

**GRADIENTES ESPACIALES EN BIORREACTORES:
EFECTOS FISIOLÓGICOS EN *Escherichia coli*
RECOMBINANTE Y ESTRATEGIAS MOLECULARES Y
DE PROCESO PARA CONTENDER CON LAS
HETEROGENEIDADES AMBIENTALES.**

Tesis Sometida al
Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

En cumplimiento de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

por

Alvaro Raúl Lara Rodríguez

Octubre de 2007





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.

Los estudios presentados en esta tesis se realizaron en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, excepto los presentados en la sección 3.1, los cuales fueron ejecutados en el Laboratorio Kluyver de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Delft, Países Bajos.

Se agradece la asesoría de la Dra. Noemí Flores en las técnicas de biología molecular y RT-CR, y el amplio apoyo otorgado por el Dr. Francisco Bolívar Zapata y el Dr. Guillermo Gosset Lagarda y sus grupos de trabajo para muchos de los experimentos descritos en esta tesis.

Se contó con financiamiento de los proyectos CONACYT NC-230, 43243, 46408-Z y UNAM/DGAPA IN220403-2, IN218902.

Se contó además con una beca para estudios de postgrado otorgada por CONACyT. Así mismo, se agradece el apoyo obtenido mediante el Premio Hy-Clone-Uniparts-SMBB a Protocolos de Investigación 2003, y a la beca otorgada por el Programa Huygens de la Agencia Neerlandesa de Cooperación Internacional (NUFFIC) para realizar una visita de investigación a la Universidad Tecnológica de Delft, en los Países Bajos.

Contenido.

Estructura de la Tesis	12
1. Introducción	13
1.1 Antecedentes	13
1.1.1 Deficiencias de los criterios tradicionales de escalamiento ascendente	14
1.1.2 Existencia de gradientes en biorreactores de gran escala	16
1.1.3 Escalamiento descendente basado en el análisis de régimen	18
1.1.4 Importancia de las fluctuaciones ambientales en cultivos de <i>E. coli</i>	20
1.2 Objetivos	26
2. Material y Métodos	27
2.1 Cepas y Plásmido empleados	27
2.1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	27
2.1.2 Plásmido	28
2.2 Medios de cultivo	29
2.2.1 Medio de cultivo para estudios de oscilaciones de oxígeno disuelto	29
2.2.2 Medio de cultivo para quimiostatos	29
2.2.3 Medio de cultivo para altas concentraciones iniciales de glucosa	30
2.2.4 Medio de cultivo para lotes alimentados	32
2.3 Condiciones de cultivo	33
2.3.1 Cultivo continuo (quimiostato)	33
2.3.2 Arreglo de biorreactores para simular gradientes de sustrato	33
2.3.3 Sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos (SED) para simular gradientes espaciales de oxígeno disuelto	36
2.3.4 Cultivo lote a altas concentraciones iniciales de glucosa	37
2.3.5 Cultivos alimentados exponencialmente	38
2.4 Métodos analíticos	38
2.4.1 Determinación de concentración celular	38
2.4.2 Medición de fluorescencia	39
2.4.3 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivos por lote y lote alimentado	39

2.4.4 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivos continuos y tras pulsos de glucosa	40
2.4.5 Cuantificación de proteína recombinante	41
2.4.6 Determinación de carbono total, orgánico e inorgánico	42
2.4.7 Medición de osmolalidad de los medios de cultivo	42
2.4.8 Extracción de ARN de cultivos de <i>Escherichia coli</i>	43
2.4.9 Síntesis de ADN complementario	43
2.4.10 PCR (semi) cuantitativa en tiempo real	45
2.5 Métodos de cálculo	46
2.5.1 Cálculos cinéticos y estequiométricos	46
2.5.2 Cálculos respiratorios	47
2.5.3 Balances de carbono	48
2.5.4 Cálculo de niveles de transcripción relativos	48
2.5.4.1 Interpretación de los niveles de transcripción	49
3. Resultados y discusión	51
3.1 Efectos de los gradientes espaciales en <i>Escherichia coli</i>	51
3.1.1 Dinámica del metabolismo de fermentación de <i>E. coli</i> ante gradientes espaciales de glucosa aerobios y anaerobios	51
3.1.1.1 Pulsos continuos de glucosa bajo condiciones aerobias	53
3.1.1.2 Pulsos continuos de glucosa bajo condiciones anaerobias	55
3.1.1.3 Discusión	57
3.1.1.4 Conclusiones parciales	62
3.1.2 Respuestas transcripcionales y metabólicas de <i>Escherichia coli</i> recombinante a gradientes espaciales de oxígeno disuelto	64
3.1.2.1 Cultivos de <i>E. coli</i> recombinante a TOD constante	64
3.1.2.2 Cultivos de <i>E. coli</i> recombinante a TOD oscilante	64
3.1.2.3 Respuesta transcripcional de <i>E. coli</i> recombinante a gradientes de TOD	67
3.1.2.4 Conclusiones parciales	77
3.2 Estrategias moleculares para contender con gradientes ambientales	78
3.2.1 Diseño de cepas de <i>E. coli</i> con un mejor desempeño ante condiciones anaerobias intermitentes	78

3.2.1.1 Cultivos de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> bajo condiciones constantes y oscilantes de oxígeno disuelto	79
3.2.1.2 Discusión	87
3.2.1.3 Conclusiones parciales	91
3.2.2 Cultivo, a altas concentraciones de glucosa, de <i>Escherichia coli</i> modificada en el sistema de transporte de sustrato: una alternativa a los cultivos alimentados para la producción de proteína recombinante	93
3.2.2.1 Cultivos de <i>E. coli</i> bajo concentraciones moderadas de glucosa	95
3.2.2.2 Cultivos de <i>E. coli</i> bajo concentraciones elevadas de glucosa	96
3.2.2.3 Cultivos de <i>E. coli</i> alimentados exponencialmente con limitación glucosa	99
3.2.2.4 Discusión	101
3.2.2.1 Conclusiones parciales	107
4. Conclusiones	109
5. Perspectivas	110
Producción científica	113
Nomenclatura	116
Abreviaturas	117
Lista de genes estudiados	118
Referencias	119

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del desarrollo experimental de la presente tesis	12
Figura 1.1. Tiempo de consumo de oxígeno (t_{OC}) en un cultivo de <i>E. coli</i> calculado según la ecuación 1.3, a dos velocidades de consumo de oxígeno	17
Figura 1.2. Tiempos característicos de subprocesos celulares y físicos	21
Figura 1.3. Mapa metabólico simplificado mostrando la producción de metabolitos de fermentación como un resultado de limitación de oxígeno	22
Figura 2.1. Mapa de construcción del plásmido pV21	29
Figura 2.2. Diagrama del PFR utilizado en la simulación de gradientes de glucosa. A. Corte transversal del PFR mostrando la sección de flujo de líquido y flujo de gas. B. Esquema del arreglo del PFR	34
Figura 2.3. Esquema del arreglo de biorreactores empleado para simular gradientes espaciales de glucosa	35
Figura 2.4 Sistema de escalamiento descendente de dos tanques agitados interconectados para simular gradientes de oxígeno disuelto	37
Figura 2.5. Barrido de longitudes de onda para medir la fluorescencia de GFP en células completas de <i>Escherichia coli</i>	39
Figura 2.6. Cromatograma típico para la cuantificación de metabolitos extracelulares	40
Figura 2.7. Curvas de calibración típicas para la cuantificación de metabolitos extracelulares mediante reacciones enzimáticas. Las concentraciones de formato y lactato se muestran multiplicadas por 10, para simplificar la figura	41
Figura 2.8. Curva típica para la cuantificación de GFP por SDS-PAGE en muestras de cultivo de <i>E. coli</i>	41
Figura 3.1. A: Concentración de O_2 y CO_2 en los gases exhaustos durante el arranque y operación del quimiostato. B: Perfil de TOD en el PFR durante pulsos de glucosa bajo condiciones aerobias	53

- Figura 3.2. Concentración de glucosa (A), acetato (B) y formato (C) en el PFR durante pulsos de glucosa bajo condiciones aerobias. Las barras de error ilustran la diferencia entre dos experimentos. Las líneas verticales indican diferentes fases de producción de metabolitos 54
- Figura 3.3. A. Concentración de O₂ y CO₂ en los gases de salida del quimiostato. B. Perfil de TOD en el PFR durante gradientes de glucosa bajo condiciones anaerobias. Valores de tiempo menores que cero indican muestras tomadas en el quimiostato 56
- Figura 3.4. Perfiles de concentración de A) glucosa, B) acetato, C) formato, D) lactato, E) succinato, y F) etanol durante el tránsito de *E. coli* por gradientes de sustrato combinados con anaerobiosis. Las barras de error ilustran las diferencias entre dos experimentos independientes. Las líneas verticales indican diferentes fases de producción de metabolitos 57
- Figura 3.5. Velocidad específica de consumo de glucosa en el quimiostato y PFR durante pulsos de glucosa combinados con aerobiosis o anaerobiosis. Las barras de error ilustran la diferencia entre dos experimentos 58
- Figura 3.6. Velocidades específicas de producción de metabolitos de fermentación ácido-mixta por *E. coli* durante pulsos de glucosa en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B). Las barras de error muestran la diferencia entre dos experimentos 59
- Figura 3.7. Perfil cinético de cultivos de *E. coli* W3110 a una TOD constante de 10%. A: Perfil de control de pH y TOD. B: Curva de crecimiento y producción de GFP. C: concentración de glucosa y metabolitos de fermentación. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos 65
- Figura 3.8. Perfil cinético de cultivos de *E. coli* W3110 bajo condiciones oscilantes de TOD en el sistema de escalamiento descendente. A: Perfil de control de TOD en ambos compartimentos. B: Curva de crecimiento y producción de GFP. C: concentración de glucosa y metabolitos de fermentación. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos 66
- Figura 3.9. Niveles de transcripción de genes de fermentación ácido-mixta y CAT en ambos compartimentos del sistema de escalamiento descendente, relativos a los cultivos aerobios a TOD constante 69

Figura 3.10. Nivel de transcripción de las fumarasas aerobia y anaerobia, relativo al gene <i>ihfB</i> , en el sistema de escalamiento descendente	73
Figura 3.11. Nivel de transcripción de citocromos, relativa al cultivo a TOD constante (A) y respecto al gene <i>ihfB</i> (B) en cada compartimiento del sistema de escalamiento descendente	74
Figura 3.12. Niveles de transcripción de reguladores globales de metabolismo aerobio/anaerobio, <i>luxS</i> , <i>sodA</i> y <i>gfp</i> , en cultivos a TOD oscilantes, relativos al cultivo a TOD constante	75
Figura 3.13. Reacciones donde el piruvato participa al nivel de glicólisis y fermentación ácido-mixta. Los genes que fueron inactivados en este trabajo se muestran en óvalos	79
Figura 3.14. Comportamiento cinético típico de las cepas recombinantes de <i>E. coli</i> a TOD constante (paneles A, B y C) y oscilantes (paneles D, E y F). Círculos rellenos: W3110; círculos vacíos: VAL22; cuadrados: VAL23, triángulos: VAL24. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos. Se han omitido las barras de error para mayor claridad en la figura	80
Figura 3.15. Perfiles cinéticos típicos de acumulación de subproductos en cultivos de <i>E. coli</i> bajo condiciones constantes (paneles A, B, C, D y E) y oscilantes de TOD (paneles F, G, H, I y J). Círculos rellenos: W3110; círculos vacíos: VAL22; cuadrados: VAL23, triángulos: VAL24. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos	82
Figura 3.16. Comparación de la velocidad específica de crecimiento (μ , A), rendimiento de GFP ($Y_{GFP/S}$, B) y rendimiento global de biomasa ($Y_{X/S}$, C) de los cultivos de las diferentes cepas bajo condiciones constantes y oscilantes de TOD. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos	83
Figura 3.17. Comparación de la concentración máxima de metabolitos de fermentación para cada cepa cultivada bajo condiciones de TOD constante y oscilante. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos	85
Figura 3.18. Comparación de la velocidad específica de consumo de glucosa (A), velocidad específica de producción de GFP (B), y concentración máxima de GFP (C) de las diferentes cepas cultivadas bajo condiciones de TOD constante y oscilante. Las velocidades específicas fueron calculadas en la	

fase exponencial de los cultivos. Las barras de error representan la diferencia entre dos cultivos	86
Figura 3.19. Esquema simplificado del transporte de sustrato a través del PTS (A) y de GalP (B), y su relación con las ramas del metabolismo relevantes para la producción de acetato	95
Figura 3.20. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de <i>E. coli</i> W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 30 g/L. Las barras de error muestran la diferencia entre dos cultivos	96
Figura 3.21. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de <i>E. coli</i> W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 50 g/L. Las barras de error muestran la diferencia entre dos cultivos.	97
Figura 3.22. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de <i>E. coli</i> W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 100 g/L. Las barras de error muestran la diferencia entre dos cultivos	98
Figura 3.23. Efecto de la concentración inicial de glucosa en la velocidad específica de crecimiento (A) y el $Y_{x/s}$ global (B) en cultivos de VH32 y W3110	99
Figura 3.24. Perfil cinético de consumo de glucosa y formación de acetato (A) y de producción de biomasa y GFP (B) en cultivos por lote alimentado exponencialmente de <i>E. coli</i> W3110. Las barras de error muestran la diferencia entre dos cultivos. La línea vertical punteada indica el inicio de la fase de alimentación a una tasa de dilución de 0.13 h^{-1}	100
Figura 3.25. Osmolalidad de los medios empleados, al inicio y final del cultivo. Las barras de error muestran la diferencia entre mediciones de dos cultivos	104
Figura 3.26. Velocidades de crecimiento de las cepas W3110 y VH32 en cultivos con una concentración inicial de glucosa de 100 g/L	105

Índice de tablas.

Tabla 1.1. Efecto de diferentes criterios de escalamiento ascendente sobre el tiempo de circulación promedio (t_c) en el biorreactor	16
Tabla 2.1. Cepas empleadas en este trabajo	27
Tabla 2.2. Composición del Medio A	30
Tabla 2.3. Composición del Medio B	31
Tabla 2.4. Composición de sales minerales del Medio C	31
Tabla 2.5. Cantidad de los compuestos añadidos en función de la concentración inicial de glucosa	31
Tabla 2.6. Composición de la solución de metales traza empleada añadida al Medio C	32
Tabla 2.7. Composición del medio de la solución de alimentación para cultivos alimentados	32
Tabla 2.8. Secuencias de los oligómeros utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por RT-PCR	44
Tabla 3.1. Principales parámetros del cultivo continuo de <i>Escherichia coli</i> W3110	52
Tabla 3.2. Tiempo calculado necesario para la síntesis de una molécula de mRNA de genes de fermentación ácido mixta y CAT	69
Tabla 3.3. Parámetros relevantes para comparar los cultivos por lote con alta concentración inicial de glucosa con cultivos por lote alimentado	108

Alvaro R. Lara R. (2007). Gradientes espaciales en biorreactores: Efectos fisiológicos en *Escherichia coli* recombinante y estrategias moleculares y de proceso para contender con heterogeneidades ambientales.

Resumen.

Empleando el enfoque del escalamiento descendente, se estudiaron en esta tesis los efectos de fluctuaciones de dos parámetros fundamentales en cultivos de *Escherichia coli* (*E. coli*): el oxígeno disuelto y la concentración de sustrato. Dichos parámetros tienen efectos profundos en el comportamiento de *E. coli*, debido a la naturaleza anaerobia facultativa de esta bacteria, y al fenómeno de sobreflujo metabólico que presenta bajo ciertas condiciones de crecimiento. Se simularon gradientes de oxígeno disuelto, empleando dos biorreactores de tanque agitado interconectados. En dicho simulador, células de *E. coli* produciendo proteína verde fluorescente (GFP) fueron expuestas continuamente a condiciones anaerobias intermitentes, simulando un tiempo de circulación promedio de 50 s. Bajo condiciones oscilantes de TOD, las células produjeron todos los metabolitos de fermentación ácido-mixta, además de que la velocidad de crecimiento, productividad y concentración de GFP producida, cayeron en 27, 48 y 19 %, comparados con cultivos aerobios. Se observó un importante reajuste transcripcional de genes de fermentación y ciclo de los ácidos tricarbóxicos, además de expresión diferencial de citocromos. La disminución en producción de GFP podría deberse a limitaciones post-traduccionales, ya que el nivel de expresión del gene *gfp* no varió significativamente en las distintas condiciones de cultivo. Se construyeron cepas parcialmente bloqueadas en el metabolismo de fermentación, y fueron sometidas a gradientes de TOD. En particular, una cepa mutante en los genes *poxB*, *ldhA* y *pflB*, mostró una virtual insensibilidad a gradientes de TOD, y su productividad de GFP y velocidad de crecimiento fueron el doble que las de su cepa progenitora bajo las mismas condiciones. En cuanto a fluctuaciones de glucosa, se sometieron células de *E. coli* a un gradiente súbito de glucosa combinado con condiciones aerobias o anaerobias, a través de un PFR, durante una ventana de tiempo de 100.3 s, simulando el tránsito de las células por regiones cercanas y alejadas del punto de alimentación en un cultivo alimentado industrial. Se observó la acumulación de acetato y formato en respuesta a una perturbación en la concentración de glucosa en condiciones aerobias, y la acumulación de todos los productos de fermentación cuando dicha perturbación se combinó con anaerobiosis en el PFR, en un tiempo tan corto como 4.6 s post-perturbación. Se evitó la presencia de gradientes de glucosa mediante el cultivo por lote de *E. coli* con concentraciones iniciales de glucosa de hasta 100 g/L. Para lograr tal resultado, se usó una cepa modificada en el sistema de transporte de sustrato, permitiendo alcanzar altas densidades celulares (52 g/L) y producción de GFP (8.2 g/L), manteniendo una baja acumulación de acetato (2 g/L). Una comparación de esta alternativa de cultivo con cultivos alimentados de la cepa progenitora, mostró que la estrategia propuesta puede ser una buena opción a los cultivos alimentados tradicionales. En conjunto, esta tesis presenta estudios de escalamiento descendente, generando datos a nivel transcripcional, cinético y estequiométrico, de la respuesta de *E. coli* a gradientes ambientales. El aporte tecnológico que resulta de estos estudios, es el diseño y aplicación de cepas modificadas para contender con gradientes ambientales y para establecer nuevas estrategias de cultivo que permitan evitar los gradientes de glucosa. Esto representa a una alternativa valiosa y novedosa a los problemas clásicos de bioproceso.

Estructura de la Tesis.

La presentación de este trabajo está organizada de la siguiente manera: el capítulo 1 presenta las generalidades del tema de manera resumida, los problemas actuales del escalamiento ascendente y los conceptos básicos del escalamiento descendente como una herramienta para investigar el efecto de oscilaciones ambientales sobre la fisiología de las células. El capítulo 2 detalla las metodologías analíticas y los arreglos experimentales empleados en el desarrollo del proyecto.

El capítulo 3 presenta en cuatro secciones los estudios que se realizaron, como se ilustra en la fig. 1. La sección 3.1 reporta los estudios del efecto de pulsos de glucosa, en condiciones aerobias o anaerobias, sobre la respuesta dinámica del metabolismo de fermentación de *E. coli*. La sección 3.2 muestra los efectos macroscópicos (cinéticos y estequiométricos) y moleculares (transcripcionales) en cultivos de *E. coli* ante gradientes de tensión de oxígeno disuelto (TOD). Estas dos secciones corresponden a los estudios de la fisiología de *E. coli* ante ambientes fluctuantes. Las siguientes dos secciones tratan sobre el diseño y empleo de cepas mutantes para contender mejor con gradientes de TOD, y para soportar altas concentraciones de sustrato manteniendo un buen desempeño y bajo sobreflujo metabólico, proponiendo soluciones moleculares a los problemas de la gran escala.

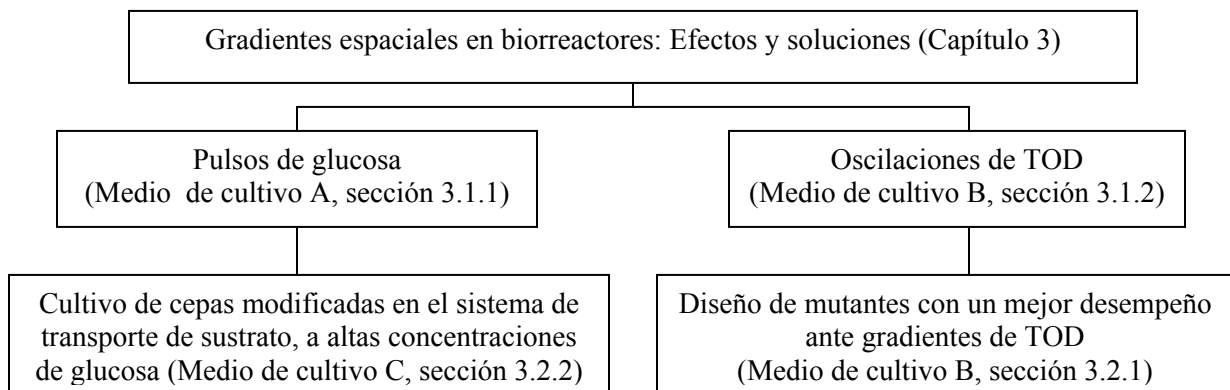


Figura 1. Estructura del desarrollo experimental de la presente tesis.

Cada sección es discutida a detalle y se extraen conclusiones por separado. En el capítulo 4, se presentan las conclusiones generales sobre el trabajo. Finalmente, en el capítulo 5 se discuten algunas perspectivas sobre el área de investigación en general y sobre los resultados obtenidos en particular.

1. Introducción.

1.1 Antecedentes.

El acelerado desarrollo de la biotecnología en las pasadas décadas, ha llevado a la generación de numerosos productos comerciales de uso farmacéutico, industrial, ambiental o energético. Posiblemente, uno de los mayores impactos que la biotecnología moderna ha tenido en los últimos años, es la producción de moléculas de uso terapéutico, como lo son las proteínas recombinantes y vectores para la transferencia de ADN como agente para terapia génica y vacunación. La Ingeniería Bioquímica tiene un papel básico en el desarrollo de procesos que permitan llevar los nuevos productos a escala comercial, o en el mejoramiento de los procesos de producción existentes. La continua expansión del ámbito de acción de la Ingeniería Bioquímica, la ha llevado al estudio fundamental de los mecanismos biológicos que rigen los procesos biotecnológicos y a la modificación de las capacidades celulares que permitan mayores niveles de producción de la molécula deseada, que en muchas ocasiones, no es producida de manera natural en la célula cultivada. Uno de los puntos más importantes, y posiblemente menos comprendidos hasta ahora, es la respuesta celular a las fluctuaciones ambientales que cualquier bioproceso necesariamente presentará.

En el corazón de casi cualquier proceso biotecnológico, se encuentra el sistema en el que las células (o parte de éstas), funcionarán como biocatalizadores para la producción de la molécula de interés: el biorreactor. Una vez que se ha decidido que cierta molécula o cepa tiene oportunidades aplicativas, el paso lógico es llevar el proceso, de la típica escala de investigación en matraces a condiciones de cultivo de mayor escala, pudiendo llegar a ser hasta de varios millones de litros de volumen. Frecuentemente, los cultivos por lote en matraces son rediseñados para alcanzar altas concentraciones celulares, con la finalidad de incrementar la productividad volumétrica. Esto puede lograrse mediante los cultivos alimentados, de uso preponderante en la industria biológica.

Este problema básico de ingeniería, conocido como escalamiento ascendente, sigue siendo un punto central. A pesar de ello, muchas de las técnicas para escalar un cultivo permanecen siendo más un arte que una ciencia. Básicamente, durante el proceso de escalamiento se esperaría que un buen diseño permitiera reproducir el comportamiento del cultivo de pequeña escala, en la gran escala. Sin embargo, en la mayoría de los casos, esto no ocurre (por ejemplo, ver. Bylund et al., 2000 y

Palomares y Ramírez, 2000a). Una de las fallas principales durante el proceso de escalamiento ascendente, es garantizar condiciones ambientales homogéneas en el biorreactor. En las siguientes secciones se mostrarán algunas consideraciones formales que permiten estimar la presencia de condiciones heterogéneas en la gran escala y las repercusiones que éstas tienen en los procesos.

1.1.1 Deficiencias de los criterios tradicionales de escalamiento ascendente.

Durante el diseño y escalamiento ascendente de biorreactores, existen tres fenómenos de gran importancia: los procesos termodinámicos, microcinéticos y de transporte. Estos tres fenómenos gobiernan esencialmente el comportamiento del biorreactor (Mijnbeek et al., 1992). Los dos primeros fenómenos son independientes de la escala. Sin embargo, los procesos de transporte (como transferencia de oxígeno y otros sustratos en el biorreactor) son dependientes de la escala, y sus características tienen un impacto en los procesos termodinámicos y cinéticos. Los fenómenos de transporte están gobernados principalmente por el flujo de los fluidos y la difusión, los cuales están directamente relacionados con los esfuerzos de corte, el mezclado, la transferencia de masa, de calor y la macrocinética. Por lo tanto, es lógico esperar que dichos fenómenos presenten diferencias sustanciales durante el escalamiento ascendente. Por ejemplo, entre los procesos físicos afectados por el incremento en escala, están la transferencia de calor (dado por diferencias en el área superficial de biorreactores de diferente escala), la velocidad superficial de gases (a valores de vvm constantes), la reología de los caldos de cultivo (principalmente los campos de turbulencia), la presión hidrostática y el tiempo de mezclado.

El tiempo de mezclado (t_m), se puede definir como el tiempo necesario para alcanzar un cierto grado de homogeneidad (generalmente, mayor al 90 % de la respuesta final) en el medio (Doran, 1998). Este tiempo característico es un buen parámetro para estimar la eficiencia de los procesos de mezclado y con ello, estimar la posible heterogeneidad en el biorreactor. El tiempo de circulación (t_c) es otro parámetro importante para estimar heterogeneidades en el biorreactor y está muy relacionado con el t_m . El t_c es una estimación del tiempo promedio que tarda una partícula (v. gr., una célula) en circular a través de las diferentes regiones de un biorreactor y regresar al punto de partida. Por lo tanto, el t_c es un indicador del tiempo promedio que una célula permanece en diferentes condiciones ambientales a lo largo de su recorrido. Del mismo modo que en un fermentador habrá una distribución de condiciones ambientales, diferentes elementos del fluido seguirán diferentes trayectorias, dando origen a una distribución de tiempos de circulación. Se volverá a este punto más

adelante. Existen varias correlaciones para estimar el t_c promedio; por ejemplo, una estimación fácil puede calcularse como (Luyben, 1993):

$$t_c = t_m / 4 \quad (1.1)$$

Otra forma de estimar el t_c es a través de la capacidad de bombeo de los impulsores (Anderson et al., 1982) y el volumen del tanque, así:

$$t_c = V / Q_i \quad (1.2)$$

donde V es el volumen del biorreactor y Q_i la capacidad de bombeo de los impulsores.

El comportamiento celular depende de las condiciones ambientales locales, y éstas quedan determinadas en gran parte por los fenómenos de mezclado, por lo que el escalamiento ascendente debería enfocarse a asegurar condiciones ambientales homogéneas en el biorreactor industrial, similares o iguales a las del biorreactor de laboratorio, como tiempos de mezclado o de circulación semejantes en las diferentes escalas. Se han empleado una variedad de métodos para el escalamiento ascendente de biorreactores: métodos fundamentales o semi-fundamentales, reglas heurísticas o de dedo, análisis dimensional y análisis de régimen, entre otros. Sin embargo, la complejidad y variedad de fenómenos interrelacionados en las diferentes escalas, no permiten una solución práctica universal para garantizar la homogeneidad (Amanullah et al., 2004). La homogeneidad es especialmente difícil de garantizar durante procesos aerobios (en los que el oxígeno debe ser transferido continuamente al medio), o en cultivos alimentados y continuos, en los que el sustrato limitante es alimentado continuamente o discontinuamente al biorreactor.

La tabla 1.1 muestra los cambios en el t_c como resultado de la aplicación de los criterios de escalamiento ascendente más comunes. Como puede observarse, los diferentes criterios dan como resultado un incremento de t_c , excepto el criterio velocidad de agitación (N) constante. Sin embargo, su aplicación en la gran escala implicaría el uso de motores de tamaños económicamente prohibitivos, además de que otros parámetros que pueden afectar el comportamiento celular mostrarán cambios sustanciales con respecto a la escala menor, por lo que es un criterio poco realista.

Tabla 1.1. Efecto de diferentes criterios de escalamiento ascendente sobre el tiempo de circulación promedio (t_c) en el biorreactor*.

Criterio de escalamiento	Cambio en t_c
P / V constante	4.55
N constante	1
U_T constante	10
Re constante	100
$k_L a$ y vvm constantes	9.4
$k_L a$ y v_s constantes	4.55

* Los t_c se estimaron según la ecuación 1.1. Esta tabla fue adaptada de Amanullah et al. (2004), quienes a su vez la adaptaron de Oldshue (1966), para un incremento lineal de 10 en la escala, a un $Re = 10^4$. N: velocidad de agitación, U_T : velocidad en la punta del impulsor, v_s : velocidad lineal de flujo del gas.

1.1.2 Existencia de gradientes en biorreactores de gran escala.

Hasta el momento, se ha hecho una breve descripción de los efectos físicos del escalamiento ascendente. El siguiente paso será investigar si estos cambios pueden afectar el metabolismo (fisiología) celular. La información más relevante, desde el punto de vista de ingeniería del proceso, es investigar los mecanismos mediante los cuales el escalamiento ascendente afecta a las células. En este punto, investigar la posible existencia de gradientes espaciales en biorreactores es el primer paso.

El análisis de régimen es una herramienta práctica para predecir la existencia de gradientes en biorreactores. Consiste en la identificación de los pasos limitantes (los más lentos) del proceso mediante la comparación de los tiempos característicos de mecanismos relevantes. De acuerdo con ésto, si el tiempo de mezclado es más largo que algún proceso biológico relevante, entonces los gradientes probablemente existirán (Lara et al., 2006c; Palomares y Ramírez, 2000b). Un ejemplo con el que esto puede visualizarse fácilmente, es con el consumo de oxígeno. Supongamos un cultivo de *E. coli* con concentraciones celulares desde 1 y hasta 50 g/L creciendo con una tasa de respiración de (q_{O_2}) de 1.4 $\mu\text{mol}/\text{g s}$ (correspondiente a una velocidad de crecimiento de 0.1 h^{-1}) y 7.2 $\mu\text{mol}/\text{g s}$

(correspondiente a una velocidad de crecimiento de 0.3 h^{-1}) (Alexeeva et al., 2000; Carlson y Srienc, 2004; Vemuri et al., 2005). Estas velocidades de consumo de oxígeno (y sus correspondientes velocidades de crecimiento) bien pueden representar las velocidades de cultivos por lote alimentado y por lote de *E. coli*. Si el valor de la TOD en el cultivo, medida en el biorreactor, es de 40 % ($C_{O_2} = 0.088 \text{ mmol/L}$), podemos calcular el tiempo característico de consumo de oxígeno (t_{OC}) simplemente como:

$$t_{OC} = (X) \times (q_{O_2}) / C_{O_2} \quad (1.3)$$

La ecuación 1.3 supone una cinética de consumo lineal, para simplificar el proceso. La fig. 1.1 muestra los resultados de t_{OC} calculado con las consideraciones mencionadas.

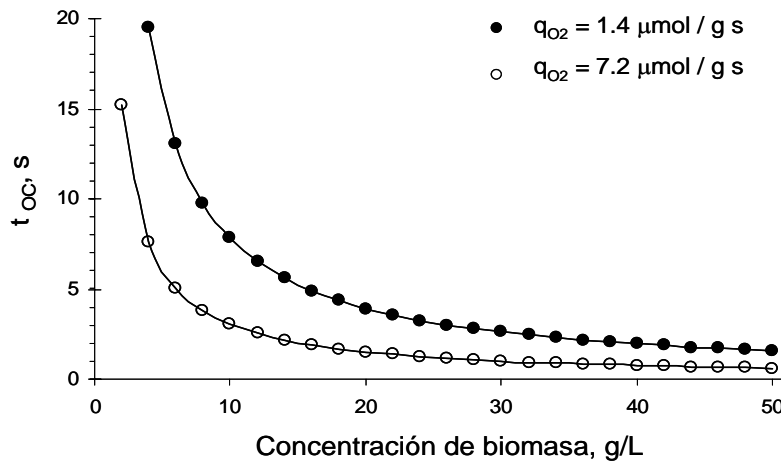


Figura 1.1. Tiempo de consumo de oxígeno (t_{OC}) en un cultivo de *E. coli* calculado según la ecuación 1.3, a dos velocidades de consumo de oxígeno.

Los valores de t_m de biorreactores para cultivo microbiano pueden tomar valores desde los 10 hasta los 250 s, pudiendo llegar a 1000 s en casos particulares (Lara et al., 2006c). Entonces, es evidente que bajo las condiciones consideradas, es muy probable encontrar gradientes de oxígeno disuelto tanto en cultivos por lote como cultivos por lote alimentado de *E. coli*, ya que el t_{OC} puede ser fácilmente menor que los mencionados tiempos de mezclado.

Existen evidencias experimentales de la existencia de gradientes de oxígeno disuelto en biorreactores industriales (Steel y Maxon, 1966; Manfredini et al., 1983; Oosterhuis y Kossen, 1984; Enfors et al., 2001).

Mediante estudios de dinámica de fluidos computarizada (CFD) y métodos simplificados, otros autores también han encontrado evidencias de gradientes de TOD (Reuss et al., 1994; Vlaev et al., 2000).

Los largos tiempos de mezclado en la escala industrial, pueden también provocar gradientes de pH (en el caso de adición de agentes de control de pH al biorreactor) y de sustrato, en los cultivos continuos y alimentados. En el caso de gradientes de sustrato, existe una compleja interacción de fenómenos que complican la situación. Por ejemplo, en un cultivo alimentado industrial de *E. coli*, el tránsito de esta bacteria de zonas con limitación de sustrato a zonas con alta concentración del mismo (cercasas al punto de alimentación), pueden provocar un aumento súbito de las velocidades de consumo de glucosa y oxígeno, llegando incluso a generar zonas anaerobias cerca de la zona de alimentación. La generación de ácidos orgánicos en esta zona (los mecanismos metabólicos se discutirán más adelante) pueden entonces disminuir localmente el valor de pH. También existen evidencias experimentales de gradientes de sustrato en cultivos microbianos alimentados (v. gr., Larsson et al., 1996; Bylund et al., 1998; Bylund et al., 1999). Otro parámetros como la concentración de dióxido de carbono disuelto y esfuerzos de corte, pueden estar presentes en los biorreactores (Lara et al., 2006 c).

La pregunta fundamental que se plantea en este proyecto es: ¿De que manera los cambios en las propiedades físicas del ambiente (gradientes), resultado de cambios de escala afectan las características cinéticas y fisiológicas de las células en un biorreactor? Una aproximación experimental para estudiar esto es descrita en la siguiente sección.

1.1.3 Escalamiento descendente basado en el análisis de régimen.

En la sección 1.1.1, se resaltó la importancia del conocimiento de la microcinética para el escalamiento ascendente de cultivos. Se ha descrito también que las características físicas de los cultivos cambian al incrementar la escala. Ya que la presencia de gradientes de TOD y sustrato es casi una certeza en la gran escala, deberá considerarse el vector de velocidad volumétrica de reacción promedio, q_{av} , como una propiedad integral de acuerdo con la siguiente ecuación (Nielsen et al., 2003):

$$\mathbf{q}_{av} = V^{-1} \iiint_V \mathbf{q} [c(x, y, z)] dV \quad (1.4)$$

donde c es la concentración de sustrato en la posición (x, y, z) en el biorreactor. Sin embargo, para resolver este vector, se requiere conocer con precisión todos los campos de concentración en el biorreactor, así como las expresiones cinéticas que describan los efectos cinéticos en las velocidades volumétricas, lo que representa una limitación práctica importante.

La fisiología celular, en el caso de microorganismos de relevancia industrial (como *E. coli* o *S. cerevisiae*) es conocida bajo condiciones bien definidas, como pueden ser aerobiosis o anaerobiosis. Sin embargo, se conoce muy poco de la fisiología celular bajo las condiciones heterogéneas transitorias y cíclicas, como las que ocurren en un biorreactor.

Una estrategia para escalar un cultivo, es establecer las condiciones que las células encontrarán en la gran escala y entonces tratar de simular dichas condiciones en el laboratorio con la finalidad de evaluar el comportamiento de los cultivos en la gran escala (Palomares y Ramírez, 2000b). El objetivo final del escalamiento descendente es mejorar el desempeño de los cultivos en escala productiva. El escalamiento descendente basado en el análisis de régimen, introducido por Oosterhuis en 1984, sugiere cuatro pasos:

- i) Un análisis de régimen del proceso a escala productiva, con el que se identifican los mecanismos limitantes, que deberán ser investigados en el laboratorio. El análisis de régimen puede hacerse mediante una comparación de tiempos característicos, como la ejemplificada en la sección 1.1.2.
- ii) La simulación de los mecanismos limitantes en sistemas de laboratorio, lo cual implica el diseño de simuladores que puedan reproducir las condiciones esperadas en la gran escala.
- iii) La optimización y modelado del proceso a escala de laboratorio.
- iv) La optimización del proceso en la escala productiva, trasladando el conocimiento generado en el paso anterior.

