. Los cultivos restantes se muestran en el anexo V.

En la Figura 23 se resumen los resultados del efecto del  $t_c$  sobre la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Como se observa, conforme aumenta el  $t_c$  la velocidad específica de crecimiento disminuye hasta en un 30 % en la condición más crítica (180 s) con respecto a los cultivos control. Amanullah *et al.* (1992) encontraron una tendencia similar con *Bacillus subtilis*, sin embargo en el intervalo de  $t_c$  estudiado por ellos, de 0 a 30 s, la  $\mu$  disminuyó drásticamente en un ca. 40 %, mientras que en su condición más crítica ( $t_c$  de 300 s) se reduce hasta un 55 %. Tales resultados los obtuvieron utilizando la relación de  $V_{Aerobio}/V_{Anaerobio}$  de 0.43. Al cambiar la relación de  $V_{Aerobio}/V_{Anaerobio}$  a 0.25 el efecto se incrementa hasta un 70%. Un resultado que contrasta con lo anterior es el obtenido por De León (1996) en un cultivo de un compartimento con periodo de 400 s, eje de 7 % TOD y amplitud de ca. 7 % TOD. Nótese que el valor de 7 % TOD, es muy similar al gradiente promedio utilizado en este trabajo. De León (1996) encontró que el comportamiento de sus cultivos oscilados fue muy similar al cultivo control (constante) cuando el eje de oscilación era el valor del cultivo constante, es decir no existió efecto alguno ya que la velocidad de crecimiento de la *E. coli* recombinante empleada y su rendimiento celular fueron muy similares.

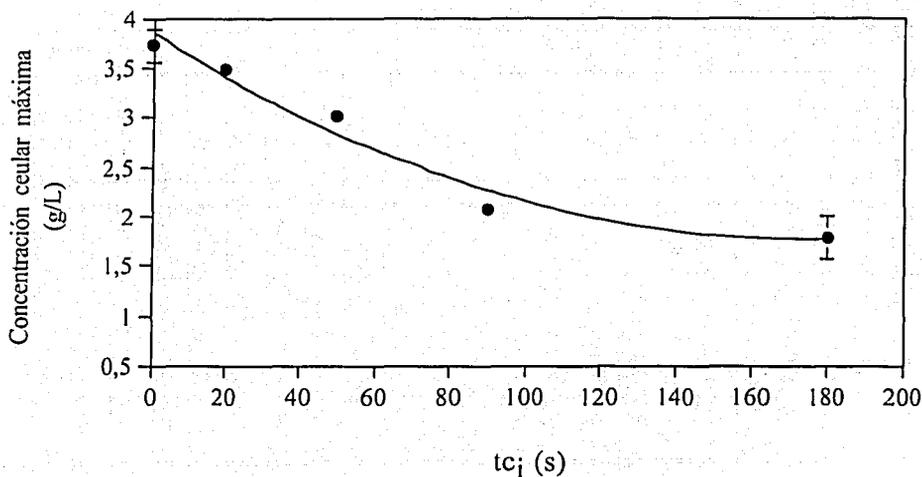
El rendimiento celular se muestra en la **Figura 23-B**, este parámetro mostró una fuerte dependencia con respecto al  $t_{c_i}$ . A  $t_{c_i}$  de 20 s existe una reducción de casi 20%, mientras que para  $t_{c_i}$  de 90 s, que fue la condición de mayor impacto, se aproximó hasta un 70 % de reducción con respecto a los cultivos control. Para el  $t_{c_i}$  de 180 s la tendencia no mostró cambio comparado con el  $t_{c_i}$  de 90 s.

Si bien el efecto observado del  $t_{c_i}$  sobre la  $\mu$  no fue tan grave, aún en la condición mas crítica evaluada (180 s), el efecto sobre el  $Y_{x/s}$  sí lo fue.



**Figura 23** .- Efecto del  $t_{c_i}$  sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

El efecto del  $t_{c_i}$  sobre la concentración celular máxima se muestra en la **Figura 24**. En el cultivo control a 10 % TOD ( $t_{c_i}$  de 0 s) se produjeron ca. 3.7 g/L, a  $t_{c_i}$  de 20 s la concentración solo se redujo un 5 %, sin embargo conforme se aumenta el tiempo de circulación hasta 90 s, la pérdida en la concentración celular presenta una caída constante disminuyendo hasta ca. 40 %. Si bien hasta  $t_{c_i}$  de 90 s se observó un efecto importante sobre la concentración, para el cultivo a  $t_{c_i}$  de 180 s siendo la condición con mayor tiempo en una condición limitante evaluada, la biomasa máxima producida fue muy similar a la obtenida en  $t_{c_i}$  de 90 s.



**Figura 24** .- Efecto del  $t_{c_i}$  sobre la concentración celular máxima. Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

En la **Figura 25-A** se muestra el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) en los cultivo oscilados. Tal y como se observa, este parámetro mostró un aumento constante desde 0 s de  $t_{c_i}$  hasta 50 s. A  $t_{c_i}$  de 90 s existió un aumento importante en el  $q_s$ , donde alcanzó un máximo de ca. 2.66 g glucosa/g célula h, sin embargo en  $t_{c_i}$  de 180 s, este parámetro disminuyó hasta 1.86 g glucosa/g célula h. El valor máximo obtenido de 2.66 g glucosa/g célula h se encuentra entre el rango para  $q_s$  de 2.7 -4.4 g glucosa/g célula h reportado por Xu *et al.* (1999) y Chen *et al.* (1997) en condiciones limitantes de oxígeno en un reactor tipo flujo-pistón. Dicho valor rompe la tendencia lógica en el comportamiento del  $q_s$ , ya que se obtuvo un valor mayor de  $q_s$  a  $t_{c_i}$  de 90 s que a  $t_{c_i}$  de 180 s,

siendo este último, la condición mas severa a la que se estarían expuestas las células y por ende se esperaría un mayor costo energético reflejado en el valor del  $q_s$ , además de que como se observó en la Figura 24, la concentración celular máxima fue muy similar a  $t_{c_i}$  de 90 y 180 s. Dado lo anterior, el valor del  $q_s$  a  $t_{c_i}$  de 180 s se hubiera esperado mayor ó por lo menos un valor igual a los datos de  $t_{c_i}$  inmediatamente menores ( $t_{c_i}$  90 s).

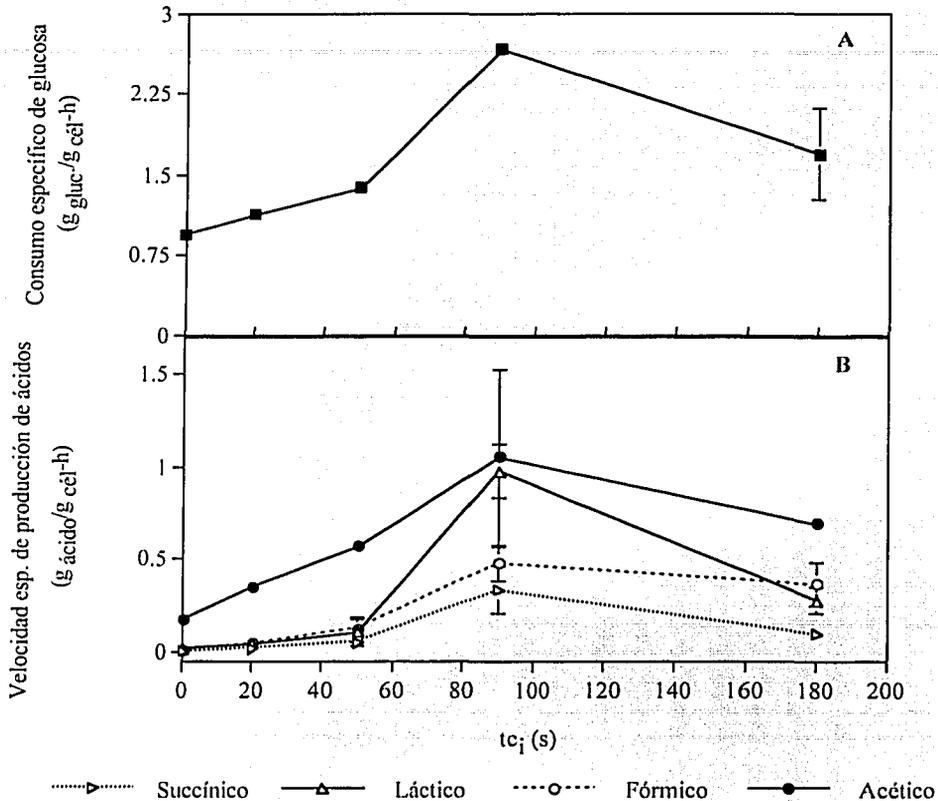


Figura 25.- Efecto del  $t_{c_i}$  sobre el consumo específico de glucosa (A) y la velocidad específica de producción de ácidos orgánicos (B). Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

Otra característica interesante en el comportamiento descrito para  $q_s$ , es que según los datos mostrados en la Figura 14-A, en los cultivos mantenidos a una TOD constante de 0.2 %, la  $q_s$  máxima obtenida fue de 1.7  $g\text{ glucosa}/g\text{ célula}\cdot h$ . Este valor de  $q_s$  considera que el 100 % de la

población celular fue mantenida a 0.2 %, mientras que a  $t_{c_i}$  de 90 s la población esta cambiando continuamente de condición ambiental. Por tal razón, resulta difícil explicar el valor de  $q_s$  obtenido a  $t_{c_i}$  de 90 s.

La Figura 25-B muestra las velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos. Las velocidades calculadas para el succínico, fórmico y láctico hasta  $t_{c_i}$  de 50 s, son muy bajas (menores a  $0.1 \text{ g ácido/g célula h}$ ), no obstante existe un incremento notable a  $t_{c_i}$  de 90 s para el succínico y el fórmico alrededor de  $0.4 \text{ g ácido/g célula h}$ , posteriormente a  $t_{c_i}$  de 180s la velocidad de estos dos ácidos fue prácticamente constante. Para el caso del láctico el incremento a  $t_{c_i}$  de 90 s fue mas importante, alcanzando una velocidad de producción de  $0.97 \text{ g láctico/g célula h}$  casi 8 veces mas que a  $t_{c_i}$  de 50 s, sin embargo a  $t_{c_i}$  de 180 s la velocidad cayó drásticamente a  $0.27 \text{ g láctico/g célula h}$ . La velocidad específica de producción de ácido acético presentó una tendencia muy similar a la observada al  $q_s$ , nótese una pendiente de aumento constante conforme se aumentaba el  $t_{c_i}$ , alcanzado un máximo de ca.  $1 \text{ g acético/g célula h}$  a  $t_{c_i}$  de 90 s. Una caída similar al  $q_s$  a  $t_{c_i}$  de 180 s fue observado para el acético.

Una posible hipótesis para explicar la formación del ácido láctico se mencionó en la discusión para los cultivos constantes, en la cual se señaló que dicho metabolito puede llegar a ser un producto terminal alternativo importante en mutantes que son severamente alteradas en la respiración aerobia (Becker *et al.*, 1999). Tal fue el caso de la mutante en (*ubiA*) al crecer aeróbicamente, produjo grandes cantidades de lactato a partir de glucosa, mientras que acetato y  $\text{CO}_2$  fueron productos minoritarios. Además de que una forma de regenerar el poder reductor en condiciones limitantes de oxígeno, recae en la enzima LDH- lactato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ , lo que supone un gasto energético extra, reflejado como un aumento en el  $q_s$ .

Un análisis acoplado entre la velocidad específica de consumo de glucosa y las velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos podría explicar el valor calculado para el  $q_s$  a  $t_{c_i}$  de 90 s. Si observamos la Figura 25-A el valor de  $2.66 \text{ g glucosa/g célula h}$  podría justificarse por el incremento en la velocidad de producción de los ácidos, especialmente por el súbito aumento en la velocidad de producción del ácido láctico (Figura 25-B).

Otra hipótesis que surge para poder explicar el incremento en el  $q_s$ , esta basada en la caracterización realizada por Xu *et al.* (1999) en la cual evaluaron la respuesta dinámica de las células sometidas a limitaciones de TOD, encontraron que ca. 54 s son necesarios para que la célula responda ante la condición de TOD impuesta, así mismo en 27 s la cantidad de mRNA de *pfI* se incrementa de 2 a 3 veces (Schweder *et al.*, 1999). Entiéndase como respuesta, el tiempo en el que es posible detectar el metabolito(s), en este caso el fórmico. Es decir, es el tiempo en el que la célula lleva a cabo todo el proceso de reconocimiento de las condiciones ambientales y “sintetiza” la enzima piruvato formato-liasa o la activa ya que dicha enzima aun en condiciones aerobias se encuentra en niveles basales de forma inactiva, (Neidhardt *et al.*, 1996). Este proceso de “síntesis-activación” podría incluir el mecanismo de un plegamiento adecuado así como la modificación postraducciona l requerida de la enzima para ser activa (Knappe *et al.*, 1984).

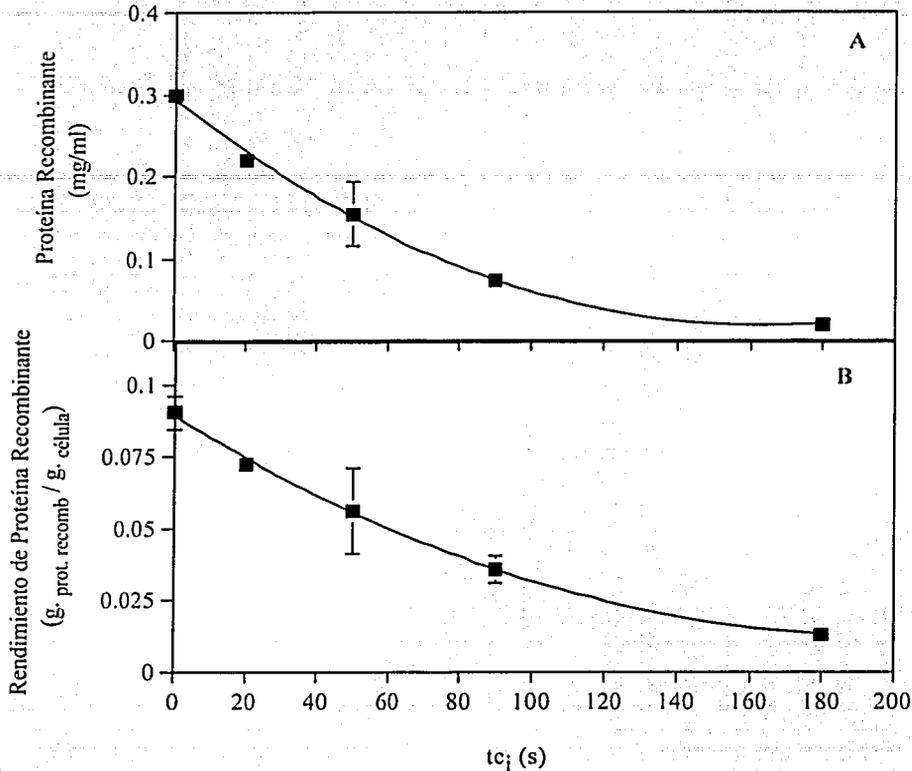
Comparando el tiempo característico de respuesta (54 s) con el valor de los  $t_{c_i}$  evaluados, se observa que precisamente el  $t_{c_i}$  de 90 s (equivalente a que la población celular en promedio permanece 45 s en el compartimento mal aireado) es muy similar al tiempo característico de respuesta de las células. Por lo que, si consideramos una fracción de la población celular que entra al  $R_{anaerobio}$ , 45 s son suficientes para comenzar el proceso de síntesis de la enzima, sin embargo dicho proceso puede verse truncado debido a que esa fracción de células regresa al  $R_{aerobio}$  en un tiempo menor al que puede completarse el procesamiento. Dado lo anterior dichas perturbaciones continuas pudieron contribuir a un gasto energético extra.