Hasta ahora, se han reportado muy pocos estudios que hayan integrado los cuatro pasos propuestos por Oosterhuis (1984). La mayoría de los reportes en la literatura se enfocan en análisis teóricos para el paso (i), aplicando por ejemplo, CFD, y en el diseño y aplicación de modelos de escalamiento descendente que permitan evaluar el efecto de gradientes de uno o más parámetros de cultivo. Como se detallará a lo largo de esta tesis, el enfoque que se ha tomado en este trabajo es llegar al paso (iii) mediante un mejoramiento de los procesos metabólicos.

El sector académico ha puesto considerable atención al diseño de sistemas de escalamiento descendente. Lara et al. (2006c) describieron los diferentes modelos de escalamiento descendente reportados hasta ahora, así como sus relativas virtudes y desventajas. En este trabajo, sólo se comentarán los modelos de dos compartimentos, éste es, dos biorreactores interconectados operados bajo diferentes condiciones ambientales, a través de los cuales se hace recircular un cultivo modelos. El empleo de dos tanques agitados (STR-STR) o de un tanque agitado conectado a un biorreactor de flujo pistón (STR-PFR) han sido de uso predominante para simular gradientes de TOD, de sustrato o de varios gradientes simultáneos (Enfors et al., 2000; Amanullah et al., 2001; Sandoval-Basurto et al., 2005; Lara et al., 2006a, b).

1.1.4 Importancia de las fluctuaciones ambientales en cultivos de *E. coli*

El análisis de régimen consta de hacer una comparación de tiempos característicos (ver sección anterior). Algunos tiempos característicos de subprocessos celulares y procesos físicos se ilustran en la fig. 1.2, de acuerdo a Sweere et al. (1987). Como se observa en la fig. 1.2, muchos de los subprocessos celulares ocurren en el mismo orden de magnitud de tiempo que los procesos físicos. Entonces, se puede inferir que existirán múltiples interacciones entre el ambiente en biorreactores y los mecanismos celulares. La escala de tiempo de interés en el escalamiento de cultivos (por ejemplo, t_c , de entre 2.5 y 62.5 s), tendrá efecto en los mecanismos de control del mRNA, inducción y control alostérico de enzimas. El impacto en la fisiología celular puede entonces ser tan vasto como afectar el transcriptoma, fluxoma y metaboloma celular. Se han logrado importantes avances en el desarrollo de modelos experimentales y herramientas analíticas para estudiar el efecto de perturbaciones ambientales en cultivos microbianos en esta escala de tiempo (v. gr. Mashego, 2005), a nivel de transcriptoma y metaboloma. Sin embargo, el efecto de las exposiciones repetidas a fluctuaciones ambientales ha sido estudiado mayormente a escala macroscópica (efectos macrocinéticos).

Existe una carencia general de información fisiológica bajo condiciones ambientales oscilantes. Es este aspecto el que se ha abordado en la presente tesis.

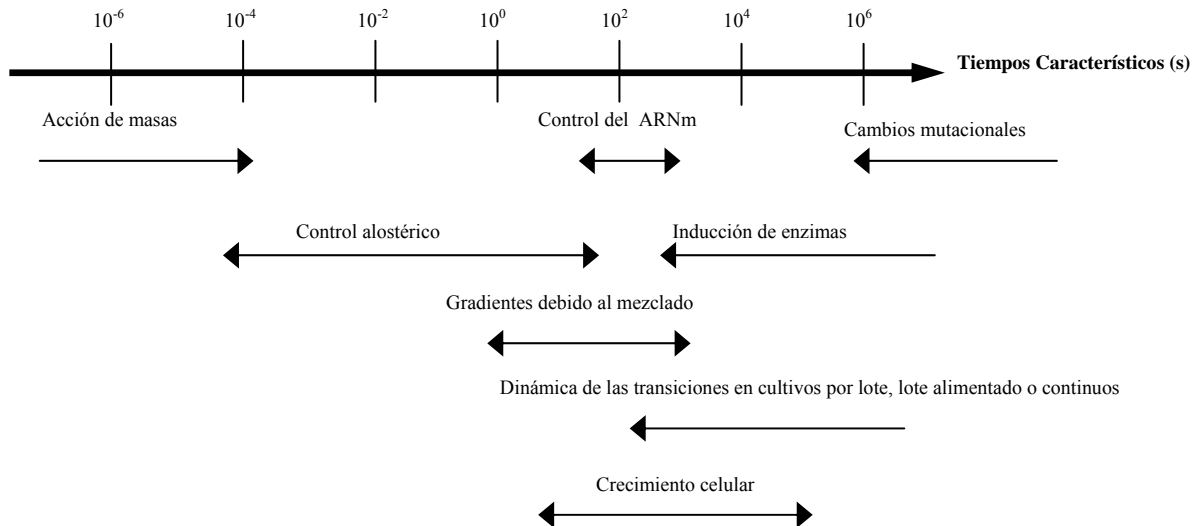


Figura 1.2. Tiempos característicos de subprocesos celulares y físicos (tomado de Sweere et al., 1987).

La bacteria *Escherichia coli* es un modelo particularmente interesante para estudios de escalamiento descendente, debido a su preponderante importancia en procesos industriales, al conocimiento de muchos aspectos de su fisiología, y a la flexibilidad de su metabolismo. Se han discutido la existencia de gradientes de sustrato y oxígeno como fenómenos de muy probable aparición en biorreactores industriales. *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa, que adapta su metabolismo central de carbono dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio. La regulación del metabolismo de *E. coli* por la disponibilidad de oxígeno es ejercida desde el nivel transcripcional, mediante los reguladores FNR (proteína de reducción de fumarato y nitrato) y el sistema de dos componentes ArcAB (proteínas de control de respiración aerobia). Una descripción detallada de dicha regulación ha sido escrita anteriormente (Unden y Bongaerts, 1997). Una de las características más notables de la cadena respiratoria de *E. coli*, es la variedad de oxidasas terminales que puede emplear en función de la disponibilidad de aceptor final de electrones, con diferentes afinidades por su sustrato y rendimientos energéticos.

La readaptación de los flujos de carbono en el metabolismo central, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, es un aspecto de primordial importancia en los bioprocesos. En ausencia del oxígeno y el nitrato como aceptores finales de electrones, *E. coli* produce varios metabolitos con diferentes grados de oxidación, mediante una vía denominada “fermentación ácido-mixta”. Este cambio en los flujos de carbono en el metabolismo central, alcanza al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el que la 2-ceto glutarato deshidrogenasa deja de funcionar y el ciclo ya no opera como tal, sino como dos ramas abiertas: una oxidativa y otra reductiva. La fig. 1.2 muestra una red metabólica simplificada incluyendo los productos de la fermentación ácido-mixta. En *itálicas*, se muestran los nombres de los genes cuyos productos intervienen en las reacciones en que se ubican. Los productos de fermentación se resaltan en **negritas**.

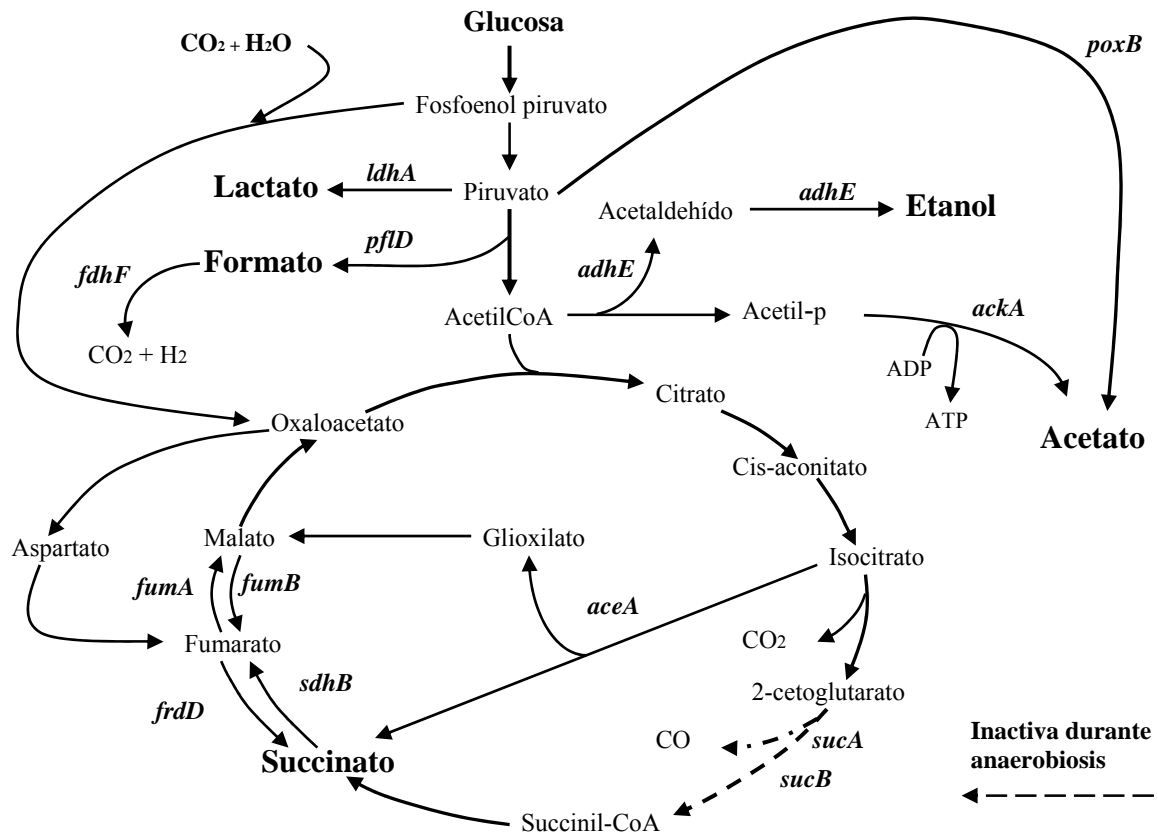


Figura 1.3. Mapa metabólico simplificado mostrando la producción de metabolitos de fermentación como un resultado de limitación de oxígeno.

La presencia de gradientes de TOD es, como puede verse, un problema que afectará profundamente la fisiología de *E. coli*, si los tiempos de exposición a regiones con limitaciones de oxígeno en biorreactores es suficientemente prolongado como para inducir vías anaerobias. Dada la importancia de los gradientes de oxígeno en cultivos de *E. coli*, se han reportado varios estudios que abordan la presencia de dichos gradientes (v. gr. Namdev et al., 1982), y se ha realizado una revisión completa de la literatura existente al respecto (Lara et al., 2006 c). Uno de los estudios más recientes (Sandoval-Basurto et al., 2005) mostró que los gradientes de TOD, como única variable de estudio (específicamente, sin gradientes de sustrato), provocaron la acumulación de metabolitos de fermentación, disminuyó la velocidad de crecimiento de *E. coli* y la productividad de proteína recombinante, aún a t_c tan cortos como 20 s, simulados en un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos.

Con esto puede observarse que periodos de cerca de 7 s de exposición cíclica de *E. coli* a condiciones anaerobias (Sandoval-Basurto et al., 2005), son suficientes para activar las vías de fermentación ácido-mixta. Sin embargo, hasta antes del trabajo aquí reportado, no se sabía si la activación ocurre a nivel transcripcional o a nivel de modulación de la actividad de enzimas, o ambas. La producción de metabolitos de fermentación en cultivos industriales es indeseable, ya que suponen un desperdicio de fuente de carbono, y afectan negativamente la fisiología de la bacteria, además de acidificar el medio, requiriéndose entonces la adición de agentes de control de pH.

Por otra parte, la presencia de gradientes de sustrato en cultivos alimentados de *E. coli* es también de particular importancia. La bacteria *E. coli* transporta la glucosa al interior de la célula a través del sistema de la fosfotransferasa (PTS) (Gosset, 2005). El transporte a través del PTS es altamente eficiente, y llega a causar un en los flujos de carbono a través de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) (Majewsky y Domach, 1990; Delgado y Liao, 1997; Farmer y Liao, 1997). Esto conduce a una acumulación de acetyl-CoA, que es entonces oxidado a acetato, aún en condiciones completamente aerobias (ver fig. 1.2). Este fenómeno se conoce como sobreflujo metabólico (Wolfe, 2005), y es un problema recurrente en cultivos de *E. coli*, ya que bajo condiciones aerobias, hasta el 15 % del carbono proveniente del sustrato puede llegar a ser excretado como acetato (Wolfe, 2005). Además, el acetato ejerce varios efectos negativos en la fisiología de *E. coli* que serán discutidos más adelante. La producción de acetato limita también las concentraciones de biomasa que pueden ser alcanzadas en un biorreactor.

La alimentación de glucosa a bajas velocidades, permite alcanzar altas concentraciones de biomasa con muy poca acumulación de acetato, por lo que los cultivos alimentados son ampliamente usados en escenarios industriales. Sin embargo, como ya se ha descrito, el ineficiente mezclado propio de la gran escala, tendrá como consecuencia la presencia de gradientes de sustrato y estos a su vez pueden provocar gradientes de oxígeno disuelto y de pH.

Básicamente, puede suponerse que la exposición de *E. coli* a regiones con alta concentración de glucosa activará el sobreflujo metabólico. Los efectos de gradientes de sustrato en cultivos de *E. coli* han sido ampliamente estudiados, principalmente en sistemas de escalamiento descendente conformados por un STR y un PFR (Neubauer et al., 1995; Bylund et al., 1999, 2000; Schweder et al., 1999; Xu et al., 1999; Hewitt et al., 2000; Lin and Neubauer, 2000; Enfors et al., 2001; Onyeaka et al., 2003). La adición de glucosa en el PFR puede generar gradientes de TOD (no documentados en el PFR hasta ahora). En los estudios mencionados, se ha observado acumulación de lactato y formiato, además del acetato, y disminución en la cantidad de biomasa viable. Además de estos efectos macroscópicos, se han observado un par de fenómenos como resultado de gradientes de sustrato. Por ejemplo, Neubauer et al. (1995) observaron un incremento en los niveles de la molécula ppGpp (3', 5' bis pirofosfato de guanosina) 20 s después de que *E. coli* pasó de un ambiente rico en glucosa, a un ambiente con limitación de la misma, como ocurre en un cultivo alimentado. Esta molécula está involucrada principalmente en el fenómeno de respuesta estricta, que reduce la capacidad biosintética de la célula en respuesta a limitación de glucosa, pese a que todos los demás nutrientes estén presentes en exceso. El efecto lógico para el bioproceso es que el tránsito repetido de *E. coli* por regiones con alta limitación de sustrato, limitará la síntesis de producto, aún cuando no haya limitación de otros factores. Un aporte importante en los estudio de escalamiento descendente de cultivos de *E. coli*, es el publicado por Schweder et al (1999). Ellos midieron los niveles de transcripción relativa de cinco genes (*proU*, *ackA*, *dnaK*, *clpB*, *pfl* y *frd*) durante el tránsito de *E. coli* por el PFR anteriormente mencionado. En general, observaron variaciones en los niveles de transcripción de estos genes después de 27 s de residencia de *E. coli* en el PFR. Este estudio es probablemente el primero y el único, antes del presente trabajo, que proporciona información a nivel transcripcional del efecto de gradientes en *E. coli*. Los estudios mencionados son muy relevantes, ya que simulan condiciones ambientales que pueden ser muy cercanas a las que experimentan las bacterias en cultivos de gran escala. Sin embargo, ha sido reconocido que en los casos presentados, la limitación de oxígeno seguida del sobreflujo metabólico, más que el sobreflujo por sí mismo, es el parámetro crítico (Bylund et al., 2000).

A pesar del interés en estudios de escalamiento descendente en cultivos de *E. coli*, existen pocos estudios empleando cepas recombinantes. Es importante investigar el efecto de fluctuaciones ambientales no sólo en el metabolismo de *E. coli*, sino también en la productividad del proceso y la calidad de la proteína recombinante producida bajo condiciones ambientales heterogéneas. Hasta ahora se sabe que bajo las limitaciones temporales de oxígeno causadas por gradientes de glucosa, la cantidad de monómero de hormona de crecimiento humana degradado fue menor (Bylund et al., 2000) que bajo condiciones completamente aerobias, lo cuál fue atribuido a una menor producción de proteasas. En otro trabajo (Sandoval-Basurto et al., 2005) se reportó una disminución en la producción de pre-insulina humana acumulada como cuerpos de inclusión de entre 20 y 90 % en cultivos bajo condiciones oscilantes de TOD, al simular t_c de 20 y 180 s, respectivamente.

En el presente trabajo, se ha abordado el estudio del efecto de gradientes de TOD y de sustrato en cultivos de *E. coli*, empleando modelos de escalamiento descendente que han permitido evaluar los efectos de dichas variables por separado y en conjunto. Las oscilaciones de TOD, sin adición de glucosa, se estudiaron en un sistema compuesto por dos biorreactores agitados interconectados. Aunque existe una buena cantidad de información acerca de la adaptación transcripcional de *E. coli* a cambios en la disponibilidad de oxígeno, los experimentos reportados abarcan ventanas de tiempo demasiado altas para los objetivos del escalamiento descendente. Por ejemplo, se ha estudiado la dinámica transcripcional durante la transición de *E. coli* de condiciones anaerobias a condiciones aerobias, tomando una muestra 5 minutos después de airear un cultivo anaerobio (Partridge et al., 2006). Obviamente, la información generada es de poca utilidad para entender la fisiología de esta bacteria en biorreactores (ver fig. 1.1).

A pesar del relativamente alto número de estudios de escalamiento descendente, los mecanismos básicos de respuesta celular a fluctuaciones ambientales es un tema muy poco entendido, y es necesario para integrar modelos cinéticos con los fenómenos de dinámica de fluidos. Más aún, a pesar del consenso general acerca del efecto negativo de los gradientes en los cultivos, se han planteado pocas soluciones de proceso o a nivel biológico para disminuir dichos efectos. Uno de los factores de novedad del presente trabajo, es precisamente la aplicación de herramientas de biología molecular e ingeniería de rutas metabólicas para modificar las propiedades celulares, basados en estudios de escalamiento descendente para obtener cepas que presenten un mejor desempeño ante condiciones de la gran escala.

1.2 Objetivos

El objetivo general del presente trabajo, fue estudiar el impacto de los gradientes de oxígeno disuelto y sustrato en *Escherichia coli*. Con el conocimiento generado, se propuso además aplicar estrategias de ingeniería celular y de cultivo para generar cepas de *Escherichia coli* con un mejor desempeño ante gradientes espaciales y/o modos de cultivo que eviten gradientes de sustrato. Específicamente, se planteó:

- i) Estudiar el efecto de gradientes de TOD, simulando un tiempo de circulación de 50 s, en los patrones cinéticos, estequiométricos y transcripcionales de *E. coli* recombinante.
- ii) Analizar la respuesta dinámica del metabolismo de fermentación de *E. coli* ante gradientes espaciales de glucosa, bajo condiciones aerobias o anaerobias, en una ventana de tiempo de 110.3 s.
- iii) Proponer alternativas moleculares y de proceso para contender con gradientes de TOD.
- iv) Proponer alternativas moleculares y de proceso para evitar la presencia de gradientes de glucosa en cultivos de *E. coli* recombinante.

2. Material y Métodos.

En el presente capítulo se describen las cepas de *E. coli* y el plásmido empleados, así como los sistemas de biorreactores usados y los métodos de análisis para la determinación de concentración de metabolitos, proteína recombinante y niveles relativos de transcripción.

2.1 Cepas y Plásmido empleados.

2.1.1 Cepas de *Escherichia coli*.

Las cepas de *Escherichia coli* empleadas en el presente trabajo se describen en la tabla 2.1. La cepa W3110 fue usada como cepa progenitora silvestre para el resto de las cepas. La cepa W3110 fue obtenida de la colección del Dr. Francisco Bolívar, IBt-UNAM. Las cepas VAL22 y VAL24 fueron construidas en el laboratorio del Dr. Octavio T. Ramírez, IBt-UNAM en colaboración con el Dr. Francisco Bolívar. La cepa VAL23 fue obtenida del laboratorio del Dr. Agustín López-Munguía, IBt-UNAM, y fue empleada como base para la construcción de la cepa VAL24. La cepa VH32GalP⁺ fue obtenida del laboratorio del Dr. Guillermo Gosset, IBt-UNAM.

Tabla 2.1. Cepas empleadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Fuente	Referencia
W3110	F ⁺ IN(rrnD-rrnE) λ^{-}	F. Bolívar, UNAM	ATCC 27325
VAL22	W3110 <i>poxB::cat</i>	Este trabajo	Lara et al., 2006b
VAL23	W3110 $\Delta pflB$, $\Delta ldhA$	A. López/C. Vázquez, UNAM	Lara et al., 2006b
VAL24	W3110 $\Delta pflB$, $\Delta ldhA$, <i>poxB::cat</i>	Este trabajo	Lara et al., 2006b
VH32GalP ⁺	W3110 $\Delta ptsH$, <i>ptsI</i> , <i>crr::Km</i> , $\Delta lacI$, <i>lacZ::loxP</i>	G. Gosset, UNAM	De Anda et al., 2006

Las cepas VAL22 y VAL24 fueron construidas a partir de las cepas W3110 y VAL23, respectivamente. Para ello, se reemplazó el gene *poxB* por la construcción *poxB::cat* mediante transducción empleando el fago P1. La transducción fue confirmada por PCR genómico empleando los oligómeros 5' AATAACATCCTGCGGCGTACG y 5' CAGCCGCGTCTATGGGTTGC así como por resistencia a cloramfenicol. La construcción *poxB::cat* fue transducida de la cepa PB12 (JM101 PTS⁻, *poxB::cat*) (Flores et al., 2004).

La cepa VH32GalP⁺ es una cepa PTS⁻ derivada de W3110 (Hernández-Montalvo et al., 2003). Con la finalidad de incrementar la capacidad de transporte de glucosa por esta cepa, el promotor cromosomal *galP* fue sustituido por el promotor híbrido *trc* empleando una técnica basada en la estrategia reportada por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), con algunas modificaciones. El método consistió en usar productos de PCR para obtener la inactivación de genes cromosomales. En este caso, el templado usado para generar el producto de PCR fue el plásmido *ptrc_cat* (ver De Anda et al., 2006), que contiene el gene de resistencia a cloramfenicol (*cat2*) corriente arriba del promotor *trc* para permitir la selección de la mutante en la que promotor de *galP* cromosomal ha sido sustituido por el promotor *trc* (Palmeros et al., 2000). Por efectos de simplicidad, la cepa VH32GalP⁺ será renombrada a lo largo de este trabajo como VH32.

Las cepas fueron transformadas con el plásmido pV21 (descrito abajo) y almacenadas en crioviales (1 mL de volumen total) en glicerol al 80%, a -70°C.

2.1.2 Plásmido.

Todas las cepas descritas en la tabla 2.1 fueron transformadas con el plásmido pV21, amablemente donado por los Drs. Joel Osuna y Lorenzo Segovia, IBt-UNAM. Dicho plásmido está basado en el esqueleto de plásmido pBCSK⁺ (Stratagene, California, EUA). En él se insertó un gene que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. La expresión de *gfp* está controlada por el promotor *lacZ*. El gene *gfp* (SuperGlo GFP, de QBiogene, Montreal, Canadá) fue modificado para mejorar el uso de codones, la brillantez y la solubilidad de la GFP en el citoplasma de *E. coli* y se añadió un gene de resistencia a espectinomicina (J. Osuna, datos no publicados). La fig. 2.1 muestra un esquema del plásmido pV21.

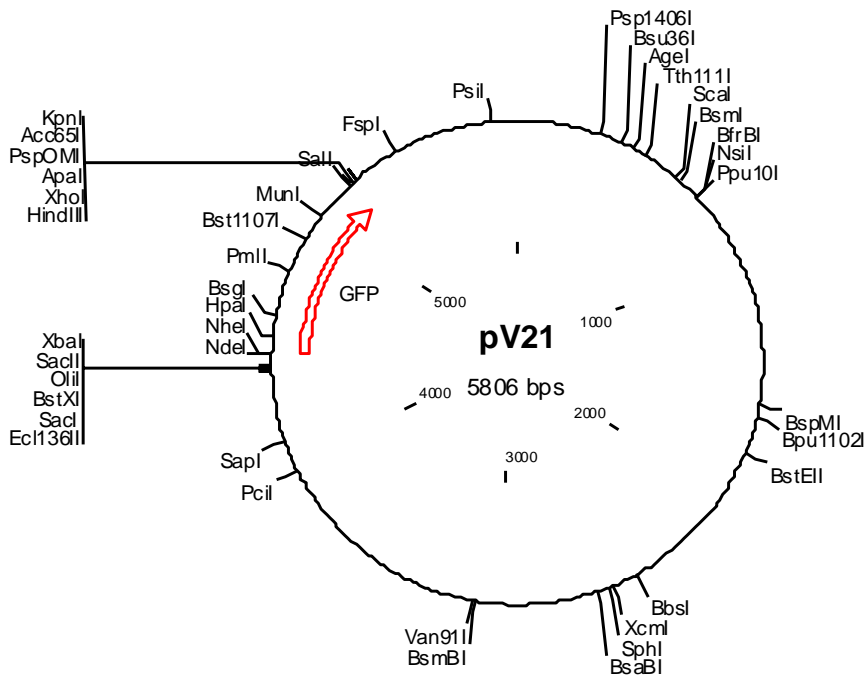


Figura 2.1. Mapa de construcción del plásmido pV21.

2.2 Medios de cultivo.

2.2.1 Medio de cultivo para quimiostatos.

Para el cultivo continuo de *E. coli*, se empleó un medio mineral suplementado con glucosa (Medio A). La composición del medio se describe en la tabla 2.2. Se empleó el mismo medio para el desarrollo del inóculo.

2.2.2 Medio de cultivo para estudios de oscilaciones de oxígeno disuelto.

Para los estudios del efecto de oscilaciones de oxígeno en cultivos de *E. coli* recombinante, se empleó un medio mineral (Hewitt et al., 2000) suplementado con glucosa y tiamina (Medio B). Su composición se especifica en la tabla 2.3. Se empleó el mismo medio de cultivo para el desarrollo de los inóculos. En los cultivos en biorreactor, se añadió isopropil beta-galacto tiopiranosido (IPTG) estéril a una concentración final de 0.5 mM para inducir la expresión de GFP.

Tabla 2.2. Composición del Medio A.

Componente	Concentración (g/L)
Monohidrato de glucosa	7.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
NaCl,	0.5
NH ₄ Cl	2.0
K ₂ HPO ₄	14.6
Citrato de sodio	1.0
Na ₂ -EDTA	0.015
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.0045
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.001
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.003
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0006
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.0004
CaCl ₂ • H ₂ O	0.0045
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.0037
H ₃ BO ₃	0.001
KI	0.0001
Tiamina	0.001

2.2.3 Medio de cultivo para altas concentraciones iniciales de glucosa.

Para este medio de cultivo, la concentración de sales minerales se mantuvo constante, independientemente de la concentración inicial de glucosa. Las cantidades se calcularon para producir 70 g/L de biomasa bacteriana, tomando en cuenta la composición promedio de *E. coli*. La cantidad de sales minerales empleadas se reporta en la tabla 2.4 (Medio C). La concentración de MgSO₄•7H₂O, extracto de levadura, tiamina y metales traza se varió en función de la cantidad de glucosa añadida, de acuerdo a la tabla 2.5. La composición de la solución de metales traza se reporta en la tabla 2.6. Para el crecimiento de los inóculos, se empleó el medio con concentración de 30 g/L de glucosa. En los cultivos en biorreactor, se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM para inducir la producción de GFP.

Tabla 2.3. Composición del Medio B.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	5.0
Na ₂ SO ₄	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.7
NH ₄ Cl, 0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	14.6
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	4.0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.24
Citrato de sodio	1.0
CaCl ₂ • H ₂ O	0.00074
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.00018
MnSO ₄ • H ₂ O	0.0001
Na ₂ -EDTA	0.0201
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.0167
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.0001
CoSO ₄ • 7H ₂ O	0.00021
Tiamina	0.01
Espectinomicina	0.1

Tabla 2.4. Composición de sales minerales del Medio C.

Componente	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0
K ₂ HPO ₄	10.0
KH ₂ PO ₄	5.0
Citrato de sodio	2.0

Tabla 2.5. Cantidad de los compuestos añadidos en función de la concentración inicial de glucosa.

Glucosa (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	MgSO ₄ •7H ₂ O (g/L)	Sol. de elementos traza (mL/ L)
30	15	1.25	1
50	25	1.25	1
100	50	2	3

Tabla 2.6. Composición de la solución de metales traza empleada añadida al Medio C.

Componente	Concentración (g/L)
Na EDTA	14.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	15
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.5
H ₃ BO ₃	3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O,	2.1
Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	33.8
Citrato de FE(III)	100.8

2.2.4 Medio de cultivo para lotes alimentados.

La fase lote de los cultivos alimentados se inició con una concentración de glucosa de 20 g/L, 10 g/L de extracto de levadura, y 1 mL/L de solución de elementos traza, mientras que las concentraciones de sales minerales, IPTG y espectinomicina fueron las descritas en la sección anterior. La composición de la solución de alimentación se reporta en la tabla 2.7. Se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM y 1 mL/L de solución de metales traza.

Para el crecimiento de los inóculos, se empleó el Medio C con concentración de 30 g/L de glucosa, como se describió en la sección anterior.

Tabla 2.7. Composición del medio de la solución de alimentación para cultivos alimentados*.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	353
Extracto de levadura	177
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Espectinomicina	0.1

* Se añadió además IPTG a una concentración final de 0.5 mM y 1 mL/L de solución de metales traza.

2.3 Condiciones de cultivo.

2.3.1 Cultivo continuo (quimiostato).

El cultivo continuo aerobio ($D = 0.1 \text{ h}^{-1}$) se efectuó en un biorreactor de tanque agitado de 7 L (Applikon, Schiedam, The Netherlands) con un volumen de trabajo de 4 L, equipado con control de pH (7.0), agitación (600 rpm) y temperatura (37 °C). El flujo de aireación se mantuvo en 0.5 vvm. El cultivo fue operado con una sobre presión de 0.2 atm. Los gases exhaustos fueron analizados en un equipo de analizador infrarrojo NGA 200 Analyzer (Rosemount Analytics, CA, USA). La TOD fue medida (pero no controlada) mediante electrodos polarográficos y el cultivo se mantuvo siempre en condiciones aerobias. La alimentación de medio de cultivo se efectuó mediante una bomba peristáltica (Masterflex) conectada al sistema de control del biorreactor para mantener constante el peso del fermentador, medido por una balanza, mientras que el flujo de salida se controló mediante otra bomba peristáltica calibrada para mantener la tasa de dilución predeterminada.

2.3.2 Arreglo de biorreactores para simular gradientes de sustrato.

El tránsito de las células de regiones con limitación de glucosa a regiones con exceso de glucosa en biorreactores de gran escala, fue simulado mediante un sistema de dos compartimentos que consistió en un biorreactor de tanque agitado conectado a un reactor de flujo pistón (PFR). El biorreactor de tanque agitado fue operado en modo continuo, con limitación de glucosa, en condiciones aerobias. Se derivó una fracción del flujo de salida (1.8 mL/min) para ser conectada a un PFR (fig. 2.2). Exactamente en la entrada del PFR se aplicó de manera continua una inyección de una solución de glucosa (30 g/L) que se mezcló instantáneamente con la corriente proveniente del quimiostato. De esta manera, las células pasan súbitamente de una región con limitación de glucosa (quimiostato) a una región con exceso de glucosa (PFR) (fig. 2.3). La inyección de glucosa representó el 10 % del flujo total de entrada al PFR (2 mL/min), de manera que la concentración de glucosa a la entrada al PFR fue de 3 g/L y el flujo total de entrada fue de 2.0 mL/min. El PFR fue sanitizado antes de cada experimento.

El PFR consistió en un mini-biorreactor basado en dos canales semiesféricos con un diámetro interno de 1.2 mm fabricado en un bloque de Perspex (material plástico polimérico), separados por una membrana de silicón de 0.6 mm de grosor que permite la difusión de O_2 y CO_2 (fig. 2.2 A y B)

(Mashego et al., 2006). La configuración del PFR es de geometría de serpentín, asegurando un flujo pistón. El volumen total del PFR es de 3.46 mL, la longitud total es de 6.51 m. El PFR se colocó en un gabinete con temperatura controlada (37 °C), y está equipado con puertos de muestreo localizados a las siguientes distancias (en m) relativas al punto de adición de la solución de glucosa: -0.09, 0.27, 0.54, 0.8, 1.1, 1.5, 1.9, 2.6, 3.3, 4.9 y 6.5. Estos puntos corresponden a los puertos de muestreo 1 al 11, mostrados en la fig. 2.2 B.

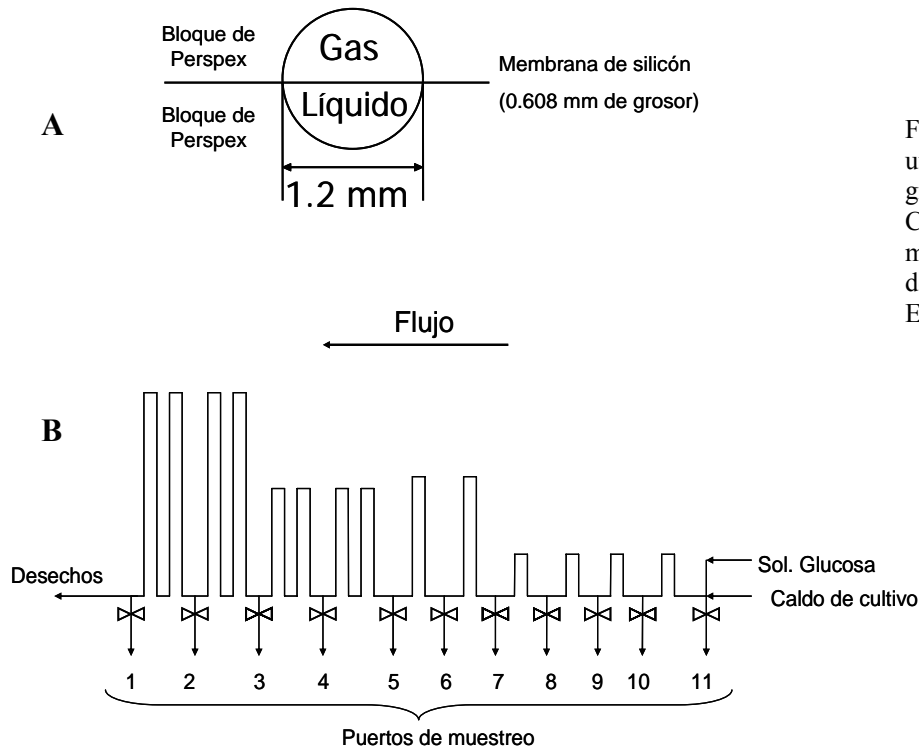


Figura 2.2. Diagrama del PFR utilizado en la simulación de gradientes de glucosa. **A.** Corte transversal del PFR mostrando la sección de flujo de líquido y flujo de gas. **B.** Esquema del arreglo del PFR.

El puerto 1 corresponde al muestreo pre-perturbación, y permite muestrear el caldo de cultivo justo antes de la inyección de la solución de glucosa. Los puertos de muestreo están equipados con mini-válvulas de dos vías, conectadas a un programa de control, que permite la toma automatizada de muestras. El PFR (denominado "BioScope" de segunda generación) fue diseñado y construido en el Laboratorio Kluyver de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Delft, en los Países Bajos, por el grupo de investigación del Prof. J. J. Heijnen.

Se inyectó una corriente gaseosa al PFR (en la sección del serpentín correspondiente al flujo de gases) para asegurar condiciones completamente aerobias o bien completamente anaerobias durante el tránsito de las células por dicho biorreactor. Para experimentos de pulsos de glucosa en

condiciones aerobias, se inyectó en el PFR una mezcla de aire/oxígeno a un flujo de 100 mL/min. Los flujos individuales de los gases y el flujo total se controlaron mediante controladores de flujo másico (Brooks Instruments, PA, USA). Para mantener condiciones anaerobias en el PFR, se disminuyó la TOD en el quimiostato a un valor de 16 % de saturación, inyectando al biorreactor de tanque agitado una mezcla de aire/nitrógeno a un flujo de 100 mL/min. Esta TOD es lo suficientemente alta para mantener un metabolismo aerobio en *E. coli*. El análisis de los gases exhaustos (% CO₂ y % O₂) medidos por un analizador infrarrojo NGA 200 Analyzer (Rosemount Analytics, CA, USA) no presentó cambios al reducir la TOD, y la concentración de biomasa no cambio, por lo que se asumió que la disminución de TOD no alteró el estado de equilibrio alcanzado previamente en el quimiostato. Adicionalmente, se inyectó nitrógeno en la sección gaseosa del PFR para acelerar la transición a anaerobiosis tras el pulso de glucosa. La TOD a lo largo del PFR se midió desviando el flujo de cada puerto de muestreo a una cámara de flujo cruzado en donde se insertó un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Mettler-Toledo GmbH, Switzerland). Las mediciones de TOD se realizaron previas a la toma de muestras tras pulsos de glucosa en condiciones aerobias o anaerobias. El flujo de la mezcla de solución de glucosa y caldo de cultivo en el PFR (2 mL/min) resultó en un tiempo de residencia en el PFR de 110.3 s. La toma automática secuencial de muestras se activó manualmente mediante un programa computacional. Se tomaron 2 mL de muestra en cada puerto, en tubos de poliestireno conteniendo 31 g de esferas de acero inoxidable (de 4 mm de diámetro) previamente enfriadas. Los tubos se mantuvieron en un criostato (Lauda RK 20 KS, Lauda-Köningshofen, Germany) a temperatura controlada de 0 °C. Con este sistema, las muestras eran enfriadas instantáneamente y mantenidas a 0°C durante el proceso de toma de muestras, que tomó alrededor de 1 min por muestra. En la fig. 2.3 se muestra un esquema del arreglo experimental. El PFR fue sanitizado antes de cada experimento.