Uno de los principales resultados del estudio, fue dar respuesta a la interrogante planteada en la hipótesis al inicio del proyecto. Las condiciones fluctuantes de TOD encontradas en biorreactores a gran escala y simuladas en un sistema de dos compartimentos ¿afectarán la productividad de Trp-LE-proinsulina en *E. coli* recombinante?

La **Figura 26** muestra el efecto que tiene el  $t_{c_i}$  sobre la concentración de proteína (A) y el rendimiento ( $Y_{P/X}$ ) (B). Como puede observarse, tanto la concentración como rendimiento de proteína recombinante se vieron fuertemente afectados a medida que se aumentó el  $t_{c_i}$ . Al menor  $t_{c_i}$  evaluado (20 s), el rendimiento disminuyó un 20 % con respecto al control, mientras

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que al mayor  $t_{c_i}$  (180 s) la disminución llegó a ser del 90 %. La proteína mostró un perfil muy similar.



**Figura 26** .- Efecto del  $t_{c_i}$  sobre la concentración y rendimiento de proteína recombinante. Las barras indican el rango de dos experimentos independientes, puntos sin barra significa que el símbolo es mas grande que la barra.

El comportamiento descrito es similar a lo obtenido por Oosterhuis y Kossen, (1985), ya que en su caso el producto de interés (ác. glucónico) se reduce al aumentar el  $t_{c_i}$ . Sin embargo no existen en la literatura reportes en el que utilicen *E.coli* recombinante y cuya proteína sea expresada como cuerpo de inclusión en una configuración de dos tanques agitados. Es importante señalar que la discusión realizada sobre el efecto de la TOD constante sobre la concentración y rendimiento de proteína recombinante (**Figura 15**) también puede aplicarse para este caso pero tomando en consideración que el efecto es debido al  $t_{c_i}$ .

Tal y como se mostró el “efecto negativo” del  $t_{c_i}$  fue mucho mas pronunciado sobre el rendimiento de proteína recombinante que para la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular.

Siguiendo los principios del escalamiento descendente, la comparación de tiempos característicos podrían ser un indicador del dominio de ciertos procesos medio-ambientales, sobre subprocesos biológicos. Para el caso de la elongación de un péptido, la velocidad de traducción estimada es entre 13 –16 aminoácidos /s (Koplove y Cooney, 1979). Si consideramos la velocidad de traducción promedio, así como el número de aminoácidos de nuestra proteína recombinante (260 a.a), se requieren de ca. 18 s para completar la formación por lo que el menor  $t_{c_i}$  (20 s) simulado estaría en el mismo orden de magnitud y por lo tanto podría interferir en dicho proceso. Para el caso específico de una proteína recombinante expresada en *E.coli* el análisis de transcripción mostró que el mRNA de  $\beta$ -galactosidasa fue formado en un tiempo < 300 s siendo una proteína de 1024 aminoácidos (Sandén *et al.*, 2002).

Resulta difícil establecer y asegurar que a partir de una comparación de este tipo, un mecanismo en particular fue el limitante, y por el cual, la expresión de la proteína recombinante se vió reducida. Finalmente se llega a suponer, dado el análisis que se hizo en secciones anteriores, que esta fuerte dependencia del rendimiento de proteína recombinante es el resultado de una estricta regulación metabólica ante fluctuaciones de oxígeno disuelto. Es decir conforme aumenta el tiempo de circulación existe un tiempo de residencia mayor de la población celular en condiciones limitantes, lo que conduce a sugerir una utilización preferencial de mecanismos de producción energética para funciones esenciales sobre procesos secundarios como la producción de una proteína heteróloga.

#### Control de oxígeno disuelto.

A continuación se describirá un comportamiento especial de la cepa utilizada encontrado al inicio del estudio con respecto al control del oxígeno disuelto la cual trajo consigo una modificación en la estrategia de control de la TOD. Esta estrategia fue necesaria ya que, tal y



depende fundamentalmente de la fisiología de la célula así como también de las condiciones medio ambientales. Los modelos de crecimiento microbiano, suponen un consumo específico de sustrato constante en fase exponencial (Doran, 1999), situación que no se cumplía para el caso de nuestro modelo.

Para determinar si la pérdida de control de TOD podía ser debido al propio algoritmo de control se realizaron cultivos sin control de TOD (burbujeado con aire) (Figura 28). En estos cultivos se observa que la pendiente en el consumo de oxígeno en fase exponencial presenta perturbaciones transitorias reflejadas en la TOD tanto con la cepa recombinante (Figura 28-A) como con la no transformada (Figura 28-B). Tales perturbaciones equivalen a las observadas en los cultivos controlados. Nótese que después del cese transitorio, el consumo nuevamente recobró la tendencia inicial de una pendiente relativamente constante (Figura 28-A).

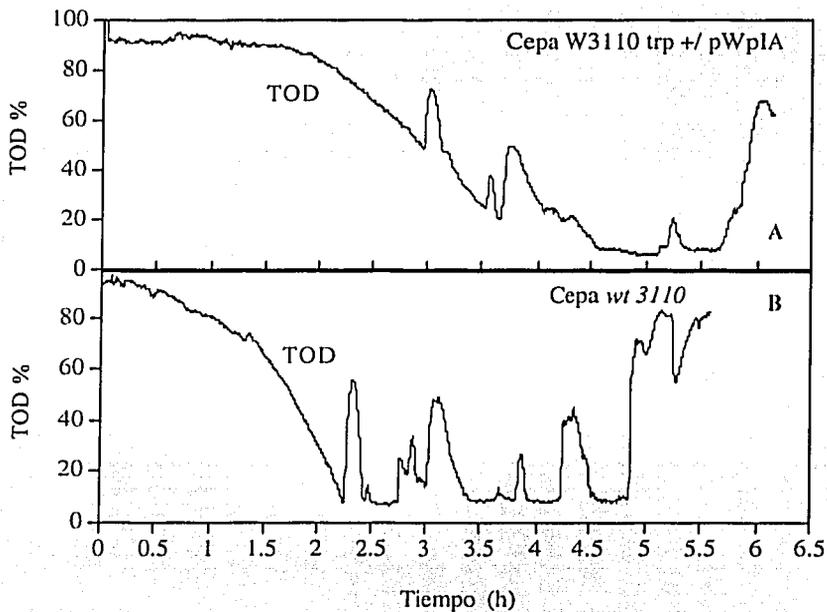


Figura 28.- Perfiles de TOD sin control de TOD y burbujeado con aire para la cepa recombinante (A) y silvestre (B).

A partir de tales resultados se descartaron posibles causas que podrían dar lugar a la perturbación de la TOD como lo eran la manipulación ó afinación inadecuadas de las constantes del algoritmo PID de control (Stephanopoulos, 1984), agotamiento de glucosa (Lin *et. al.*, 79

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

2000), inicio de la expresión de la proteína recombinante (Ryan y Parulekar, 1990), y/o adición de antiespumante al medio (Morão *et. al.*, 1999).

Una hipótesis alternativa que se planteó para explicar tal comportamiento fue que el agotamiento de algún nutrimento presente en el extracto de levadura (aminoácido, cofactor, vitamina, etc) era la causa del comportamiento descrito. Para corroborar esta hipótesis se realizó un cultivo en el cual se enriqueció el medio de cultivo con 50 % mas de extracto de levadura, aunque la perturbación se presentó nuevamente en etapa exponencial esta se retrazó ca. 3 h.

En la **Figura 29** se muestra el efecto del medio de cultivo sobre la densidad óptica (DO) a la que ocurre la perturbación en la TOD. En la figura se muestran resultados de las cepas evaluadas, dos de las cuales eran recombinantes y genotípicamente distintas, así como la cepa silvestre (*wt*). Las tres cepas presentaron la perturbación al mismo tiempo a (ca. 4 de DO) al usar la composición original del medio. Sin embargo con el medio enriquecido el momento de la perturbación se desplaza hasta ca. 6.5 de DO. Los resultados de los experimentos anteriores confirmaron que por una parte los ceses transitorios en el consumo de O<sub>2</sub> no eran exclusivos de la cepa recombinante, ya que la cepa silvestre (*wt*) también los presentó. Además sostenían la hipótesis planteada debido a que existía un componente en el medio que se agotaba, manifestándose como la perturbación de la TOD observada.

Para contender con tal situación, se planteó otra estrategia de control de la TOD, la cual consistió en manipular el “tiempo de control” (tc) del sistema, un parámetro de importancia relevante para el algoritmo de control y que esta definido como el tiempo en que el sistema compara, decide y actúa, enviando la señal de cierre o apertura a los controladores de flujo másico para compensar el valor deseado de TOD. En el nuevo algoritmo este parámetro (tc) se modifica segundos después de observar en pantalla la primera perturbación de la TOD (**Figura 30-A**) asignándole un valor tal que la acción de control se suspende y las aperturas de los controladores se mantienen constantes en su último valor (**Figura 30-B**) hasta que el consumo se reestablece reflejado esto como una caída pronunciada en la TOD. En ese momento nuevamente se reestablece el tc al valor original. Por medio de esta estrategia de control semi-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

automático se obtuvo un mejor control de la TOD tal y como el que se observa en la Figura 30-A.

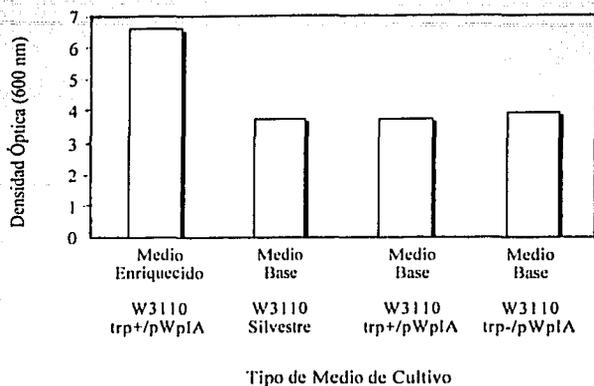


Figura 29.- Efecto del medio de cultivo sobre la DO a la que ocurre la perturbación en la TOD en cultivos a 20% TOD constante usando diferentes cepas.

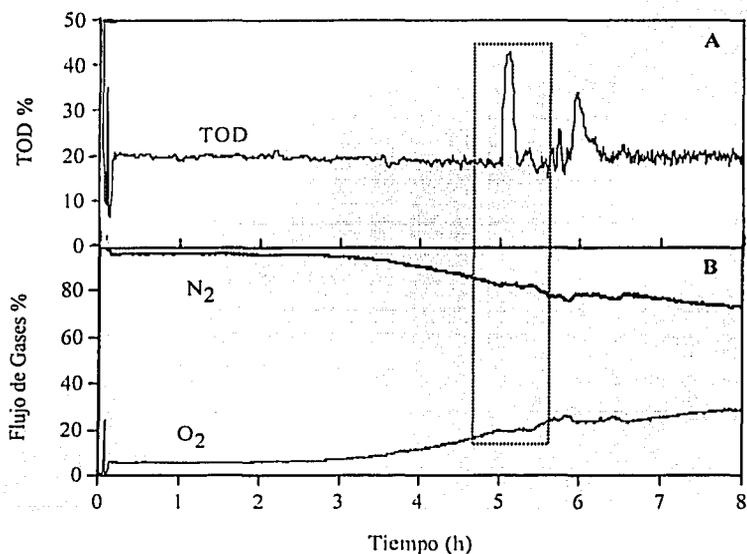


Figura 30.- Control a 20 % TOD constante manipulando el tiempo de control ( $t_c$ ) al momento de la perturbación, indicado en el recuadro. Tensión de oxígeno disuelto (A) y porcentaje de flujo de gases establecidos automáticamente por el algoritmo de control a través de controladores de flujo másico

## Capítulo 6 Conclusiones

Debido al interés tecnológico del modelo de estudio utilizado, los resultados del presente trabajo enriquecen la vasta información generada hasta el momento sobre la fisiología de *Escherichia coli*, particularmente sobre el efecto de condiciones cambiantes de oxígeno disuelto en la producción de una proteína recombinante.

El sistema desarrollado dentro del contexto de la metodología del escalamiento descendente representa una herramienta versátil para evaluar el comportamiento dinámico de diversos modelos biológicos ante fluctuaciones de oxígeno disuelto que simulan los gradientes potencialmente encontrados en biorreactores a gran escala. Es importante resaltar que el presente trabajo es el único hasta la fecha que reporta los perfiles de TOD generados para cada uno de sus componentes en un sistema de dos compartimentos. Esto permite establecer los rangos de tolerancia del modelo con respecto a la función objetivo evaluada.

La caracterización realizada para los cultivos a TOD constante permitió conocer el comportamiento cinético de la cepa además que dichos cultivos fueron la base comparativa para los cultivos oscilados. La velocidad específica de crecimiento se ajustó a un modelo tipo Monod ( $\mu$  máx de  $0.39 \text{ h}^{-1}$  y  $K_{O_2}$  de ca. 1 %), el rendimiento celular máximo obtenido fue de  $0.4 \text{ g células/g glucosa}$ . Los valores de rendimiento también se ajustaron a una curva de tipo hiperbólico con respecto a la TOD.

Para la región de TOD menor a 5 % el comportamiento del consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) fue inverso al obtenido con la velocidad esp. de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento celular ( $Y_{x/s}$ ). Es decir mientras disminuía la TOD el  $q_s$  aumentó mientras que  $\mu$  y  $Y_{x/s}$  disminuyeron. El  $q_s$  máximo alcanzado fue de ca.  $1.6 \text{ g glucosa/g célula h}$  a 0.2 % de TOD constante.

La reducción en la expresión de la proteína recombinante en los cultivos a TOD constante pudo haber sido debido a 2 factores, a un efecto directo sobre la concentración celular y/o sobre la expresión por célula. Ciertamente sea un efecto u otro, el desempeño del bioproceso en especial

el rendimiento de la proteína recombinante se hace dependiente a valores de TOD menores a 10 %.

De los cultivos constantes evaluados se observó que a partir de 5 % de TOD existió un cambio importante en las velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos. Lo anterior hace evidente un cambio en el flujo metabólico hacia rutas alternas como la fermentación ácido-mixta. Dado que el ácido acético se puede producir por 2 rutas metabólicas distintas, fue posible diferenciar el origen de su producción. En el intervalo entre 5 y 20 % TOD su generación fue debida principalmente al sobreflujo metabólico, mientras que a valores menores a 5 % TOD es producto de la combinación entre el sobreflujo metabólico y fermentación ácido-mixta.

En los cultivos oscilados, el gradiente obtenido entre los biorreactores aerobio y ananerobio mostró una fuerte dependencia con la dinámica del sistema. El gradiente máximo obtenido fue ca. 12 % de TOD para el cultivo a  $t_{c_i}$  de 180 s, mientras que para la condición más dinámica (20 s) esta se redujo a ca. 6 % de TOD %.

El  $t_{c_i}$  afectó la velocidad específica de crecimiento aunque de forma relativamente menor ya que aún en la condición mas crítica (180 s) solo se redujo un 25 %, en cambio el rendimiento celular se vió fuertemente afectado disminuyendo un 70 %. El rendimiento de proteína recombinante mostró una fuerte dependencia con respecto al  $t_{c_i}$ , disminuyendo hasta un 90 % en  $t_{c_i}$  de 180 s.

A  $t_{c_i}$  de 90 s el valor máximo para el consumo específico de glucosa ( $q_s$ ) puede justificarse especialmente por la alta velocidad específica de producción de láctico, lo que sugiere una alta actividad de la enzima LDH lactato-deshidrogenasa en dicha condición. Lo anterior indica que a  $t_{c_i}$  de 90 s existió una alta demanda en la reoxidación del NADH. Si bien a  $t_{c_i}$  de 50 s existió un ligero aumento en la velocidad de producción de los ácidos fórmico y succínico con respecto a  $t_{c_i}$  menores, es hasta  $t_{c_i}$  de 90 s donde se hace mas evidente un desvío del metabolismo hacia la fermentación ácido mixta. El perfil en la producción de ácido acético de

igual forma podría sugerir que hasta  $t_{c_i}$  de 50 s su formación es debido principalmente a un sobreflujo metabólico.

Al intentar simular  $t_{c_i}$  tan cortos como 7 s, la dinámica del sistema, superó los tiempos de los mecanismos de transferencia de masa y respuesta, dando lugar a que el sistema se equilibrara igualándose las concentraciones de TOD en ambos biorreactores a lo largo de toda la cinética.

La comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos entre cultivos control y recirculados demostraron que las células fueron capaces de adaptarse a los altos esfuerzos de corte generados en el cabezal de la bomba peristáltica al simular un  $t_{c_i}$  de 5 s.

La manipulación del tiempo de control ( $t_c$ ) resultó ser una estrategia exitosa, para contender con los ceses transitorios en el consumo de oxígeno de la bacteria, ya que mejoró el perfil constante de la TOD.

El análisis comparativo de tiempos característicos puede sugerir que la similitud de magnitudes de ciertos subprocesos biológicos con los subprocesos medio-ambientales podrían limitar el proceso de expresión de proteína recombinante. Sin embargo no es posible puntualizar o atribuir el efecto a un solo mecanismo. Una hipótesis que se propone para poder entender y explicar el comportamiento de la bacteria en condiciones dinámicas es que, ante condiciones constantes de TOD la maquinaria celular sufre ajustes coordinados entre las rutas alternativas que posee, las cuales le permiten producir los metabolitos para generar la energía necesaria en las condiciones a la cual se somete a la bacteria. En otras palabras, en la condición constante de TOD se establece un "estado metabólico estacionario" predeterminado, mientras que en condiciones fluctuantes ó dinámicas como las evaluadas en este trabajo dicho "estado" se convierte en cambios o alteraciones continuas en la que la célula trata de reajustar su maquinaria, lo que desbalancea el proceso.

Dado el efecto potencial de los gradientes de la TOD sobre la disminución en producción de la proteína recombinante en esta cepa en particular, es necesario establecer estrategias mas

racionales para futuras operaciones de escalamiento ascendente y evitar a máximo la generación de gradientes de TOD para que la reproducibilidad en ambas escalas sea similar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Capítulo 7 Perspectivas

Las perspectivas del presente estudio pueden ser divididas en dos enfoques distintos, uno de ellos tiene que ver con la mejora en el diseño del sistema de dos compartimentos, mientras que el otro estaría basado en tratar de entender con mayor profundidad la respuesta fisiológica y metabólica de la bacteria ante condiciones fluctuantes.

Uno de los puntos que fue determinante en el sistema fue la rapidez para desorber el oxígeno en el  $R_{\text{anaerobio}}$ . En este trabajo se probó burbujear helio en lugar de nitrógeno en  $R_{\text{anaerobio}}$ , ya que este gas presenta una mayor solubilidad que el nitrógeno, sin embargo no hubo mejoría en la rapidez de la desorción. Para mejorar el diseño del sistema resultaría provechoso buscar alternativas con las cuales se pudiera aumentar la dinámica del sistema y poder simular tiempos de circulación ( $t_c$ ) tan cortos como 5 s y en los que se mantuviera un gradiente de al menos 10 % de TOD. Como sabemos la concentración del oxígeno en el medio y en general de un gas es función de la presión total del biorreactor y parcial del gas, así como de la temperatura. El principio del sistema de control utilizado fue modificar la presión parcial del oxígeno, suministrando una mezcla de  $O_2/N_2$  para mantener constante la TOD. Una estrategia que podría ensayarse para lograr aumentar la dinámica, sería el aumentar la presión total del biorreactor que simula la región bien mezclada con lo cual se aumentaría la solubilidad del oxígeno y por otro lado reducir la presión total del biorreactor anaerobio con lo cual se disminuiría la solubilidad en este compartimento, de forma tal que esta presión en el biorreactor anaerobio de lugar a una concentración de saturación en el líquido ( $C^*$ ) menor a la que proviene el líquido del compartimento bien aireado y por medio de este cambio habría una eliminación instantánea de al menos una fracción del oxígeno proveniente del biorreactor aerobio. El resto del  $O_2$  que entra al reactor anaerobio y que no es eliminado por el cambio de presión, se desorbería por la corriente de gas inerte burbujeado.

Es necesario mencionar que la alternativa anterior lleva implícito ciertos riesgos como el que representa presurizar recipientes de vidrio por lo que debe de tomarse las medidas necesarias para llevar cabo dicha propuesta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tal y como se describió en la sección de resultados, no fue posible puntualizar la causa que dió lugar a la reducción en la expresión de proteína recombinante tanto a TOD constante como oscilante. Para discriminar entre una falta en la acumulación de biomasa y por ende una falta en el agotamiento de triptofano (represor de la inducción) y un efecto directo de la TOD sobre la maquinaria biosintética de la proteína heteróloga, se propone realizar cultivos constantes a 20 y 0.2 % de TOD, en los cuales se cuantifique la concentración de triptofano usando el medio de cultivo utilizado en este estudio o en medio mínimo suplementado con una concentración conocida de triptofano. y así poder observar si existe algún umbral en la represión de la expresión de la proteína recombinante.

Otra alternativa sería el uso de un vector que no dependa de la concentración de biomasa ni de la triptofano por ejemplo una inducción con un agente químico, temperatura e incluso un promotor constitutivo. Mediciones adicionales como cuantificación del número de copias de plásmido pueden realizarse para observar la relación entre la concentración de proteína y el número de copias.

Para un mejor análisis metabólico la cuantificación en línea de los gases a la salida del sistema puede proporcionar información importante para fines prácticos de balances de carbono, así como también el uso de medios simples y definidos. Al cuantificar el oxígeno y el bióxido de carbono se puede calcular el coeficiente respiratorio o  $RQ$ , con este coeficiente es posible inferir cambios en la cadena respiratoria inducidos por las fluctuaciones de oxígeno disuelto. Para analizar los gases normalmente se realiza acoplado un analizador paramagnético para el caso de oxígeno y un analizador infrarrojo para el bióxido de carbono e incluso un espectrómetro de masas.

Dado el comportamiento peculiar de la bacteria con respecto a los ceses transitorios en el consumo de oxígeno, resultaría interesante investigar cual es el componente clave que esta dando lugar a dicho comportamiento.

Sería interesante evaluar en el sistema desarrollado, el comportamiento de cepas de *E. coli* que han sido modificadas por ingeniería de vías metabólicas, específicamente aquellas que tienen bloqueado el transporte de glucosa (por ejemplo cepas PTS<sup>-</sup> glk<sup>+</sup>) ya que se ha observado una disminución en la acumulación de acético en el medio.

Finalmente la incorporación de técnicas como el uso de microarreglos de ADN y métodos propios de la proteómica, podrían generar información valiosa sobre el comportamiento de *Escherichia coli* en condiciones fluctuantes de oxígeno disuelto, datos que hasta el momento no existen en la literatura y que ayudarían entender lo que sucede en los biorreactores a gran escala desde un punto de vista de la fisiología de la bacteria. Mediante estas técnicas se podrían conocer por ejemplo, los tiempos en que la bacteria responde ante una fluctuación a nivel de mensajero así como también la concentración de una proteína específica siendo de especial interés el perfil a lo largo de la cinética de la enzimas piruvato formato-liasa y lactato deshidrogenasa, las cuales son claves en la ruta fermentativa.

## Referencias

1. Amanullah, A., Emery, A. N. and Nienow, A. W. The effects of dissolved oxygen cycling on the biological performance of a culture of *Bacillus subtilis*. **The 1992 IchemE Research Event, Birmingham, U.K.** 10-12, 1992.
2. Amanullah A., McFarlane C.M., Emery A. N. and Nienow A.W. Scale down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering** 73: 390-399, 2001.
3. Andersen D.C., Swartz J., Ryll T., Lin N. and Snedecor B. Metabolic oscillations in an *E.coli* fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** 75: 212-218, 2001.
4. Anderson C., LeGrys G.A. and Solomons G.L. Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. **The Chemical Engineering**. Febrero : 43-49 , 1982
5. Bailey J. E. and Ollis D. F. **Biochemical Engineering and Fundamentals**. Mc Graw Hill., New York.1986
6. Bakker A. The Colorful Fluid Mixing Gallery, <http://www.bakker.org/cfm> (2000).
7. Becker S., Holighaus G., Gabrielczyk T. and Uden G. O<sub>2</sub> as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 178: 4515-4521, 1996.
8. Becker S., Vlad D., Schuster S., Pfeitter P. and Uden G. Regulatory O<sub>2</sub> tensions for synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. **Archives of Microbiology** 168: 290-296, 1997.
9. Bongaertz J. and Uden G. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimia et Biophysica Acta** 1320: 217-234, 1997.
10. Bylund F., Collet E., Enfors S.-O. and Larsson G. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. **Bioprocess Engineering** 18: 171-180, 1998
11. Bylund F., Castan A., Mikkola R., Veide A. and Larsson G. Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. **Biotechnology and Bioengineering** 69: 119-128, 2000.
12. Castan A. and Enfors S.-O. Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering** 77: 324-328, 2002.

13. Chen J., Tannahill L. and Shuler M.L. Design of a system for the control of low dissolved oxygen concentrations: Critical oxygen concentrations for *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering** 27: 151-155, 1985.
14. Da Silva N.A. and Bailey J.E. Theoretical growth yield estimates for recombinant cells. **Biotechnology and Bioengineering** 28: 741-746, 1986.
15. De León, A. Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. 1996
16. Doran P.M. Design of reactors for plant cells and organs, En: **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, Fiechter A. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 115-168, 1993
17. Doran P.M. **Bioprocess Engineering Principles**. (Ed.), Academic Press., San Diego, CA. 1998.
18. Eastwood L. H., Leung S. and Karavanov A. Detection and assay methods. In **Current Protocols in Protein Science**. Coligan J.E., Dunn B.M., Ploegh H.L., Speicher D.W. Wingfield P.T. (Eds). John Wiley and Sons, New York, pp 3.41- 3.4.10, 1995.
19. Einsele A. Scaling Up Bioreactors. **Process Biochemistry**. July: 13-14, 1978.
20. Galindo E. Traslación de escala. Memorias del V Curso latinoamericano de Biotecnología y XXII Curso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso, Chile: 1-20, 1996.
21. Garnier A., Voyer R., Tom R., Perret S., Jardin B. and Kamen A. Dissolved carbon dioxide accumulation in a large scale and high density production of TGF $\beta$  receptor with baculovirus infected Sf-9 cells. **Cytotechnology** 22: 53-66, 1996.
22. Gosset G., de Anda R., Cruz N., Martinez A., Quintero R. and Bolivar F. Recombinant protein production in cultures of an *Escherichia coli* trp-strain. **Applied Microbiology and Biotechnology** 51: 564-571, 1993.
23. Guillard F. and Trägårdh C. Modeling of the performance of industrial bioreactor with a dynamic microenvironmental approach: A critical review. **Chemical Engineering Technology** 22: 187-195, 1999.
24. Hewitt C.J., Boon L.A., McFarlane C. M. and Nienow A. W. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during

- continuos cultivation in an agitated bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering** 59: 612-620, 1998.
25. Joshi J.B., Elias C.B. and Patole M.S. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. **The Chemical Engineering Journal** 62: 121-141, 1996.
  26. Knappe J., Neugebauer F.A., Blaschkowski H.P. and Gänzler M. Post-traduccional activation introduces a free radical into piruvate formate-lyase. **Proceedings of the National Academic Science. USA** 81:1332-1335, 1984
  27. Konz J.O., King J., Cooney C.L. Effects of oxygen on recombinant protein expression. **Biotechnology Progres** 14: 393-409, 1998.
  28. Koplove H.M. and Cooney C.L. Enzyme production during transient growth. **Advances in Biochemichal Engineering** 2: 1-40, 1979.
  29. Landwall P. and Holme T. Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture. **Journal of Genetic Microbiology** 103: 353-358, 1977.
  30. Lehninger A. L., Nelson D. I., and Cox M. M. Principles of Biochemistry. Worth Publishers., New York, 1993.
  31. Lester R.L and De Moss J.A. Effect of molybdate and selenite on formiate and nitrate metabolism in *E.coli*. **Journal of Bacteriology** 105: 1006-1014, 1971
  32. Li J., Gomez P. and Humphrey A. The use of fluorometry for on-line measurement of mixing time and hold-up in fermentations. **Biotechnology Techniques** 4: 293-298, 1990.
  33. Lin H.Y., Mathiszik B., Xu B., Enfors S.O. and Neubauer P. Determination of the maximun specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed batch cultivations of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioingneering** 73: 347-357, 1999.
  34. Lidén G. Understanding the bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering** 24: 273-279, 2002.
  35. Luli G. W. and Strohl W.R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied Enviromental Microbiology** 56: 1004-1011, 1990.
  36. Luyben K.ChA.M. Regimen analysis for the scale-down of biotechnological processes, En: *Proceedings of the international symposium on bioreactor performance*, Nordic

- programme on bioprocess engineering, Mortensen U. and Noorman H.J. (Eds.), Denmark, pp. 159-169, 1993.
37. Manfredini R., Cabellera V., Marini L. and Donati G. Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. **Biotechnology and Bioengineering** 25: 3115-3131, 1983.
  38. Morao A., Maia C.I., Fonseca M.M.R., Vasconcelos J.M.T. and Alves S.S. Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. **Bioprocess Engineering** 20: 165-172, 1999.
  39. Namdev P.K., Irwin N., Thompson B.G. and Gray M.R. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** 41: 666-670, 1993.
  40. Neidhardt F.C. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. (Ed.) ASM Press, Washington D.C. 1996.
  41. O'Beirne D. and Hamer G. The utilization of glucose/acetate mixtures by *Escherichia coli* W3110 under aerobic growth conditions. **Bioprocess Engineering** 23: 375-380, 2000.
  42. O'Beirne D. and Hamer G. Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: A problem exacerbated by scale up. **Bioprocess Engineering** 23: 487-494, 2000.
  43. O'Beirne D. and Hamer G. Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: Dynamic responses to limitation and starvation. **Bioprocess Engineering** 23: 4381-387, 2000.
  44. Olmos J., Cruz N., Sánchez M., López M., Balbás P., Gosset G., Valle F. and Bolivar F. Production in *Escherichia coli* of a rat chimeric proinsulin polypeptide carrying human A and B chains and its preparative chromatography. **Journal of Biotechnology** 38: 89-96, 1994.
  45. Ossterhuis N.M.G. Scale-up of bioreactors, a scale down approach, Ph. D thesis, Delft University Technology, Delft, The Netherlands, 1980.
  46. Ossterhuis N.M.G., Kossen, N.W.F Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering** 26: 546-550, 1984.
  47. Ossterhuis N.M.G., Kossen, N.W.F., Oliver, A.P.C. and Schenk, E.S. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. **Biotechnology and Bioengineering**. 27: 711-720, 1985.