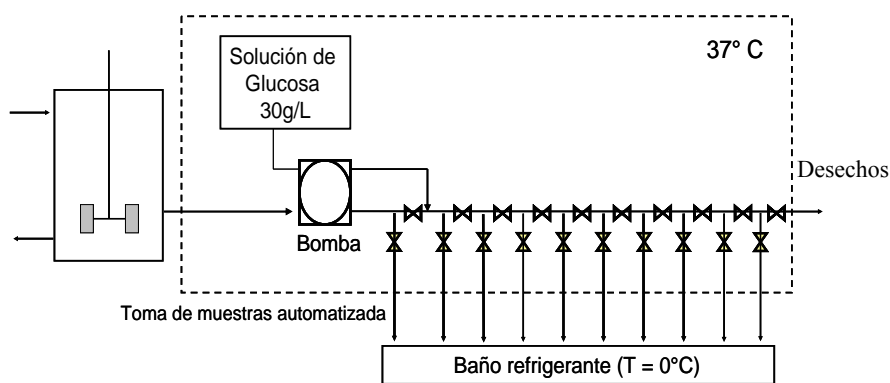


Figura 2.3. Esquema del arreglo de biorreactores empleado para simular gradientes espaciales de glucosa.

Al terminar el periodo de muestreo, el contenido de los tubos fue inmediatamente transferido a jeringas preenfriadas a 4°C, conectadas a filtros de 0.45 µm de diámetro de poro y la biomasa fue separada por filtración. El filtrado fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

2.3.3 Sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos (SED) para simular gradientes espaciales de oxígeno disuelto.

Para cultivos bajo condiciones oscilantes de oxígeno disuelto, se empleó el SED descrito por Sandoval-Basurto, et al. (2005) con algunas modificaciones. Dicho sistema consiste en dos tanques agitados Virtis (Gardiner, NY), de 1.5 L de capacidad, instrumentados e interconectados por tubería flexible de Tygon® (12.8 mm de diámetro interno), con muy baja permeabilidad al O₂. Cada tanque estaba equipado con baffles y con dos turbinas Rushton de 6 paletas planas. El líquido contenido en los tanques fue recirculado empleando dos bombas peristálticas (Masterflex modelo 7592-40), con cabezal tipo “Easy Load” (Masterflex, modelo 77601-10). Los puertos de entrada y salida para recirculación de caldo de cultivo, se colocaron a 3 cm de la base de los tanques, separados 180 ° uno del otro. El pH se midió constantemente mediante un electrodo (Mettler Toledo, OH) y mantenido a 7.0 ± 0.2 por adición de NaOH 2N. Cada tanque se equipó con un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto convencional (Mettler Toledo, OH). Uno de los tanques se mantuvo bajo condiciones aerobias ($B_{Aerobio}$), a una TOD constante de 10 %, mediante la adición de una mezcla de gases (O₂/Aire/N₂), cuya proporción fue controlada mediante un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo, que automáticamente varió el flujo individual de los gases a través de controladores de flujo másico, manteniendo un flujo total constante. El otro tanque se mantuvo bajo condiciones anaerobias ($B_{Anaerobio}$), por medio de burbujeo constante de N₂ a 1 vvm. La agitación se varió manualmente entre 500 y 1000 rpm, y la temperatura se mantuvo constante a 37 °C.

En cultivos a TOD constante, se empleó un solo tanque (sistema sin recirculación). El volumen de trabajo de $B_{Aerobio}$ fue de 0.3 L, mientras que el de $B_{Anaerobio}$ fue de 0.6 L. Esta relación de volúmenes mantiene a las células bajo condiciones anaerobias durante el 67 % del tiempo de recorrido, y bajo condiciones aerobias durante el 33 % del ciclo, en promedio. Dichas proporciones están de acuerdo con los cálculos previos para la bacteria *B. subtilis* (Amanullah et al., 2004), cuyas características reológicas y respiratorias son similares a cultivos de *E. coli* y pueden entonces aplicarse a nuestro modelo de estudio.

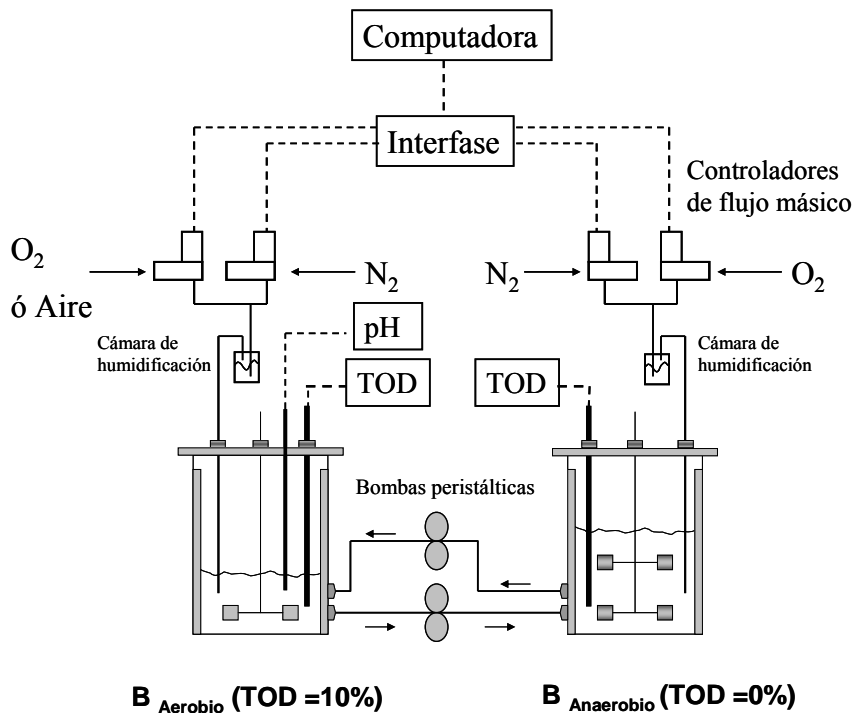


Figura 2.4 Sistema de escalamiento descendente de dos tanques agitados interconectados para simular gradientes de oxígeno disuelto.

2.3.4 Cultivo lote a altas concentraciones iniciales de glucosa.

Los cultivos a alta concentración inicial de glucosa se llevaron a cabo en el Sistema Modular de Fermentación BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, NJ). Se emplearon biorreactores de 1 L de capacidad, usando un volumen de trabajo de 0.6 L. Los parámetros operacionales y la adquisición de datos se ejecutaron mediante el software AFS-Biocommand Bioprocessing Software (New Brunswick Scientific, NJ).

La temperatura se controló a 37 °C, la TOD se mantuvo por arriba de 30 % de saturación mediante incrementos en la velocidad de agitación y en caso necesario, mezclando la corriente de aire de entrada al fermentador con oxígeno puro. Adicionalmente, se incrementó de manera gradual el flujo de gases de 0.5 a 2 vvm para contender con la alta demanda de oxígeno de los cultivos a alta densidad celular. El pH se controló a 7.0 ± 0.05 unidades, mediante la adición de NH_4OH al 15 %.

2.3.5 Cultivos alimentados exponencialmente.

Para los cultivos alimentados, se empleó el sistema modular de fermentadores descrito en 2.3.2. Los biorreactores se usaron con un volumen inicial de 0.4 L. En el software Biocommand Bioprocessing se programó un algoritmo de alimentación exponencial de acuerdo a la siguiente ecuación (Martínez, et al., 1996):

$$F = \frac{\mu V_0 x_0}{S_i Y_{X/S}} \exp [\mu t] \quad (2.1)$$

donde F es el flujo de alimentación de glucosa, μ es la velocidad específica de crecimiento, V_0 y x_0 son el volumen y concentración de biomasa al inicio de la alimentación, respectivamente, S_i es la concentración de glucosa en la alimentación, y $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa en glucosa. El pH, la TOD y la temperatura se controlaron de la forma descrita en 2.3.4.

2.4 Métodos analíticos.

2.4.1 Determinación de concentración celular.

La concentración de biomasa se determinó centrifugando de 1.5 a 6 mL de muestra en tubos para centrífuga de 1.5 mL, previamente puestos a peso constante. El pellet obtenido se lavó con solución isotónica (NaCl 0.9 %) y secado en un horno a 80 °C por al menos 18 h. En los cultivos por lote bajo altas concentraciones de sustrato, lote alimentado y continuo, se determinó biomasa como peso seco para cada muestra, empleando el mismo método.

Para cultivos a baja concentración celular (en medio mineral, con 5 g/L de glucosa como fuente de carbono) se construyó una curva tipo que correlaciona absorbancia (medida en espectrofotómetro a 600 nm) con peso seco. Una vez que se observó una buena correlación lineal para cada cepa, se obtuvieron factores de conversión y la concentración celular se calculó a partir de las lecturas de absorbancia.

2.4.2 Medición de fluorescencia

La fluorescencia de GFP producida en los cultivos se midió en muestras de caldo de cultivo con células completas. Para ello se empleó un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS55. Se realizó un barrido de longitudes de onda de excitación y emisión en muestras de cultivo en medio mineral, acotado a un rango cercano a las longitudes de excitación y emisión máximas reportadas para la GFP *in vitro*. Los resultados se muestran en la fig. 2.5.

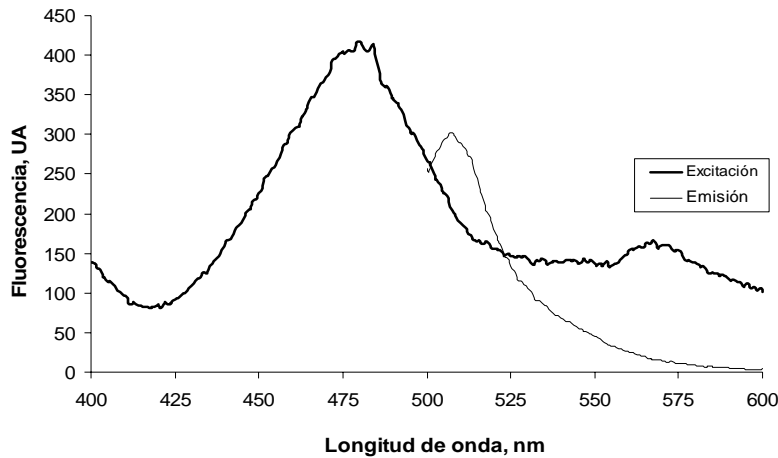


Figura 2.5. Barrido de longitudes de onda para medir la fluorescencia de GFP en células completas de *Escherichia coli*.

Con los valores máximos de fluorescencia detectados, se eligió emplear una longitud de onda de 480 nm para excitación y 507 nm para emisión. Durante los cultivos, las muestras se diluyeron en agua destilada para mantener las lecturas dentro de valores de 20 y 100 UA.

2.4.3 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivos por lote y lote alimentado.

Para determinar la concentración de metabolitos extracelulares, las muestras de fermentación fueron centrifugadas por 10 minutos a 12,000 rpm en una minicentrífuga. El sobrenadante fue filtrado por una membrana cuyo tamaño de poro era 0.2 μm . Los ácidos orgánicos y glucosa en el medio de cultivo fueron cuantificados en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, Waters), equipado con detector de índice de refracción y foto arreglo de diodos en serie. Se empleó una columna Aminex HPX-87H.

La fase móvil empleada fue H₂SO₄ 5 mM, a un flujo de 0.5 mL/min y temperatura de 55 °C. Para cada compuesto se determinó su tiempo de retención en muestras puras y en mezclas de ellos, y se construyeron curvas de calibración correlacionando la concentración de la muestra inyectada con el área bajo la curva integrada mediante el software Millennium de Waters. Un cromatograma típico se muestra en la fig. 2.6.

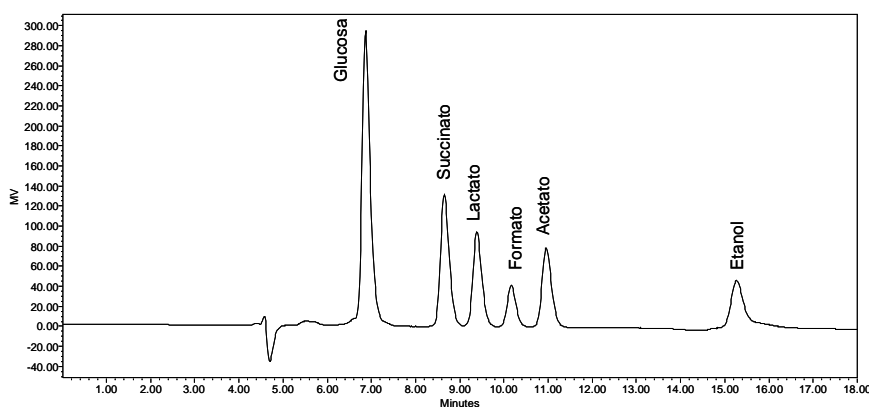


Figura 2.6. Cromatograma típico para la cuantificación de metabolitos extracelulares.

2.4.4 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivos continuos y tras pulsos de glucosa.

La cuantificación de glucosa, succinato, lactato, formato y etanol en las situaciones mencionadas arriba, se realizó empleando los kits enzimáticos de Roche (R-Biopharm, de Boehringer Mannheim, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto que el volumen de las reacciones fue escalado para realizarse en placas de 48 pozos. En estos experimentos se prefirió el uso de kits enzimáticos sobre el HPLC, debido a las bajas concentraciones de metabolitos esperados en estos experimentos (del orden de mg/L). En la fig. 2.7 se muestran las curvas de calibración típicas obtenidas. Cada reacción se realizó por triplicado, tanto para la curva de calibración como para las muestras. Las concentraciones de acetato y etanol se determinaron mediante cromatografía de gases (Chrompack CO 9001, Hewlett Packard, USA) empleando un detector de ionización de flama y siguiendo el protocolo descrito por Mashego (2005). Los análisis por cromatografía de gases fueron realizado por Cor Ras, Analista del Laboratorio Kluver de Biotecnología, Universidad Tecnológica de Delft.

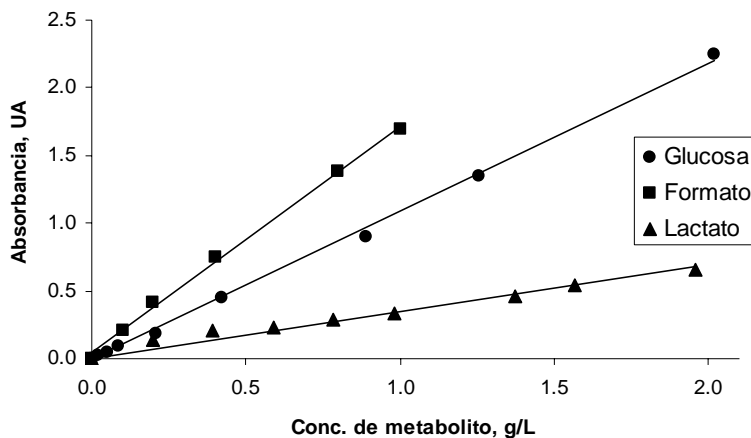


Figura 2.7. Curvas de calibración típicas para la cuantificación de metabolitos extracelulares mediante reacciones enzimáticas. Las concentraciones de formato y lactato se muestran multiplicadas por 10, para simplificar la figura.

2.4.5 Cuantificación de proteína recombinante.

La proteína recombinante se cuantificó mediante análisis densitométricos de geles SDS-PAGE al 10% obtenidos de células lisadas por sonicación. Las muestras obtenidas durante los cultivos fueron diluidas en buffer de fosfatos (pH=8) para obtener una densidad óptica (DO) de aproximadamente 1 unidad. La muestra diluída se sometió a ruptura en un sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc.), aplicando una serie de 3 a 5 pulsos de 8 segundos a una amplitud de 25 %. Posteriormente se tomaron 20 μ L de las células lisadas y se añadieron 20 μ L de buffer Laemmli 2X. Dicha mezcla se calentó por 10 minutos a 95 $^{\circ}$ C. Las muestras así tratadas fueron cargadas (de 10 a 12 μ L) en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10 % para separar las proteínas, empleando un voltaje constante de 100 V.

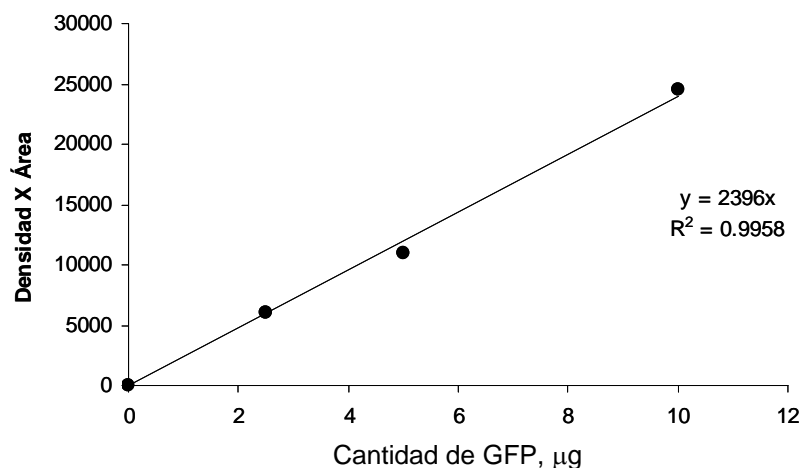


Figura 2.8. Curva típica para la cuantificación de GFP por SDS-PAGE en muestras de cultivo de *E. coli*

En cada gel, se cargaron 2, 4 y 8 μL de una solución estándar de proteína verde fluorescente (GFP) obtenida de cultivos de *E. coli*, previamente semi-purificada mediante filtración por exclusión de peso molecular, cuya concentración de proteína total y GFP fue se determinó antes de ser usada como estándar. Además, se cargaron 2 mL de una escalera de pesos moleculares de proteína para identificar la banda correspondiente a GFP (peso de la GFP: aprox. 29 kDa). Con estos datos se analizaron las manchas por densitometría, usando el software de análisis de imágenes Image J de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA (NIH). Para cada gel, se construyó una curva estándar que correlaciona concentración de GFP contra el producto (Intensidad de la banda X Área de la banda). Dicha curva se empleó para calcular la concentración de GFP en la banda correspondiente para cada muestra. Una curva típica para la cuantificación de GFP por densitometría se muestra en la fig. 2.8.

2.4.6 Determinación de carbono total, orgánico e inorgánico.

El carbono total en muestras de cultivo continuo se realizó en un analizador TOC Shimadzu Modelo 5050A, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La muestra es sometida a una combustión catalítica a 680 °C, con inyección de gas (aire u oxígeno). El carbono presente en la muestra es descompuesto a CO_2 y cuantificado por un analizador de gases infrarrojo. Esta cantidad de carbono, es referida como carbono total (TC), que está compuesto de carbono orgánico total (TOC) y carbono inorgánico (IC). El carbono inorgánico se detecta empleando el mismo dispositivo, pero en este caso se inyecta el gas en forma de pequeñas burbujas en una solución acidificada conteniendo la muestra, especialmente formulada para la determinación de IC. Debido a las condiciones de reacción, solamente el IC de la muestra es descompuesto a CO_2 y entonces cuantificado por el analizador infrarrojo. El IC proviene del carbono presente en la muestra como carbonatos y bicarbonatos. El TOC se obtiene sustrayendo el IC del TC.

2.4.7 Medición de osmolalidad de los medios de cultivo.

Se tomaron muestras de los medios de cultivo con altas concentraciones de sustrato (30, 50 y 100 g/L de glucosa), antes de la inoculación y al término del cultivo. En este último caso, la muestra fue centrifugada por 10 min a 14,000 rpm para eliminar las células. Las muestras fueron diluídas en agua destiladas antes de medir su osmolalidad empleando un osmómetro crioscópico Osmomat 030 (Gonotec, Berlin), amablemente prestado por el Dr. O. Pantoja, IBt-UNAM.

2.4.8 Extracción de ARN de cultivos de *Escherichia coli*.

Para la extracción de ARN de caldos de cultivo de *E. coli*, se tomaron aproximadamente 50 mL (aprox. 0.02-0.03 g de biomasa) de muestra de cultivo y se recibieron en un tubo estéril y libre de nucleasas de 50 mL, mantenido en un baño de hielo. El tubo contenía 2 mL del reactivo comercial *RNAlater*[™] de Ambion. Este reactivo permeabiliza en las células, estabilizando y protegiendo el ARN. En conjunto con la baja temperatura, se minimiza la síntesis y degradación de ARN después de la toma de muestra y durante el correcto procesamiento de la misma.

El ARN total se extrajo mediante el método del fenol caliente (Flores et al., 2005), precipitando los ácidos nucleicos en 40 μ L de acetato de sodio a una concentración 3 M y 1 mL de etanol. A las muestras así obtenidas, se les agregó 1 μ L de inhibidor de ribonucleasas (Ambion, USA), con la finalidad de evitar una degradación posterior del ARN. El ARN total así obtenido, se trató con DNAsa (Turbo DNA-free[™], Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN purificado se cuantificó cuidadosamente por densitometría en geles de agarosa al 1.2 %, en los que también se verificó su integridad.

2.4.9 Síntesis de ADN complementario.

El cADN se sintetizó por el método de síntesis de primera cadena de ADN empleando oligonucleótidos específicos para cada gene a analizar (ver tabla 2.3), empleando el producto Revert Aid[™] Minus H First Strand cDNA Síntesis Kit, de Fermentas Inc, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los oligómeros descritos en la tabla 2.3 fueron también empleados para la amplificación específica en la reacción de PCR en tiempo real (secc. 2.4.9). Las secuencias fueron diseñadas con el programa Primer Express Software (PE Applied Biosystems), el cual minimiza la probabilidad de que los oligómeros seleccionados puedan amplificar un gene distinto al gene a analizar. El tamaño de los productos de amplificación a obtener con los oligómeros diseñados es de 101 bases.

Tabla 2.8 Secuencias de los oligómeros utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por RT-PCR*.

Gene	Oligómero	Secuencia del oligómero
<i>aceA</i>	aceA a aceA b	ACATGGGCGGCAAAGTTTTA AACCAGCAGGGTTGGAACG
<i>acKA</i>	ackA a ackA b	CTGGTTCTGAACTGCGGTAGTTC GGCAGGTGGAACATTTCGG
<i>adhE</i>	adhE a adhE b	AAGTCCCTGTGTGCTTTCGG TGCAGAGCCTGACCATCAGA
<i>arcA</i>	arcA a arcA b	ATCACCAAACCGTTCAACCC ACGCTACGACGTTCTTCGCT
<i>arcB</i>	arcB a arcB b	AATCTGACGGCGCAGGATAA TGACCCAGCTGTTGCAGATG
<i>cydA</i>	cydA a cydA b	AATCCACCACACCAAACACCA TGATCAGCTCTTCAACCGGC
<i>cyoB</i>	cyoB a cyoB b	CTGACCTCCGTCGACCATAAA TGGCTACGCATCATAATGGC
<i>fdhF</i>	fdhF a fdhF b	GCAGTACGGTGAAGCGTTTG CTCCGGGTAACGTTTCAGG
<i>fnr</i>	fnr a fnr b	CGGAAAAGCGAATTATACGGC TTCGTTGAGTGTGAACGCGA
<i>frdD</i>	frdD a frdD b	TGGTCGCGTATTCCTGTTCC CCGCAGGTACGTGGATTTTC
<i>fumA</i>	fumA a fumA b	ATGTCGATCAACTGCAAGCG GAAGCCGCCGTGTTTTTTAC
<i>fumB</i>	fumB a fumB b	GTACCCTCGGTACTGCAGCC AGCGCTTGCTAACTTGACGG
<i>gfp</i>	gfp a gfp b	TGGCGAAAACAATGAACACC ATGGATCCCTCTTTCTGGCA
<i>ihfB</i>	ihfB a ihfB b	GCCAAGACGGTTGAAGATGC GAGAAACTGCCGAAACCGC
<i>ldhA</i>	ldhA a ldhA b	GCGTGATGATCGTCAATACC ACGTCCATACCCAACGAACC
<i>luxS</i>	luxS a luxS b	CGTGGCCAACCCTAGTCACT GGGCATGGCACTCTTGAAAA
<i>pflD</i>	pflD a pflD b	AAAGTCCGCGCTCGCTTAAT TCTTGCAGTAGTGGCGCAA

Tabla 2.8, continuación.

Gene	Oligómero	Secuencia del oligómero
<i>poxB</i>	poxB a	AAAAGCCGATCGCAAGTTTC
	poxB b	GGTGAATGGCTTTCTCGCTC
<i>sdhB</i>	sdhB a	TGAACGGCAAGAATGGTCTG
	sdhB b	GATCACCGGTAAACCTGGCA
<i>sodA</i>	sodA a	AATCCACCACACCAAACACCA
	sodA b	TGATCAGCTCTTCAACCGGC
<i>sucA</i>	sucA a	GCGGCAAAGAAACCATGAAA
	sucA b	TTCGGTGCTGGTAATGTGCA
<i>sucB</i>	sucB a	GCAGTACGGTGAAGCGTTTG
	sucB b	CTTCCGGGTAACGTTTCAGG

* Los oligómeros “a” se unen al extremo 5’ y los oligómeros “b” al extremo 3’. Todas las secuencias de los oligómeros se indican en el sentido de 5’ a 3’.

2.4.10 PCR (semi) cuantitativa en tiempo real.

La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Biosystems), empleando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Las reacciones de amplificación se ejecutaron por 10 min a 95 °C, con un ciclo de dos pasos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s por un total de 40 ciclos. Al emplear los oligómeros descritos en la tabla 2.3, el tamaño de los amplímeros obtenidos por el este método de PCR es de 101 pares de bases.

Cada reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en un volumen de 15 µL, en los cuales la concentración de amplímeros fue de 0.2 µM. Cada reacción contenía 5 ng de cADN. Cada reacción se ejecutó por triplicado para cada gene de cada condición evaluada. La diferencia entre los resultados de cada reacción por triplicado fue menor a 0.3 SD. Se incluyó siempre un control sin templado y con la mezcla de reacción de cada gene. Se incluyó también una reacción por triplicado para el gene *ihfB* de cada muestra en las condiciones evaluadas, para ser empleado como gene control (ver sección 2.5.2).

2.5 Métodos de cálculo

2.5.1 Cálculos cinéticos y estequiométricos

Las velocidades específicas de crecimiento, consumo de sustrato y de producción de acetato y GFP fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\mu = (dX / dt) / X \quad (2.2)$$

$$q_S = - (dS / dt) / X \quad (2.3)$$

$$q_{GFP} = (dGFP / dt) / X \quad (2.4)$$

$$q_{AO} = (dAO / dt) / X \quad (2.5)$$

Los rendimientos se calcularon como sigue (en fase exponencial de cultivos, o globales, según se indique en el texto):

$$Y_{X/S} = - (dX/dS) \quad (2.6)$$

$$Y_{GFP/S} = (dGFP/dS) \quad (2.7)$$

donde:

μ :	Velocidad específica de crecimiento	[h ⁻¹]
q_S :	Velocidad específica de consumo de sustrato	[g / g h]
q_{GFP} :	Velocidad específica de producción de GFP	[g / g h]
q_{AOt} :	Velocidad específica de producción de ácido orgánico	[g / g h]
X:	Concentración de biomasa	[g/ L]
GFP:	Concentración de GFP	[g/ L]
S:	Concentración de glucosa	[g/ L]
AO:	Concentración de ácido orgánico	[g/ L]
t:	Tiempo	[h]

2.5.2 Cálculos respiratorios.

Las velocidades específicas de consumo de oxígeno y generación de dióxido de carbono fueron calculadas para los cultivos continuos incluyendo los datos obtenidos del análisis de gases y la concentración de biomasa, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\text{OUR} = \frac{Q}{V} \times \frac{273}{(T+273)} \times \frac{(C_{O_2 E} - C_{O_2 S}) / 100}{R} \quad (2.8)$$

$$q_{O_2} = \text{OUR} / X \quad (2.9)$$

$$\text{CER} = \frac{Q}{V} \times \frac{273}{(T+273)} \times \frac{(C_{CO_2 S} - C_{CO_2 E}) / 100}{R} \quad (2.10)$$

$$q_{CO_2} = \text{CER} / X \quad (2.11)$$

$$\text{RQ} = \text{CER} / \text{OUR} \quad (2.12)$$

donde:

OUR :	Velocidad volumétrica de consumo de oxígeno	[mmol / L h]
Q :	Flujo volumétrico de gas de salida	[L / h]
V :	Volumen del cultivo	[L]
T :	Temperatura	[°C]
C _{O₂ E} :	Concentración de oxígeno en el gas de entrada	[%]
C _{O₂ S} :	Concentración de oxígeno en el gas de salida	[%]
R :	Constante estándar de gases	= 22.4 [L / mol]
q _{O₂} :	Velocidad específica de consumo de oxígeno	[mmol / g h]
CER =	Velocidad volumétrica de generación de CO ₂	[mmol / L h]
C _{CO₂ S} :	Concentración de CO ₂ en el gas de salida	[%]
C _{CO₂ E} :	Concentración de CO ₂ en el gas de entrada	[%]

q_{CO_2} :	Velocidad específica de producción de CO_2	[mmol / g h]
q_{AOt} :	Velocidad específica de producción de ácido orgánico	[g / g h]
X:	Concentración de biomasa	[g/ L]
RQ :	Cociente respiratorio	[mol CO_2 / mol O_2]

2.5.3 Balances de carbono.

Los balances de carbono en cultivos continuos se realizaron empleando un modelo de caja negra:

$$C_S = C_{TOC} + C_{CO_2} + C_{IC} \quad (2.13)$$

Donde (todas las concentraciones en g/L):

C_S = Carbono proveniente del sustrato de entrada

C_{TOC} = Carbono orgánico total en la muestra de efluente

C_{CO_2} = Carbono contenido en el CO_2 producido

C_{IC} = Carbono inorgánico en la muestra de efluente.

2.5.4 Cálculo de niveles de transcripción relativos.

Los niveles de transcripción se calcularon de acuerdo al método propuesto por Livak y Schmittgen (2001). Brevemente, dicho método considera una amplificación exponencial del ADN durante los ciclos de reacciones de PCR. Se define el parámetro N_T como el ciclo umbral, esto es, el número de ciclo en el cual las moléculas de ADN iniciales alcanzan un nivel umbral predeterminado. Este nivel se define, durante un experimento de RT-PCR, para todas las muestras que se han sometido a amplificación. Para ello, se elige el ciclo umbral en el punto en que las reacciones de amplificación se están llevando a cabo a velocidades similares, indicadas por las pendientes en las gráficas de señal de amplificación durante los ciclos de PCR, la cual es dada por la señal de fluorescencia del SYBR Green. La identificación del ciclo N_T puede ser ejecutada por el programa de análisis del ABI Prism 7000 Sequence Detection System. En todos los análisis de RT-PCR, se incluyeron reacciones por triplicado para el gene *ihfB* de cada muestra. Este gene, cuyo nivel de expresión no cambió en los diferentes cultivos (datos no mostrados), se usó como gene de control interno. El término ΔN_T se define como la diferencia entre

los ciclos umbral para el gene a analizar (denominado X) y para el gene de referencia (*ihfB*, denotado como R):

$$\Delta N_T = (N_{T,X} - N_{T,R}) \quad (2.14)$$

Una forma de calcular un nivel de transcripción, basado en la naturaleza exponencial de replicación del cADN, se puede calcular como:

$$\text{Nivel de transcripción} = 2^{-\Delta N_T} \quad (2.15)$$

El nivel de transcripción calculado con la ecuación 14, es un nivel relativo al gene *ihfB*, y se empleó en un par de ocasiones para elucidar la expresión diferencial de citocromos y fumarasas en *E. coli*, como se explica en el capítulo 3.

Para calcular el nivel de transcripción de una muestra obtenida de una condición B, relativo a una muestra proveniente de una condición A, se calcula el parámetro $\Delta\Delta N_T$ así:

$$\Delta\Delta N_T = (\Delta N_{T,B} - \Delta N_{T,A}) \quad (2.16)$$

Finalmente, el nivel de transcripción de un gene en una condición, relativo a otra condición se calcula como:

$$\text{Nivel de transcripción} = 2^{-\Delta\Delta N_T} \quad (2.17)$$

Este es el modo más común de reportar niveles de expresión.

2.5.4.1 Interpretación de los niveles de transcripción.

En un experimento de RT-PCR, el número de ciclo umbral es inversamente proporcional a la cantidad de cADN del gene a analizar, y ésta a su vez es directamente proporcional a la cantidad de mRNA presente en la muestra original. Esto ocurre debido a la naturaleza exponencial de síntesis de cADN. Por lo tanto, tenemos los siguientes casos:

i) $\Delta\Delta N_T = 0$; lo cual implicaría que no hay diferencia en la cantidad de mRNA presente en la muestra original. En consecuencia, $2^{-\Delta\Delta N_T} = 1$, lo que se significa que no hubo cambio en el nivel relativo de transcripción del gene analizado en las dos condiciones experimentales.

ii) $\Delta\Delta N_T > 0$; lo cual significa que la cantidad de mRNA del gene analizado fue menor en la situación B que en la situación A. Por lo tanto, $2^{-\Delta\Delta N_T} < 1$, lo que se interpreta como una menor transcripción (del gene analizado) en la condición B, relativo a la condición A.

ii) $\Delta\Delta N_T < 0$; lo cual significa que la cantidad de mRNA del gene analizado fue mayor en la situación B que en la situación A. Por lo tanto, $2^{-\Delta\Delta N_T} > 1$, lo que se interpreta como una mayor transcripción (del gene analizado) en la condición B, relativo a la condición A.

3. Resultados y discusión.

El presente capítulo se divide en cuatro secciones. Las dos primeras muestran los resultados de experimentos dirigidos a investigar las respuestas fisiológicas de *E. coli* ante exposiciones cíclicas a condiciones anaerobias. La tercera sección reporta el diseño y evaluación de cepas mutantes con un mejor desempeño ante oscilaciones de oxígeno disuelto. La última sección presenta la aplicación de una cepa mutante en cultivos con elevadas concentraciones de glucosa. Ésta última sección presenta una alternativa a los cultivos alimentados, evitando la inherente presencia de regiones con altas concentraciones de sustrato en el biorreactor, originadas de procesos de mezclado deficiente.

3.1 Efectos de los gradientes espaciales en *Escherichia coli*.

3.1.1 Dinámica del metabolismo de fermentación de *E. coli* ante gradientes espaciales de glucosa aerobios y anaerobios.

El efecto de la exposición de las células a cambios transitorios en la concentración de sustrato, como puede ocurrir en cultivos alimentados de gran escala, fue investigado en un sistema de dos compartimentos tipo STR-PFR. El STR fue operado en continuo (quimiostato) para observar los cambios en las células al pasar de un estado fisiológico constante y bien definido, a un incremento súbito de concentración extracelular de glucosa. De este modo, el quimiostato representa las regiones alejadas del punto de adición de sustrato en un cultivo industrial, en donde la concentración de glucosa es prácticamente cero. El tránsito de las células a regiones con alta concentración de glucosa es simulado en un PFR en donde se inyecta un pulso de una solución de glucosa. En la tabla 3.1, se muestran las características más importantes del quimiostato de *E. coli* W3110 durante el estado de equilibrio, el cuál se definió una vez que se alcanzaron lecturas constantes en el análisis de los gases exhaustos.

La tasa de dilución de 0.1 h^{-1} se eligió para ser representativa de las velocidades de crecimiento típicas empleadas en cultivos alimentados de *E. coli*. Los valores reportados en la tabla 3.1 comparan bien con los reportados por otros autores (v. gr., Kayser et al., 2005). Es interesante notar que, a pesar de la baja velocidad de crecimiento y las condiciones completamente aerobias del cultivo, se observó

una ligera acumulación de acetato y formato, del orden de miligramos por litro. Como se detalló en el capítulo de Material y Métodos, una pequeña fracción de la corriente de salida del quimiostato se derivó para ser introducida al PFR. En las siguientes secciones se describen los resultados de los pulsos de glucosa bajo condiciones aerobias o anaerobias. El tiempo de residencia en el PFR fue de 110.3 s, y se tomaron 11 muestras a lo largo del mismo. Esto permitió tener una ventana de observación más corta de lo que anteriormente se ha usado para estudios con *E. coli*. De hecho, la segunda muestra en el PFR se tomó tras 4.6 s de exposición de *E. coli* al gradiente de glucosa, lo que podría compararse al tiempo de residencia de las células a regiones con alta concentración de sustrato en un cultivo alimentado industrial.

Tabla 3.1. Principales parámetros al estado estacionario del cultivo continuo de *Escherichia coli* W3110.

Parámetro (Unidades)	Valor
D (h ⁻¹)	0.100
X (g/L)	2.790
Y _{X/S} (g / g)	0.370
q _{CO2} (mmol / g h)	3.410
q _{O2} (mmol / g h)	3.783
RQ	0.901
Glucosa (g/L)	0.025
Acetato (mg/L)	5.000
Formato (mg/L)	0.224
Recuperación de carbono (%)	101
q _S (g / g h)	0.268
q _{Acetato} (mg / g h)	0.179
q _{Formato} (mg / g h)	0.008

3.1.1.1 Pulsos de glucosa bajo condiciones aerobias.

En la fig. 3.1 se muestra la concentración de O_2 y CO_2 en el gas de salida del quimiostato, y el perfil de TOD en el PFR durante pulsos continuos de glucosa en condiciones aerobias. La composición de los gases exhaustos proporcionó información para comprobar que se alcanzó el estado estacionario en el quimiostato (fig. 3.1 A). La fig. 3.1 B muestra que en el quimiostato la TOD era de 116 %, debido a la ligera sobrepresión con la que fue operado (ver Material y Métodos). Durante el tránsito al PFR (que tomó alrededor de 2 s), la TOD disminuyó a 80 %, probablemente debido a la reducción a presión normal. En la entrada al PFR se observó un ligero incremento de la TOD, llegando a 89 %, debido probablemente a la transferencia de oxígeno de la mezcla aire/oxígeno. La TOD se redujo durante los siguientes 25.5 s, periodo que coincide con una alta velocidad de producción de subproductos, como se detalla más adelante.

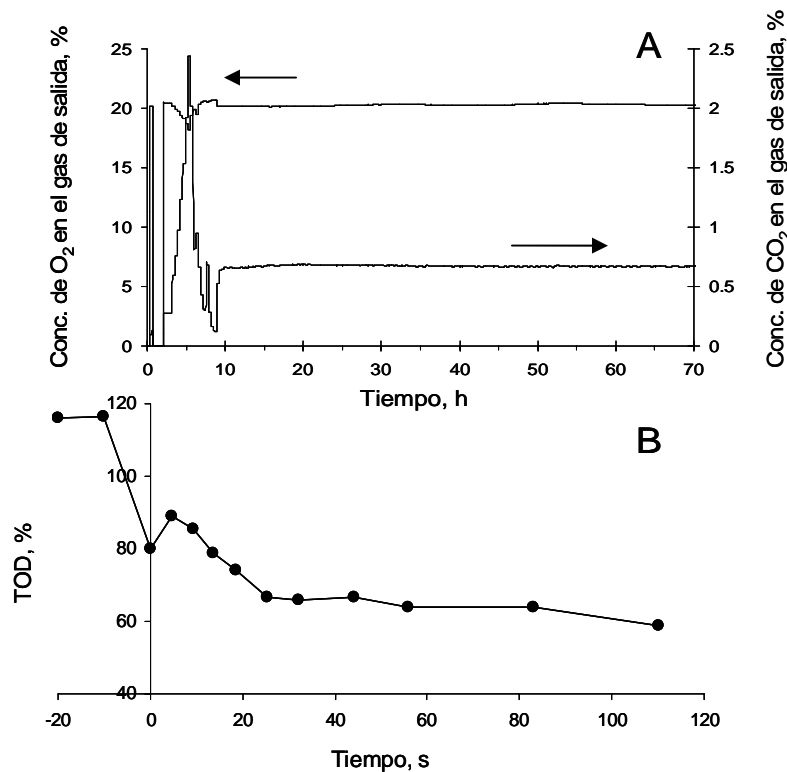


Figura 3.1. A: Concentración de O_2 y CO_2 en los gases exhaustos durante el arranque y operación del quimiostato. B: Perfil de TOD en el PFR durante gradientes de glucosa bajo condiciones aerobias. Valores negativos de tiempo indican datos tomados en el quimiostato.

Después de los primeros 25.5 s, la TOD se mantuvo en niveles de 66 - 59 %, lo que indica que la velocidad de transferencia de oxígeno al PFR fue sólo ligeramente menor que la velocidad de consumo en el mismo. Este segundo periodo coincide con una menor velocidad de acumulación de acetato y formato, que se discutirá más adelante. En general, la fig. 3.1 demuestra que con la

estrategia descrita en Material y Métodos, se garantizaron condiciones aerobias durante el paso de las células a regiones con alta concentración de glucosa.

En la fig. 3.2 se muestra el perfil de concentración extracelular de glucosa y metabolitos de fermentación tras pulsos de glucosa bajo condiciones completamente aerobias. Las barras de error muestran las diferencias entre dos experimentos de pulsos de glucosa. De acuerdo con el arreglo experimental, la concentración de glucosa en el medio se incrementó súbitamente de 0.008 ± 0.002 g/L a 2.97 ± 0.006 g/L, para llegar a valores de 2.78 ± 0.007 g/L a los 110.3 s de residencia en el PFR (fig. 3.2 A). Esto significa un consumo de 0.19 g/L (1.06 ± 0.073 mmol/L) de glucosa por *E. coli* durante su residencia en el PFR.

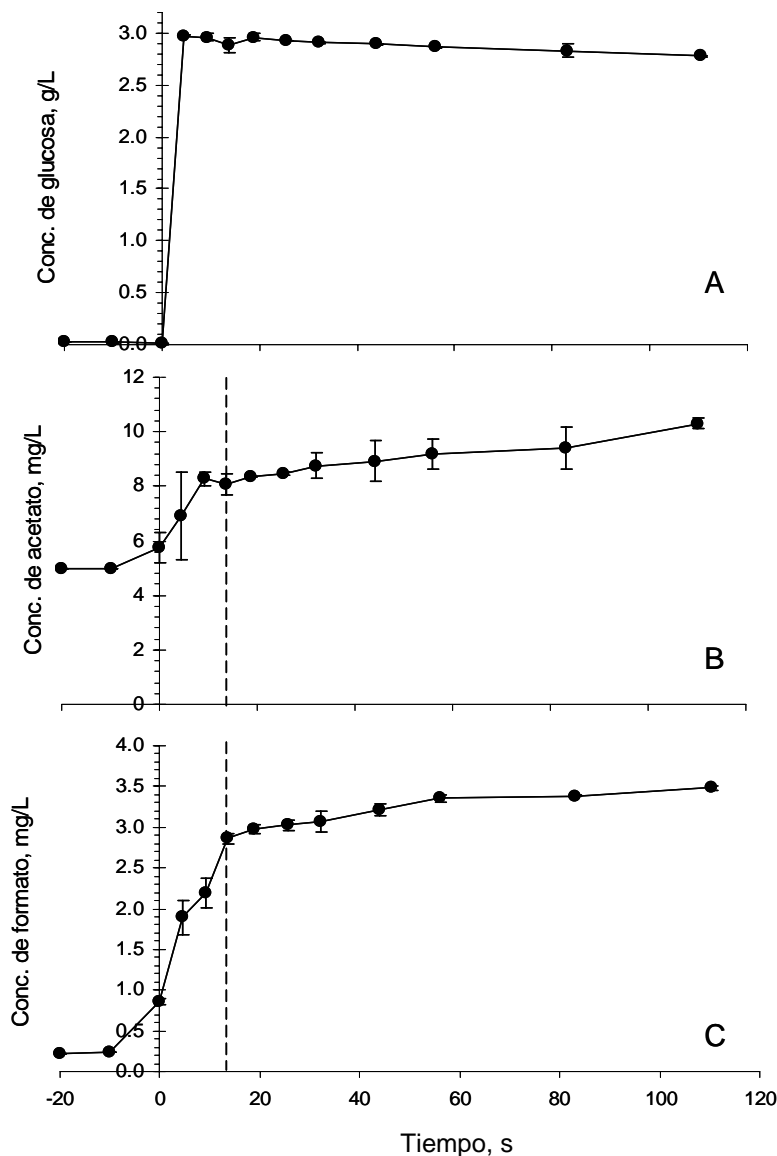


Figura 3.2. Concentración de glucosa (A), acetato (B) y formato (C) en el PFR durante pulsos de glucosa bajo condiciones aerobias. Las barras de error ilustran la diferencia entre dos experimentos. Valores negativos de tiempo indican datos tomados en el quimiostato. Las líneas verticales indican diferentes fases de producción de metabolitos (ver texto).

Se analizaron todas las muestras en busca de metabolitos de fermentación ácido-mixta, de los cuales únicamente se detectó acetato y formato. Ello confirma las condiciones completamente aerobias en el PFR. Como se observa en la fig. 3.2 B y C, se encontró acumulación de acetato y formato desde los 4.6 s de permanencia en el PFR. Es importante destacar que pueden distinguirse dos fases de acumulación de acetato y formato, en las que las velocidades de acumulación son diferentes. La primera fase, puede ser ubicada durante los primeros 13.6 s (después del pulso de glucosa), en la que se produjeron 2.29 ± 0.14 mg/L de acetato y 2.00 ± 0.022 mg/L de formato, mientras que durante los 96.7 s restantes, se produjeron 2.23 ± 0.62 mg/L de acetato y 0.624 ± 0.035 mg/L de formato. La línea vertical en la fig. 3.2 denota la división de estas dos fases.

3.1.1.2 Pulsos continuos de glucosa bajo condiciones anaerobias.

Para simular el efecto combinado que los gradientes de glucosa (de muy baja a alta concentración) pueden causar en biorreactores de gran escala, se realizó un experimento similar al anterior, pero manteniendo condiciones anaerobias en el PFR. Como se detalló en la sección de Material y Métodos, la TOD del quimiostato se redujo a 15 %, lo que garantizó condiciones completamente anaerobias, pero facilitó la transición a anaerobiosis en el PFR. La disminución de TOD no alteró la concentración de CO₂ en los gases exhaustos, como se muestra en la fig.3.3 A. La concentración de biomasa, glucosa y acetato tampoco fueron afectados (datos no mostrados), por lo que se considera que no se alteró el estado estacionario alcanzado en el quimiostato. En la fig. 3.3 B se muestra el perfil de TOD en el PFR para los experimentos de gradientes de glucosa bajo condiciones anaerobias. Como se observa, la TOD disminuyó de 15 a 12 % durante los 2 s de tránsito de las células del quimiostato al PFR. Una vez dentro del PFR, la TOD disminuyó a 1.1 % luego de 4.6 s de residencia, para alcanzar valores de 0.1 % en el resto del PFR. Con la estrategia seguida, se logró simular gradientes simultáneos de concentración de sustrato y TOD, haciendo pasar las células completamente aerobias (quimiostato) a anaerobiosis (PFR), lo cual representa una ventaja para generar mayor información en este tipo de estudios fisiológicos.

A diferencia de las exposiciones súbitas a altas concentraciones de glucosa bajo condiciones aerobias, en los que sólo se detectó la acumulación de acetato y formato, durante la transición de un ambiente aerobio y limitado en fuente de carbono a un ambiente rico en glucosa pero anaerobio, las

células de *E. coli* acumularon todos los productos de fermentación ácido-mixta. La fig. 3.4 ilustra la formación de dichos productos y el consumo de glucosa.

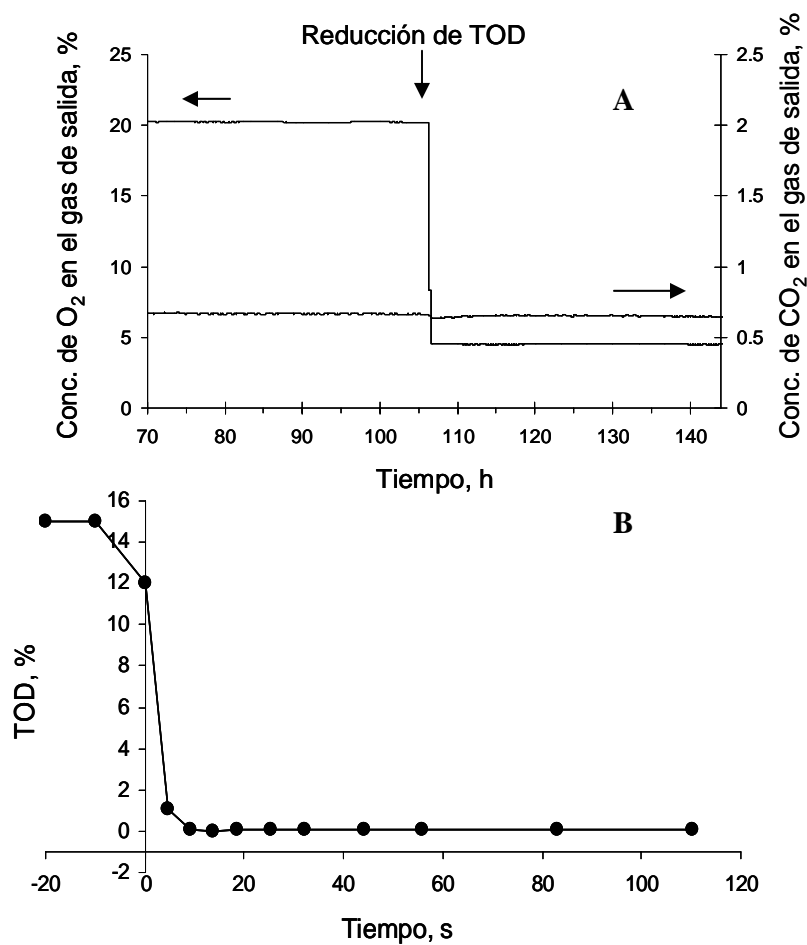


Figura 3.3. A. Concentración de O₂ y CO₂ en los gases de salida del quimiostato. B. Perfil de TOD en el PFR durante gradientes de glucosa bajo condiciones anaerobias. Valores de tiempo menores que cero indican muestras tomadas en el quimiostato.

Nuevamente, el acetato y el formato fueron los productos mayormente acumulados, llegando a concentraciones de 22.8 ± 1.58 y 19.91 ± 0.59 mg/L, respectivamente. El lactato fue el tercer metabolito más acumulado (10.04 ± 0.49 mg/L), seguido del etanol (9.06 ± 0.56 mg/L) y el succinato (5.39 ± 0.11 mg/L). Al igual que en el caso de gradientes de sustrato en condiciones aerobias, se identificaron dos diferentes fases de producción de metabolitos: de 0 a 13.6 s de residencia en el PFR, las velocidades de acumulación fueron altas, mientras que de 13.6 a 110.3 s, las velocidades decrecieron notoriamente. En la siguiente sección se detallan las velocidades de producción calculadas para cada fase y las implicaciones que ello puede tener en los bioprocesos.

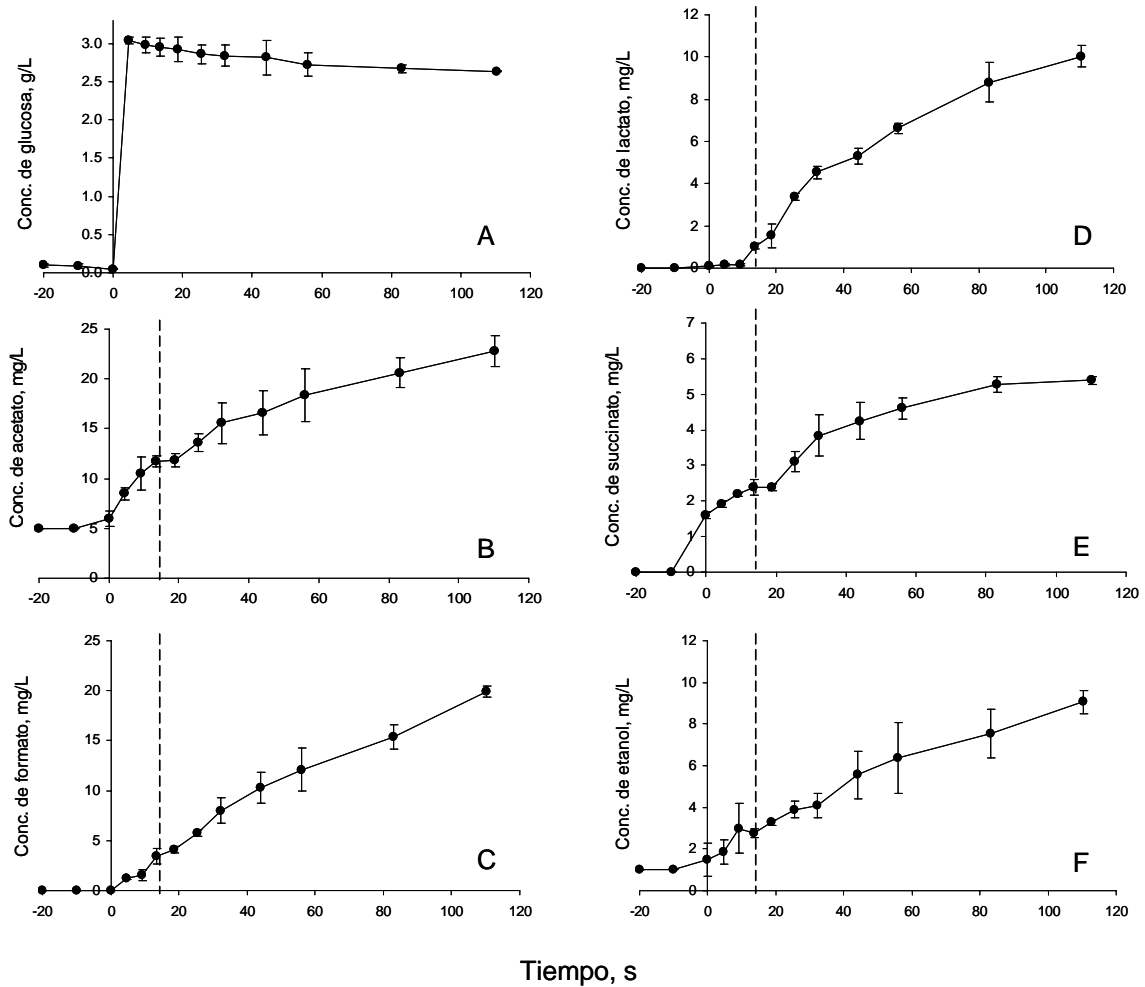


Figura 3.4. Perfiles de concentración de A) glucosa, B) acetato, C) formato, D) lactato, E) succinato, y F) etanol durante el tránsito de *E. coli* por gradientes de sustrato combinados con anaerobiosis. Las barras de error ilustran las diferencias entre dos experimentos independientes. Las líneas verticales indican diferentes fases de producción de metabolitos (ver texto).

3.1.1.3 Discusión.

Como se ha discutido anteriormente, la presencia de gradientes de glucosa en cultivos industriales es un problema que ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, gran parte de los estudios realizados han implicado tomas de muestra después de tiempos relativamente largos de exposición *E. coli* a regiones con alta concentración de glucosa, generalmente de más de 10 s (Bylund et al., 1999; Xu et al., 1999; Enfors et al., 2001).

Dichos estudios han empleado también un PFR en el que aplican soluciones concentradas de glucosa, y se ha asumido que existe limitación de oxígeno a lo largo del PFR, aunque a hasta ahora no se han mostrado perfiles de TOD. En el sistema de biorreactores aquí empleado, se ha logrado evaluar el efecto de gradientes de sustrato, de manera independiente de los gradientes de sustrato combinados con anaerobiosis, lo que fue comprobado al medir la TOD en once puntos a lo largo del PFR.

Cabe resaltar que bajo condiciones aerobias, un gradiente de glucosa (de 0.008 a 2.973 g/L) provocó sobreflujo metabólico, el cual resulta en la producción inmediata de acetato. El sobreflujo metabólico será descrito con más detalle en otras secciones de este capítulo.

En la fig. 3.5, se comparan las velocidades específicas de consumo de glucosa en el quimiostato y PFR. Como puede verse, el valor de q_s aumentó más de 9 veces tras un pulso de glucosa (de 0.243 a 2.239 g/g h) cuando las células de *E. coli* pasaron del quimiostato al PFR. El valor de q_s en el PFR sin duda está por encima del valor umbral que provoca el sobreflujo metabólico. Por ejemplo, se ha reportado (Kayser et al., 2005) la producción de acetato en quimiostatos aerobios de *E. coli* TG1 a valores de q_s a partir de 0.640 g/g h. El sobreflujo metabólico (producción de acetato) es una respuesta de *E. coli* que coincide con un súbito incremento de la velocidad de consumo de glucosa, y la producción de acetato fue tan rápida que pudo detectarse a partir de los 4.6 s de exposición de *E. coli* al cambio súbito de concentración de glucosa (fig. 3.2).

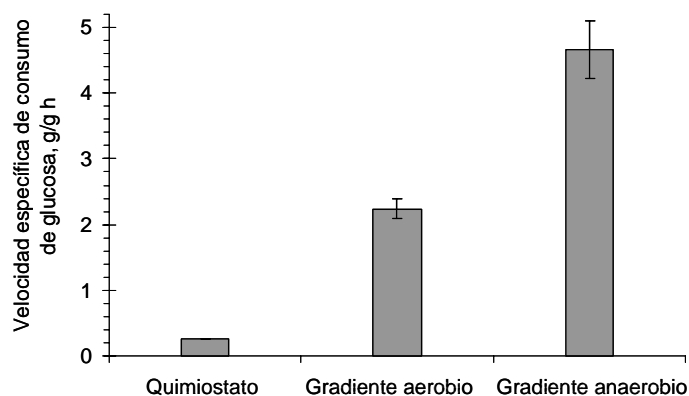


Figura 3.5. Velocidad específica de consumo de glucosa en el quimiostato y PFR durante pulsos de glucosa combinados con aerobiosis o anaerobiosis. Las barras de error ilustran la diferencia entre dos experimentos.

Además del acetato, se detectó acumulación de formato durante pulsos de glucosa en condiciones aerobias. Otros autores han observado también la producción de formato por *E. coli* bajo condiciones aerobias (Castan y Enfors, 2002; Sandoval-Basurto et al., 2005; Lara et al., 2006 A, B). Aunque el mecanismo exacto por el cuál se activa la producción de formato bajo condiciones aerobias es

desconocido, se ha relacionado han relacionado su producción con la liberación de ADN celular al medio de cultivo (Castan y Enfors, 2002). La acumulación de formato también se observó desde los 4.6 s de residencia de *E. coli* en el PFR.

Durante el tránsito de *E. coli* en gradientes de glucosa bajo condiciones aerobias, se observaron dos diferentes etapas en la producción de ácidos orgánicos (delimitadas por una línea vertical en la fig. 3.2B, C). La fig. 3.6A muestra la diferencia entre las velocidades de producción de formato y acetato en cada etapa. Es interesante observar que la producción de acetato cayó alrededor de 8 veces (de 0.218 ± 0.013 a 0.028 ± 0.003 g / g h) comparando la primera fase de producción con la segunda.

La fase de rápida acumulación de acetato coincide con la caída de TOD en el PFR (fig. 3.1). El sobreflujo metabólico ocurre en estrecha dependencia de dos parámetros: la velocidad específica de consumo de glucosa, y la de consumo de oxígeno (Eiteman y Altman, 2006). Es posible que durante los primeros 13.6 s de exposición de *E. coli* a altas concentraciones de glucosa hubiera una alta tasa de respiración (evidenciada por la caída de TOD), y ello combinado con una alta q_s , provocara la elevada q_{acetato} .

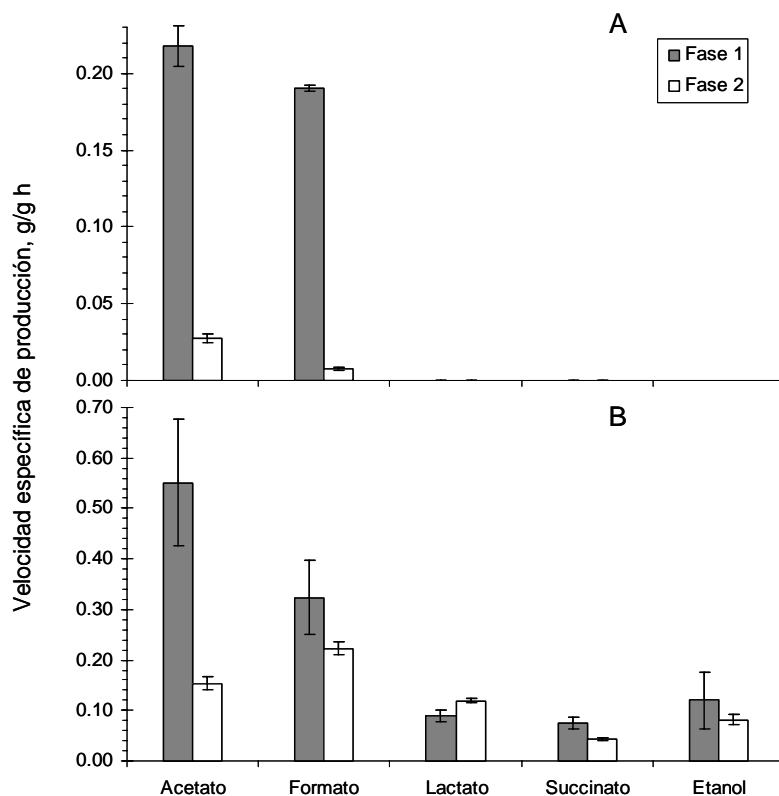


Figura 3.6. Velocidades específicas de producción de metabolitos de fermentación ácido-mixta por *E. coli* durante pulsos de glucosa en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B). Las barras de error muestran la diferencia entre dos experimentos.

De hecho, el valor de q_{acetato} de la primera fase en el PFR, es comparable al valor reportado para una velocidad de consumo de oxígeno por *E. coli* de alrededor de $5.5 \text{ mmol O}_2 / \text{g h}$ (0.99 g/g h) (Alexeeva et al., 2000), 45 % más alta de la observada en el quimiostato (tabla 3.1).

La rápida acumulación de acetato desde el inicio de la exposición de *E. coli* a un incremento súbito de concentración de sustrato significa que la vía de producción de acetato mediante la PTA y la ACK (fosfotranscetilasa y acetato cinasa, respectivamente) es muy sensible y de hecho, es una vía constitutiva en *E. coli* (Clark, 1989; Wolfe, 2005). La fig. 3.2 demuestra que estas enzimas presentes en *E. coli* aún sin sobreflujo metabólico, son lo bastante eficientes para la acelerada producción de acetato.

La disminución de q_{acetato} después de 13.6 s de permanencia de *E. coli* en el PFR puede deberse a la naturaleza transitoria de la respuesta celular a gradientes ambientales (más intensa al inicio, más lenta en cuanto se prolonga la exposición a la segunda condición ambiental), o bien a que las vías de producción de acetato fueron saturadas y parte del acetato producido hubiera sido reasimilado por *E. coli* a través del CAT y el resultado neto de acumulación observado sea menos intenso.

La producción de formato bajo condiciones aerobias siguió un patrón similar, presentando una q_{formato} de $0.19 \pm 0.02 \text{ g/g h}$ durante los primeros 13.6 s, para disminuir a $0.01 \pm 0.001 \text{ g/g h}$ durante el resto del tiempo. Cabe hacer notar que aunque el gene *pfl*, que codifica para la enzima responsable de la formación de formato a partir de piruvato (piruvato formato liasa, o PFL), es una enzima expresada bajo condiciones anaerobias, la acumulación de formato se observó desde los 4.6 s de exposición al gradiente de sustrato, bajo condiciones aerobias. La regulación de la síntesis de la PFL es compleja, sin embargo se sabe que bajo condiciones aerobias existe un nivel basal de PFL presente en *E. coli* (Pecher et al., 1982). Por lo tanto, la producción de formato observada en el PFR es debida a una activación de la PFL presente, mediante un proceso sumamente eficiente.

Durante el gradiente de glucosa bajo condiciones anaerobias, la producción de los metabolitos de fermentación también puede ser separada en una fase rápida (de 0 a 13.6 s de exposición al gradiente) y de una segunda fase más lenta (de 13.6 s a 110.3 s de permanencia en el PFR) (figs. 3.4 y 3.6). Durante los primeros 13.6 s, el acetato y el formato fueron los metabolitos más rápidamente acumulados, a velocidades de 0.55 ± 0.12 y $0.32 \pm 0.07 \text{ g/g h}$, respectivamente. Estas velocidades son más del doble que las observadas durante gradientes aerobios de glucosa.

Es posible que en este caso se haya observado una combinación del gradiente de glucosa combinado con el cambio súbito a condiciones anaerobias. Después del acetato y formato, los metabolitos más rápidamente acumulados fueron (en orden descendente), el etanol (0.12 ± 0.06 g/g h), el lactato (0.09 ± 0.01 g/g h) y el succinato (0.07 ± 0.01 g/g h). Durante la segunda fase de permanencia en el PFR, el patrón de velocidades de producción cambió, siendo ahora el formato el metabolito más rápidamente acumulado (0.22 ± 0.01 g/g h), seguido del acetato (0.15 ± 0.01 g/g h), mientras que el resto de los metabolitos de fermentación presentaron menores variaciones en sus velocidades de producción (fig. 3.6).

Durante la estancia de *E. coli* en el PFR, puede asumirse que la concentración de enzimas presente es constante, ya que 110.3 s es un tiempo insuficiente para llevar a cabo la secuencia completa de los eventos de inducción genética, transcripción y traducción de proteínas. Esta consideración es particularmente importante durante los primeros 13.6 s en el PFR bajo condiciones anaerobias, en los que se ha observado una alta acumulación de metabolitos de fermentación. Durante la exposición de *E. coli* a gradientes de glucosa en condiciones anaerobias, se observó la acumulación de todos los metabolitos de fermentación luego de 4.6 s de estancia en el PFR (fig. 3.4). Por lo tanto, la producción de estos ácidos orgánicos debió ser catalizada por enzimas presentes en la célula aún en las condiciones aerobias del quimiostato. Como ya se ha mencionado, la PFL tiene un cierto nivel basal en *E. coli* bajo condiciones aerobias, y la vía PTA-ACK de producción de acetato es constitutiva. Por otra parte, la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima responsable de la síntesis de lactato en *E. coli*, está presente en condiciones aerobias y anaerobias (Mat-Jan et al., 1989). Su inducción en condiciones aerobias requiere acidificación del medio, es posible que por ello no se haya detectado producción de lactato durante pulsos de sustrato bajo condiciones aerobias. Por otra parte, también se detectó etanol desde etapas tempranas en el PFR. La alcohol deshidrogenasa (ADH) es la enzima responsable de la producción de etanol a partir de acetyl-CoA en dos reacciones consecutivas. La ADH fermentativa es codificada por el gene *adhE*, cuya inducción ha sido encontrada sólo en condiciones anaerobias (Clark, 1989). Sin embargo, los datos mostrados en la fig. 3.4, implican que algún nivel basal de la ADH debe estar presente en *E. coli* en condiciones aerobias.

En total, se produjeron 4.52 mg/L de acetato (0.15 mmol C/L) y 2.63 mg/L de formato (0.06 mmol C/L) durante los 110.3 s de permanencia de *E. coli* en el PFR bajo condiciones aerobias. Esto significa que durante este proceso, se desperdició, como productos de fermentación,

aproximadamente 3.30 % de los moles de carbono provenientes de la glucosa consumidos en el PFR. En contraste, cuando el aumento súbito en concentración de glucosa se combinó con condiciones anaerobias, *E. coli* produjo en total 1.75 mmol C/L de productos de fermentación, formados a partir de 13.29 ± 1.26 mmol C/L de glucosa consumida. Esto significa una fuga del 13.19 % del mmol C/L de la glucosa consumida hacia productos de desecho. Las implicaciones que esto puede tener en la gran escala son claras: un tiempo de exposición de *E. coli* a gradientes de glucosa menor de 5 s, es suficiente para activar el sobreflujo metabólico y la producción de formato, aún en condiciones completamente aerobias. Basados en los perfiles de TOD de la fig. 3.1, confirmamos que la presencia de gradientes de glucosa muy probablemente esté combinada con gradientes de oxígeno que conduzcan a zonas con limitación del mismo, ya que los cultivos a nivel industrial difícilmente se operan a valores de TOD tan altos como los mostrados en la fig. 3.1. Los gradientes de oxígeno son un fenómeno complejo en los que intervienen, además de procesos de mezclado, procesos de transferencia de masa. Por lo tanto, si bien los gradientes de glucosa no necesariamente coincidirán con los gradientes de TOD a través de un biorreactor industrial, sí es razonable pensar que las regiones con alta concentración de sustrato podrán también presentar limitaciones de oxígeno en biorreactores alimentados.

En la segunda parte de este estudio, los gradientes de glucosa se combinaron con gradientes de TOD, y la respuesta del metabolismo de fermentación fue notoriamente intensificada. Nuevamente, bastó una exposición menor de 5 s de *E. coli* a dichas condiciones, para redirigir los flujos de carbono hacia la producción de metabolitos de fermentación.

Se ha estimado (Enfors et al., 2001) que el tamaño de los campos con alta concentración de glucosa en aproximadamente el 10 % del volumen del biorreactor. Si tomamos un tiempo de circulación en un biorreactor industrial de 50 s, entonces en promedio las células permanecerían en las regiones con altas concentraciones de sustrato alrededor de 5 s, precisamente el tiempo en el que se observó una activación del metabolismo de fermentación en *E. coli*.

3.1.1.4 Conclusiones Parciales.

En el presente estudio, se analizó la respuesta dinámica del metabolismo de fermentación de *E. coli* a gradientes de glucosa, bajo condiciones completamente aerobias y en combinación con anaerobiosis. Se encontró que el efecto directo de la exposición a gradientes de sustrato, fue la activación del

sobreflujo metabólico y la producción de formato, en menos de 5 s después del cambio de concentraciones de glucosa. Si los gradientes de sustrato se combinan con escasez de oxígeno, el metabolismo de fermentación es activado también en menos de 5 s. Los flujos de carbono hacia las vías fermentativas fueron altos durante los primeros 25.5 s de exposición a gradientes, disminuyendo durante el resto del tiempo de permanencia de *E. coli* en el PFR. Los resultados mostrados, indican que el fenómeno de un cambio súbito de aerobiosis a anaerobiosis, tiene mayor relevancia para la respuesta del metabolismo de fermentación y con ello la acumulación de subproductos que redundará en un deficiente desempeño de biorreactores industriales.

Estos resultados son relevantes para estimar que en biorreactores alimentados de escala industrial, los mencionados metabólicos muy probablemente estarán presentes, ya que la ventana de tiempo empleada en nuestros experimentos, permitió analizar la respuesta de *E. coli* en tiempos de exposición a gradientes de glucosa y TOD que pueden ocurrir en la gran escala.

Ya que la exposición de *E. coli* a incrementos súbitos en la concentración de glucosa tiene efectos más importantes bajo condiciones anaerobias que bajo condiciones aerobias, en la siguiente sección se presentan estudios sobre el efecto de exposiciones repetidas de *E. coli* a condiciones anaerobias, sin variaciones repentinas de concentración de sustrato.

3.1.2 Respuestas transcripcionales y metabólicas de *Escherichia coli* recombinante a gradientes espaciales de oxígeno disuelto.

3.1.2.1 Cultivos de *E. coli* recombinante a TOD constante.

Se realizaron cultivos controlados a una TOD de 10 % en el B_{aerobio} sin recirculación de caldo de fermentación para caracterizar el comportamiento cinético de *E. coli* bajo condiciones aerobias constantes. El valor de TOD de 10 % fue seleccionado como un valor adecuado para asegurar condiciones aerobias, y a la vez es suficientemente bajo para permitir el establecimiento de gradientes de oxígeno disuelto satisfactorios en el sistema de escalamiento descendente (De León et al., 2003; Sandoval-Basurto et al., 2005). La cinética típica de crecimiento, consumo de glucosa, producción de ácidos orgánicos y perfiles de control de pH y TOD se muestran en la fig. 3.7. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos. Como se observa en la fig. 3.7 C, el acetato se acumuló hasta una concentración máxima de 0.674 g/L, debido al efecto del sobreflujo metabólico. Se acumularon además cantidades pequeñas de otros metabolitos de fermentación, incluyendo formiato (0.343 g/L), succinato (0.050 g/L), lactato (0.010 g/L), y etanol (0.184 g/L). Una vez agotada la glucosa, se observó reasimilación de acetato y succinato. Como se esperaba, la producción de proteína verde fluorescente (GFP) se observó desde el inicio del cultivo, debido a que el inductor IPTG se agregó al momento de la inoculación. La velocidad de crecimiento específica durante la fase exponencial y la concentración máxima de GFP alcanzada fueron 0.225 h⁻¹ y 0.122 g/L, respectivamente. Se realizaron además cultivos recirculados manteniendo condiciones aerobias en ambos compartimentos, con resultados similares, excepto que se observó una fase lag mayor (2 h) y una concentración máxima de acetato ligeramente mayor (0.790 g/L). Estos resultados indican que el estrés mecánico en *E. coli* en los cabezales de las bombas no fue relevante, lo que concuerda con reportes previos (Onyeaka et al., 2003; Sandoval-Basurto et al., 2005).

3.1.2.2 Cultivos de *E. coli* recombinante a TOD oscilante.

Con la finalidad de imitar condiciones de biorreactores de gran escala, *E. coli* fue recirculada continuamente entre los compartimentos aerobio y anaerobio del sistema de escalamiento descendente. Los cultivos se ejecutaron por duplicado y los resultados cinéticos se muestran en la fig. 3.8. A lo largo de los cultivos, se mantuvo un gradiente de al menos 9 % de TOD (fig. 3.8 A). Se

observaron diferencias importantes en el comportamiento de estos cultivos respecto a cultivos aerobios a TOD de 10 %.