48. Ozturk S. Engineering challenges in high density cell culture systems. **Cytotechnology** 22: 3-16, 1996.
49. Palomares, L.A. and Ramírez, O.T. "Bioreactor Scale-Down" En: The Encyclopedia of Cell Technology; Spier, R.E. (Ed), John Wiley and Sons, Inc., 174-183, 2000.
50. Palomares, L.A., Kuri-Breña, F. and Ramírez, O.T. " Industrial Recombinant Protein Production", En: The Encyclopedia of Life Support System, D. Al Gobaisi (Ed.), EOLSS Publishers, UNESCO. 2002.
51. Pedersen A. G., Bundgaard-Nielsen M., Nielsen J. and Villadsen J. Characterization of mixing in stirred tank bioreactors equipped with Rushton turbines. **Biotechnology and Bioengineering** 44: 1013-1017.
52. Qoronfleh M.W. Dissolved oxygen affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 80: 107-120, 1999.
53. Ramírez O.T., Zamora R., Quintero R. and Lopez-Munguía A. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. **Enzyme Microbiology Technology** 10 : 895-903, 1994.
54. Ramírez O.T., Zamora R., Espinosa G., Merino E., Bolívar F. and Quintero R. Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E.coli* in batch cultures. **Process Biochemistry** 29: 197-206, 1994.
55. Rusell J. B. and Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on the bacterial growth. **Advances of Microbial Physiology** 39: 205-34, 1998.
56. Ryan W. and Parulekar S.J. Recombinant protein synthesis and plasmid instability in continuous cultures of *Escherichia coli* JM103 harboring a high copy number plasmid. **Biotechnology and Bioengineering**. 37: 415-429, 1991.
57. Sandén A.M., Prytz I., Tubulekas I., Förbger C., Le H., Hektor P., Neubauer P., Pragai Z., Harwood C., Ward A., Picon A., Teixer de Mattos J., Postma P., Farewell A., Nyström T., Reeh S., Pedersen S. and Larsson. Limiting factors in *Esherichia coli* fed batch production of recombinant proteins. **Biotechnology and Bioengineering** 81: 157-166, 2002.
58. Sawers G. And Jarsch M. Alternative regulation principles for production of recombinant proteins in *Esherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology** 46: 1-9, 1996.
59. Serrato P. J.A. Estudio de escalamiento descendente del proceso de producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, UNAM, 2002.

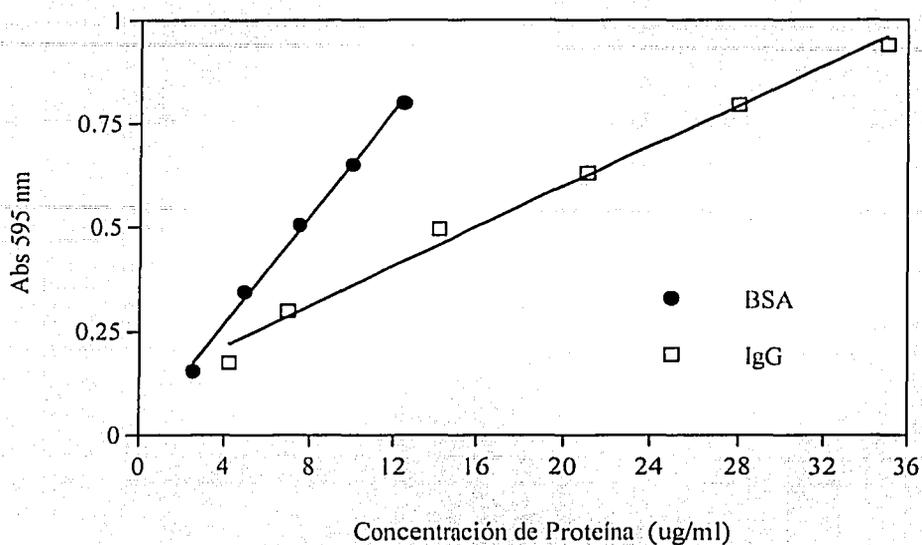
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

60. Schweder T., Krüger E., Xu B., Jürgen B., Blomsten G., Enfors S.,-O. and Hecker M. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. **Biotechnology and Bioengineering** 65: 151-159, 1999.
61. Solá C. and Gòdia F. Scale-up, En: Bioreactor system design, Asenjo J.A. and Noorman H.J. (Eds), Denmark: 15-22, 1995.
62. Stephanopolous G. Chemical process control. An introduction to Theory and Practice, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1987.
63. Supantharika M., Ison A.P. and Lilly M.D. The effect of cycling dissolved oxygen tension on the synthesis of the antibiotic difficin by *Bacillus subtilis*. **Bioprocess Engineering** 12: 181-186, 1995
64. Swartz J.R. U.S. patent 5,342,763. Method of determining propensity of dissolved oxygen instability, 1995.
65. Sweere A.P.J., Luyben K.Ch.A.M. and Kossen N.W.F. Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. **Enzyme Microbiology Technology** 9: 386-398, 1987.
66. Sweere A.J., Janse L., Luyben K.Ch.A.M. and Koseen N.W.F. Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production: 2. Two-fermentor system. **Biotechnology and Bioengineering** 31: 579-586, 1988b.
67. Suarez D. C. and Kilikian B.V. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli* **Process Biochemistry** 35 : 1051-1055, 2000.
68. Träger M., Hollmann D., Buse R. and Onken Ulfert. Device for fermentations with oscillations of dissolved oxygen. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 72: 46-53, 1991.
69. Trujillo-Roldán M.A., Peña C., Ramírez O.T. and Galindo E. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Progress** 17: 1042-8, 2001.
70. Uden G. and Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1320 217-234, 1997.
71. Unutmaz C., Cail R. G. and Haggat K. D. Increased  $\alpha$ -lytic protease production from recombinant *Escherichia coli* grown with oxygen limitation. **Biotechnology Letters** 19: 731-734.

72. Weber J. and Kayser A. Steady state and dynamics in continuous culture of *Escherichia coli*: metabolic fluxes and activation of the methylglyoxal pathway. abstract Metabolic Engineering III Conference, Colorado Springs, CO, October, 2000.
73. Xu. B., Jahic M., Blomsten G., Enfors S.O. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology** **51**: 564-571, 1999.
74. Xu B., Jahic M., Blomsten G. and Enfors S.O. Modeling overflow metabolism in batch and fed batch cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress** **15**: 81-90, 1999.
75. Yegneswaran P.K. and Gray M.R. Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology and Bioengineering**. **38**: 1203-1209, 1991.
76. Yamane T. K. and Shimizu S. Fed batch techniques in microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** **39**: 550-555, 1984.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Anexo I. Curvas estándar de proteína total y ácidos orgánicos.

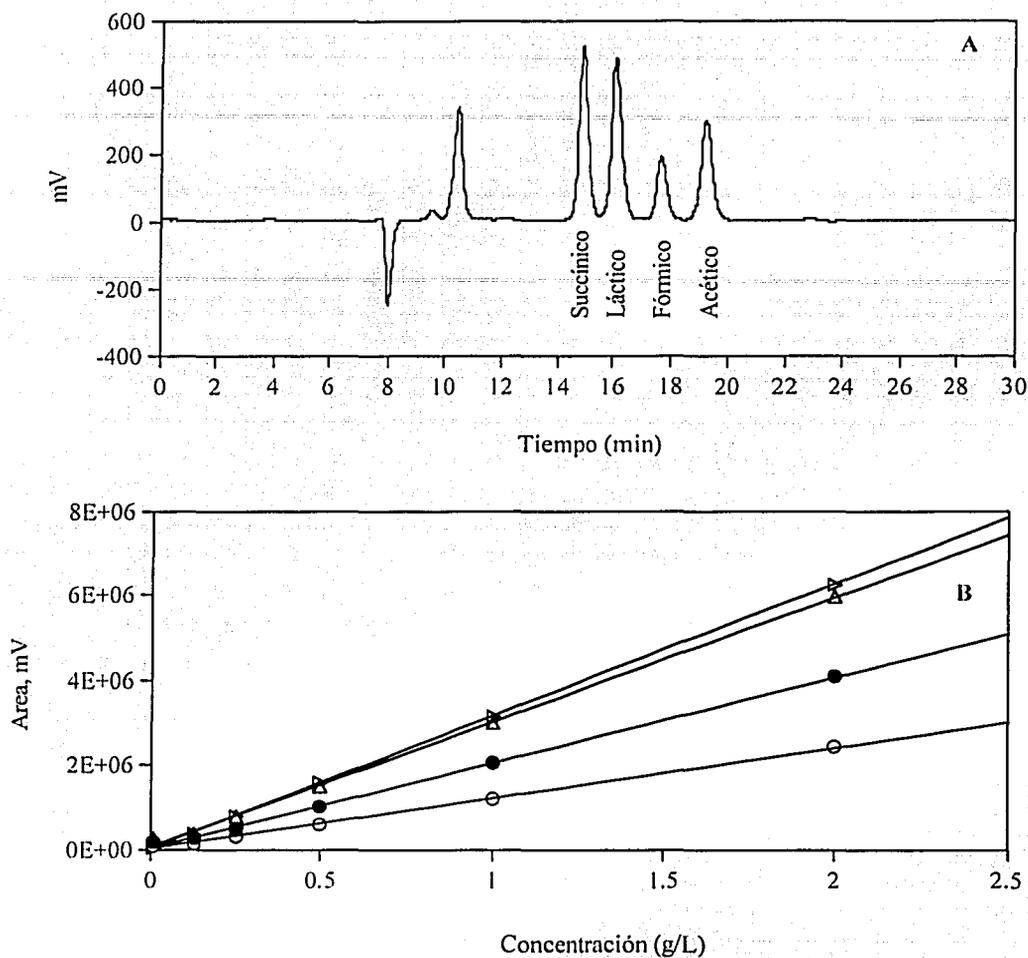


$$y = 0.0638 X + 0.0119 \quad r^2 = 0.997 \quad \text{BSA}$$

$$y = 0.0241 X + 0.1164 \quad r^2 = 0.9906 \quad \text{IgG}$$

$$\text{Conc. de Prof. Total IgG (ug/ml)} = 2.64 \text{ Conc. de Prof. Total BSA (ug/ml)} - 4.33$$

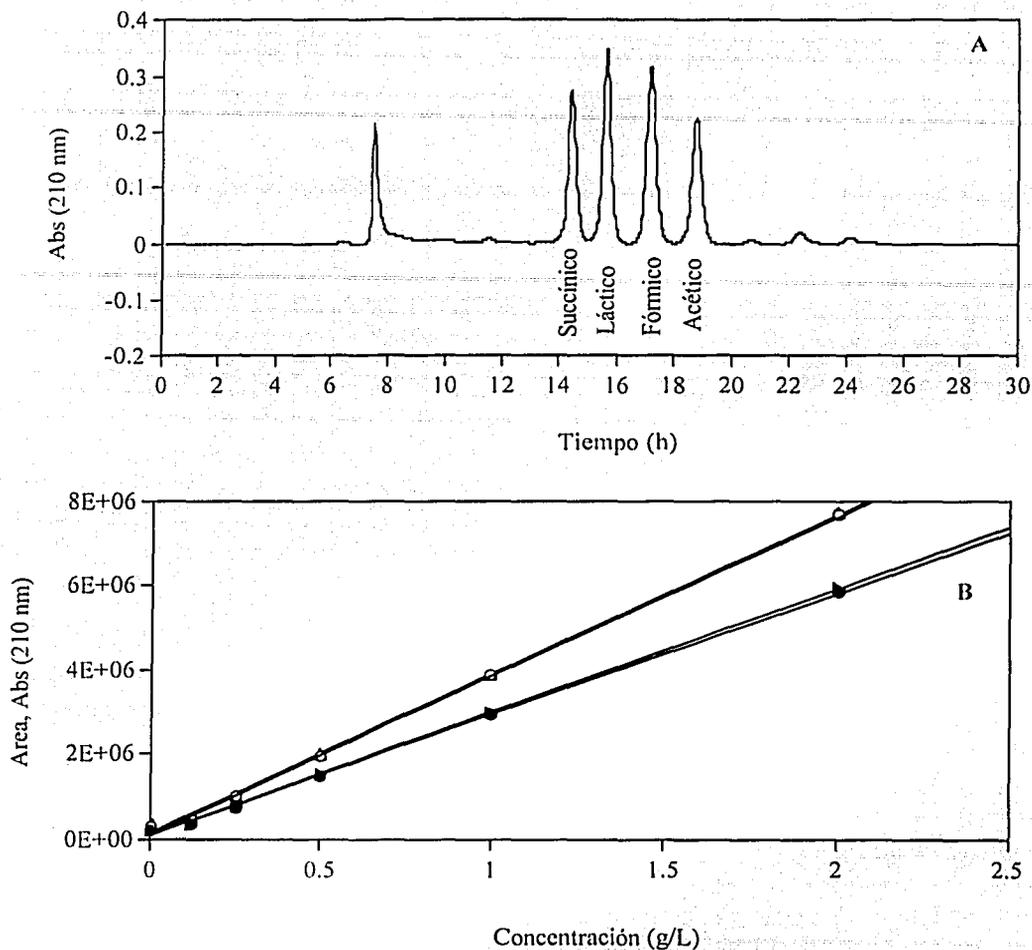
Figura I-1.- Curva estándar de albúmina bovina (BSA) y gama globulina (IgG) para cuantificación de proteína total.