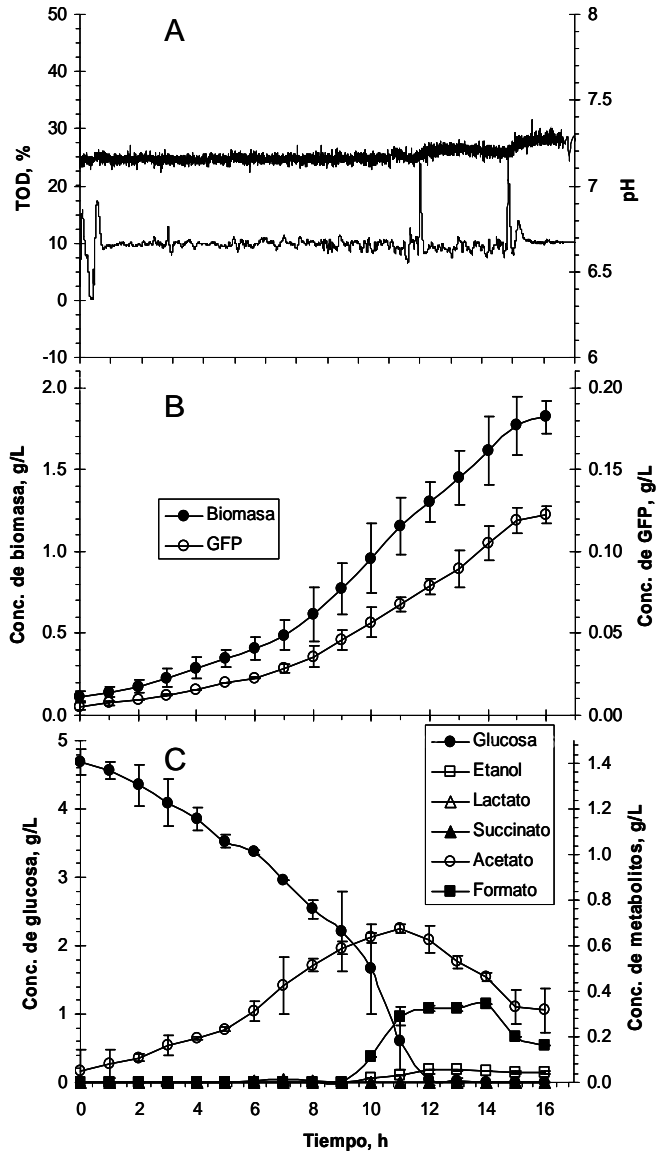


Figura 3.7. Perfil cinético de cultivos de *E. coli* W3110 a una TOD constante de 10%. A: Perfil de control de pH y TOD. B: Curva de crecimiento y producción de GFP. C: concentración de glucosa y metabolitos de fermentación. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos.

La velocidad específica de crecimiento disminuyó en un 30 % respecto a cultivos a TOD constante, mientras que la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) se triplicó. Además, las concentraciones máximas de acetato, formato, succinato, lactato, y etanol se incrementaron en promedio 2, 2.15, 21, 53 y 1.8 veces, respectivamente, comparadas con los cultivos a TOD constante (fig. 3.7). Este comportamiento es evidencia de que las células desviaron su metabolismo de respiración aerobia a la fermentación ácido-mixta, en respuesta a condiciones anaerobias

intermitentes tan cortas como 33 s, con la consecuente reducción en la eficiencia de generación de energía (Cronan y Laporte, 1996).

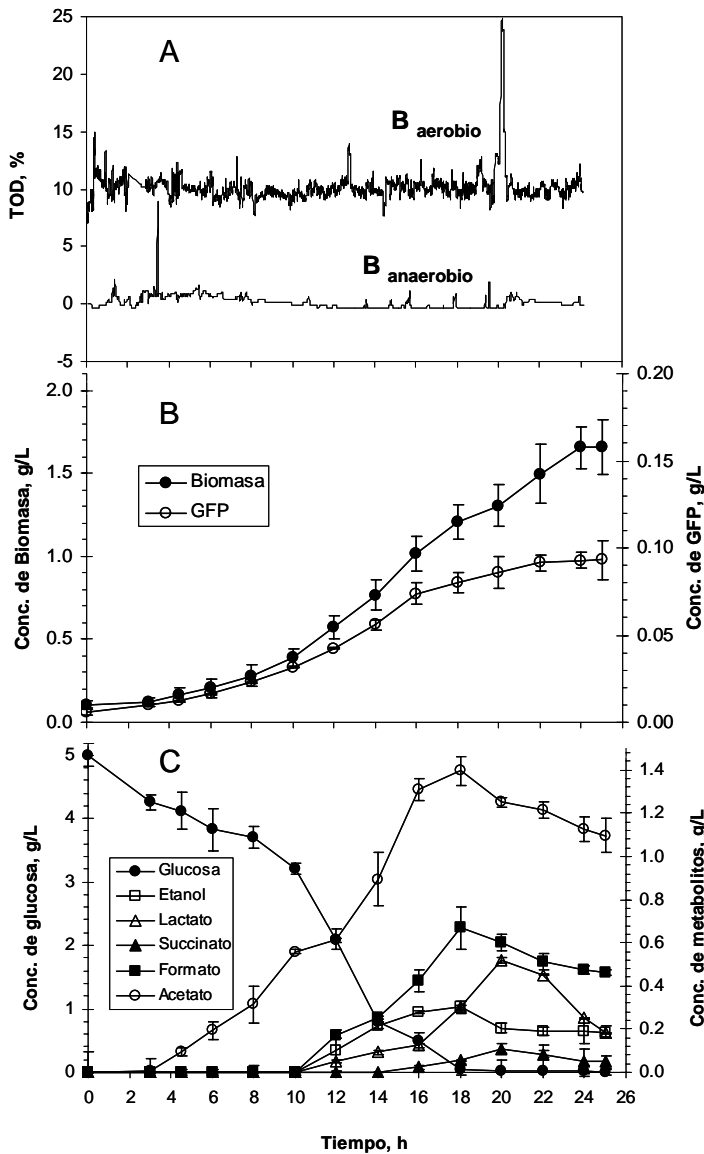


Figura 3.8. Perfil cinético de cultivos de *E. coli* W3110 bajo condiciones oscilantes de TOD en el sistema de escalamiento descendente. A: Perfil de control de TOD en ambos compartimentos. B: Curva de crecimiento y producción de GFP. C: concentración de glucosa y metabolitos de fermentación. Las barras de error corresponden a la diferencia entre dos cultivos.

Las concentraciones de metabolitos de fermentación producidos para mantener el balance redox durante el crecimiento bajo condiciones anaerobias transitorias, declinaron cuando la concentración de glucosa cayó a valores cercanos a 0.15 g/L.

La concentración máxima de GFP producida se redujo en 17% en los cultivos oscilados comparada con los cultivos control (fig. 3.8 C). Esto concuerda con reportes anteriores (Namdev et al., 1993; Sandoval-Basurto et al. 2005), en los que se observó una reducción en la producción de proteína recombinante y en la estabilidad del plásmido en cultivos de *E. coli* sometidos a condiciones de TOD

fluctuantes. En el primer estudio, la inducción del gene recombinante se encontraba bajo control del promotor del operón *trp*, por lo que pudo ocurrir un retraso en la inducción debido a un consumo de triptofano más lento y ello ser una causa de la reducción de la proteína recombinante reportada. En el presente estudio las condiciones de inducción (concentración de IPTG y tiempo de inducción) fueron constantes en los cultivos control y oscilados. En consecuencia, la pérdida en producción de proteína recombinante observada fue un efecto directo de los gradientes de TOD simulados. La limitación de oxígeno reprime al CAT, lo que lleva a un estado energético desfavorable y a una reducción en la producción de aminoácidos como isoleucina, valina, y leucina (Konz et al., 1998). Además, se ha reportado (Salmon et al., 2003) que bajo condiciones anaerobias se reprime la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos como *trpB* y *pheA* en *E. coli*. Esto también puede reducir la capacidad biosintética de la célula, repercutiendo directamente en la productividad de proteína recombinante como se observó en los cultivos oscilados. Sin embargo, no se pueden extraer conclusiones generales al respecto, ya que existen ejemplos de una mayor producción y calidad de proteína recombinante en cultivos bajo condiciones limitantes u oscilantes de TOD (Bylund et al., 2000; De León et al., 2003), lo que se contrapone a una capacidad biosintética reducida. Un acercamiento más profundo para comprender los mecanismos que limitan la producción de proteína recombinante en el sistema de escalamiento descendente puede lograrse mediante el análisis transcripcional, que se discute en las siguientes secciones.

3.1.2.3 Respuesta transcripcional de *E. coli* recombinante a gradientes de TOD.

Para el propósito del presente estudio, se seleccionaron 21 genes cuya transcripción fue analizada mediante qRT-PCR. Los genes seleccionados incluyen aquellos relacionados a ramas del metabolismo directamente afectadas por disponibilidad de oxígeno y cuya inducción afecta el desempeño del bioproceso, como el metabolismo fermentativo y genes del CAT. En la fig. 1.3 se muestran las reacciones en que dichos genes están involucrados. Se seleccionaron además otros genes que se consideraron importantes para evaluar la fisiología de *E. coli*, como lo es una superóxido dismutasa anaerobia (*sodA*), dos de los más importantes citocromos (*cydA* y *cyoB*), reguladores globales del metabolismo aerobio/anaerobio (*fnr*, *arcA*, and *arcB*), una sintasa señal del sistema de respuesta poblacional denominado *quorum sensing* (*luxS*), y el gene heterólogo responsable de la producción de GFP (*gfp*).

Los niveles de transcripción relativos se muestran en las figs. 3.9 a 3.12. Particularmente, se observó una diferencia importante en los niveles de transcripción de genes del CAT y fermentación ácido-mixta entre las muestras tomadas en los compartimentos aerobio y anaerobio del sistema de escalamiento descendente (figs. 3.9-3.10). Esto demuestra que el tiempo de exposición a condiciones anaerobias fue lo suficientemente largo para inducir respuestas transcripcionales, pero no lo suficientemente largo como para completar la transcripción de los genes mostrados. Como se puede ver en la tabla 3.2, el tiempo calculado para la transcripción de una cadena de mARN de varios genes de fermentación ácido-mixta, es mayor que el tiempo promedio de residencia de las células en $B_{\text{anaerobio}}$ (33 s) (con excepción de *frdD* y *ldhA*, que son genes más cortos). De acuerdo a esto, la mayoría de los productos de transcripción se detectan por la técnica de PCR hasta que las células han pasado al compartimiento aerobio, y es entonces posible detectarlos por la técnica del PCR. En el sistema de escalamiento descendente, las células son continuamente recirculadas al $B_{\text{anaerobio}}$ después de un tiempo de residencia de 17 s en el B_{aerobio} . Por lo tanto, la diferencia en niveles de transcripción entre compartimentos, también implica que se lleva a cabo una muy eficiente, rápida y selectiva degradación de cadenas de mARN bajo condiciones oscilantes de TOD para la mayoría de los genes de fermentación ácido-mixta y del CAT. Estas consideraciones son consistentes con estudios recientes que han demostrado que las bacterias pueden adaptarse a cambios en el ambiente de crecimiento por una degradación controlada y rápida del mARN (Kushner, 2002; Takamaya y Kjelleberg, 2000; Wang et al., 2004). Particularmente, se ha encontrado que el oxígeno es importante en la regulación de las moléculas de mARN. Por ejemplo, se ha observado (Georgellis et al., 1993) que la anaerobiosis produce una reducción general en las tasas de degradación de las moléculas de mARN estudiadas, en comparación con condiciones aerobias. La degradación selectiva de mARN es también una estrategia para reducir el desperdicio de energía y evitar la síntesis de proteínas que no serán utilizadas bajo las condiciones de crecimiento prevalecientes en ese momento.

Es interesante observar que genes como *gfp*, *cyoB*, *cydA*, *luxS*, *sodA* y reguladores globales (fig. 3.12), no tuvieron una diferencia en sus niveles de transcripción entre los compartimentos del SED. Esto sugiere que bajo condiciones fluctuantes de TOD, una rápida inducción de genes y una alta tasa de degradación de las cadenas de mRNA ocurren solo para los genes de mayor impacto inmediato en el metabolismo, por ejemplo, los que redireccionan los flujos de carbono y alteran la eficiencia energética, como las vías de fermentación ácido-mixta y CAT. En las siguientes secciones, los niveles relativos de transcripción son discutidos en detalle.

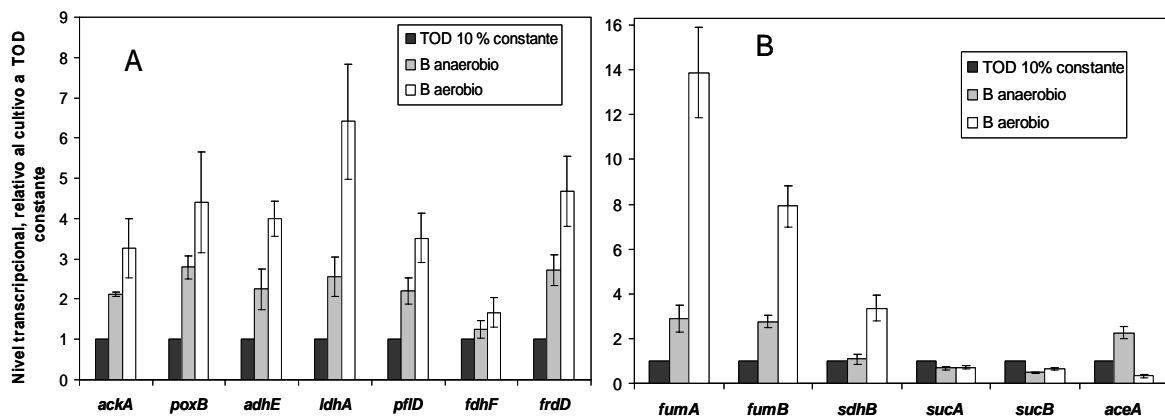


Figura 3.9. Niveles de transcripción de genes de fermentación ácido-mixta (A) y CAT (B) en ambos compartimentos del sistema de escalamiento descendente, relativos a los cultivos aerobios a TOD constante.

Tabla 3.2. Tiempo calculado necesario para la síntesis de una molécula de mRNA de genes de fermentación ácido mixta y CAT*.

Gene	Longitud del gene (pb)	Tiempo de transcripción (s)
<i>aceA</i>	1304	35.2
<i>ackA</i>	1202	32.5
<i>adhE</i>	2675	72.3
<i>fdhF</i>	2147	58.0
<i>frdD</i>	359	9.7
<i>fumA</i>	1646	44.5
<i>fumB</i>	1646	44.5
<i>ldhA</i>	991	26.8
<i>pflD</i>	2297	62.1
<i>poxB</i>	1718	46.4

* No se consideró el tiempo necesario para la inducción. Los valores fueron calculados a partir de las longitudes de los genes y las velocidades de elongación en función de la velocidad específica de crecimiento dados (Bremer y Denis, 1996). Se consideró sólo una polimerasa por gene.

Genes de fermentación ácido-mixta.

Se observó un incremento generalizado en los niveles de transcripción de los genes de fermentación ácido-mixta en ambos compartimentos del sistema de escalamiento descendente, comparados con los cultivos a TOD constante (fig. 3.9). Estos resultados concuerdan con el incremento en los productos de las ramas de metabolismo anaerobio (fig. 3.8). Cuando *E. coli* creciendo bajo condiciones aerobias es llevada a condiciones anaerobias, la piruvato deshidrogenasa es rápidamente inactivada por la acumulación de NADH, debido a la supresión de la respiración aerobia. El piruvato es entonces canalizado a lactato, mediante la lactato deshidrogenasa (LDH) o a acetil-CoA y formato, mediante la piruvato-formato liasa (codificada por *pfl*). De los tres tipos de LDH presentes en *E. coli*, la única involucrada en fermentación es codificada por el gene *ldhA*. *ldhA* es uno de los genes de fermentación más cortos (991 nucleótidos), no está bajo control transcripcional de FNR, y está presente bajo condiciones aerobias y anaerobias (Linch and Lin, 1996). En consecuencia, *ldhA* puede ser uno de los primeros genes de fermentación en ser transcritos. Esto explica que *ldhA* tuviera uno de los niveles de transcripción más altos (6.4 en B_{aerobio} , fig. 3.9). En comparación, los niveles relativos de transcripción de *pfl* (3.5 y 2.2 en B_{aerobio} y $B_{\text{anaerobio}}$, respectivamente, fig. 3.9) fueron alrededor de la mitad del de *ldhA*. Sin embargo, la concentración máxima de formato fue 1.5 veces mayor que la de lactato en cultivos a TOD oscilante. Este resultado podría explicarse por las diferentes afinidades de las enzimas por el piruvato (2 mM para PFL y 7.2 mM para LDH) (Yang, 1999). Debe tomarse en cuenta también que *E. coli* sintetiza productos de fermentación en una fina selección para mantener el balance redox, y los niveles de transcripción de genes no necesariamente corresponden con la cantidad de metabolitos sintetizados. El formato puede ser transformado en hidrógeno y CO₂ por el complejo enzimático FHL-FDH. Estos productos siguen diferentes destinos y su generación es importante para el balance redox celular (Clark, 1989). La formato deshidrogenasa (FDH) está asociada con un seleniopéptido de 80-kDa codificado por el gene *fdhF* gene, el cuál presentó un incremento en su nivel de transcripción de 1.7 en B_{aerobio} durante cultivos a TOD oscilante (fig. 3.9).

El acetato fue el principal producto de fermentación acumulado en los cultivos a TOD constante u oscilante. Los niveles transcripcionales de *poxB* y *ackA* fueron muy similares y se vieron incrementados más de 3.3 veces en el B_{aerobio} bajo condiciones oscilantes de TOD (fig. 3.9). Ambos genes codifican enzimas que producen acetato a partir de diferentes sustratos.

Como se muestra en la fig. 1.3, el acetato es producido a partir de piruvato o de acetil-CoA, lo que sugiere en parte la importante acumulación de este metabolito bajo condiciones heterogéneas de TOD, que también ha sido observada por otros autores (Bylund et al., 1999; Enfors et al., 2001; Sandoval-Basurto et al., 2005; Xu et al., 1999). La producción de acetato a partir de acetil-CoA es importante en condiciones anaerobias, ya que se genera 1 mol de ATP por mol de acetato producido, lo cual es significativo, ya que solamente 2 moles de ATP se producen a partir de glucosa (en la glicólisis) en dichas condiciones. Se ha reportado (Schweder et al., 1999) que *E. coli* sobre expresa *ackA* a más del doble cuando permanece por 54 s en condiciones de limitación de oxígeno. Dichos datos concuerdan con lo obtenido en nuestro sistema de escalamiento descendente, ya que encontramos un nivel de transcripción de 2.12 en el $B_{\text{anaerobio}}$ y de 3.25 en el B_{aerobio} (fig. 3.9). Durante la oxidación del piruvato a acetato por la piruvato oxidasa (PoxB), hay un desperdicio de energía en comparación con la conversión a acetato a partir de acetil Co-A.

Se ha sugerido que bajo condiciones microaerobias, la piruvato oxidasa (PoxB) puede jugar un papel importante en proveer energía para el catabolismo del piruvato (Chang et al., 1994). Consistente con esta sugerencia, se ha demostrado que la expresión de *poxB* es máxima en la fase estacionaria temprana, y que es estrictamente dependiente del factor RpoS (Chang et al., 1994), el cuál está involucrado en la respuesta de choque térmico y otras respuestas de estrés global. Esto puede explicar el incremento observado en la transcripción de *poxB* (fig. 3.9).

Un destino alternativo para la acetil Co-A durante el metabolismo fermentativo es la conversión a etanol en dos pasos catalizados por la alcohol deshidrogenasa (codificada por *adhE*), la cual es una de las enzimas mayor tamaño producidas por *E. coli* (Clark, 1989). La producción de etanol y lactato es importante durante condiciones anaerobias, ya que son las únicas vías para regenerar el NAD^+ consumido en la glicólisis y con ello mantener el balance redox. Como se mencionó antes, se observó un incremento de 1.8 veces en la cantidad máxima de etanol producida bajo condiciones oscilantes de TOD, respecto a cultivos completamente aerobios. En concordancia con ello, los niveles transcripcionales de *adhE* incrementaron 2.3 y 4 veces en $B_{\text{anaerobio}}$ y B_{aerobio} , respectivamente.

E. coli puede emplear al fumarato como aceptor terminal de electrones y preferiblemente cataliza la reacción para reducir fumarato a succinato como parte de reacciones reversas en el CAT, que operan bajo condiciones limitantes de oxígeno disuelto (se discute más adelante). La regulación anaerobia del operón *frdABCD* está mediada por FNR. En este trabajo, se evaluó el nivel de transcripción de

frdD, gene que codifica para la fumarato reductasa (FrdD), la cuál es responsable de la transferencia de electrones de las quinonas a FrdB. Se encontró un incremento de 2.7 veces en el nivel de transcripción de *frdD* en el compartimiento anaerobio, y de 4.7 veces en el compartimiento aerobio, comparado a condiciones de TOD constante (fig. 3.9). Esto es consistente con los reportado por otros autores (Schweder et al., 1999), quienes reportaron un incremento del doble en la expresión de *frd* (no se informó la subunidad analizada) en *E. coli* luego de 54 s de exposición a condiciones anaerobias.

Genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El CAT es esencial en el metabolismo central de carbono de *E. coli*, ya que es responsable de la oxidación de la acetil Co-A, y sus intermediarios son requeridos para la síntesis de aminoácidos. Los niveles de expresión del CAT responden principalmente a la disponibilidad de oxígeno (Cronan y Laporte, 1996). Bajo condiciones anaerobias, el CAT funciona como dos ramas biosintéticas: una rama reductiva que produce succinil Co-A y una rama oxidativa que produce 2-cetoglutarato (fig. 1.2). Estas dos ramas no forman un ciclo debido a que la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (codificada por *sucA* y *sucB*) está virtualmente ausente durante el crecimiento anaerobio (Cronan y Laporte, 1996). Como se muestra en la fig. 3.9, *sucA* y *sucB* tuvieron una reducción en su nivel de transcripción del 30% en ambos compartimentos del sistema de escalamiento descendente, comparados con condiciones aerobias, lo que sugiere la actividad del CAT como dos ramas separadas. Durante el crecimiento anaerobio, *frdD* reemplaza a la succinato deshidrogenasa (codificada por *sdhB*) para permitir la producción reductiva de succinil Co-A. Como se mencionó previamente, se observó un importante incremento en el nivel transcripcional de *frdD* bajo condiciones oscilantes de TOD (fig. 3.9). Las fumarasas también son reguladas por disponibilidad de oxígeno (Tseng et al., 2001). En el CAT completo, la fumarasa A (codificada por *fumA*) cataliza la formación de malato a partir de fumarato, mientras que en el CAT abierto, la fumarasa B cataliza la reacción exactamente inversa. En este caso, el malato es utilizado como un aceptor anaerobio de electrones (Cronan and Laporte, 1996). Los niveles relativos de expresión de *fumA* y *fumB* (calculados con el método de $2^{-\Delta\Delta N_T}$) durante los cultivos a TOD oscilante se incrementaron 13.9 y 7.9 veces, respectivamente (en B_{aerobio}), comparados con sus niveles aerobios (fig. 3.9). Al normalizar los niveles de transcripción de *fumA* y *fumB* respecto al nivel de transcripción del gene *ihfB*, el cual fue constante en todas las condiciones estudiadas (datos no mostrados), se pueden obtener sus niveles de transcripción (calculados mediante el método de $2^{-\Delta N_T}$) bajo la misma condición. Al ejecutar dicha

normalización, puede observarse que *fumB* fue transcrita preferentemente sobre *fumA* en las células cultivadas bajo condiciones oscilantes de TOD (fig. 3.10).

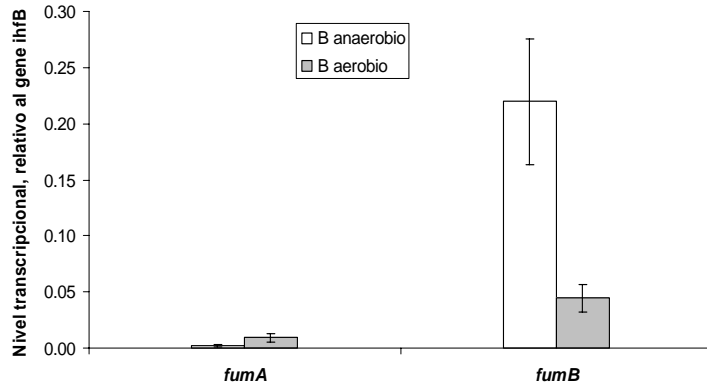


Figura 3.10. Nivel de transcripción de las fumarasas aerobia y anaerobia, relativo al gene *ihfB*, en el sistema de escalamiento descendente.

Como se muestra en la figura 3.9, el nivel transcripcional de *aceA* (que codifica para la enzima isocitrato liasa en la rama del glioxilato) se incrementó a más del doble en el $B_{\text{anaerobio}}$. La rama del glioxilato es inducida cuando *E. coli* crece consumiendo acetato o ácidos grasos (Clark and Cronan, 1996). Además, se ha relacionado la expresión de *aceA* con condiciones de hambruna o estrés (Flores et al., 2005). De acuerdo con ello, el incremento en transcripción de *aceA* en $B_{\text{anaerobio}}$ puede indicar que las células están generando una respuesta al estrés, y/o que se activa la reasimilación de acetato como fuente de carbono a pesar de la disponibilidad de glucosa, o bien, la activación de la rama del glioxilato como una vía anaplerótica que surta de intermediarios al CAT para la producción de aminoácidos.

Genes que codifican para citocromos.

E. coli posee dos importantes oxidasas respiratorias: el citocromo *bd* y el citocromo *bo₃*, que no están relacionados estructuralmente y tienen funciones fisiológicas diferentes (Gennis and Stewart, 1996). El citocromo de baja afinidad al oxígeno (citocromo o oxidasa, codificado por *cyoB*) predomina bajo condiciones de crecimiento completamente aerobias, mientras que el citocromo de alta afinidad al oxígeno (citocromo d oxidasa, codificado por *cydA*) prevalece bajo condiciones de limitación por oxígeno (Poole and Ingledew, 1987). Consistente con estas propiedades, la transcripción del operón *cydAB* es activada cuando el oxígeno es limitante. Bajo condiciones completamente anaerobias, la transcripción de *cydAB* es subsecuentemente reprimida a un nivel intermedio entre condiciones de microaerobiosis y aerobiosis. Este control es mediado por las proteínas ArcA y FNR (Gennis and Stewart, 1996). La expresión de *cydAB* alcanza su máximo a valores de TOD de aproximadamente

2 % (Tseng et al., 1996). La pregunta que se planteó para el presente proyecto, es si *E. coli* emplea diferentes citocromos selectivamente en diferentes zonas de un biorreactor de gran escala (aquellas limitadas por oxígeno y aquellas completamente aerobias) como una estrategia de adaptación rápida. En la fig. 3.11 se muestran los resultados. El citocromo d oxidasa (codificado por *cydA*) fue preferido sobre el citocromo o oxidasa (codificado por *cyoB*) bajo condiciones oscilantes de TOD. Esto significa que durante condiciones anaerobias transitorias, *E. coli* usa un citocromo menos eficiente en generación de energía, pero con mayor afinidad por el oxígeno. Si se analiza la expresión de los genes de citocromos relativa al gene *ihfB* (mediante el método mencionado arriba), se puede ver que el nivel de transcripción de *cydA* prácticamente no cambió en el sistema de escalamiento descendente, comparado con el cultivo aerobio (fig. 3.11). Para afirmar con certeza que no hay cambio en el nivel transcripcional de dicho gene, sería necesario realizar una prueba estadística con un mayor número de datos. En contraste, el gene *cyoB* sí mostró un decremento importante en su nivel transcripcional en los cultivos a TOD oscilante. De acuerdo con esto, podemos afirmar que *E. coli* aparentemente adapta su cadena respiratoria a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto en biorreactores de gran escala mediante la represión del gene *cyoB*.

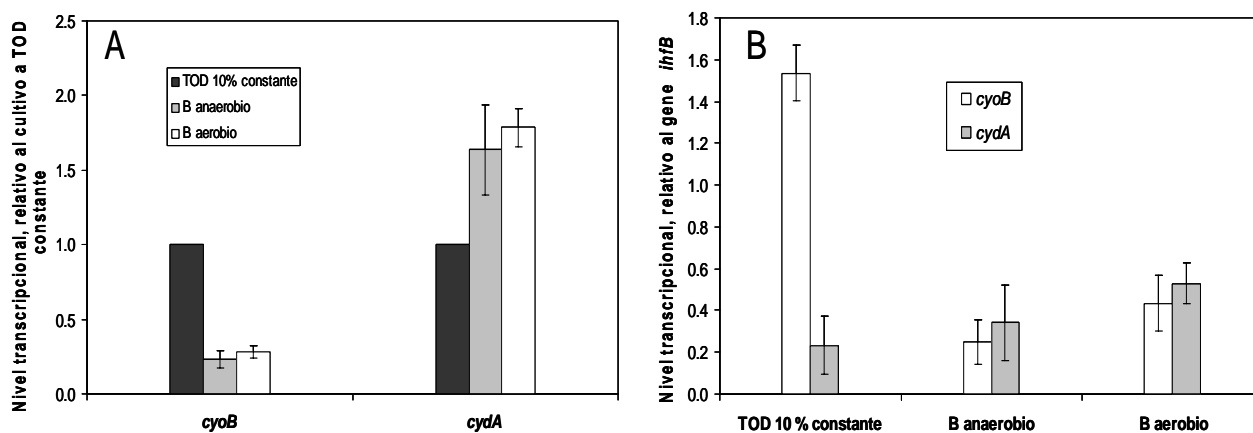


Figura 3.11. Nivel de transcripción de citocromos, relativo al cultivo a TOD constante (A) y respecto al gene *ihfB* (B) en cada compartimiento del sistema de escalamiento descendente.

Se ha reportado anteriormente (Yoon et al., 2003) que durante la fase estacionaria de cultivos alimentados con una TOD controlada por encima de 30 %, *cydA* fue sobre expresado y *cyoB* fue reprimido. Ellos relacionaron dicho cambio con una represión del CAT y a una severa competencia

por el oxígeno a altas densidades celulares. Una conclusión similar puede proponerse para nuestros cultivos sometidos a cambios transitorios entre aerobiosis y anaerobiosis.

Genes de reguladores globales de metabolismo aerobio/anaerobio

Los genes que codifican para los reguladores globales de metabolismo aerobio (ArcAB) y anaerobio (FNR) de *E. coli* también fueron evaluados en el presente estudio, y sus niveles transcripcionales se muestran en la fig. 3.12. No se encontraron diferencias entre los compartimentos del sistema de escalamiento descendente para *arcA*, *arcB*, y *fnr*. Sin embargo, *arcB* (que codifica para la enzima señal de membrana autofosforilante que detecta la disponibilidad de oxígeno) y *fnr* (que codifica para la proteína FNR, el principal regulador de respiración aerobia) mostró un ligero descenso en su nivel de transcripción, comparado con cultivos aerobios. Para *arcB* la reducción fue de entre $24.1\% \pm 13.9\%$ y $47.1\% \pm 14.6\%$ para el $B_{\text{anaerobio}}$ y B_{aerobio} , respectivamente, mientras que para *fnr* la reducción fue entre $41.1\% \pm 1.0\%$ y $35.0\% \pm 13.8\%$ para $B_{\text{anaerobio}}$ y B_{aerobio} , respectivamente. En contraste, *arcA*, que codifica para una proteína citoplasmática que se une al DNA para controlar el metabolismo aerobio, presentó un ligero incremento en su nivel de transcripción de entre $54.1\% \pm 5.5\%$ y $60.2\% \pm 40.1\%$ para $B_{\text{anaerobio}}$ y B_{aerobio} , respectivamente.

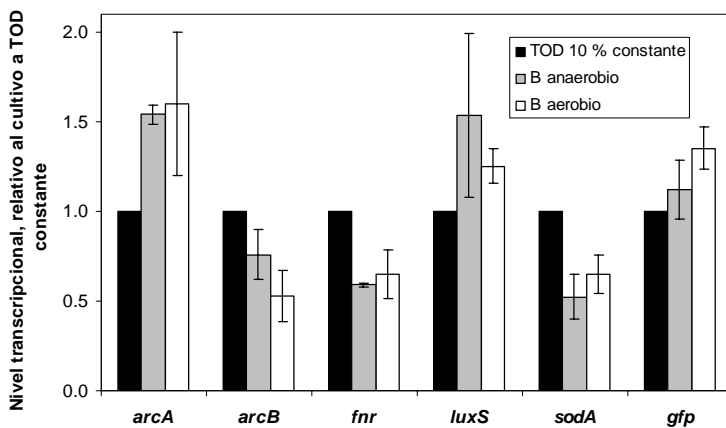


Figura 3.12. Niveles de transcripción de reguladores globales de metabolismo aerobio/anaerobio, *luxS*, *sodA* y *gfp*, en cultivos a TOD oscilantes, relativos al cultivo a TOD constante.

Debe hacerse notar en este punto que los valores determinados por duplicado mediante qRT-PCR pueden diferir en un 30 % (Flores et al., 2005). Por lo tanto, diferencias entre niveles de expresión de alrededor de 30 % deben tomarse con precaución, ya que se encuentran dentro de los límites de error de la técnica, y necesita una prueba estadística con más datos para afirmar con seguridad que no hay cambio en el nivel de transcripción de los genes mencionados. Ya que los reguladores globales usualmente tienen un nivel de expresión constante en *E. coli*, podrían esperarse niveles de expresión

iguales de *arcA*, *arcB*, y *fnr* en los compartimentos y el control. Esta fue la tendencia general observada, ya que sólo diferencias ligeramente por encima del error experimental fueron encontradas para estos genes (fig. 3.12).

Quorum sensing, sodA y gene heterólogo.

El gene heterólogo, *gfp*, presentó una ligera variación en su nivel transcripcional en ambos compartimentos del sistema de escalamiento descendente y entre cultivos oscilados y completamente aerobios (fig. 3.12). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se observó una importante caída en la producción de GFP en los cultivos oscilados. Dichos resultados indican que, aunque no hay un efecto directo de los gradientes de TOD a nivel transcripcional, hubo un efecto portranscripcional importante. La evidencia de que eventos post-transcripcionales limitan la producción de proteína recombinante en el sistema de escalamiento descendente es fundamental para explorar el diseño de mejores modos de operación en la gran escala, donde los gradientes de TOD son inevitables. El hecho de que el CAT funcione en dos ramas separadas puede causar limitación de aminoácidos que a su vez resultan en una disminución de la producción de proteína recombinante. Este problema podría ser superado por ejemplo, mediante una estrategia adecuada de adición de aminoácidos.

La respuesta tipo *quorum sensing* permite la señalización entre bacterias para desatar respuestas sincronizadas a nivel poblacional. El *quorum sensing* en *E. coli* es promovido por la producción, liberación y respuesta a un factor intracelular llamado autoinductor-2 (AI-2) (Huisman and Colter, 1994), sintetizado por la AI-2 sintasa, codificada por *luxS*. Se ha demostrado (De Lisa et al., 2001), que la sobre expresión de genes heterólogos resulta en la atenuación de la señal de AI-2, y que la producción de AI-2 está regulada por las condiciones de crecimiento, como el pH, la TOD y la osmolalidad del medio. Aunque los mecanismos exactos del *quorum sensing* en *E. coli* no están completamente claros a la fecha, se ha sugerido (De Lisa et al., 2001) que la expresión del gene de *quorum sensing* puede jugar un papel central en la fisiología celular. Como se observa en la fig. 3.12, *luxS* presentó un pequeño incremento en su nivel de transcripción en los cultivos oscilados, aunque los resultados están muy cercanos error experimental de la qRT-PCR. Esto quiere decir que las células no están incrementando, al menos a nivel transcripcional, la comunicación intercelular mediada por AI-2 durante condiciones de TOD oscilante.

E. coli sintetiza dos diferentes superóxido dismutasas (SOD), una conteniendo fierro (codificada por *sodB*) y la otra conteniendo manganeso (codificada por *sodA*). La SOD-Mn sólo está presente bajo condiciones aerobias (Touati, 1988). De acuerdo con esto, los resultados mostrados en la fig. 3.12 indican que bajo condiciones oscilantes de TOD, el tiempo de exposición de las células a anaerobiosis no induce una respuesta importante en la represión transcripcional de *sodA*.

3.1.2.4 Conclusiones parciales.

Hasta donde se sabe, este es el primer estudio de escalamiento descendente que presenta de manera conjunta datos de procesos moleculares (transcripción) e información macroscópica (parámetros cinéticos y estequiométricos, formación de subproductos, etc.) para un sistema de expresión recombinante. Los resultados mostrados aquí explican lo que ocurre a una cepa recombinante de *E. coli* bajo condiciones típicas de la gran escala, ya que el t_c simulado en este trabajo representa adecuadamente el ambiente presente en biorreactores industriales. Durante los cultivos a TOD oscilante, todos los productos de fermentación ácido-mixta fueron producidos. Dicho comportamiento correlaciona adecuadamente con los patrones transcripcionales. Basado en los niveles transcripcionales de *frdD*, *sucA*, *sucB*, *fumA* y *fumB*, se puede concluir que bajo las condiciones oscilantes de TOD que pueden prevalecer en biorreactores de gran escala, *E. coli* emplea preferentemente el CAT como dos ramas separadas. Ello, aunado con los niveles de expresión de citocromos, indica que la fisiología de *E. coli* ante exposiciones periódicas a anoxia presenta un estado intermedio entre metabolismo anaerobio y aerobio.

Las diferencias en niveles de transcripción entre compartimentos del SED implican que la respuesta y adaptación a un ambiente oscilante fueron muy rápidas, y que posiblemente estén reguladas por procesos de degradación rápida y selectiva del mRNA. El nivel transcripcional del gene heterólogo *gfp* no cambió en los cultivos oscilados, indicando que limitaciones post-transcripcionales y no eventos transcripcionales son los responsables de la caída en producción de proteína recombinante. En conjunto, los datos mostrados aquí demuestran que el metabolismo central de carbono es fuertemente afectado a nivel transcripcional y de producción de metabolitos de fermentación ácido-mixta cuando *E. coli* es sometida a cambios cíclicos en la TOD. Estos resultados son importantes para establecer criterios racionales de escalamiento ascendente y para mejorar las estrategias de operación de biorreactores, así como para el diseño de cepas con un mejor desempeño ante condiciones industriales. Este último punto será abordado en el siguiente capítulo.

3.2 Estrategias moleculares para contender con gradientes ambientales.

En esta sección, se describen los resultados obtenidos al construir y emplear cepas diseñadas para contender con gradientes espaciales de oxígeno disuelto, y cepas con un reducido sobreflujo metabólico.

3.2.1 Diseño de cepas de *E. coli* con un mejor desempeño ante condiciones anaerobias intermitentes.

En el capítulo anterior, se mostró que bajo condiciones oscilantes de TOD, *E. coli* induce rápidamente la expresión de genes de rutas fermentativas. Entre ellos, los genes *poxB*, *ldhA* y *pflD* fueron algunos de los más sobre expresados. Consistentemente, el acetato, formato y lactato, fueron los ácidos orgánicos que mostraron mayores niveles de acumulación. Estos ácidos orgánicos también fueron los más producidos ante pulsos aerobios y anaerobios de glucosa, como se mostró en un capítulo anterior. Aunque el acetato es producido principalmente por la acción de las enzimas AckA y Pta, bajo condiciones aerobias y anaerobias (Díaz-Ricci et al., 1991; Dittrich et al., 2005a, b), dichas vías no fueron eliminadas en el presente trabajo, ya que ha sido demostrado previamente que su inactivación conduce a la excreción de piruvato y una considerable reducción en la velocidad específica de crecimiento (Bauer et al., 1990; Díaz-Ricci et al., 1991). El papel principal de la vía AckA-Pta es producir acetato bajo condiciones de exceso de glucosa, generando 1 mol de ATP por mol de piruvato consumida. La inactivación de *ackA* y *pta* en estas condiciones de cultivo es detrimental para la célula por que el acetyl-CoA puede acumularse y saturar el CAT, con la consecuente reducción en velocidad de crecimiento (Dittrich et al., 2005a, b; Wolf, 2005). En una menor proporción, PoxB también contribuye a la producción de acetato bajo condiciones anaerobias a través de la descarboxilación de piruvato (Abdel-Hamid et al., 2001; Flores et al., 2004). Sin embargo en contraste con mutantes *ackA*⁻ y *pta*⁻, el carbono es incorporado más eficientemente en biomasa por mutantes *poxB*⁻, y sólo se ha observado una pequeña disminución en velocidad de crecimiento en estas cepas (Abdel-Hamid et al., 2001; Flores et al., 2004; Ponce, 1999; Vemuri et al., 2005). De hecho, se ha reportado (Causey et al., 2004) el efecto benéfico de una mutación *poxB*⁻ en la producción de piruvato y crecimiento celular. Debe recalarse que *poxB* es un gene que no sólo es inducido en fase estacionaria. De hecho, se sabe que juega un papel importante en al menos dos tipos de estreses: limitación de carbono o nutrientes y estrés oxidativo (Flores et al., 2004; King y Ferenci,

2005). Por otra parte, en el capítulo anterior de esta tesis se ha descrito el papel de los genes *pfl* y *ldhA* en la fisiología de *E. coli*. Estos genes no son esenciales para metabolismo aerobio de dicha bacteria. Por lo tanto, el objetivo primordial en el presente estudio fue diseñar cepas mutantes capaces de reducir o eliminar la producción de acetato, formato y lactato bajo condiciones oscilantes de oxígeno disuelto. Esto fue llevado a cabo eliminando las reacciones catalizadas por los productos de los genes *pflB*, *ldhA* y *poxB*. En la fig. 3.13 se muestra una red metabólica simplificada mostrando los genes involucrados en las mutaciones al nivel del nodo del piruvato. A lo largo de este capítulo se seguirá la nomenclatura descrita en Material y Métodos para denominar las cepas mutantes: VAL22 (*poxB*⁻), VAL23 (*ldhA*⁻, *pflB*⁻) y VAL24 (*ldhA*⁻, *pflB*⁻, *poxB*⁻).

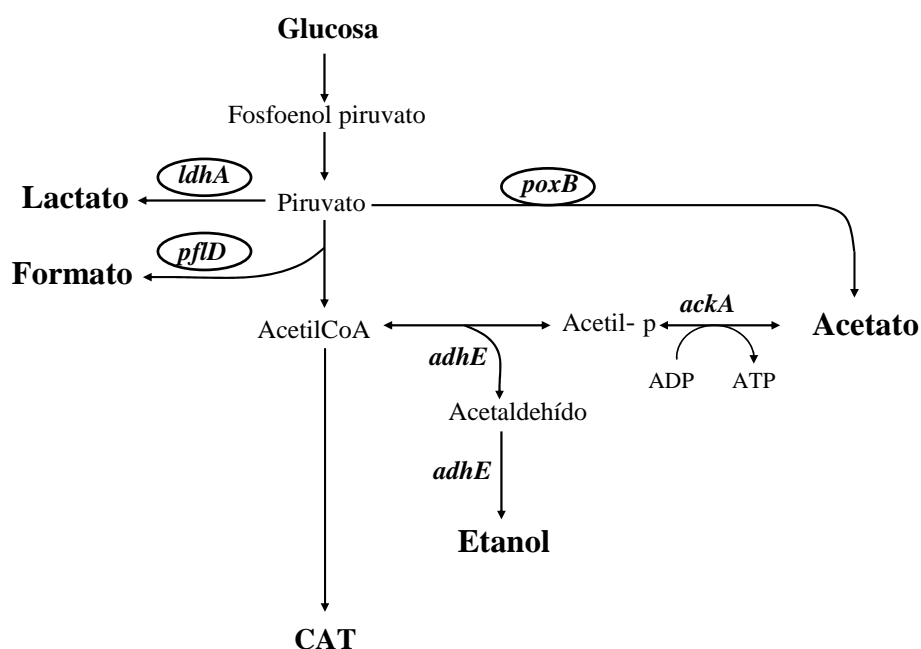


Figura 3.13. Reacciones donde el piruvato participa al nivel de glicólisis y fermentación ácido-mixta. Los genes que fueron inactivados en este trabajo se muestran en óvalos.

3.2.1.1 Cultivos de las diferentes cepas de *E. coli* bajo condiciones constantes y oscilantes de oxígeno disuelto.

Para caracterizar el comportamiento de las diferentes cepas de *E. coli* bajo condiciones aerobias constantes, se ejecutó un primer grupo de cultivos a una TOD de 10% y pH de 7.1. Un segundo grupo de cultivos fue llevado a cabo en el SED, con la finalidad de simular gradientes de oxígeno disuelto con un t_c de 50 s. En los cultivos bajo gradientes de oxígeno disuelto, se mantuvo un gradiente de al menos 9 % de TOD a lo largo de los cultivos. El pH también fue adecuadamente

controlado en los cultivos oscilados. Las cinéticas típicas de crecimiento y producción de GFP bajo condiciones de TOD constante y oscilante, para todas las cepas, se muestran en la fig. 3.14.

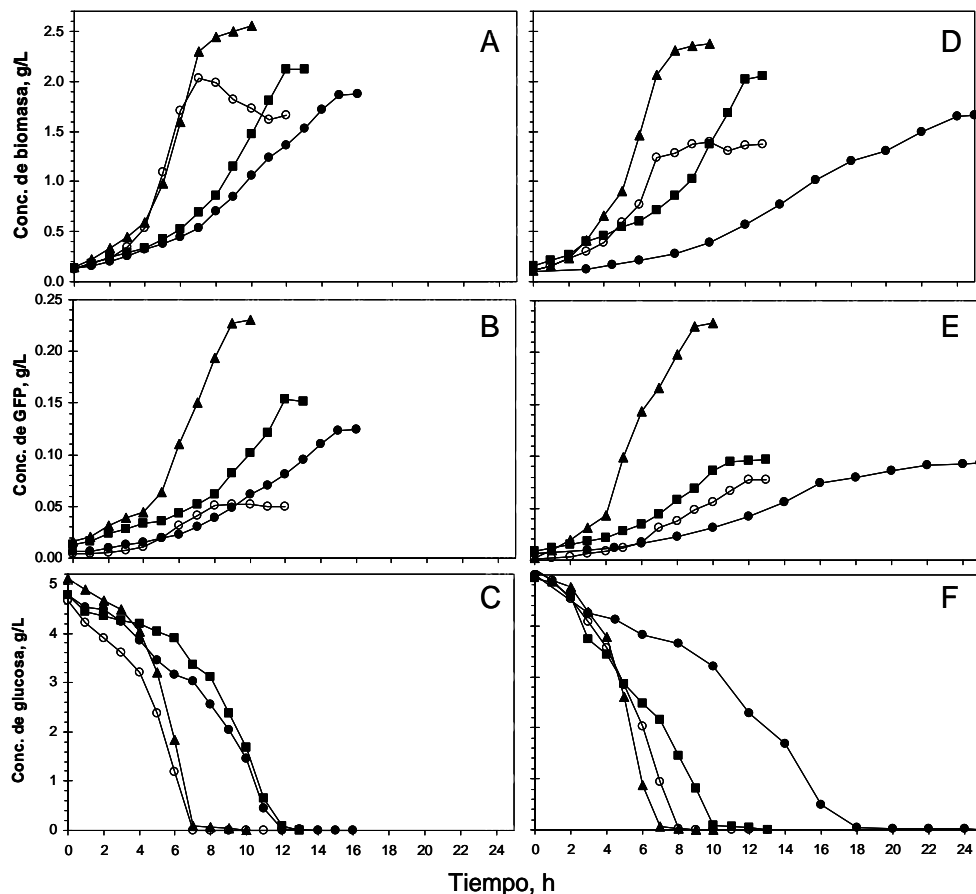


Figura 3.14. Comportamiento cinético típico de las cepas recombinantes de *E. coli* a TOD constante (paneles A, B y C) oscilante (paneles D, E y F). Círculos rellenos: W3110; círculos vacíos: VAL22; cuadrados: VAL23, triángulos: VAL24. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos. Se han omitido las barras de error para mayor claridad en la figura.

Se ilustran valores promedio, y se han omitido las barras de error para una mayor claridad en la figura. Las variaciones entre dos cultivos fueron de alrededor del 10%. Como se esperaba, la GFP fue producida desde el inicio del cultivo de todas las cepas, ya que el inductor (IPTG) fue adicionado desde la inoculación. Comparados con la cepa W3110, los valores máximos de concentración de biomasa y GFP bajo condiciones constantes de TOD fueron alcanzados cerca de 3, 6 y 8 h antes en cultivos de VAL23, VAL24 y VAL22, respectivamente (fig. 3.14 A, B). Ambas cepas *poxB*⁻ crecieron a velocidades similares durante las primeras 6 h de cultivo (fig. 3.14 A). Sin embargo, una vez consumida la glucosa a las 7 h (fig. 3.14 C), el crecimiento de VAL22 cesó por completo,

mientras que VAL24 presentó un ligero crecimiento durante otras 3 h. En el caso de los cultivos a TOD oscilante, las diferencias fueron más obvias. La cepa W3110 creció significativamente más lento que sus cepas derivadas bajo condiciones oscilantes de TOD. De acuerdo con esto, las concentraciones máximas de biomasa y GFP fueron alcanzadas en cultivos de W3110 después de 24 h bajo condiciones oscilantes (fig. 3.14 D, E). Esto demuestra el impacto negativo que los gradientes de TOD tienen en el comportamiento de los cultivos de *E. coli*. En cambio, la cepa VAL23 alcanzó sus máximos valores de concentración de biomasa y GFP después de 12 h de cultivo bajo estas condiciones (fig. 3.14 D, E). A pesar de que la cepa VAL22 inicialmente creció más rápido que las cepas W3110 y VAL23, el crecimiento cesó cerca del punto de agotamiento de glucosa (fig. 3.14 F) a las 8 h, y las máximas concentraciones de biomasa y GFP fueron las menores alcanzadas por las 4 cepas. De manera similar a lo observado en cultivos a TOD constante, la cepa VAL24 alcanzó mayores concentraciones de biomasa y GFP que las otras tres cepas, en condiciones de TOD oscilante. Las concentraciones máximas de biomasa y GFP de VAL24 fueron alcanzadas después de 8 h de cultivo (fig. 3.14 D, E). Cabe destacar que los perfiles cinéticos de VAL24 fueron similares bajo condiciones constantes u osciladas de TOD.

Las cinéticas típicas de formación de metabolito de fermentación para todas las cepas bajo condiciones constantes y oscilantes de TOD, se muestran en la fig. 3.15. Después del acetato, el formato fue el subproducto de mayor acumulación, seguidos de lactato, etanol y succinato. Todos los productos de fermentación ácido-mixta fueron parcialmente consumidos después del agotamiento de la glucosa, aunque a diferentes velocidades y en diferentes proporciones. En todas las cepas, bajo condiciones homogéneas o heterogéneas de TOD, el acetato fue producido al inicio y parcialmente consumido luego del agotamiento de glucosa (fig. 3.15 A, F).

Es interesante notar que la cepa VAL22 bajo condiciones de TOD constante produjo menos acetato y lo consumió completamente después del agotamiento de la glucosa, mientras que en las otras tres cepas una importante cantidad de acetato permaneció sin ser consumida.

En las figs. 3.16-3.18 se muestra una comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos más importantes de las 4 cepas bajo las dos condiciones de cultivo evaluadas. Los datos mencionados abajo son promedios de dos cultivos.

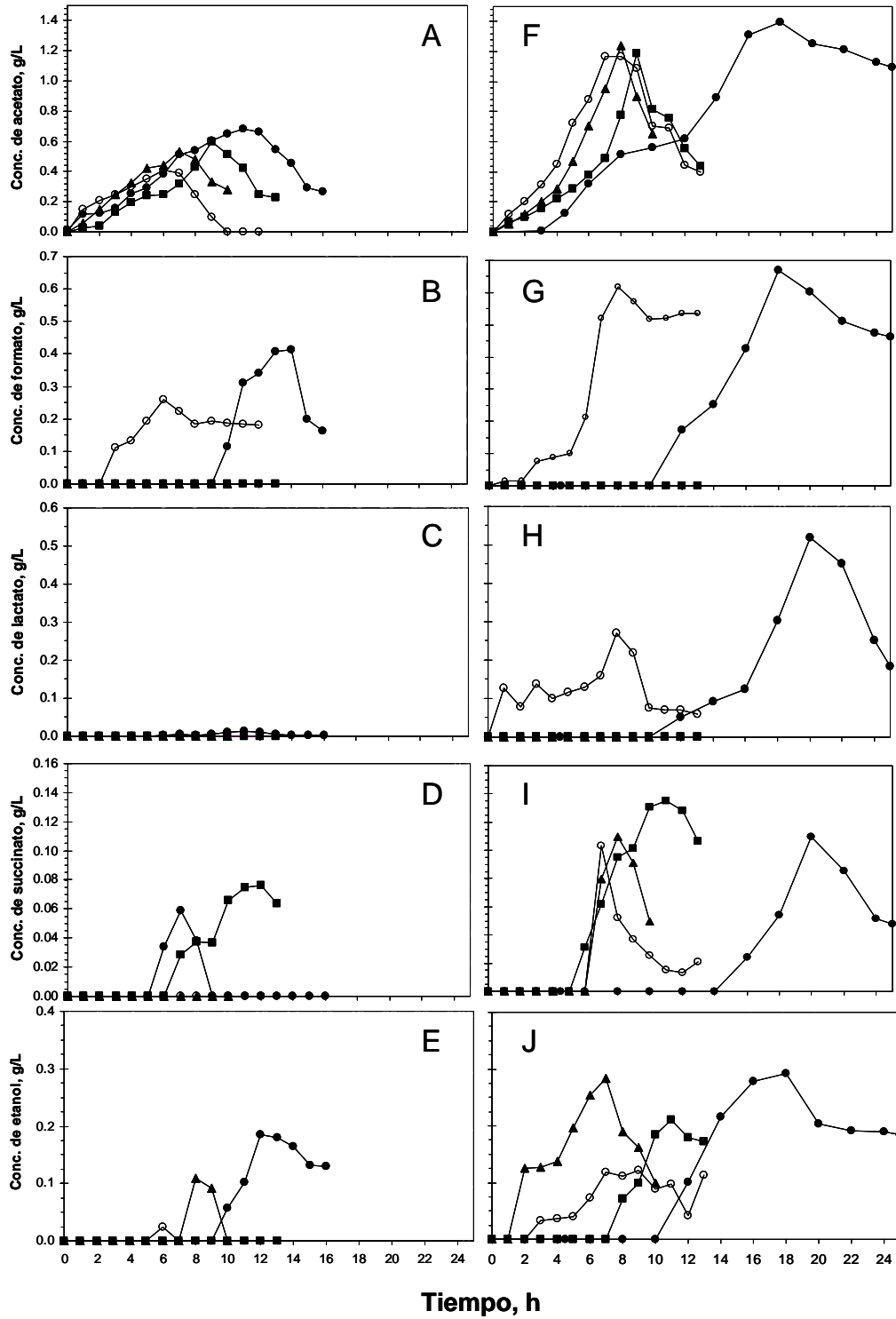


Figura 3.15. Perfiles cinéticos típicos de acumulación de subproductos en cultivos de *E. coli* bajo condiciones constantes (paneles A, B, C, D y E) y oscilantes de TOD (paneles F, G, H, I y J). Círculos rellenos: W3110; círculos vacíos: VAL22; cuadrados: VAL23, triángulos: VAL24. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos.

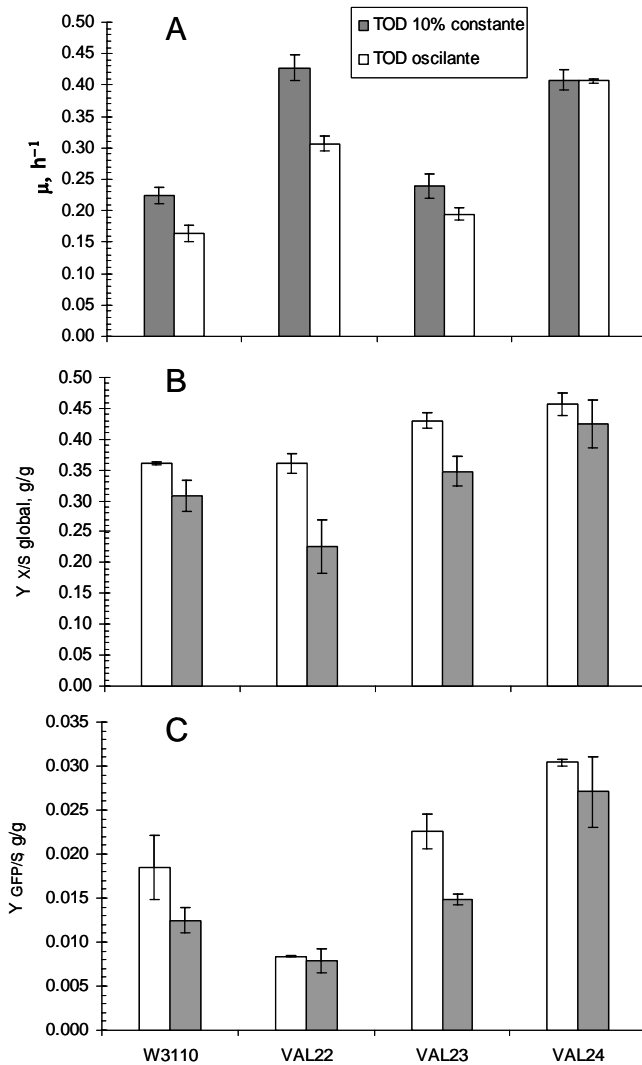


Figura 3.16. Comparación de la velocidad específica de crecimiento (μ , A), rendimiento de GFP ($Y_{GFP/S}$, B) y rendimiento global de biomasa ($Y_{X/S}$, C) de los cultivos de las diferentes cepas bajo condiciones constantes y oscilantes de TOD. Las barras de error ilustran las diferencias entre dos cultivos.

La velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento de GFP en glucosa ($Y_{GFP/S}$) (calculado durante la fase exponencial de crecimiento), y el rendimiento global de biomasa en glucosa ($Y_{X/S}$) fueron similares o mejores para VAL23 que para su cepa progenitora bajo condiciones oscilantes de TOD (fig. 3.16). Específicamente, μ , $Y_{X/S}$ y $Y_{GFP/S}$ fueron $0.225 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$, $0.361 \pm 0.002 \text{ g/g}$ y $0.019 \pm 0.004 \text{ g/g}$, respectivamente, para W3110, y $0.239 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$, $0.43 \pm 0.012 \text{ g/g}$, y $0.023 \pm 0.002 \text{ g/g}$, respectivamente para VAL23 (fig. 3.16).

En comparación, cuando VAL24 fue crecida bajo condiciones constantes de TOD, μ , $Y_{GFP/S}$ y $Y_{X/S}$ global fueron $0.41 \pm 0.013 \text{ h}^{-1}$, $0.030 \pm 0.0042 \text{ g/g}$, y $0.46 \pm 0.019 \text{ g/g}$, respectivamente, lo que significa un incremento de más del 70, 30 y 7 % sobre los valores correspondientes a la cepa progenitora y VAL23 (fig. 3.16). VAL22 tuvo una μ y $Y_{X/S}$ similares a las de VAL24, aunque su

valor de $Y_{GFP/S}$ fue de sólo 0.008 g/g. El desempeño mejorado de la cepa triple mutante fue más evidente cuando se cultivó bajo condiciones oscilantes de TOD. Por ejemplo, mientras que μ cayó en más del 27% para W3110 y VAL22 ante gradientes de TOD simulados, en comparación con cultivos completamente aerobios, su valor sólo se redujo en alrededor de 18 % para VAL23, y prácticamente no varió para VAL24 (fig. 3.16). Además, el valor de $Y_{X/S}$ global disminuyó en 15, 38 y 19% para W3110, VAL22 y VAL23, respectivamente, mientras que sólo disminuyó en 7 % en cultivos de VAL24 a TOD oscilante. El valor de $Y_{GFP/S}$ para VAL24 y VAL 22 no fue afectado por gradientes de TOD, sin embargo, disminuyó en más de 30 % en cultivos de W3110 y VAL23 bajo dichas condiciones.

Como se ha explicado en capítulos anteriores, la acumulación de ácidos orgánicos es un problema recurrente es cultivos de *E. coli* sometidos a gradientes de TOD como los que ocurren en la gran escala. En la fig. 3.17 se muestra una comparación de las cantidades máximas de ácidos orgánicos producidas por las diferentes cepas empleadas, bajo condiciones constantes y oscilantes de TOD. Durante cultivos aerobios, se acumuló una cantidad importante de acetato en cultivos de W3110 (0.674 ± 0.027 g/L) debido a sobreflujo metabólico. Es interesante observar que también se formaron formato (0.343 ± 0.077 g/L) y etanol (0.184 ± 0.030 g/L). Comparados con W3110, la acumulación de acetato fue ligeramente menor en cultivos aerobios de VAL22 (0.4 ± 0.019 g/L), VAL23 (0.554 ± 0.91 g/L) y VAL24 (0.498 ± 0.040 g/L) (fig. 3.17). En contraste con W3110, no se detectó etanol en cultivos aerobios de VAL23, mientras que el succinato se acumuló a una concentración máxima de 0.073 ± 0.002 g/L (fig. 3.17). Como se esperaba, no se observó producción de lactato ni formato en cultivos aerobios de las cepas VAL23 y VAL24. Tampoco se encontró producción de succinato en cultivos aerobios de VAL22 y VAL24, pero cantidades pequeñas de etanol fueron detectadas (0.025 ± 0.001 y 0.092 ± 0.002 g/L, respectivamente; fig. 3.17). Como ya se ha descrito antes, se observó un importante incremento en la acumulación de metabolitos de fermentación ácido-mixta en cultivos a TOD oscilante de W3110, siendo el acetato el mayormente acumulado, alcanzando concentraciones de 1.358 ± 0.066 , 1.12 ± 0.09 , 1.201 ± 0.100 y 1.162 ± 0.115 g/L para las cepas W3110, VAL22, VAL23 y VAL24, respectivamente.

El formato y el lactato alcanzaron concentraciones máximas de 0.739 ± 0.099 y 0.516 ± 0.015 g/L, respectivamente en cultivos de W3110, y 0.658 ± 0.084 y 0.281 ± 0.022 g/L en cultivos de VAL22 (fig. 3.17). En cambio, no se observó acumulación de formato o lactato en los cultivos de VAL23 y

VAL24 bajo condiciones oscilantes de TOD, confirmando el fenotipo de las mutaciones en *pflB* y *ldhA*. El succinato y etanol fueron acumulados a niveles similares por todas las cepas bajo condiciones oscilantes de TOD.

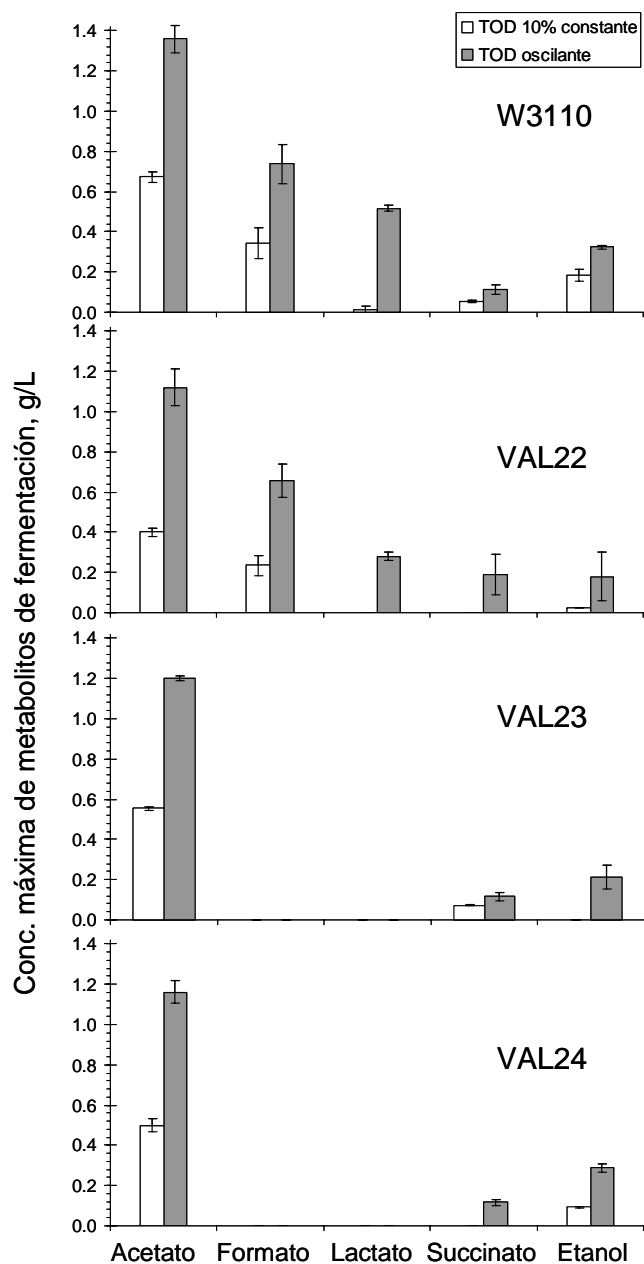


Figura 3.17. Comparación de la concentración máxima de metabolitos de fermentación para cada cepa cultivada bajo condiciones de TOD constante y oscilante. Las barras de error representan la diferencia entre dos cultivos.

El succinato llegó a concentraciones de 0.111 ± 0.03 , 0.19 ± 0.1 , 0.117 ± 0.022 , y 0.116 ± 0.013 g/L (fig. 3.17) en cultivos oscilados de W3110, VAL22, VAL23 y VAL24, respectivamente.

Por otra parte, la concentración máxima de etanol fueron 0.323 ± 0.011 , 0.18 ± 0.12 , 0.213 ± 0.057 , y 0.188 ± 0.012 g/L en cultivos de W3110, VAL22, VAL23 y VAL24, respectivamente. No se detectó piruvato extracelular en ninguna de las muestras de cultivos a TOD constante u oscilante.

Como se ilustra en la fig. 3.18, la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) (calculada durante la fase exponencial), fue similar para las cepas W3110, VAL22 y VAL23 cultivadas bajo condiciones aerobias (i.e., 0.586 ± 0.07 , 0.565 ± 0.09 , y 0.562 ± 0.05 g/g h, respectivamente). En cambio, para la cepa VAL24 se encontró un valor de q_s de 1.260 ± 0.182 g/g h.

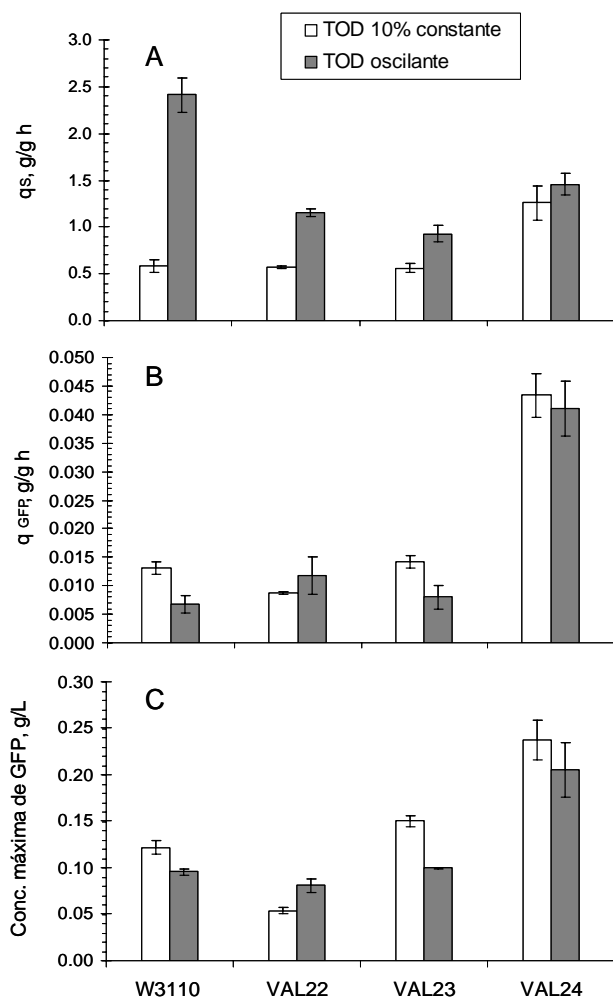


Figura 3.18. Comparación de la velocidad específica de consumo de glucosa (A), velocidad específica de producción de GFP (B), y concentración máxima de GFP (C) de las diferentes cepas cultivadas bajo condiciones de TOD constante y oscilante. Las velocidades específicas fueron calculadas en la fase exponencial de los cultivos. Las barras de error representan la diferencia entre dos cultivos.

Comparado con cultivos a TOD constante, el valor de q_s bajo condiciones oscilantes de TOD mostró un importante incremento para W3110, VAL22 y VAL23 (i.e., 2.410 ± 0.179 , 1.148 ± 0.041 , y 0.928 ± 0.090 g/g h, respectivamente), pero no fue así para la cepa VAL24, cuyo valor bajo

condiciones oscilantes de TOD (1.46 ± 0.110 g/g h) fue similar al obtenido bajo TOD constante. La velocidad específica de producción de GFP (q_{GFP}) tuvo una disminución similar en cultivos de W3110 y VAL23 bajo condiciones oscilantes de TOD (fig. 3.18). Los valores de q_{GFP} para cultivos aerobios de W3110 y VAL23 fue 0.013 ± 0.0011 y 0.014 ± 0.0011 g/g h, respectivamente, mientras que bajo condiciones oscilantes de TOD cayó a 0.007 ± 0.0015 y 0.008 ± 0.002 g/g h. Esto representa una disminución de más del 43 % para ambas cepas. En cambio, los valores de q_{GFP} para VAL22 incrementaron ligeramente de condiciones aerobias (0.009 ± 0.0003 g/g h) a anaerobias intermitentes (0.012 ± 0.001 g/g h), y en el caso de VAL24, fueron similares para condiciones constantes y oscilantes de TOD (0.043 ± 0.0044 y 0.041 ± 0.004 g/g h, respectivamente). Las concentraciones máximas de GFP alcanzadas en cultivos aerobios constantes fueron 0.122 ± 0.007 , 0.054 ± 0.004 , 0.151 ± 0.006 , y 0.238 ± 0.021 g/L para W3110, VAL22, VAL23 y VAL24, respectivamente. Esto es, la concentración máxima de GFP se incrementó en alrededor de 25 y 95% en las cepas VAL23 y VAL24, respectivamente, pero disminuyó cerca de 56 % en la cepa VAL22, comparadas con la cepa W3110. En los cultivos bajo gradientes de TOD simulados, se obtuvo una concentración máxima de GFP de 0.0954 ± 0.0029 y 0.0994 ± 0.0013 g/L para cultivos de W3110 y VAL23, respectivamente. Esto representa un decremento, con respecto a cultivos aerobios, de cerca de 22 y 33 %. En comparación, la concentración máxima de GFP para cultivos oscilados de VAL22 se incrementó en 50 % (0.081 ± 0.007), y en el caso de VAL24, no hubo un cambio significativo. La cantidad de GFP producida en cultivos oscilados de VAL24 fue más del doble que la producida por W3110 bajo dichas condiciones. De hecho, VAL24 produjo casi el doble de GFP bajo condiciones oscilantes de TOD, que W3110 bajo condiciones completamente aerobias (fig. 3.18).

3.2.1.2 Discusión.

La hipótesis básica de este trabajo es que, creciendo bajo condiciones heterogéneas de TOD, la bacteria *E. coli* no requiere necesariamente la activación de las vías de fermentación ácido-mixta. La capacidad de modulación del metabolismo de *E. coli* permite una rápida adaptación a fluctuaciones ambientales, en particular a cambios en la disponibilidad de oxígeno.

Dicha plasticidad puede ser una desventaja en el caso de cultivos industriales, en los que pueden encontrarse fluctuaciones intermitentes y cíclicas. El SED empleado en este estudio, mantiene a las células bajo condiciones aerobias durante 17 s, seguidas de una estancia de 33 s, en promedio, en condiciones anaerobias. Debido a la naturaleza transitoria del periodo anaerobio, las células podrían temporalmente sostener sus actividades metabólicas de tipo aerobio, consumiendo los metabolitos

presentes (específicamente poder reductor) hasta regresar a condiciones aerobias, sin necesariamente desviar su metabolismo. En el capítulo anterior, hemos sugerido la existencia de procesos de degradación de mARN rápida y selectiva cuando *E. coli* se encuentra en condiciones oscilantes de TOD. Ello soporta la idea de la existencia de oscilaciones metabólicas rápidas en biorreactores de gran escala. De esta manera, el enfoque inicial para modificar genéticamente a *E. coli*, fue inactivar parcialmente las vías de fermentación ácido mixta. El nodo glicolítico del piruvato ha sido un blanco común para modificar el metabolismo central de *E. coli* (Alexeeva et al., 2000; Ponce, 1999). Como se muestra en la fig. 3.13, el piruvato puede ser transformado a acetil-CoA, formato, lactato o acetato. La estrategia básica del presente trabajo fue evitar la desviación del piruvato hacia productos de fermentación, al eliminar las reacciones catalizadas por los productos de los genes *pflB*, *ldhA* y *poxB*. De este modo, el piruvato podría ser dirigido principalmente hacia la producción de acetil-CoA, independientemente de las condiciones de disponibilidad de oxígeno (ver fig. 3.13). La eliminación de los genes *pflB* y *ldhA*, directamente impiden la producción de formato y lactato, que, junto con el acetato, son los principales productos de fermentación producidos por *E. coli* en ambientes de TOD heterogénea. Adicionalmente, en un esfuerzo por reducir la producción de acetato, se inutilizó el gene *poxB*, cuya participación en la síntesis de acetato bajo gradientes de TOD fue demostrada en el capítulo anterior. El comportamiento de la cepa VAL23 bajo condiciones constantes de TOD fue similar al de su cepa progenitora, lo cual era esperado, ya que ni *pflB* ni *ldhA* juegan un papel importante en la fisiología de *E. coli* bajo condiciones aerobias. Sin embargo, se observó una mayor producción de GFP y biomasa en la cepa VAL23. La cantidad de formato acumulada en cultivos aerobios de W3110 fue 0.343 g/L. esto significa que los esqueletos de carbono que no se desperdiciaron como formato, fueron incorporados a biomasa y producto. La velocidad específica de crecimiento de VAL23 bajo condiciones oscilantes de TOD decreció en 18%, comparada con cultivos aerobios, mientras que para W3110, cayó en más de 27 %. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las vías de fermentación ácido mixta no son esenciales para *E. coli* bajo condiciones fluctuantes de TOD típicas de la gran escala.

Es interesante comentar que se observó una pequeña reducción en la acumulación de acetato en los cultivos aerobios de las tres cepas mutantes, en comparación con la progenitora. Esto coincide con un reporte previo (Zhu y Shimizu, 2004) en el que también se observó un pequeño decremento en la acumulación de acetato en condiciones aerobias y microaerobias en cultivos de mutantes *pflB*⁻ de *E. coli*. La menor cantidad de acetato acumulado, ocurrió en la cepa mutante *poxB*⁻ (VAL23). Sin embargo, basados en los niveles de transcripción de *poxB* bajo condiciones oscilantes de TOD (ver capítulo anterior), la reducción en producción de acetato por una mutación en *poxB* no fue tan

importante como se esperaba. Esto significa que en exceso de glucosa, la vía de producción de acetato por Ack y Pta es lo suficientemente eficiente para convertir casi la misma cantidad de acetil-CoA a acetato, sin la acción de la piruvato oxidasa (Flores et al., 2004). En el capítulo anterior, se demostró que *E. coli* despliega un metabolismo parcialmente anaerobio cuando es expuesta a gradientes de TOD simulados, lo cual es consistente con el incremento en q_s y la acumulación de productos de fermentación observados para W3110 en cultivos oscilados. Como se esperaba, se eliminó la producción de lactato y formato en la VAL23. En consecuencia, se observó un valor mucho menor de q_s en cultivos oscilados de esta cepa, ya que el flujo de carbono hacia metabolitos de fermentación fue reducido. Sin embargo, no hubo una mejora importante en la velocidad específica de producción de GFP y la concentración máxima de GFP producida por cultivos oscilados de VAL23 fue comparable a la de W3110 bajo las mismas condiciones. No obstante, VAL23 muestra claras ventajas sobre su cepa progenitora, ya que la recuperación parcial de velocidad de crecimiento bajo condiciones anaerobias transitorias y la reducción en acumulación de subproductos resultó en una reducción de 8 h para que el cultivo de VAL23 alcanzara las máximas concentraciones de biomasa y GFP, comparada con cultivos de W3110.