## Ácidos Orgánicos

- Acético  $y = 2011592.770x + 40981.094$   $r^2 = 0.999$
- Fórmico  $y = 1191166.060x + 22754.288$   $r^2 = 0.999$
- △ Láctico  $y = 2930304.781x + 82721.428$   $r^2 = 0.999$
- ▷ Succínico  $y = 3129911.026x + 4674.005$   $r^2 = 1.000$

Figura I-2. Cromatograma de estándares (A) y curva estándar (B) de ácidos orgánicos cuantificados en detector de índice de refracción (IR).



Ácidos Orgánicos

- Acético  $y = 2871719.222x + 52671.640 \quad r^2 = 0.999$
- Fórmico  $y = 3766493.808x + 89803.467 \quad r^2 = 0.999$
- △ Láctico  $y = 3774490.440x + 119414.405 \quad r^2 = 0.999$
- ▷ Succinico  $y = 2917930.816x + 60668.297 \quad r^2 = 0.999$

Figura I-3. Cromatograma de estándares (A) y curva estándar (B) de ácidos orgánicos cuantificados en detector de arreglo de diodos (PDA).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## Anexo II.

Tabla II-1.- Secuencias de proteínas Anhidrasa carbónica Bovina y Trp-LE proinsulina

Aminoácidos	Anhidrasa Carbonica Bovina				Trp-Le proinsulina			
	256 aa		260 aa		256 aa		260 aa	
	PM: 28490 Dalton		PM: 28115 Dalton					
	n	n(%)	PM	PM(%)	n	n(%)	PM	PM(%)
A ala alanine	17	6.6	1207	4.2	32	12.3	2273	8.1
C cys cysteine	-	-	-	-	9	3.5	927	3.3
D asp aspartic acid	16	6.2	1840	6.5	11	4.2	1265	4.5
E glu glutamic acid	10	3.9	1290	4.5	16	6.2	2064	7.3
F phe phenylalanine	11	4.3	1617	5.7	5	1.9	735	2.6
G gly glycine	20	7.8	1140	4	25	9.6	1425	5.1
H his histidine	11	4.3	1507	5.3	8	3.1	1096	3.9
I ile isoleucine	5	2	565	2	8	3.1	904	3.2
K lys lysine	18	7	2305	8.1	5	1.9	640	2.3
L leu leucine	26	10.2	2940	10.3	32	12.3	3618	12.9
M met methionine	3	1.2	393	1.4	6	2.3	786	2.8
N asn asparagine	13	5.1	1482	5.2	6	2.3	684	2.4
P pro proline	19	7.4	1844	6.5	9	3.5	873	3.1
Q gln glutamine	12	4.7	1536	5.4	11	4.2	1408	5
R arg arginine	9	3.5	1404	4.9	19	7.3	2965	10.5
S ser serine	16	6.2	1392	4.9	13	5	1131	4
T thr threonine	14	5.5	1414	5	12	4.6	1212	4.3
V val valine	20	7.8	1981	7	21	8.1	2080	7.4
W trp tryptophan	7	2.7	1302	4.6	2	0.8	372	1.3
X --- unknown	-	-	-	-	-	-	-	-
Y tyr tyrosine	8	3.1	1304	4.6	10	3.8	1630	5.8
Z --- STOP	1	0.4	-	-	-	-	-	-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Anexo III. Cultivos a TOD constante.

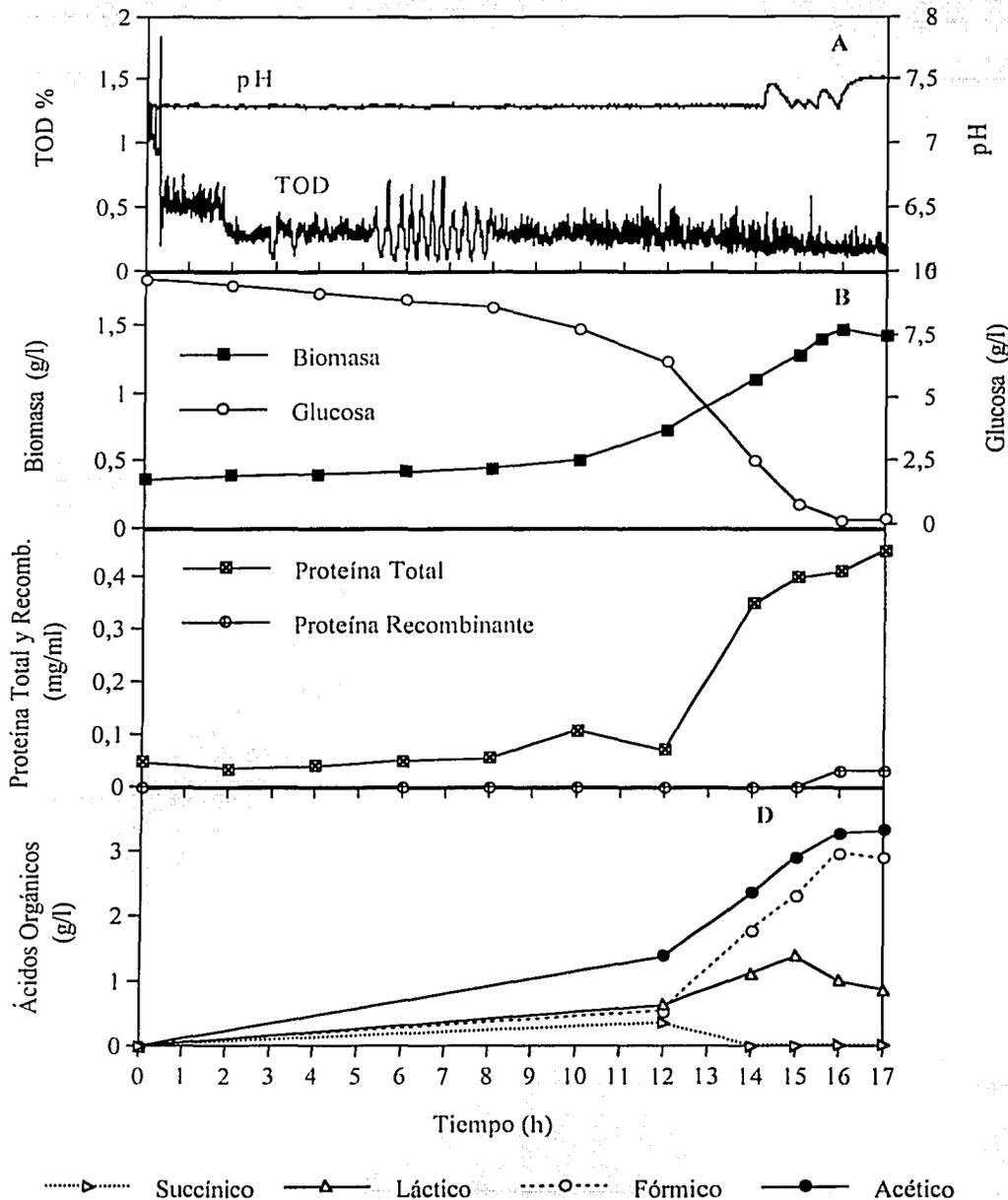


Figura III-1 .- Perfil cinético de cultivo a 0.2 % TOD constante. (Duplicado)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

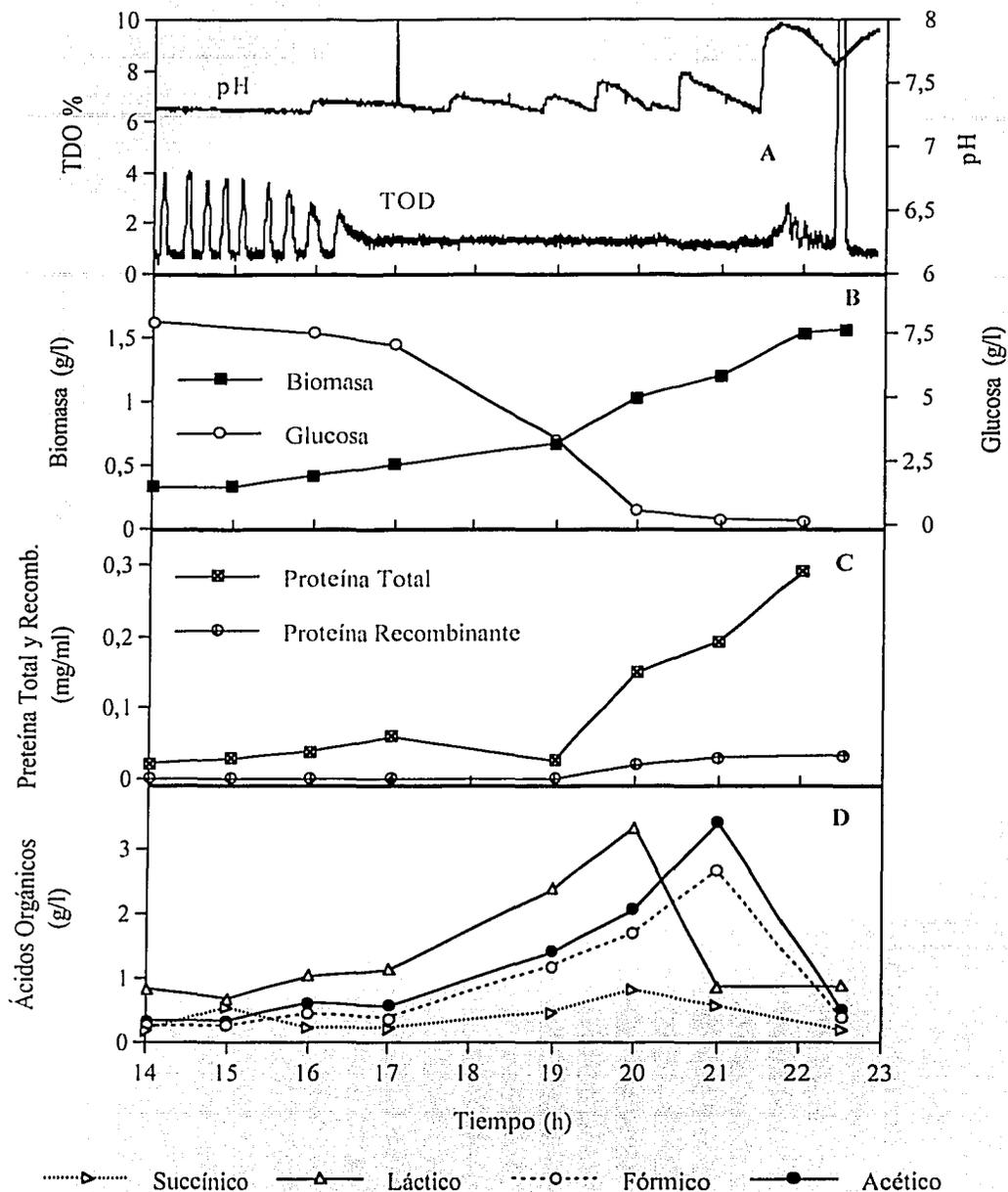


Figura III-2.- Perfil cinético de cultivo a 1 % TOD constante.

TESIS CON  
FALLA EN EL EN

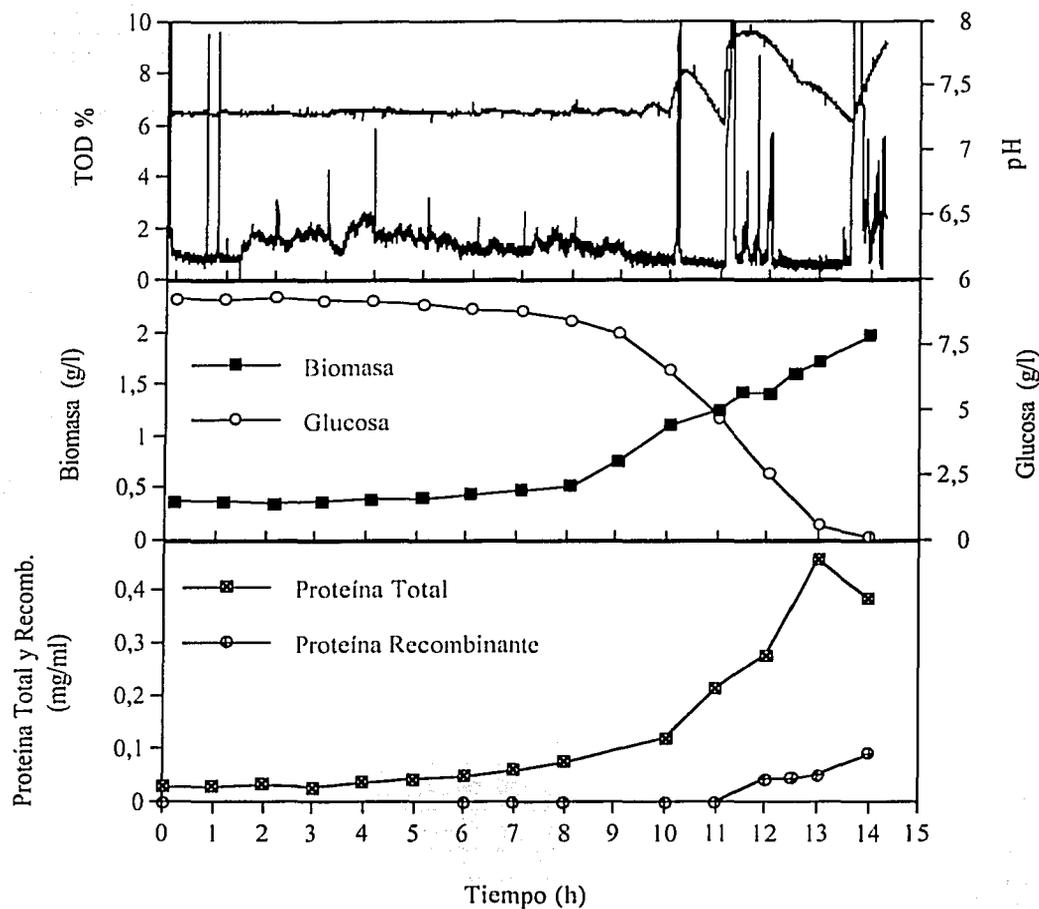


Figura III-3.- Perfil cinético de cultivo a 1 % TOD constante (Duplicado). Los datos de ácidos orgánicos no son mostrados debido a problemas de contaminación en las muestras de la fermentación.