La posibilidad de que el CAT funcione como dos ramas separadas en *E. coli* bajo gradientes de TOD (ver capítulo anterior), permite suponer que bajo estas condiciones habrá limitaciones biosintéticas debido a limitación de aminoácidos producidos a partir de intermediarios de CAT, punto que no fue atacado con las mutaciones hechas en VAL23, lo que explica hasta cierto punto, que dichas limitaciones no hayan sido superadas para la producción de GFP por VAL23. Sin embargo, lo que no parece suficientemente claro es la manera en que dichas supuestas limitaciones fueron superadas por la cepa VAL24, que porta además una mutación en *poxB*. Se ha sugerido que *poxB* podría estar involucrado en la detección de diferentes estreses, incluida la limitación de carbono y la transición entre condiciones aerobias y anaerobias (Flores et al., 2004; King y Ferenci, 2005). La carencia de esta enzima podría hacer a la cepa mutante menos sensible a dichos estreses. Esto, sumado a las mutaciones en *pflB* y *ldhA*, podría haber ayudado a la cepa VAL24, con un menor desperdicio de esqueletos de carbono, a desempeñarse mejor, produciendo más biomasa y GFP bajo condiciones constantes y oscilantes de TOD.

En general, hay poca información acerca de la fisiología celular bajo ambientes oscilantes, como el estudiado aquí, pero puede encontrarse información interesante acerca de mutaciones aisladas de los genes de interés en este capítulo. Por ejemplo, algunos autores han mostrado (Kabir et al., 2005) que

la eliminación de *ldhA* en *E. coli* causó la represión de la fosfoenol piruvato carboxilasa (Ppc), enzima que se sabe contribuye a la formación catabólica de succinato bajo condiciones anaerobias. La fosfoenol piruvato carboxicinasa, que cataliza la reacción inversa a la Ppc, fue sobre expresada en dicha mutante. Ello podría causar una reducción en la acumulación de succinato. Sin embargo, en los experimentos presentados en este capítulo no se observó reducción en la acumulación de succinato de las cepas mutantes cultivadas bajo condiciones anaerobias intermitentes. La acumulación de lactato puede tener efectos deletéreos importantes en *E. coli*, y podría tener relevancia para explicar el pobre desempeño de las cepas VAL22 y W3110 para producir GFP bajo condiciones oscilantes de TOD. Por ejemplo, reportaron que el lactato actúa como un efector importante que amplifica la actividad de la cinasa ArcB (Rodríguez et al., 2004). Como se mencionó en capítulos anteriores, ArcB es una molécula sensora que forma parte del sistema de dos componentes de regulación global de metabolismo aerobio/anaerobio en *E. coli* (Georgellis et al., 2001). La presencia de lactato en el medio de cultivo puede amplificar las señales necesarias para la inducción de genes anaerobios y represión de genes aerobios, cuya expresión es regulada por dicho sistema. Durante los cultivos bajo oscilaciones de TOD, la ausencia de lactato podría entonces disminuir la fuerza de la señal y esto a su vez disminuir la inducción de genes anaerobios, lo que puede explicar en parte la recuperación de velocidad de crecimiento por las cepas mutantes en *ldhA*. Por otra parte, se ha determinado (Zhu y Shimizu, 2004) que la concentración intracelular de ATP fue hasta 18 % mayor en mutantes *pflB*⁻. Si esto también ocurriera en las cepas VAL23 y VAL24, un ambiente intracelular más favorable energéticamente podría estar también contribuyendo a la recuperación de velocidad de crecimiento en los cultivos oscilados, en los que se espera un metabolismo menos eficiente en generación de energía.

La cepa VAL24 (una cepa W3110, *ldhA*⁻, *pflB*⁻, *poxB::cat*), mostró un comportamiento superior al de las otras cepas, indicando un resultado sinérgico de las tres mutaciones. Además, esta fue la cepa menos afectada por los gradientes de oxígeno disuelto. Parámetros importantes, como la velocidad específica de crecimiento, la velocidad específica de producción de GFP y la máxima concentración de GFP fueron similares en condiciones constantes y oscilantes de TOD.

Debe hacerse notar que los efectos de las citadas mutaciones sólo han sido estudiados por separado, y no como el genotipo de una sola cepa (Vemuri et al., 2005; Yang y San, 1999; Zhu y Shimizu, 2004). Los efectos globales de estas tres mutaciones juntas pueden ser diferentes que los de cada mutación aislada.

Se ha demostrado que una mutación *poxB* en *E. coli* causa una pequeña reducción en la acumulación aerobia de acetato, y que disminuye ligeramente la velocidad de crecimiento en condiciones aerobias (Abdel-Hamid et al., 2001; Flores et al., 2004; Ponce, 1999; Vemuri et al., 2005), aunque la reducción de crecimiento no fue observada en VAL22 en las condiciones aerobias de crecimiento empleadas aquí. En este trabajo, las cepas doble y triple mutantes alcanzaron mayores velocidades de crecimiento, comparadas con su progenitora. Se ha encontrado (Vemuri et al., 2005) que el coeficiente de mantenimiento fue 55 % más bajo y el coeficiente respiratorio 18 % más alto para cepas *poxB*, comparadas con su cepa progenitora. Esto sugiere que el carbono es más eficientemente incorporado en biomasa en dichas mutantes. Si a ese efecto le sumamos las ventajas otorgadas por las mutaciones en *pflB* y *ldhA*, podemos suponer que en la triple mutante se potencia la capacidad biosintética para la producción de proteína heteróloga, ya que $Y_{GFP/S}$ y el rendimiento global $Y_{X/S}$ bajo condiciones oscilantes de TOD permanecieron casi inalteradas, comparadas a cultivos a TOD constante de la cepa triple mutante. Además, podemos decir que prácticamente todo el acetato producido por VAL24 es sintetizado por las enzimas AckA y Pta, lo que significa que, como consecuencia de la inactivación de *poxB*, se produce un mol de ATP por cada mol de acetato producido en los cultivos de VAL24. Esto a su vez, puede resultar en un mejor estado energético de las células, y ello combinado con los efectos de un desperdicio de carbono reducido debido a las mutaciones en *pflB* y *ldhA*, pueden ser, al menos en parte, la explicación del mejor desempeño observado en VAL24.

Comparada con la cepa progenitora, VAL24 acumuló 0.739 g/L menos de formiato, 0.516 g/L menos de lactato y 0.196 g/L menos de acetato. Esto resulta en una reducción del carbono desperdiciado de 0.038 $C_{mol/L}$ durante cultivos anaerobios intermitentes. En comparación, la cepa W3110 desperdició 0.0935 $C_{mol/L}$ en forma de metabolitos de fermentación. Esto significa que las mutaciones presentes en VAL24 resultaron, en promedio, en un ahorro de 40 % de carbono en forma de subproductos de fermentación en cultivos oscilados, lo que a su vez explica las mayores concentraciones de biomasa y GFP alcanzadas y los mejores rendimientos observados.

3.2.1.3 Conclusiones parciales.

Los resultados presentados demuestran que, aunque *E. coli* responde rápidamente a ambientes heterogéneos en TOD mediante la activación de su metabolismo de fermentación, el uso de tales vías no es necesario en tiempos de circulación cortos (i.e., 33 s en condiciones anaerobias, seguidos de

17 s en condiciones aerobias). Las cepas mutantes, bloqueadas en algunas de las reacciones de fermentación ácido-mixta al nivel del nodo del piruvato, recuperaron velocidad de crecimiento y disminuyeron la fracción de carbono desperdiciada como productos de fermentación tóxicos cuando fueron cultivadas bajo gradientes de TOD como los que pueden ocurrir biorreactores de gran escala. La cepa VAL24, una triple mutante en los genes *pflB*, *ldhA* y *poxB*, mostró un desempeño superior cultivada bajo condiciones aerobias constantes o anaerobias intermitentes, manteniendo una rápida velocidad de crecimiento y alcanzando mayores concentraciones de proteína heteróloga y mayor productividad que su cepa progenitora, que la mutante simple (VAL22, *poxB*⁻), y que la doble mutante (VAL23, *pflB*⁻, *ldhA*⁻). Esto abre nuevas posibilidades para la ingeniería metabólica de cepas menos sensibles a gradientes de TOD y con mejores características productivas bajo condiciones de gran escala. Por último, la información presentada en este capítulo, puede ser útil hacia el diseño de células con un genoma mínimo para aplicaciones industriales.

3.2.2 Cultivo, a altas concentraciones de glucosa, de *Escherichia coli* modificada en el sistema de transporte de sustrato: una alternativa a los cultivos alimentados para la producción de proteína recombinante.

Los cultivos con una alta concentración celular (alta densidad celular) son la opción preferida para la producción de productos biológicos, debido a las productividades volumétricas alcanzables. Las altas concentraciones celulares (mayores de 40 g/L), son alcanzadas una vez que elevadas cantidades de sustrato han sido convertidos a biomasa. Sin embargo, en el caso particular de cultivos de *E. coli*, las concentraciones de sustrato (generalmente glucosa) empleadas para los cultivos raramente exceden de 30 g/L. Una de las causas principales para evitar el uso de concentraciones mayores de glucosa, es la considerable acumulación de acetato, aún bajo condiciones aerobias, fenómeno conocido como sobreflujo metabólico (Eiteman y Altman, 2006). La glucosa es transportada normalmente en *E. coli* por el sistema de la fosfotransferasa (PTS). Este es un sistema inducible y altamente eficiente. El sobreflujo metabólico se asume como consecuencia de un desbalance entre los flujos de la glicólisis y del CAT en *E. coli*. Los altos valores de q_s transportada por el PTS son procesadas eficientemente por la glicólisis. Sin embargo, el acetil-CoA, producto final de la glicólisis, no es procesado a la misma velocidad por el CAT, lo que provoca su acumulación (Eiteman y Altman, 2006). El acetil-cCoA es alternativamente transformado en acetil-fosfato por la enzima fosofotransacetilasa, y enseguida convertido a acetato por la acetato-cinasa, en una reacción que genera 1 ATP por mol de acetato producido (Eiteman y Altman, 2006). La cantidad de acetato producido debido al sobreflujo metabólico puede ser hasta 15 % de la glucosa suministrada (Wolfe, 2005). Además de la lógica pérdida de productividad del proceso debido a un desperdicio de esqueletos carbonados, la acumulación de acetato provoca efectos fisiológicos indeseables en *E. coli*, incluso a concentraciones de 1.5 g/L (Luli y Strohl, 1990; Bauer et al., 1990). Algunos de los efectos incluyen reducción de la capacidad de *E. coli* para producir proteína recombinante (Jensen y Carlsen, 1990), y que el acetato interfiere con la producción de ATP al reducir el gradiente de protones transmembranal (Lee, 1996). Koh et al. (1992) demostraron que el acetato tiene un mayor impacto en células recombinantes que en células silvestres de *E. coli*. El mecanismo exacto de daño en la producción de proteína recombinante no ha sido elucidado, pero se ha sugerido que el acetato puede reprimir la síntesis de ADN, ARN, proteínas y lípidos (Lee, 1996).

En consecuencia, uno de los objetivos básicos en el cultivo a alta densidad celular de *E. coli* es reducir o eliminar la producción de acetato. El enfoque típico del ingeniero de bioproceso para

eliminar el sobreflujo metabólico es reducir q_s mediante el suministro de glucosa a tasas bajas y con perfiles predeterminados. El esquema típico de los cultivos alimentados consta de una fase de cultivo en lote, en la que las células adicionadas en el inóculo consumen una cantidad de sustrato contenida inicialmente en el medio. Para cultivos de *E. coli*, esta cantidad de sustrato (generalmente glucosa), oscila entre los 5 y 30 g/L. Una vez agotado el sustrato, se inicia la alimentación al biorreactor de una solución de sustrato altamente concentrada (v. gr., para el caso de glucosa llega a ser de una concentración de hasta 800 g/L). La adición exponencial de glucosa al cultivo permite mantener una velocidad de crecimiento constante y, al menos idealmente, un estado fisiológico constante en *E. coli*. Sin embargo, los cultivos alimentados tienen las desventajas que se detallaron en la introducción de este trabajo, con los efectos negativos descritos en la sección 3.2. Además, los cultivos alimentados a escala industrial requieren de costosos equipos adicionales, mayor tiempo de operación y esquemas de control más complejos que los empleados en las operaciones en lote. Esas desventajas podrían ser superadas si fuera posible alcanzar altas densidades celulares en modos de cultivo simples, como el lote.

Una alternativa para reducir el sobreflujo metabólico es disminuir q_s mediante la ingeniería del sistema de transporte de sustrato. Esta estrategia ha sido explorada anteriormente (De Anda et al., 2006), empleando una cepa de *E. coli* en la que el PTS fue bloqueado y la glucosa es transportada a través de la permeasa de galactosa (GalP), que fue colocada bajo el control del promotor fuerte *trc*, directamente en el cromosoma (fig. 3.19). El transporte de glucosa por GalP, en esta construcción ayuda a balancear los flujos entre CAT y glicólisis (Hernández-Montalvo et al., 2003), lo que reduce fuertemente el sobreflujo metabólico (Flores et al., 2002, 2004, 2005). Una vez que se ha obtenido una construcción molecular robusta para reducir el sobreflujo metabólico, podrían emplearse elevadas concentraciones de glucosa en el medio para cultivar *E. coli*, con una mínima producción de acetato.

En este trabajo se propuso el empleo de altas cantidades iniciales de glucosa (hasta 100 g/L) en cultivos por lote, con la finalidad de lograr altas densidades celulares sin añadir sustrato externamente y evitando en consecuencia, los gradientes de sustrato inherentes a los cultivos alimentados.

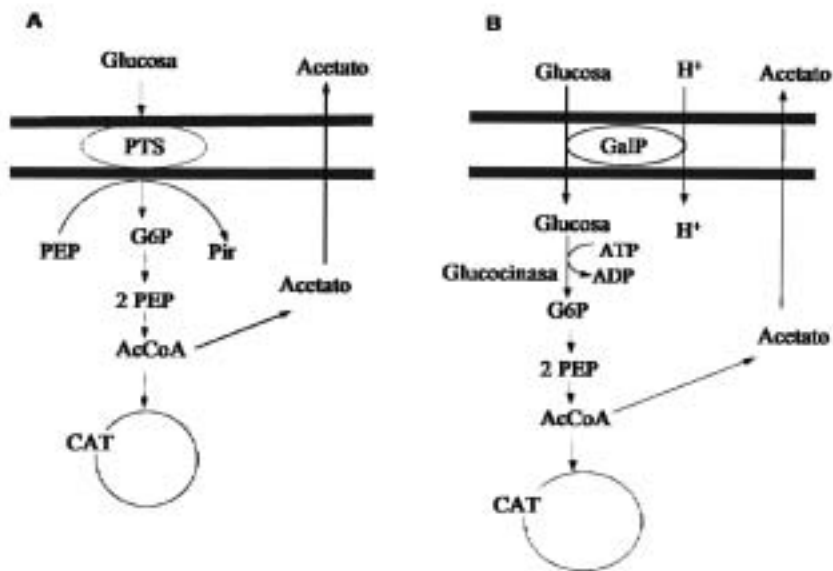


Figura 3.19. Esquema simplificado del transporte de sustrato a través del PTS (A) y de GalP (B), y su relación con las ramas del metabolismo relevantes para la producción de acetato.

3.2.2.1 Cultivos de *E. coli* bajo concentraciones moderadas de glucosa.

La cepa nativa W3110 y la cepa modificada en el transporte de sustrato, denominada VH32, fueron transformadas con el plásmido pV21 para la producción de GFP. Ambas cepas fueron cultivadas en modo lote, bajo condiciones aerobias (TOD mayor de 30% saturación) y pH constante (7.05) en un medio de cultivo complejo. La producción de GFP fue inducida desde la inoculación mediante la adición de IPTG. Las concentraciones de glucosa empleadas fueron 30, 50 y 100 g/L. Los perfiles cinéticos de los cultivos se muestran en las figuras 3.20 a 3.22. La concentración de 30 g/L de glucosa fue empleada como base de comparación para los cultivos a 50 y 100 g/L de glucosa. La figura 3.20 muestra los perfiles crecimiento de W3110 y VH32, la producción de GFP y acetato, y la concentración extracelular de glucosa. VH32 creció a una velocidad ligeramente menor ($\mu_{\max} = 0.61 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) que la de W3110 ($\mu_{\max} = 0.65 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) (ver abajo).

Globalmente, la glucosa fue consumida con mayor lentitud por VH32 que por su cepa progenitora, ya que el agotamiento de glucosa tomó 9 h en cultivos de VH32 y 8 h en cultivos de W3110. El acetato alcanzó concentraciones de $3.96 \pm 0.2 \text{ g/L}$ en W3110, y fue después fue parcialmente consumido. En contraste, la concentración de acetato alcanzó un valor máximo de sólo $0.15 \pm 9 \times 10^{-4} \text{ g/L}$ en cultivos de VH32. Las concentraciones de biomasa y GFP fueron 14.7 % ($20.25 \pm 0.5 \text{ g/L}$) y 94 % ($3.3 \pm 0.2 \text{ g/L}$) mayores en cultivos de VH32 que para W3110.

La diferencia en la asimilación de glucosa entre las cepas se reflejó en los rendimientos globales de biomasa/substrato ($Y_{X/S}$), los cuales fueron 0.54 ± 0.01 g/g para W3110 y 0.65 ± 0.01 g/g para cultivos de VH32 (detalles abajo).

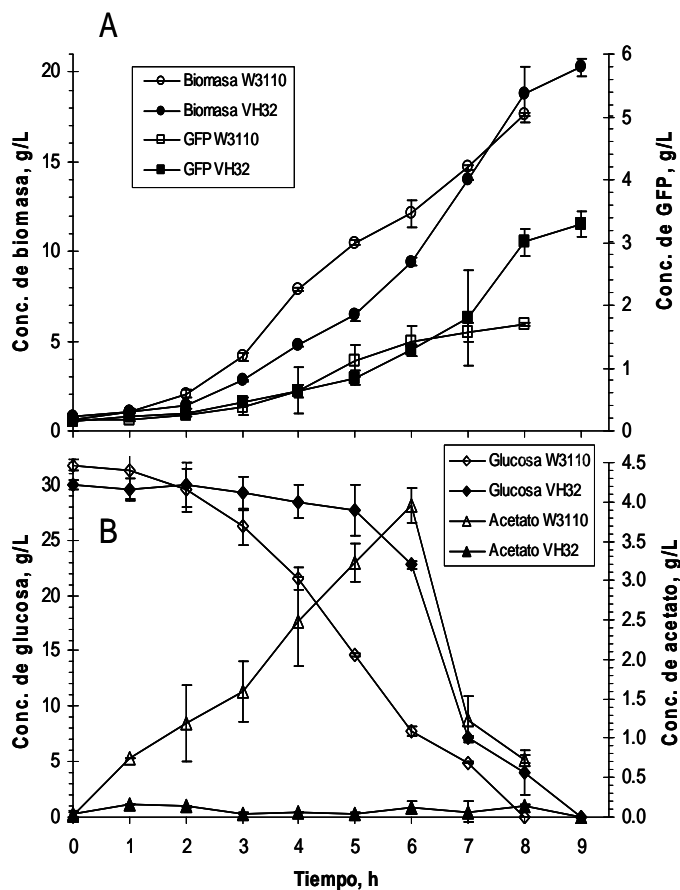


Figura 3.20. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de *E. coli* W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 30 g/L. Las barras de error muestran las diferencias entre dos cultivos.

3.2.2.2 Cultivos de *E. coli* bajo concentraciones elevadas de glucosa.

Con la finalidad de alcanzar mayores concentraciones celulares sin adición externa de glucosa, se realizaron cultivos con concentraciones iniciales de glucosa de 50 y 100 g/L. Las cinéticas de los cultivos se muestran en las figuras 3.21 y 3.22, respectivamente. En estos cultivos a altas concentraciones de glucosa, las ventajas del sistema de transporte de sustrato modificado en VH32 son más evidentes. El acetato se acumuló hasta concentraciones de 12.09 ± 0.73 g/L en cultivos de W3110 a 50 g/L de glucosa inicial (fig. 3.21, tabla 3.3). En contraste, para cultivos de VH32 a la misma concentración de sustrato, el acetato alcanzó niveles de 0.55 ± 0.2 g/L.

La velocidad específica de crecimiento máxima de VH32 fue 15 % menor ($\mu_{\max} = 0.51 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) que la de W3110 ($\mu_{\max} = 0.6 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) (fig. 3.21) a una concentración de glucosa de 50 g/L. La máxima concentración de biomasa alcanzada fue 19 % mayor en cultivos de VH32 que en los de W3110 (tabla 3.3). En consecuencia, $Y_{X/S}$ fue 17 % mayor en cultivos de VH32 ($0.55 \pm 0.01 \text{ g/g}$) que en cultivos de W3110 ($0.47 \pm 0.03 \text{ g/g}$) (fig. 3.21).

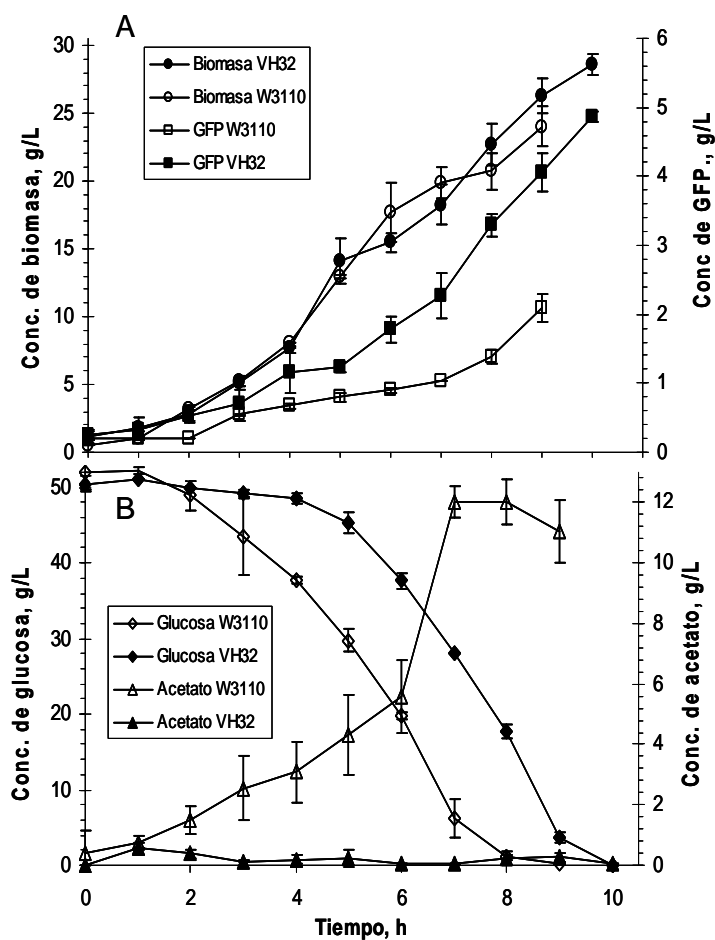


Figura 3.21. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de *E. coli* W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 50 g/L. Las barras de error muestran las diferencias entre dos cultivos.

Estas son diferencias importantes en la acumulación de subproductos y producción de biomasa, y también lo son en la síntesis de GFP. W3110 produjo solo $2.1 \pm 0.2 \text{ g/L}$ de GFP, mientras que VH32 produjo $4.87 \pm 0.08 \text{ g/L}$, lo que es un incremento de 2.32 veces sobre su cepa progenitora. Estas diferencias de comportamiento entre las cepas fue más importante en cultivos a concentración inicial de glucosa de 100 g/L (fig. 3.22). La acumulación de acetato alcanzó un máximo de $13.56 \pm 0.36 \text{ g/L}$ en cultivos de *E. coli* W3110. Nuevamente, la producción de acetato en cultivos de VH32 fue mucho más baja, alcanzando niveles máximos de tan solo $2.08 \pm 0.22 \text{ g/L}$ a las 6 h de cultivo, para ser reasimilado posteriormente. En consecuencia, VH32 produjo $52.1 \pm 0.5 \text{ g/L}$ de biomasa, mientras

que W3110 sólo alcanzó niveles de 33.9 ± 0.06 g/L. Esto significa una producción de biomasa 54 % más alta para VH32, y se reflejó en un valor de $Y_{X/S}$ 58 % más alto para VH32 (0.52 ± 0.02 g/g) que para W3110 (0.33 ± 0.01 g/g). Es importante notar que VH32 produjo 8.29 ± 0.37 g/L de GFP, esto es, 210% más que lo producido por su cepa progenitora (tabla 3.3).

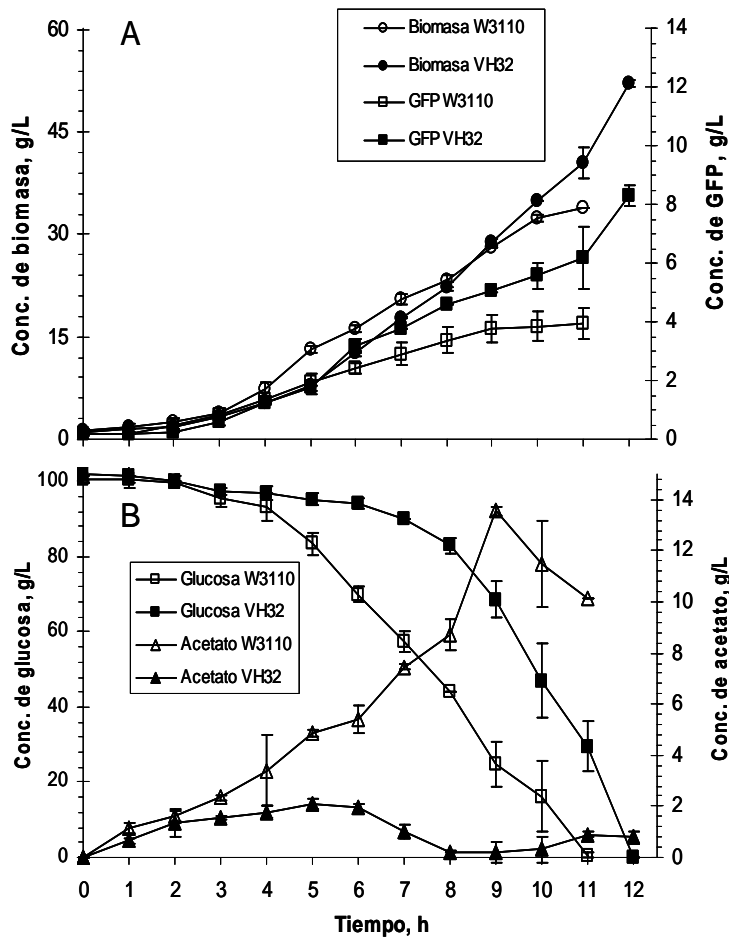


Figura 3.22. Perfil cinético de producción de biomasa y GFP (A) y de consumo de glucosa y producción de acetato (B) en cultivos de *E. coli* W3110 y VH32 empleando una concentración inicial de glucosa de 100 g/L. Las barras de error muestran las diferencias entre dos cultivos.

La velocidad específica de crecimiento para ambas cepas, fue menor que la alcanzada en cultivos a menores concentraciones de glucosa, siendo 0.52 ± 0.03 h⁻¹ para W3110 y 0.47 ± 0.01 h⁻¹ para VH32. A concentraciones iniciales de glucosa de 50 y 100 g/L, la glucosa fue agotada 1 h más tarde en cultivos de VH32, comparados con los cultivos de W3110.

La fig. 3.23 muestra una comparación de los efectos de las concentraciones de glucosa sobre el $Y_{X/S}$ global y la velocidad específica de crecimiento (en fase exponencial). Se puede observar una reducción lineal en la velocidad específica de crecimiento, similar para ambas cepas, a medida que se

incrementa la concentración inicial de glucosa. En la condición de mayor concentración de glucosa evaluada, la velocidad específica de crecimiento cayó en un 25 %, comparada con la de la menor concentración de glucosa, para ambas cepas. Los valores mostrados en la fig. 3.23 fueron calculados durante las primeras 5-6 h de cultivo, por lo que dicha disminución de velocidad de crecimiento puede atribuirse a la concentración inicial de nutrientes principalmente. Otro factor importante para inhibir la velocidad de crecimiento, aunque en etapas más avanzadas del cultivo, es la concentración de acetato, que se discute más adelante.

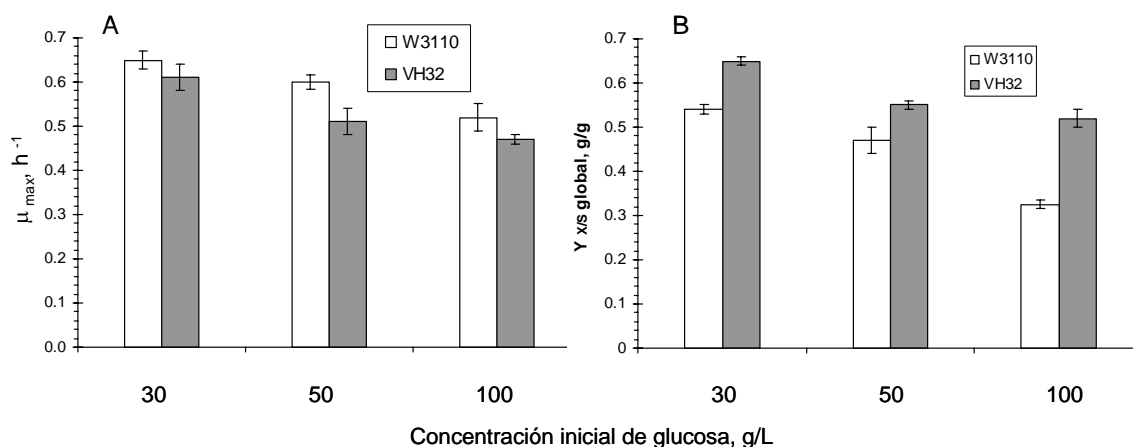


Figura 3.23. Efecto de la concentración inicial de glucosa en la velocidad específica de crecimiento (A) y el $Y_{X/S}$ global (B) en cultivos de VH32 y W3110.

El incremento de la concentración de nutrientes causó también una reducción lineal del valor global de $Y_{X/S}$. Sin embargo, dicho efecto fue claramente mayor en cultivos de W3110, probablemente debido a la importante fracción de fuente de carbono que es dirigida a la producción de acetato en esta cepa. En conjunto, los resultados obtenidos indican que el flujo de carbono fue redireccionado efectivamente a la producción de biomasa y síntesis de proteína heteróloga por la cepa modificada en el sistema de transporte de sustrato, en vez de ser dirigido a la producción de acetato, aún en ambientes con muy altas concentraciones de glucosa.

3.2.2.3 Cultivos de *E. coli* alimentados exponencialmente con limitación glucosa.

Para evaluar si el cultivo de la cepa modificada en el transporte de sustrato a elevadas concentraciones de nutrientes, puede ser una alternativa viable a los cultivos alimentados

tradicionales, se llevaron a cabo cultivos exponencialmente alimentados, limitados en glucosa, de W3110. El desempeño de estos cultivos fue comparado con el de cultivos de VH32 a una concentración inicial de glucosa de 100 g/L. Los cultivos alimentados fueron operados con una fase lote inicial a una concentración de 20 g/L de glucosa. Una vez que esta glucosa fue consumida totalmente, se inició un perfil de alimentación exponencial de glucosa para mantener una velocidad de crecimiento de 0.13 h^{-1} (fig. 3.24). La solución de alimentación conservó la proporción de extracto de levadura/glucosa empleada en todos los cultivos por lote, y contenía espectinomina e IPTG para mantener constantes las concentraciones de estos compuestos en el biorreactor. Como puede observarse en la fig. 3.24, la glucosa fue consumida después de 5.5 h en la fase lote. En ese momento, la concentración de acetato era de $2 \pm 0.15 \text{ g/L}$. El acetato fue reasimilado durante las siguientes 8.5 h, y su concentración permaneció cercana a cero el resto del cultivo (fig. 3.24). Esto demuestra que la tasa de alimentación mantuvo la velocidad de consumo de glucosa a un valor lo suficientemente bajo para evitar el sobreflujo metabólico. Después de 30 h de cultivo, la biomasa alcanzó una concentración de $91.7 \pm 5 \text{ g/L}$, y la GFP una concentración de $24.95 \pm 1.8 \text{ g/L}$. Las productividades de estos cultivos y los cultivos de VH32 a 100 g/L de glucosa inicial se discuten más enseguida.

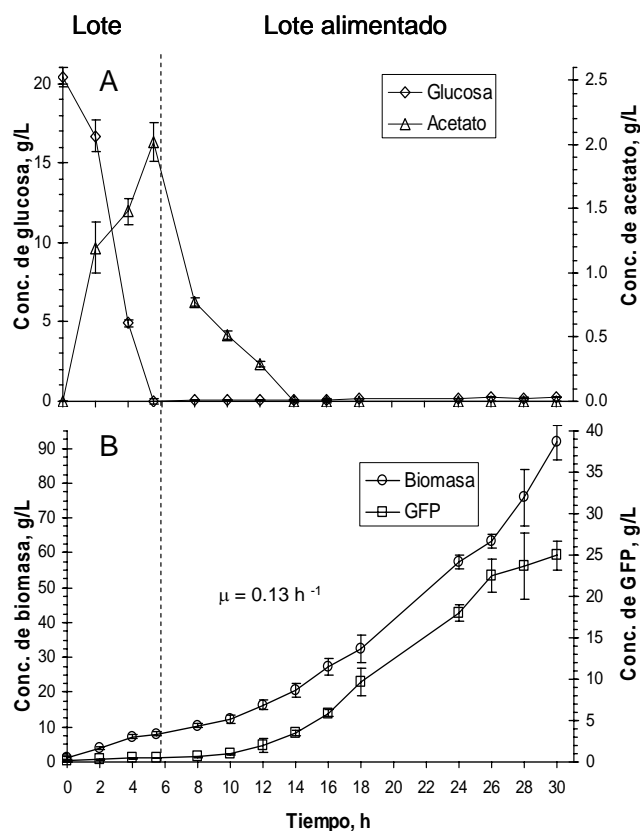


Figura 3.24. Perfil cinético de consumo de glucosa y formación de acetato (A) y de producción de biomasa y GFP (B) en cultivos por lote alimentado exponencialmente de *E. coli* W3110. Las barras de error muestran las diferencias entre dos cultivos. La línea vertical punteada indica el inicio de la fase de alimentación, a una tasa de dilución de 0.13 h^{-1} .

3.2.2.4 Discusión.

Los cultivos alimentados son una tecnología bien establecida en la industria de fermentaciones. La importancia de este modo de cultivo se ve reflejada en el amplio uso en todos los campos de la biotecnología y en los reportes que continuamente son publicados sobre estrategias de alimentación, esquemas de control, y estudios de fisiología celular en cultivos alimentados. Usualmente, los cultivos de *E. coli* en lote alimentado, son operados a una baja tasa de dilución para evitar el sobreflujo metabólico mediante el control de la velocidad específica de consumo de glucosa a un valor bajo, a través de la adición controlada de glucosa (Eiteman y Altman, 2006). Sin embargo, algunos hallazgos recientes indican que una velocidad de crecimiento muy baja desata respuestas de tipo estrés en cultivos de *E. coli* (Ihssen y Egli, 2004). Por ejemplo, en cultivos de *E. coli* a bajas tasas de crecimiento (por debajo de 0.1 h^{-1}) puede existir liberación de endotoxinas (Svensson et al., 2005) lo que representa también una desventaja importante para la producción de vacunas y terapéuticos bajo dichas condiciones de cultivo.

Un problema inherente de los cultivos de gran escala alimentados es la presencia de gradientes ambientales, generalmente atribuidos a procesos de mezclado ineficientes en los biorreactores industriales (Lara et al., 2006a). Por ejemplo, a pesar de que se asume que la concentración de glucosa en el biorreactor permanece prácticamente en cero, las células están expuestas a regiones con concentraciones muy altas de sustrato en la zona de alimentación (Enfors et al., 2001). En contraste, en regiones distantes del punto de alimentación, las células pueden sufrir de serias limitaciones de sustrato (“hambruna”) (Lapin et al., 2006). En consecuencia, las células en reactores alimentados viajan continuamente de regiones con alta concentración de sustrato a regiones sin glucosa. Cuando las células circulan por regiones con alta concentración de glucosa, las células de *E. coli* incrementan su tasa de q_s y, a pesar de los cortos tiempos de exposición a esas regiones, el sobreflujo metabólico puede ser activado. En las regiones con alta concentración de glucosa, la respiración aerobia es incrementada inmediatamente, y esto puede crear zonas con limitaciones de oxígeno, lo que a su vez induce el metabolismo de fermentación ácido-mixta en *E. coli*. De acuerdo con esto, además de acetato, se ha observado la acumulación de lactato, y formato bajo condiciones ambientales oscilantes (Xu et al., 1999; Enfors et al., 2001; Sandoval et al., 2005; Lara et al., 2006b). Dichas desviaciones metabólicas causan efectos negativos importantes en la producción de proteína recombinante (ver sección 3.1.1), como los descritos en este trabajo. Se esperan pocas mejoras en los

procesos de mezclado en la gran escala durante los próximos años, por lo que parece que la presencia de gradientes de sustrato en los reactores alimentados difícilmente podrá ser evitada.