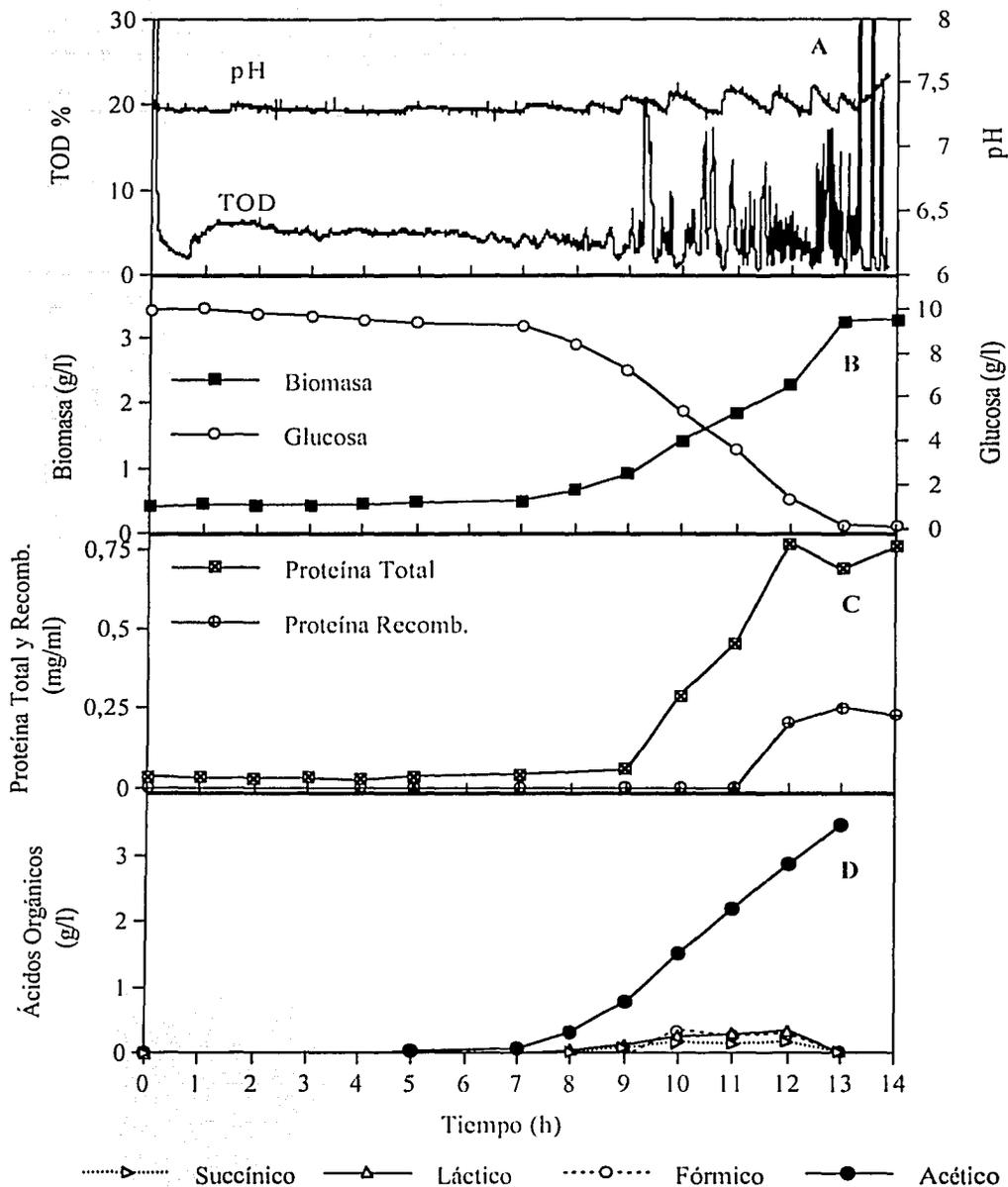
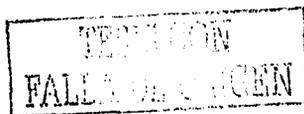


Figura III-4 .- Perfil cinético de cultivo a 5 % TOD constante.



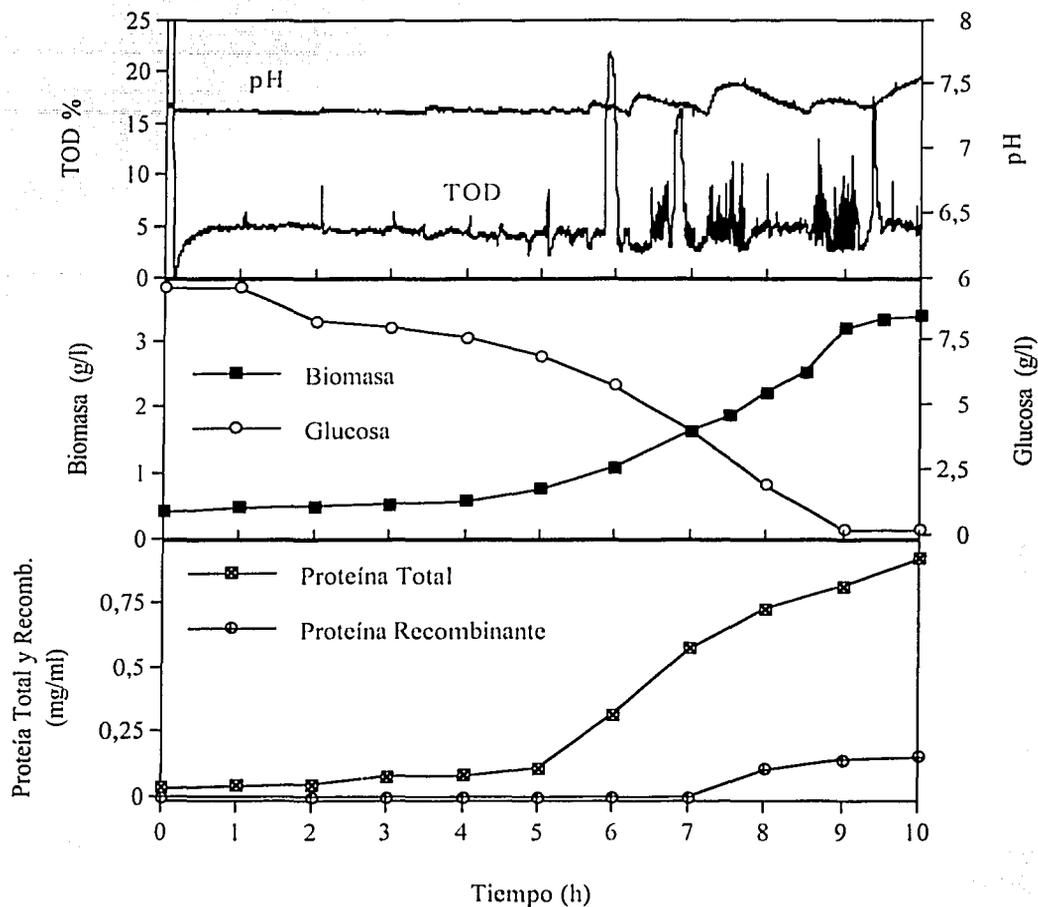


Figura III-5.- Perfil cinético de cultivo a 5 % TOD constante. (Duplicado). Los datos de ácidos orgánicos no son mostrados debido a problemas de contaminación en las muestras de la fermentación.

TESIS CON  
FALSO ORIGEN

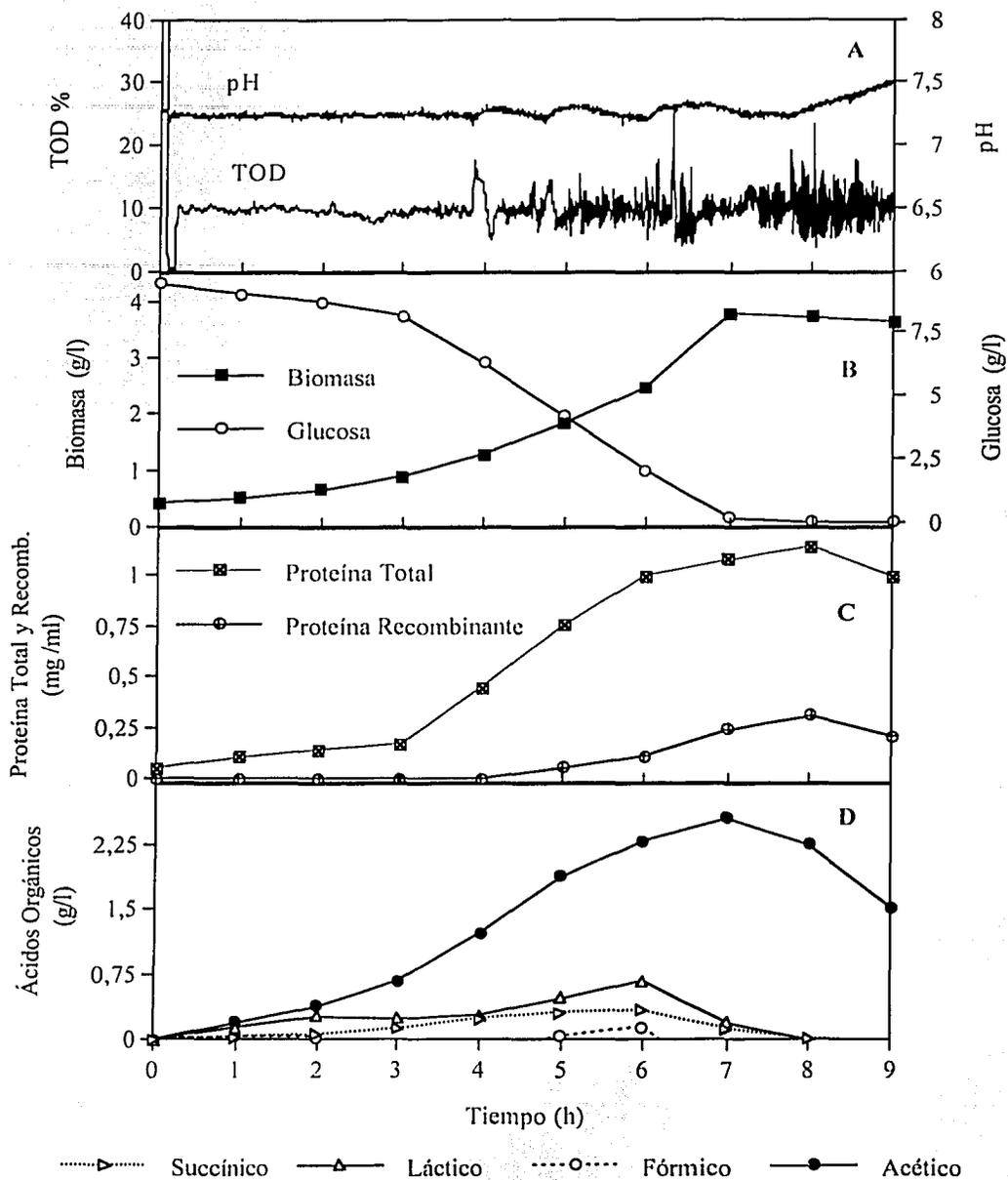


Figura III-6.- Perfil cinético de cultivo a 10 % TOD constante.

TESIS CON  
FALLA EN EL CEN

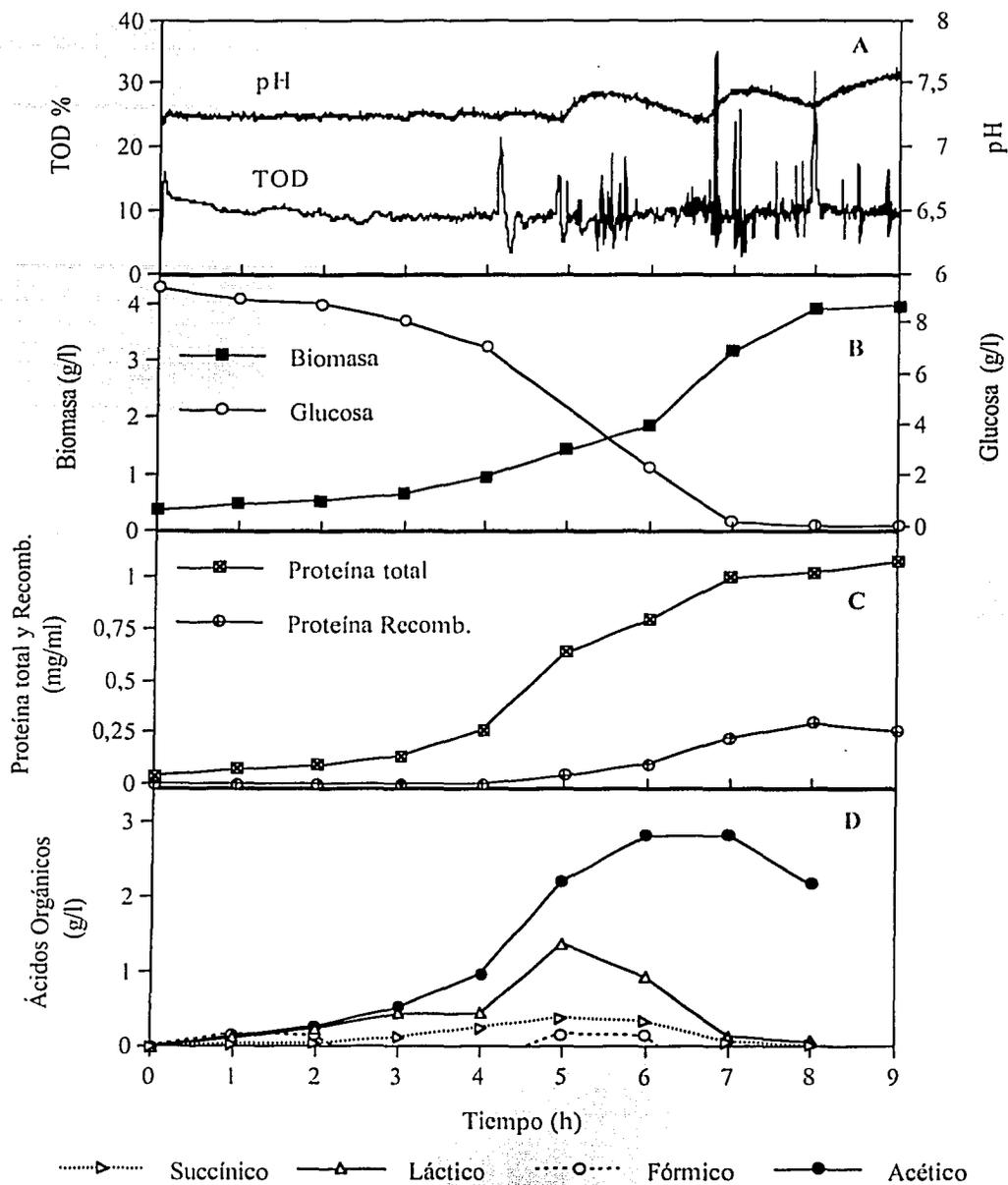


Figura III-7.- Perfil cinético de cultivo a 10 % TOD constante. (Duplicado)

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

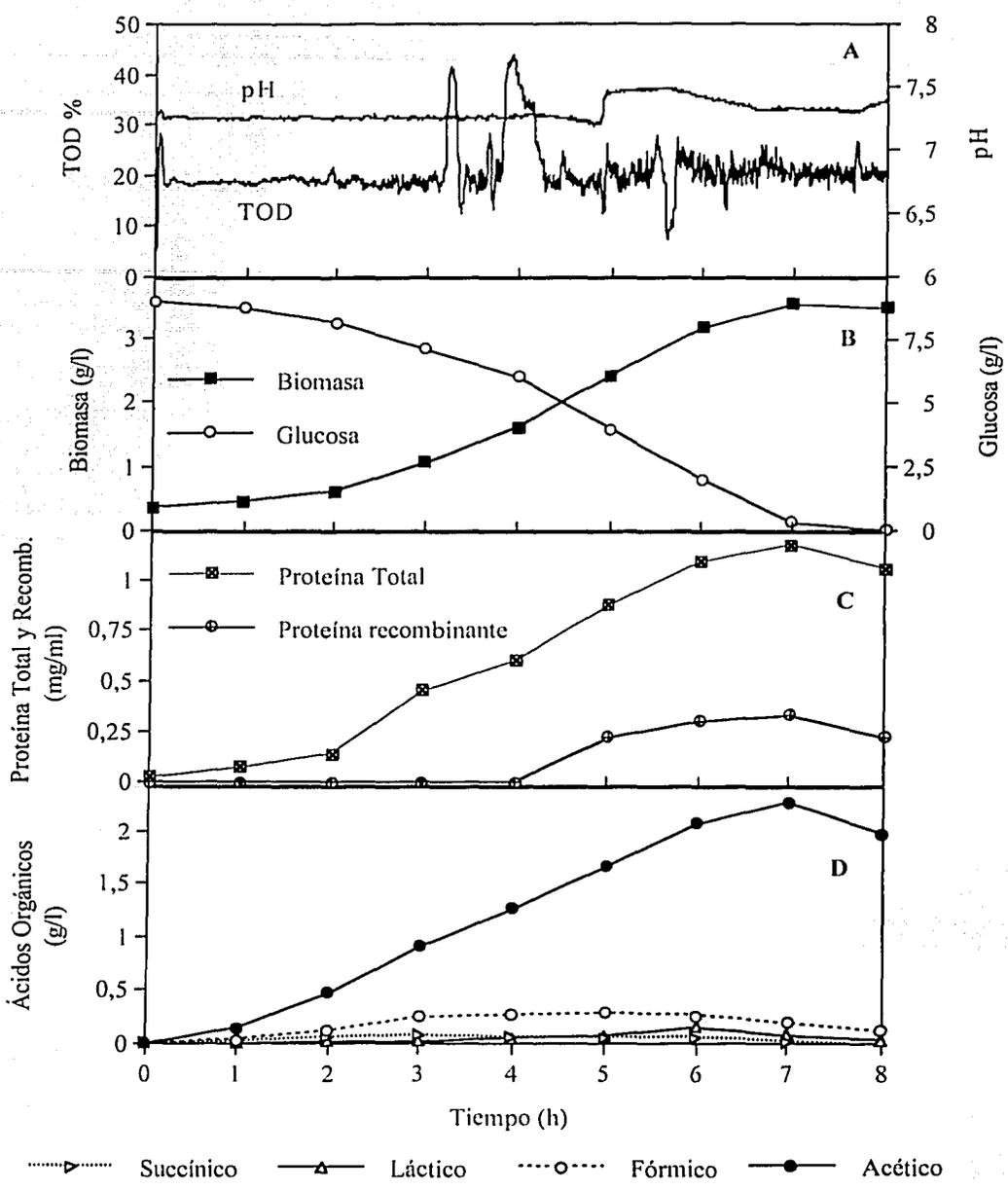
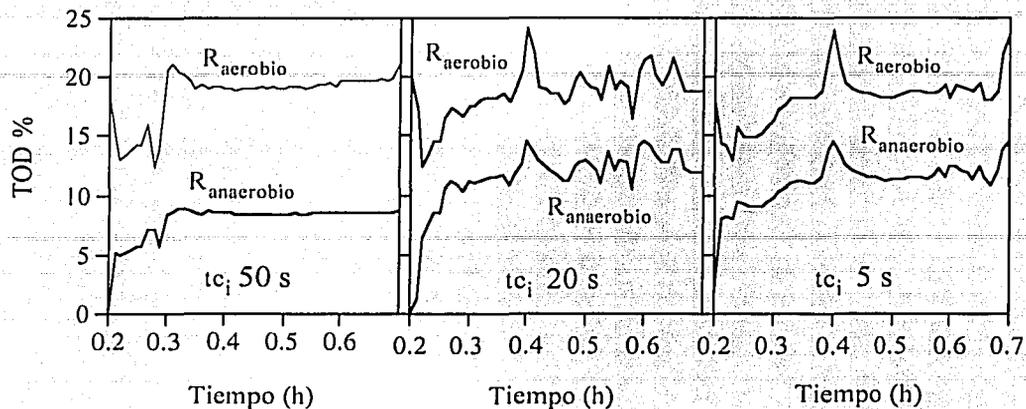
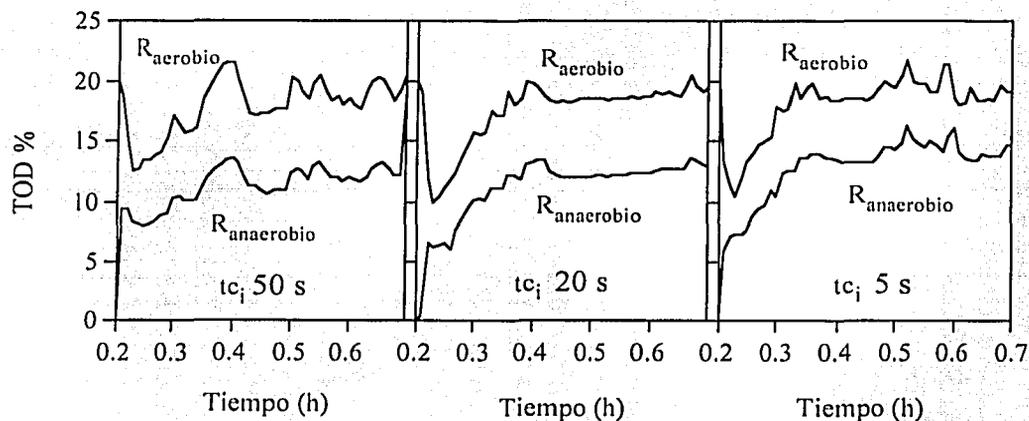


Figura III-8 .- Perfil cinético de cultivo a 20 % TOD constante. (Duplicado)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Anexo IV.- Caracterización del sistema doble a 500 y 900 rpm en  $R_{anaerobio}$** 


**Figura IV-1** .- Caracterización del sistema de 2 compartimentos utilizando una agitación 500 rpm en  $R_{aerobio}$  y 900 rpm en  $R_{anaerobio}$ .



**Figura IV-2** .- Caracterización del sistema de 2 compartimentos utilizando una agitación 500 rpm en  $R_{aerobio}$  y 500 rpm en  $R_{anaerobio}$ .

LES CON  
FALTA DE ORIGEN

Anexo V.- Cultivos a TOD oscilante.

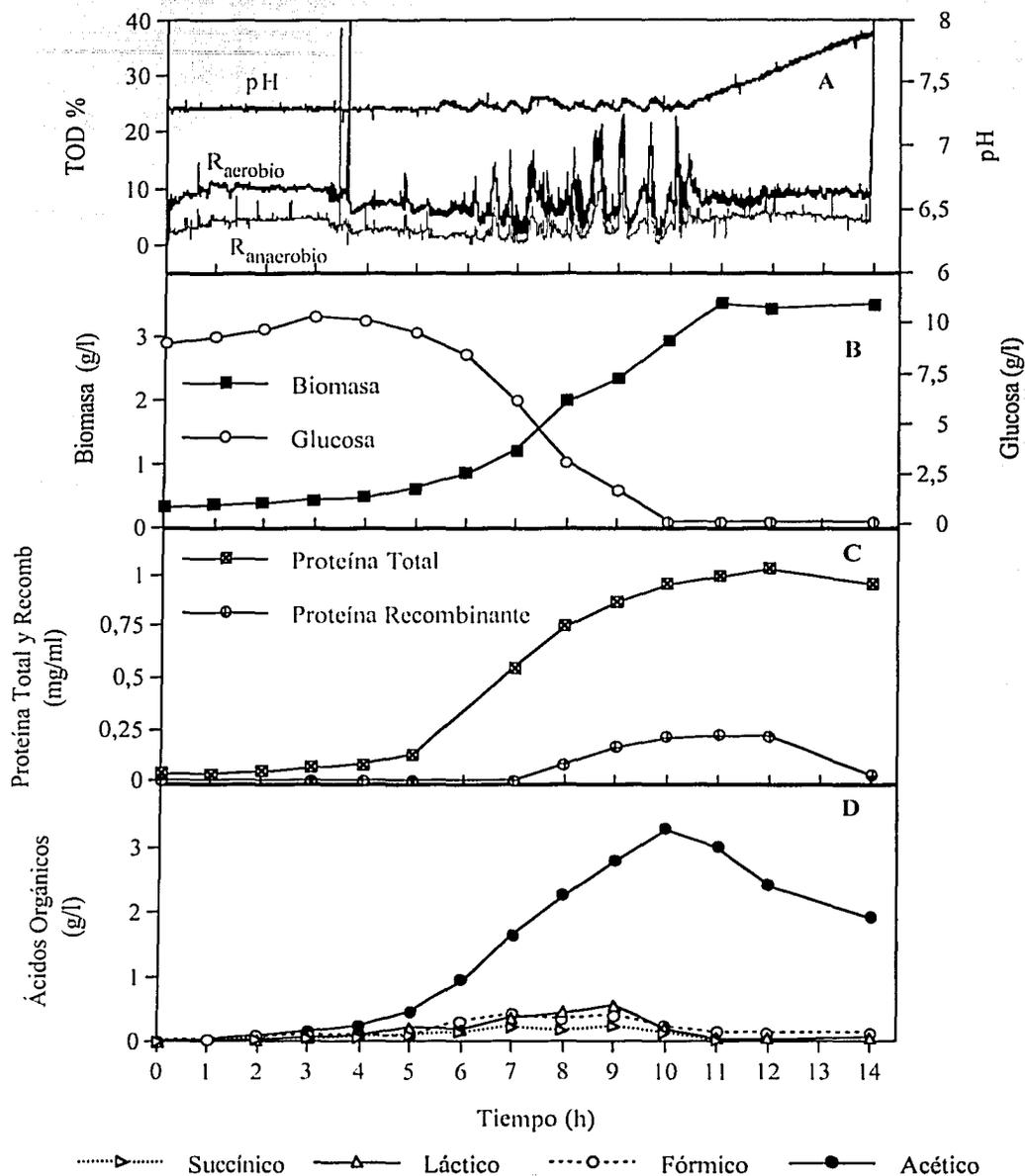


Figura V-1.- Perfil cinético de cultivo a un  $t_{c1}$  de 20 s. (Duplicado)

TEMAS CON  
CALIDAD DE OXIGEN

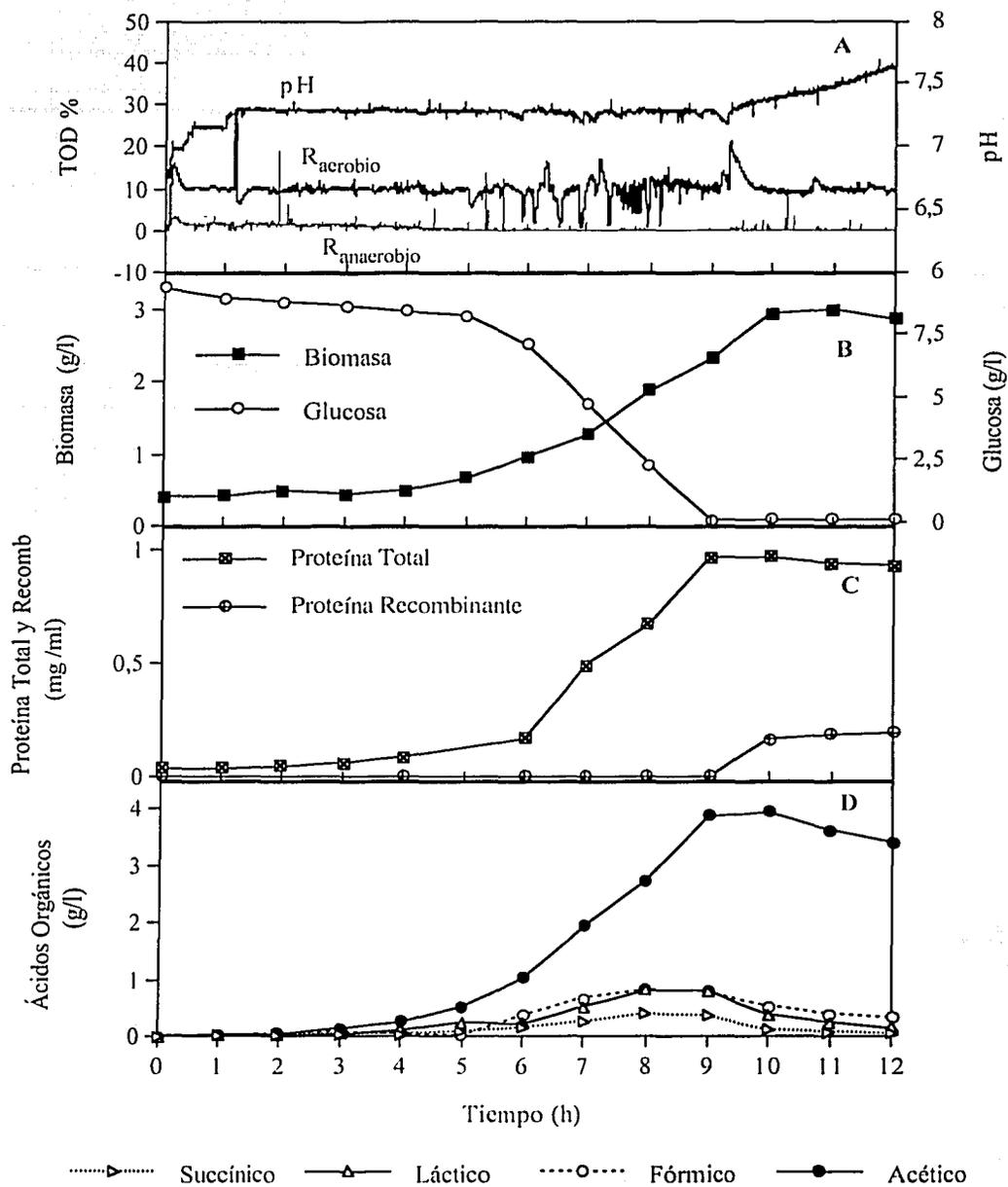


Figura V-2 .- Perfil cinético de cultivo a un  $t_c$  de 50 s.

ANÁLISIS CON  
PAQUETE DE ORIGEN

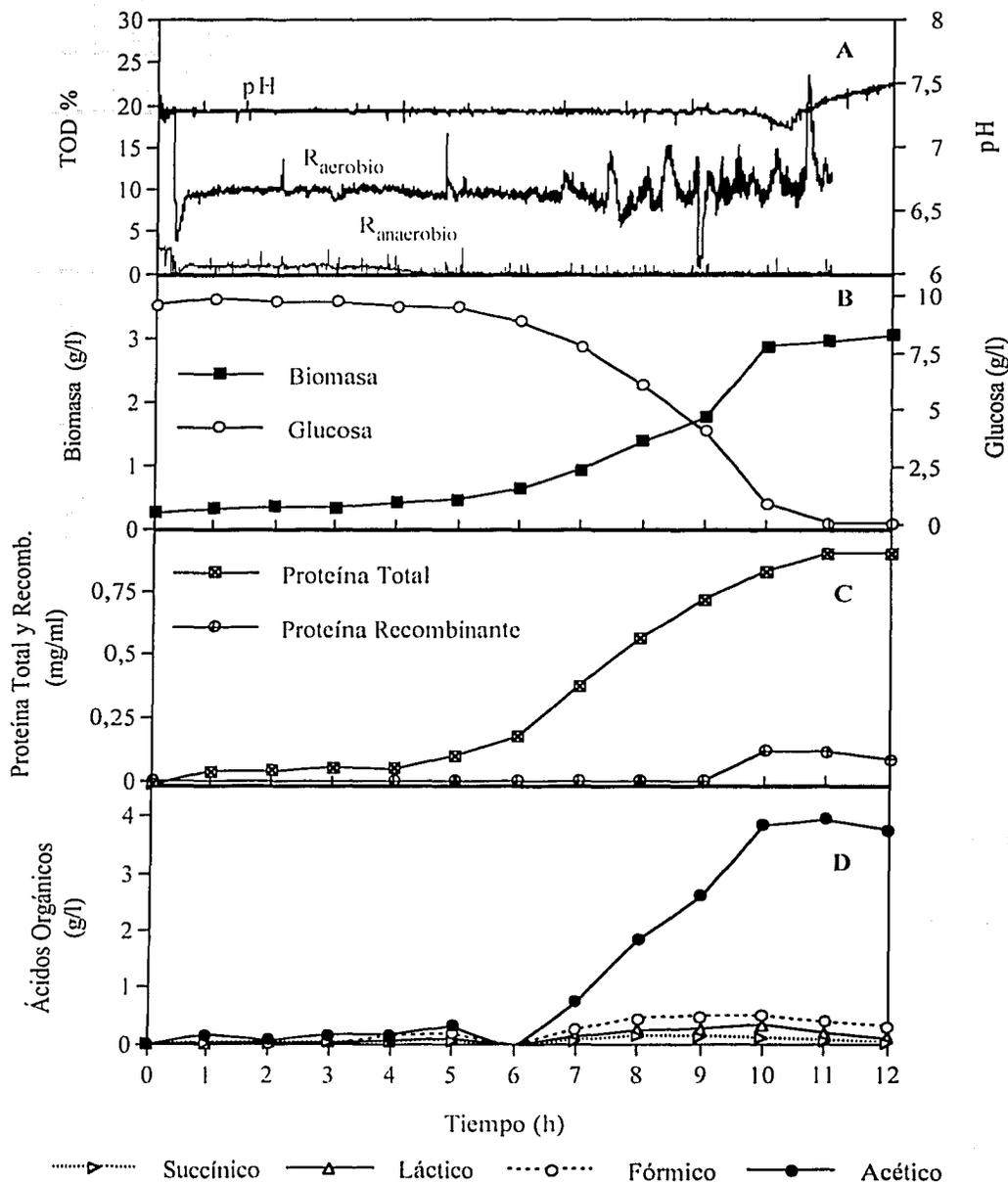


Figura V-3 .- Perfil cinético de cultivo a un  $t_{c1}$  de 50 s. (Duplicado)

TESIS CON  
ORIGEN

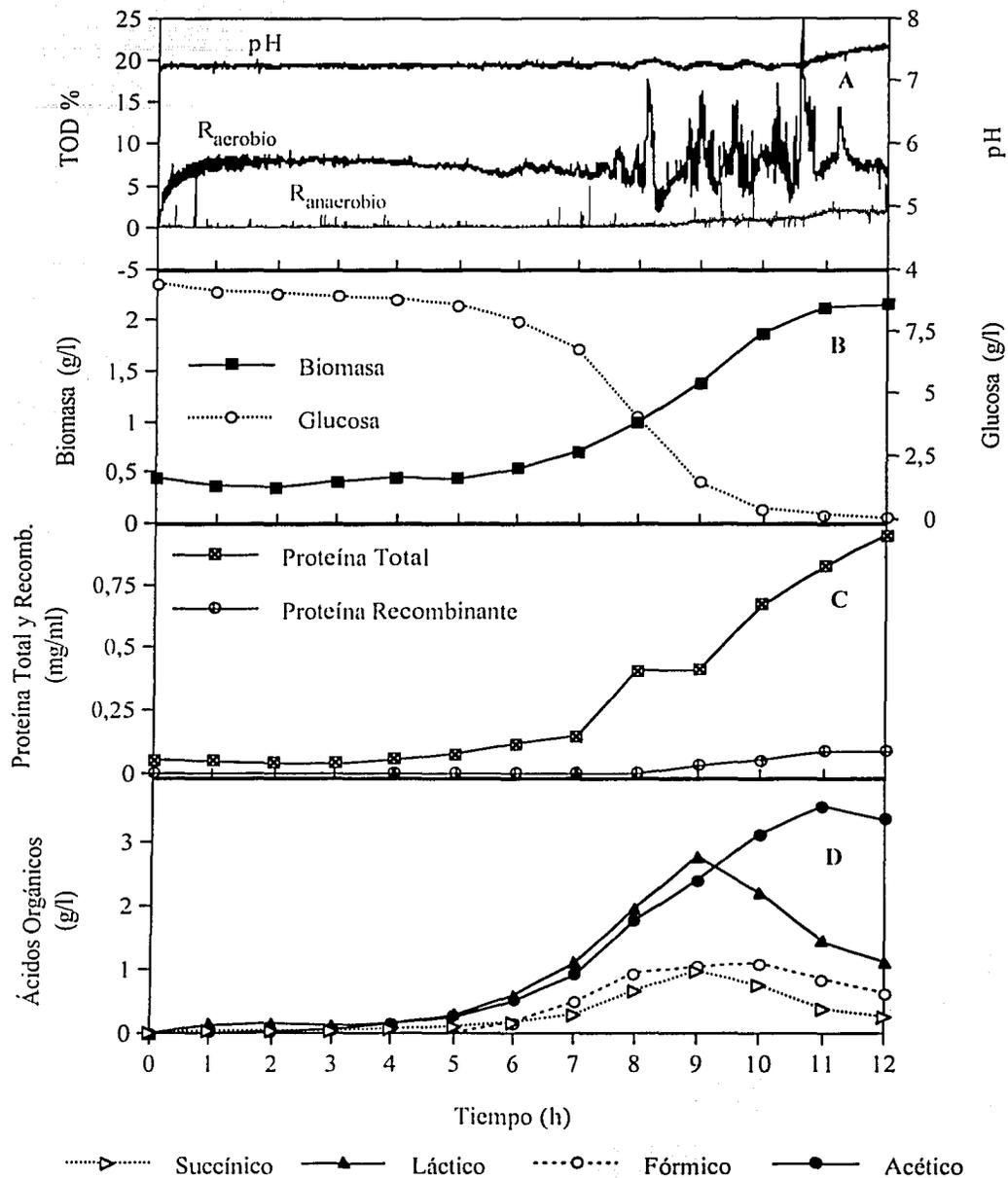


Figura V-4.- Perfil cinético de cultivo a un  $t_{c1}$  de 90 s.

TESIS CON  
 FAL DE ORIGEN

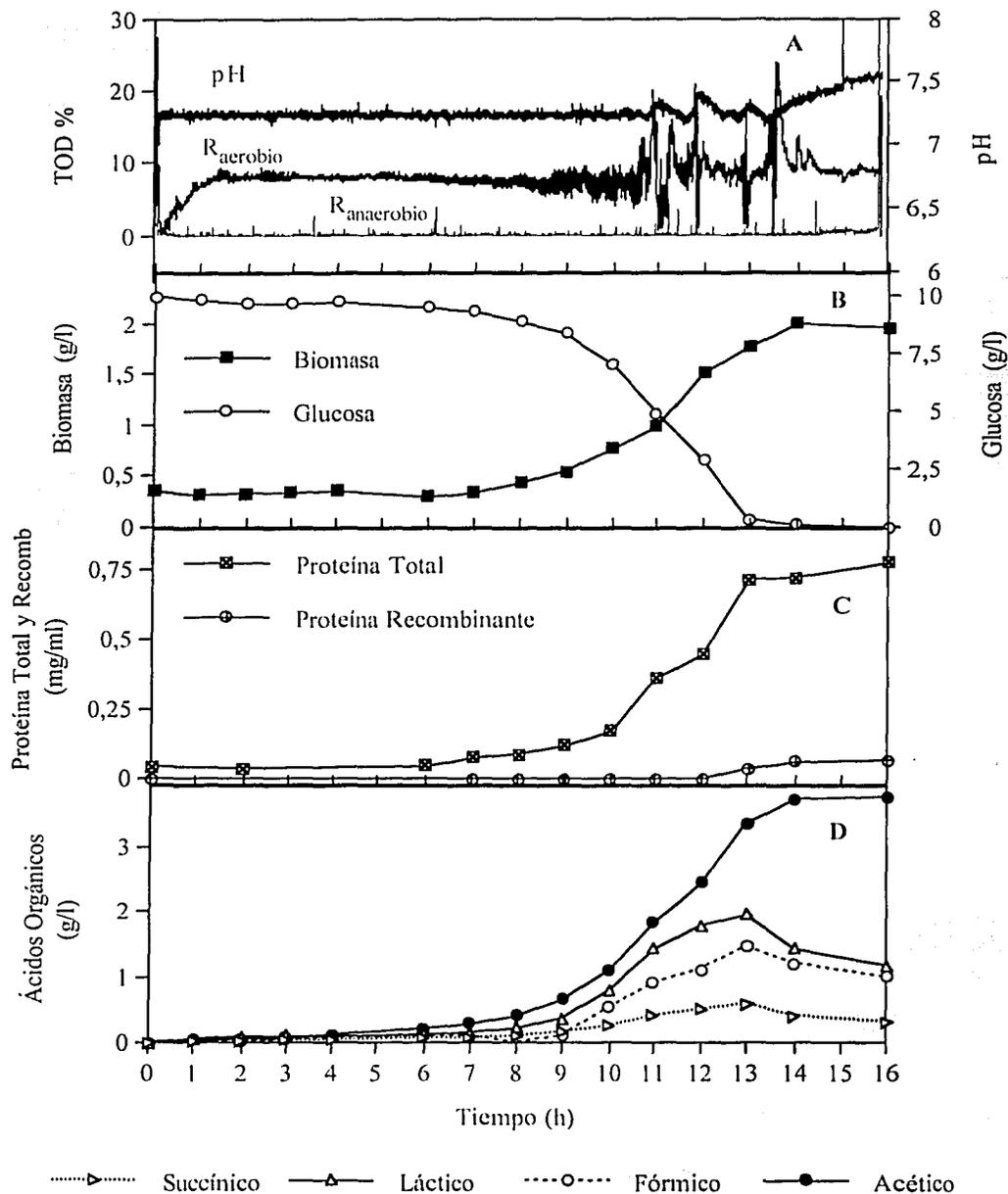


Figura V-5.- Perfil cinético de cultivo a un  $t_c$  de 90 s. (Duplicado)

TESIS CON  
FALSA ORIGEN

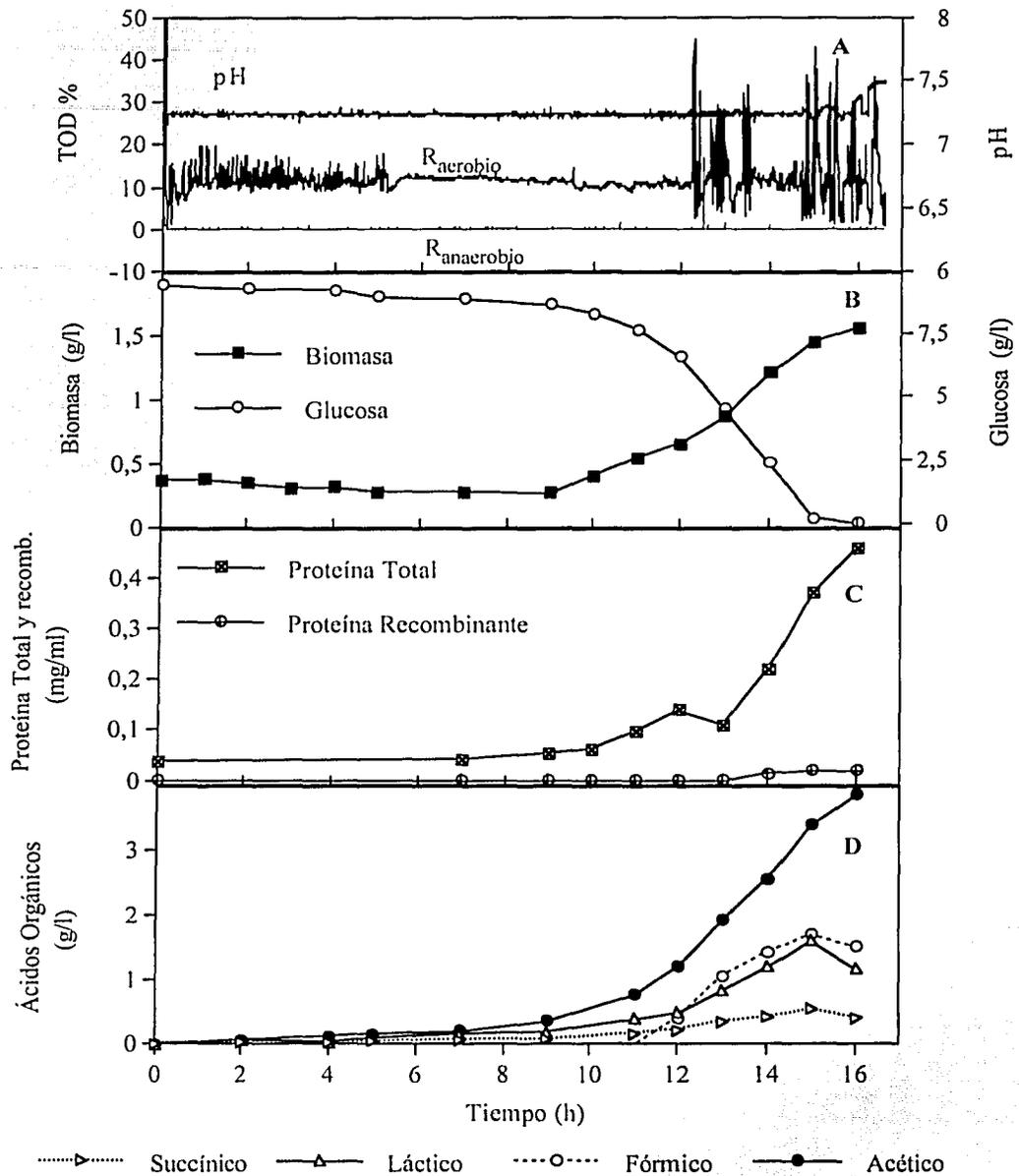


Figura V-6.- Perfil cinético de cultivo a un  $t_{c1}$  de 180 s. (Duplicado)

TESIS CON  
VALOR DE ORIGEN