Estudios previos han demostrado que los problemas de la ingeniería del bioproceso pueden ser atacados mediante el uso de ingeniería metabólica. Tal es el caso del diseño de cepas de *E. coli* virtualmente insensibles a gradientes de oxígeno disuelto, como se describió la sección 3.2.1 de esta tesis. En el presente estudio, la presencia de gradientes de glucosa ha sido evitada mediante la adición de cantidades de glucosa muy elevadas desde el principio del cultivo, eliminando de esta manera la alimentación externa de sustrato. El problema preponderante de la acumulación de acetato fue superado mediante el empleo de una cepa con un sistema de transporte de sustrato modificado (De Anda et al., 2006). La acumulación de acetate en cultivos de W3110 y VH32 se vio incrementada con el incremento de la concentración inicial de glucosa. No obstante, la cantidad de acetato acumulado por VH32 fue tan solo de 2 g/L bajo la mayor concentración de glucosa, lo que significa únicamente un 15 % de la cantidad producida por W3110 bajo las mismas condiciones. En comparación con el sistema PTS nativo, que es inducible por glucosa, el transporte de glucosa a través de GalP en la cepa modificada es constitutivo. GalP internaliza la glucosa a una tasa más baja que PTS, ya que la máxima velocidad de transporte de glucosa por GalP es de $15.6 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{prot}}$, mientras que el PTS la transporta a una máxima velocidad de $126 \mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{prot}}$ (Gosset, 2005). De esta manera, W3110 transporta la glucosa por el sistema PTS virtualmente a su máxima capacidad a lo largo del cultivo, saturando el metabolismo de glucosa y la cadena respiratoria, como se explicó anteriormente. En contraste, el transporte de glucosa más lento en VH32, evidenciado por la menor velocidad específica de consumo de glucosa (ver fig. 3.20 a 3.22), mantiene un metabolismo más balanceado. El valor de q_s para cultivos de W3110 creciendo exponencialmente en cultivos por lote fue $0.49 \pm 0.06 \text{ g/g h}$, mientras que q_s para cultivos de VH32 fue $0.19 \pm 0.05 \text{ g/g h}$, lo que significa que el consumo de glucosa por VH32 fue alrededor de 61 % menor que el de su cepa progenitora. En la figura 3.13 se ilustró la producción de acetato a partir de acetyl-CoA, sin embargo, el acetato puede también ser producido a partir de piruvato por acción de la piruvato (PoxB). Esta enzima es controlada transcripcionalmente por RpoS, el factor transcripcional de respuesta a estrés global (Chang et al., 1994). Entonces, es probable que si las células estuvieran estresadas en condiciones de alta concentración de sustrato, parte del acetato generado estuviera originado por respuestas de estrés además de sobreflujo metabólico (Flores et al., 2004, 2005).

En la literatura, las concentraciones celulares con las que se denomina a un cultivo como de “alta densidad celular” varían desde 25 hasta más de 120 g/L de biomasa seca. De acuerdo con esto, los cultivos de VH32 a concentraciones iniciales de glucosa de 50 y 100 g/L presentados aquí, pueden ser referidos como de alta densidad celular. Los valores de concentración de biomasa presentados en este trabajo, representan, hasta donde tenemos conocimiento, las mayores concentraciones de biomasa alcanzadas para un cultivo por lote de *E. coli* productora de proteína recombinante. Basados en los datos recientemente compilados (Choi, et al., 2006), la concentración máxima de GFP producida por VH32 (8.29 g/L) compara muy favorablemente con cultivos alimentados de *E. coli* para la producción de proteína heteróloga. Hasta donde se sabe, la concentración inicial de 100 g/L de glucosa es la más alta empleada para cultivos de aplicación práctica de *E. coli*. Otros autores han empleado concentraciones de fuente de carbono tan altas como 50 g/L. Específicamente, se ha reportado (Voss et al., 2004) la producción de ADN plasmídico para aplicaciones biofarmacéuticas por *E. coli* DH5 α en un medio conteniendo 50 g/L de glicerol. Dichos autores reportaron la producción de cerca de 27 g/L de biomasa, pero no reportaron la producción de acetato. Por otra parte, Phue et al. (2005) reportaron el cultivo de *E. coli* JM109 y BL21 en procesos por lote con una concentración de glucosa de 40 g/L, con fines de estudios fisiológicos. Bajo estas condiciones, el acetato se acumuló hasta 11 y 3.7 g/L, y la densidad óptica máxima alcanzada (a 600 nm) fue de 35 y 63.6 para JM109 y BL21, respectivamente. No se reportaron datos de la concentración de biomasa, y las cepas no expresaban producto heterólogo ni portaban plásmidos externos. Como se mostró anteriormente, la cantidad de sustrato empleada y las concentraciones de biomasa alcanzadas fueron mucho mayores en el presente estudio. Más aún, la cepa VH32 cultivada con 100 g/L de glucosa inicial, produjo menos acetato que la cepa BL21 crecida con 40 g/L de glucosa. Es interesante remarcar que BL21 es una cepa bien conocida por su capacidad de acumular bajas cantidades de acetato, y es ampliamente utilizada para la expresión de proteína heteróloga.

Un área importante para mejorar el desempeño de VH32 es perfeccionar la composición del medio de cultivo, en particular la concentración de las sales y el extracto de levadura. Comparado con los cultivos a 30 g/L de glucosa inicial, la velocidad específica de crecimiento cayó en un 25 % en ambas cepas cuando la concentración inicial de glucosa fue 100 g/L (fig. 3.23). Existen varios factores que pueden afectar la velocidad de crecimiento bajo las condiciones evaluadas. La glucosa puede inhibir el crecimiento de *E. coli* a concentraciones mayores de 50 g/L (Shiloach y Fass, 2005). Es entonces

razonable pensar que la elevada cantidad de glucosa empleada en este trabajo puede ser uno de los factores que afectan los cultivos a 50 y 100 g/L de glucosa.

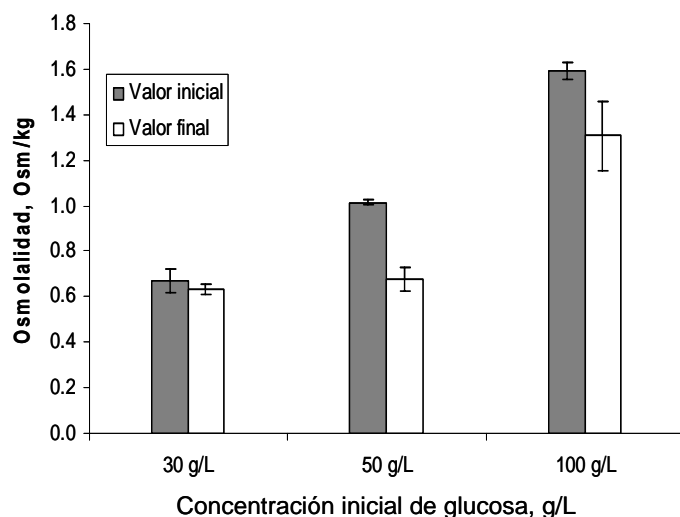


Figura 3.25. Osmolalidad de los medios empleados, al inicio y final del cultivo. Las barras de error representan la diferencia entre mediciones de dos cultivos.

Por otra parte, el extracto de levadura, que contiene una mezcla compleja de nutrientes, también fue utilizado a concentraciones inusualmente altas (hasta 50 g/L). Es posible también que uno o varios de los nutrientes presentes en el extracto de levadura causaran inhibición del crecimiento. Una característica relevante de los medios de cultivo formulados para el presente trabajo, es su alta osmolalidad, debido a la cantidad de nutrientes incluida. La fig. 3.25 muestra la osmolalidad de los medios empleados, al inicio del cultivo y al final del mismo (luego de que la glucosa fuera agotada). La osmolalidad de los cultivos fue alta, alcanzando valores de hasta 1.6 Osm/kg en el medio más concentrado. Cayley y Record (2003) reportaron una fuerte reducción en la velocidad específica de crecimiento a valores de osmolalidad superiores 0.5 OsM, comparados con los valores obtenidos a una osmolalidad de 0.3 OsM. En un medio mineral, encontraron que el crecimiento se aproximaba a cero cuando la osmolalidad alcanzaba valores de 1.8 OsM. En medio LB, el crecimiento se aproximaba a cero cuando la osmolalidad era de 3.1 OsM.

Con base en estos datos, la alta osmolalidad de los medios con altas concentraciones de glucosa, podrían ser una causa de la reducción de velocidad de crecimiento observada. Esta osmolalidad puede ser optimizada con una adecuada reformulación y evaluación del medio de cultivo. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de VH32 con 100 g/L de glucosa inicial (0.47 h^{-1}) fue mucho mayor que las velocidades de crecimiento usualmente empleadas en cultivos alimentados, que puede ser tan baja como 0.05 h^{-1} (Svenson et al., 2005). A pesar de ello, VH32 acumuló bajas cantidades de acetato y mantuvo altos niveles de producción de GFP.

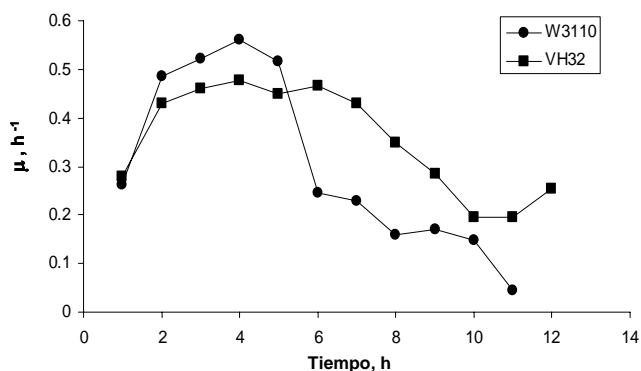


Figura 3.26. Velocidades de crecimiento de W3110 y VH32 en cultivos con una concentración inicial de glucosa de 100 g/L.

Como se muestra en la fig. 3.23, la velocidad de crecimiento de VH32 (en fase exponencial) fue ligeramente menor que la de W3110 en las diferentes condiciones evaluadas. Sin embargo, como se ilustra en la fig. 3.26 para una concentración inicial de glucosa de 100 g/L, la velocidad de crecimiento de VH32 fue mayor que la de W3110 en buena parte del cultivo. Específicamente, la velocidad de crecimiento de W3110 fue en promedio 0.52 h^{-1} durante las primeras 5 h de cultivo, pero posteriormente disminuyó en forma progresiva hasta un valor de 0.04 h^{-1} a las 11 h de cultivo (fig. 3.26). En contraste, la velocidad de crecimiento de VH32 fue casi constante durante las primeras 7 h de cultivo (fig. 3.26). A partir de entonces, hubo una disminución en la velocidad de crecimiento, pero sólo hasta un valor mínimo de 0.2 h^{-1} . Una posible razón para la importante disminución de velocidad de crecimiento de W3110 comparado con VH32 puede ser la alta acumulación de acetato en los cultivos de la cepa progenitora. Luli y Strohl (1990) observaron una fuerte inhibición del crecimiento de *E. coli* cuando el acetato se acumulaba a concentraciones mayores de 5 g/L, lo cual corresponde a una concentración de la forma protonada de cerca de 30 mg/L a pH de 7.0. Como se observa en la fig. 3.26, después de 5 h de cultivo de W3110 a altas concentraciones de glucosa, la concentración de acetato alcanzó niveles cercanos a los 5 g/L. Después de este punto, se observó la caída en velocidad de crecimiento (fig. 3.22). La máxima concentración de acetato acumulado por VH32 cultivada con 100 g/L de glucosa inicial fue 2 g/L, y fue reasimilado después de 5 h de cultivo. Ya que no se espera una fuerte inhibición debida al acetato bajo estas condiciones, la caída en velocidad de crecimiento de VH32 puede deberse a agotamiento de algún nutriente en el medio (v. gr., alguno presente en el extracto de levadura), o a respuestas de estrés como la sobre expresión de RpoS, que es inducida a altas densidades celulares (Liu et al., 2000), y que disminuye la velocidad de crecimiento. Es posible que un mayor valor del coeficiente de mantenimiento (para mantener la osmolalidad intracelular constante) pudiera ser también una causa en la reducción de los

rendimientos observada. A pesar de ello, el rendimiento $Y_{X/S}$ de VH32 cultivada a 100 g/L de glucosa fue similar que el de W3110 a 30 g/L de glucosa, lo que demuestra el desempeño superior de la cepa VH32 aún comparado con cultivos de W3110 a baja concentración de glucosa.

Los valores de q_s para W3110 se incrementaron de 1.39 a 1.98 g/ g h durante la fase de crecimiento exponencial a las concentraciones de glucosa de 30 y 100 g/L. Dichos valores de q_s están por encima de los valores umbrales reportados para la producción aerobia de acetato en quimiostatos de *E. coli* TG1 (0.64 g/g h) y MG1655 (0.8 g/g h) (Kayser et al., 2005; Vemuri et al., 2006). En contraste, los valores de q_s para VH32 se incrementaron de 0.47 hasta 0.76 g/g h. Este último valor, en cultivos de VH32 con 100 g/L de glucosa inicial, es muy cercano a los valores umbrales mencionados, lo que puede explicar parcialmente la acumulación de acetato observada.

Se ha demostrado que la concentración intracelular de fosfoenol piruvato (PEP) disminuye de manera importante al incrementarse q_s , mientras que la concentración de piruvato se incrementa (Vemuri et al., 2006). Ello ha sido atribuido al acoplamiento de la transferencia de una molécula de fosfato del PEP a la glucosa en el transporte mediado por PTS. El PEP es un intermediario importante en procesos metabólicos, como la síntesis de aminoácidos aromáticos (Gosset, 2005). En la cepa VH32 el PEP no es consumido durante el transporte de glucosa. Por lo tanto puede suponerse que la concentración intracelular de PEP sea menos dependiente de q_s , lo que a su vez provocaría una mayor disponibilidad de PEP para rutas de síntesis, como la producción de biomasa y GFP. Se ha reportado también que genes del CAT son reprimidos al aumentar q_s . Debido al bajo valor de q_s de VH32 se puede esperar una transcripción más activa de genes de CAT, con el posible resultado de una mayor producción de energía.

Para evaluar el desempeño de cultivos por lote y lote alimentado de W3110 en comparación con cultivos por lote de VH32, los principales parámetros cinéticos y estequiométricos fueron determinados y se resumen en la tabla 3.3. Se observó una reducción de hasta 14% en $Y_{GFP/S}$ a medida que se incrementó la concentración inicial de glucosa, mientras que $Y_{GFP/X}$ permaneció aproximadamente constante. Aunque la velocidad global de producción de GFP disminuyó para VH32, la productividad global incrementó para ambas cepas, debido al efecto incremental de producción de GFP durante las últimas horas adicionales del cultivo al aumentar la cantidad inicial

de glucosa. Dicho incremento fue mayor para la cepa VH32. Los rendimientos de producción de GFP ($Y_{GFP/S}$ y $Y_{GFP/X}$) en cultivos de VH32 a 100 g/L de glucosa fueron entre 25 y 41% menores comparados con los obtenidos en cultivo por lote alimentado de W3110. Sin embargo, la velocidad específica de producción de GFP fue 44 % mayor para VH32. Un resultado importante es que la productividad global fue solo 18 % menor para cultivos por lote de VH32 a 100 g/L de glucosa inicial, comparados con los cultivos por lote alimentado de W3110.

El cultivo por lote de VH32 podría ser preferido sobre el cultivo alimentado de W3110, debido a procedimientos operacionales más sencillos, que reducen el riesgo de fallas y a que se requieren menos equipo y menores tiempos de proceso para cada lote de producción. Los efectos observados debido al incremento de la concentración de nutrientes en el medio pueden ser superados, al menos parcialmente, mediante optimización del medio de cultivo y modificaciones celulares adicionales.

3.2.2.5 Conclusiones parciales.

Fue posible alcanzar altas densidades celulares en cultivos por lote empleando una alta concentración inicial de glucosa y una cepa de *E. coli* modificada en el sistema de transporte de sustrato. Las concentraciones máximas de biomasa (52 g/L) y GFP (8.29 g/L) logradas representan las más altas reportadas para cultivos por lote de *E. coli* expresando proteína heteróloga. Estos resultados fueron posibles debido a una eficiente prevención del sobreflujo metabólico en la cepa modificada, con la consecuente reducción en acumulación de acetato. Este simple modo de cultivo, puede ser una opción viable a los cultivos alimentados limitados por glucosa, y evitan los problemas inherentes a estos procesos en la gran escala, como los gradientes de glucosa, cuyos efectos negativos han sido descritos en capítulos anteriores. Existen todavía oportunidades de mejora para los cultivos de VH32 con altas concentraciones de sustrato. Se requiere un análisis detallado de la fisiología de *E. coli* bajo estas condiciones para entender el origen de los efectos observados y proponer soluciones desde la perspectiva de proceso o de ingeniería celular.

Tabla 3.3. Parámetros relevantes para comparar los cultivos por lote con alta concentración inicial de glucosa con un cultivo por lote alimentado.

Parámetro (unidades)	W3110				VH32		
	30 g/L ^{†a}	50 g/L ^{†a}	100 g/L ^{†a}	Fed-batch (250 g/L de glucosa total)	30 ^{†a} g/L	50 ^{†a} g/L	100 ^{†a} g/L
Tiempo de cultivo (h)	8	9	11	30	9	10	12
Conc. máx. de biomasa (g/L)	17.65 ± 0.10	24 ± 1.47	33.9 ± 0.06	91.67 ± 5	20.25 ± 0.5	28.57 ± 0.73	52.1 ± 0.5
Conc. máx. de GFP (g/L)	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2	3.94 ± 0.5	24.95 ± 1.8	3.3 ± 0.2	4.87 ± 0.08	8.29 ± 0.37
Conc. máx. de acet. (g/L)	3.96 ± 0.2	12.09 ± 0.73	13.56 ± 0.36	2.0 ± 0.15	0.15 ± 9x10 ⁻⁴	0.55 ± 0.2	2.08 ± 0.22
Y _{GFP/S} (g g ⁻¹)	0.049 ± 0.003	0.039 ± 0.002	0.037 ± 0.005	0.106 ± 0.01	0.105 ± 0.005	0.092 ± 0.004	0.080 ± 0.002
Y _{GFP/X} (g g ⁻¹)	0.091 ± 0.003	0.090 ± 0.004	0.110 ± 0.013	0.274 ± 0.03	0.162 ± 0.006	0.168 ± 0.013	0.160 ± 0.008
q _{GFP} (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.011 ± 4x10 ⁻⁴	0.009 ± 4x10 ⁻⁵	0.010 ± 0.001	0.009 ± 4x10 ⁻⁴	0.018 ± 7x10 ⁻³	0.017 ± 4x10 ⁻⁴	0.013 ± 6x10 ⁻⁴
Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.194 ± 0.008	0.224 ± 0.003	0.342 ± 0.051	0.826 ± 0.08	0.351 ± 0.022	0.454 ± 0.015	0.676 ± 0.027

^{†a}: Denota la concentración inicial de glucosa en cultivos por lote.

b: ± se refiere al error entre cultivos por duplicado

4. Conclusiones.

En el presente trabajo, se presentaron estudios que integraron fundamentos de escalamiento descendente y herramientas modernas de análisis fisiológico para investigar la respuesta celular a fluctuaciones ambientales que pueden ocurrir en biorreactores industriales. Se abordaron dos de los más importantes parámetros que pueden presentar gradientes en cultivos industriales: la concentración de glucosa y la TOD.

En ambos casos, se observó que *E. coli* puede responder rápidamente a periodos anaerobios intermitentes, mediante el reajuste de sus niveles transcripcionales y redireccionamiento de flujos de carbono hacia vías fermentativas. Esta bacteria también respondió a perturbaciones en concentración de sustrato en menos de 5 s canalizando carbono hacia ácidos orgánicos.

Los resultados presentados, dejan claro que los gradientes típicos de biorreactores industriales tienen un efecto tanto a nivel transcripcional como de inducción de enzimas de vías anaerobias preexistentes en las células, redireccionando los flujos de carbono.

La información generada es valiosa, sin embargo, queda mucho por hacer para obtener modelos y mecanismos que permitan resolver ecuaciones como la 1.4 (página 18), basados en un acoplamiento de la dinámica de los fluidos y la fisiología microbiana en biorreactores. Esta meta final, será la que llevará a un diseño completamente racional de biorreactores y a un escalamiento exitoso de los mismos.

Basados en la información obtenida en los estudios de escalamiento descendente, se construyeron cepas mutantes con una menor sensibilidad a gradientes de TOD, y fueron evaluadas nuevamente en el SED, mostrando un desempeño superior al de su cepa progenitora cuando expresaron proteína recombinante.

Se planteó además, cultivar una cepa de *E. coli* modificada en el sistema de transporte de sustrato, bajo altas concentraciones de glucosa. Este modo de cultivo permitió obtener altas densidades celulares, con un buen desempeño de la cepa produciendo proteína heteróloga, debido a que la cepa modificada presentó un muy bajo nivel de sobreflujo metabólico, lo cual

se infiere de la baja acumulación de acetato, comparada con su cepa progenitora. El uso de esta estrategia podría suprimir la necesidad de alimentar glucosa a los cultivos (modo lote alimentado), y con ello suprimir los gradientes de sustrato presentes en la gran escala.

El presente trabajo representa un ejemplo único en la integración de la ingeniería de biorreactores, ingeniería metabólica y fisiología celular para obtener cepas con un comportamiento más robusto ante estreses relacionados a la escala de producción.

5. Perspectivas.

Se contemplan tres factores que serán fundamentales para comprender la fisiología de las células expuestas a gradientes ambientales. El primero es la habilidad de analizar y modelar los complejos fenómenos hidrodinámicos que ocurren en los biorreactores agitados de escala industrial. En este campo, los avances en la dinámica de fluidos computacional y métodos simplificados derivados, así como computadoras cada vez más poderosas, llevarán a una mejor representación de las características del mezclado.

El segundo factor, es el desarrollo de nuevos métodos robustos para analizar la respuesta celular en células individuales o en poblaciones. Las tecnologías para análisis global de respuestas fisiológicas representan una herramienta poderosa para estudiar los cambios fisiológicos bajo ambientes fluctuantes, abarcando desde la expresión genética hasta la dinámica de metabolitos intracelulares. La citometría de flujo ha sido útil para monitorear las respuestas a nivel poblacional estudiando características como permeabilidad y polaridad de membrana como indicadores de viabilidad celular. En la medida en que la sensibilidad y precisión de dicho método mejore, su aplicación al estudio de cultivos bajo ambientes oscilantes, y su acoplamiento a biorreactores generará información valiosa.

Un tercer factor de importancia es la capacidad de simular mejor los gradientes ambientales presentes en los biorreactores de gran escala, en sistemas de laboratorio, es decir, el diseño de mejores modelos de escalamiento descendente. Hasta ahora, se han empleado sólo dos modelos de escalamiento descendente: configuraciones de uno y dos compartimentos. Si bien

estos sistemas han demostrado ser útiles, también tienen deficiencias. La configuración STR-STR, simula cambios ambientales escalonados, que no corresponden exactamente a los perfiles graduales de variación esperados en un biorreactor. Estos cambios graduales pueden simularse mejor en una configuración STR-PFR. Sin embargo, este sistema tiene la desventaja de que no se controlan los parámetros ambientales, por lo que no se ha logrado mantener un perfil predeterminado de variaciones ambientales. Aunque la sección del PFR podría estar bien instrumentada, hasta ahora no hay reportes en los que se muestren, por ejemplo, los perfiles de CO₂ disuelto o pH en el PFR. En este campo, el desarrollo de sistemas de cultivo miniaturizados, instrumentados y automatizados, pueden ser de importante aplicación. La miniaturización de biorreactores es un tema que ha captado interés en los últimos años, y que podría facilitar el diseño de sistemas de escalamiento descendente multicompartimento, que simulen de manera precisa el tránsito de las células a través de una serie de condiciones ambientales bien definidas.

Se requieren sistemas de escalamiento descendente para simular gradientes de pH a lo largo de los cultivos, sin la adición de agentes que incrementen la osmolalidad o la concentración de sales del sistema. En el caso de gradientes de TOD, se ha puesto muy poca atención al efecto de exposición de las células a regiones con una alta TOD, como la que podría ocurrir en cultivos a los que se introduce aire enriquecido con oxígeno. Otros gradientes ambientales, como la variación espacial de CO₂ y temperatura, no han sido estudiados.

Estudios fisiológicos de la respuesta celular a un nivel más detallado a condiciones de la gran escala, pueden ser la base para modificaciones celulares conducentes a un mejor desempeño celular. Los resultados de esta tesis han demostrado la utilidad de dicho enfoque.

Las perspectivas directas surgidas del presente trabajo son amplias. El sistema STR-mini PFR puede ser apropiado para evaluar no sólo la dinámica de metabolismo de fermentación, sino también los cambios en el metaboloma y la respuesta transcripcional de las células a perturbaciones en muy cortas ventanas de tiempo, y entender mejor lo que ocurre en un biorreactor. Particularmente, sería de interés caracterizar cultivos de *E. coli* recombinante bajo condiciones aerobias, con la finalidad de determinar el grado de desviación hacia anaerobiosis que existe bajo oscilaciones de TOD. Un estudio más profundo de los

mecanismos que permiten a las cepas mutantes exhibir una menor sensibilidad a gradientes de TOD, puede dar pauta a posteriores modificaciones celulares.

En el caso particular de la cepa VAL24, una evaluación de los límites de sensibilidad a periodos anaerobios durante su cultivo, pueden marcar la pauta para establecer nuevos y más eficientes modos operación de biorreactores con esta cepa.

Los cultivos en lote con elevadas concentraciones iniciales de glucosa, son una interesante área en la que se puede explorar la producción de otro tipo de biomoléculas y la optimización del medio de cultivo. Esta estrategia puede tener una importante aplicación práctica.

Producción científica.

Publicaciones derivadas de la presente tesis.

En el artículo 1 se presentó una revisión (por invitación) del estado del arte del escalamiento descendente, abarcando estudios en microorganismos, células animales y vegetales. En el artículo 2 se presentan los resultados del análisis fisiológico de *E. coli* bajo oscilaciones de TOD, que sirvió de base para la construcción de cepas con mejor desempeño bajo estas condiciones, resultados publicados en el artículo 3. El artículo 4 (en preparación) mostrará las respuestas del metabolismo de fermentación de *E. coli* ante gradientes de sustrato combinados con anaerobiosis. El artículo 5 reportó la construcción y el uso de una cepa de *E. coli* modificada en el sistema de transporte de sustrato, y que sirvió como base par el planteamiento de cultivos de dicha cepa bajo altas concentraciones iniciales de sustrato, reportados en el artículo 6 (en prensa).

1) **Lara AR**, Galindo E, Palomares AL, Ramírez OT. 2006. Living with heterogeneous bioreactors: Understanding the effect of environmental gradients in cells. *Mol Biotechnol.* 34: 355-381.

2) **Lara AR**, Leal LI, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez, OT. 2006. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng.* 93: 373-385.

3) **Lara AR**, Vázquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT. 2006. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce by-product formation during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 94: 1164-1175.

4) **Lara AR**, Taymaz H, van Winden W, Ramírez OT, Heijnen JJ. Dynamic response of *Escherichia coli* fermentation metabolism to aerobic and anaerobic glucose pulses. En preparación.

5) De Anda R, **Lara AR**, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng.* 8: 281-290.

6) **Lara AR**, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* En prensa.

Patentes sometidas.

Lara AR, Vázquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT. 2006. Estrategia para generar células insensibles a condiciones heterogéneas en biorreactores a través de mutaciones de vías metabólicas anaerobias. México. Folio: PA/E/2006/042394.

Presentaciones Orales.

AR Lara, L Caspeta, G Gosset, F Bolívar y OT Ramírez. Cultivo de *Escherichia coli* modificada en el transporte de sustrato a altas concentraciones iniciales de glucosa: una alternativa al cultivo alimentado para la producción de proteína recombinante. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, México. Junio 25-29 de 2007.

AR Lara, L Leal, C Vázquez, N Flores, G Gosset, F Bolívar, A López-Munguía, OT Ramírez. Gradientes de oxígeno disuelto en Biorreactores: respuestas metabólicas y transcripcionales de *Escherichia coli* recombinante y diseño de cepas con un mejor desempeño ante oscilaciones ambientales. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México. Septiembre 18-23 de 2005.

AR Lara, L Leal, N Flores, F Bolívar, OT Ramírez. Transcriptional analysis of recombinant *E. coli* metabolic responses to DOT spatial variations in bioreactors: a scale-down study. The 229th American Chemical Society National Meeting. San Diego, EUA. Marzo 13-17 de 2005.

AR Lara, L Leal, F Bolívar, OT Ramírez. Análisis transcripcional de la respuesta metabólica de *Escherichia coli* recombinante ante oscilaciones de oxígeno disuelto en biorreactores. XXV Congreso Nacional de Bioquímica. Ixtapa-Zihuatanejo, México, 2004.

Presentaciones en Cartel.

AR Lara, Gosset G, Bolívar F, Ramírez, OT. Engineering and molecular approaches to study and contend with problems inherent to scale-up of r-*E. coli* cultures. Biochemical Engineering XV. Quebec City, Canadá. Julio 15-19 de 2007.

AR Lara, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Culture of engineered *Escherichia coli* at high initial glucose concentration: an alternative to fed-batch cultures for recombinant protein production. Biochemical Engineering XV. Quebec City, Canadá. Julio 15-19 de 2007.

AR Lara, C Vázquez-Limón, A López-Munguía, G Gosset, F Bolívar, OT Ramírez. Metabolic Engineering strategies to reduce by-product synthesis and improve process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production under aerobic and transient intermittent anaerobic conditions. Metabolic Engineering VI, Países Bajos. Octubre 1-5 de 2006.

AR Lara, C Vázquez-Limón, A López-Munguía, OT Ramírez. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and overcome by-product formation during recombinant protein production under oscillating DOT conditions. Biochemical Engineering XIV. Vancouver, Canadá. Julio 10-14 de 2005.

AR Lara, L Leal, N Flores, F Bolívar, OT Ramírez. Transcriptional responses of recombinant *Escherichia coli* to spatial DOT gradients simulated in a two-compartment scale-down system. Biochemical Engineering XIV. Vancouver, Canada. July 10-14, 2005.

V Hernández, R de Anda, **AR Lara**, F Bolívar, OT Ramírez. Inactivation of the phosphotransferase system (PTS) in *E. coli* results in decreased metabolic waste of glucose to acetate and increased heterologous protein productivity without impairment of growth

characteristics. The 229th American Chemical Society National Meeting. San Diego, California, EUA. Marzo 13-17 de 2005.

Reconocimientos:

Premio HyClone-Uniparts-Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería al mejor protocolo de investigación a nivel maestría. Septiembre de 2003

Nomenclatura.

C_{CO_2S}	: Concentración de CO_2 en el gas de salida	[%]
C_{CO_2E}	: Concentración de CO_2 en el gas de entrada	[%]
C_{O_2E}	: Concentración de oxígeno en el gas de entrada	[%]
C_{O_2S}	: Concentración de oxígeno en el gas de salida	[%]
CER	: Velocidad volumétrica de generación de CO_2	[mmol / L h]
D	: Tasa de dilución	[h^{-1}]
F	: Flujo de alimentación de la solución de glucosa	[L / h]
GFP	: Concentración de GFP	[g / L]
IC	: Carbono inorgánico	[g / L]
k_{La}	: Coeficiente volumétrico de transferencia de masa	[h^{-1}]
N	: Velocidad de agitación	[rpm]
OC	: Carbono orgánico	[g / L]
OUR	: Velocidad volumétrica de consumo de oxígeno	[mmol / L h]
P	: Potencia	[Watt]
Q	: Flujo volumétrico de gas de salida	[L / h]
Q_i	: Capacidad de bombeo de los impulsores	[m^3 / s]
q_{AO}	: Velocidad específica de producción de ácido orgánico	[g / g h]
q_{AV}	: Vector de velocidades de reacción promedio	[g / g h]
q_{CO_2}	: Velocidad específica de producción de CO_2	[mmol / g h]
q_{GFP}	: Velocidad específica de producción de GFP	[g / g h]
q_{O_2}	: Velocidad específica de consumo de oxígeno	[mmol / g h]
q_S	: Velocidad específica de consumo de sustrato	[g / g h]
R	: Constante estándar de gases	= 22.4 [L / mol]
RQ	: Cociente respiratorio	[mol CO_2 / mol O_2]

S:	Concentración de glucosa	[g / L]
t:	Tiempo	[h, s]
t _c :	Tiempo de circulación	[s]
t _m :	Tiempo de mezclado	[s]
T:	Temperatura	[°C]
TOC:	Carbono orgánico total	[g / L]
TOD:	Tensión de oxígeno disuelto	[%]
U _T :	Velocidad en la punta del impulsor	[m / s]
V:	Volumen	[L]
vvm:	Flujo volumétrico de gas por volumen de medio	[L / L min]
X:	Concentración de biomasa	[g / L]
Y _{X/S} :	Rendimiento de biomasa en base a sustrato	[g / g]
Y _{GFP/S} :	Rendimiento de GFP en base a sustrato	[g / g]
μ:	Velocidad específica de crecimiento	[h ⁻¹]

Abreviaturas.

ATP:	Trisfosfato de adenosina
ADH:	Alcohol deshidrogenasa
CAT:	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
cADN:	Ácido desoxirribonucleico complementario (una cadena)
CFD:	Dinámica de fluidos computacional
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG:	Isopropil tiogalacto piranosido
mARN:	Ácido ribonucleico mensajero
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFL:	Piruvato formato liasa
PFR:	Reactor de flujo pistón

PTS : Sistema de transporte de carbohidrato: fosfotransferasa

SED: Sistema de Escalamiento Descendente

STR : Reactor de tanque agitado

Lista de los genes estudiados.

Gene	Producto de traducción
<i>aceA</i>	Monómero de isocitrato liasa
<i>acKA</i>	Acetato cinasa A
<i>adhE</i>	Alcohol deshidrogenasa
<i>arcA, arcB</i>	Proteínas ARC (Control de respiración aerobia)
<i>cydA</i>	Citocromo d ubiquinol oxidasa
<i>cyoB</i>	Citocromo o ubiquinol oxidasa
<i>fdhF</i>	Seleno-polipéptido subunidad de la formato deshidrogenasa H
<i>fnr</i>	Fumarato-nitrato reductasa
<i>frdD</i>	Fumarato reductasa
<i>fumA</i>	Fumarasa A
<i>fumB</i>	Fumarasa B
<i>ldhA</i>	D-Lactato deshidrogenasa
<i>pflD</i>	Piruvato-formato liasa II
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa
<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa
<i>sodA</i>	Superóxido dismutasa (Mn)
<i>sucA, sucB</i>	2-cetoglutarato deshidrogenasa subunidades E1 y E2
<i>luxS</i>	Proteína LuxS
<i>gfp</i>	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP)

Referencias.

- Alexeeva S, de Kort B, Sawers G, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos, MJ. 2000. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 182: 4934-4940.
- Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR. 2001. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. Microbiology 147:1483–1498.
- Amanullah A, Emery AN, Nienow A. 1992. The effects of dissolved oxygen cycling on the biological performance of a culture of *Bacillus subtilis*. The 1992 IChemE Research Event, Birmingham, UK. p 10-12.
- Amanullah A, McFarlane C, Emery AN, Nienow A. 2001. Scale down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. Biotechnol Bioeng 73: 309-399.
- Amanullah A, Buckland BC, Nienow A. 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries. In Handbook of industrial mixing: Science and practice, Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM (eds) pp 1071-1170. New York: John Wiley & Sons.
- Anderson C, LeGrys GA, Solomons GL. Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. 1982. The Chemical Engineer. February: 43-49.
- Bauer K, Bassat AB, Dawson M, Puente VTDL, Neway JO. 1990. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. Appl Environ Microbiol 56: 1296–1302.
- Bremer H, Dennis PP. 1996. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, Neidhardt FC (ed) pp 1553-1569. ASM Press. Washington, DC.
- Bylund F, Collet E, Enfors S, Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. Bioprocess Eng. 18: 171-180.
- Bylund F, Guillard F, Enfors S, Trägårdh C, Larsson G. 1999. Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. Bioprocess Eng. 18: 377-389.
- Bylund F, Castan A, Mikkola R, Veide A, Larsson G. 2000. Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. Biotechnol Bioeng. 69: 119-128.
- Carlson R, Srienc F. 2004. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: creation of overall flux states. Biotechnol Bioeng. 86: 149-162.

- Castan A, Enfors S-O. 2002. Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 77: 324-328.
- Castan A, Näsman A, Enfors S-O. 2002. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and human growth hormone. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 847-854.
- Causey TB, Shanmubam KT, Yomano LP, Ingram LO. 2004. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proc Nat Acad Sci USA* 101:2235–2240.
- Cayley S, Record, T. 2003. Roles of cytoplasmic osmolytes, water, and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine. *Biochemistry.* 42: 12596-12609.
- Chang YY, Wang YY, Cronan JE. 1994. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol Microbiol.* 11: 1019-1028.
- Choi JH, Keum KC, Lee SY. 2006. Production of recombinant protein by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci.* 61: 876-885.
- Clark, DP. 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 63, 223-234.
- Clark D, Cronan JE. 1996. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. Neidhardt FC (ed) pp 358-379. American Society for Microbiology Press. Washington, DC.
- Cronan JE, Laporte D. 1996. Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular Biology, Neidhardt FC (ed) pp 206-216. ASM Press. Washington, DC.
- Datsenko KA, Wanner BA. 2000. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 97: 6640-6645.
- De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng.* 8: 281-290.
- De León A, Hernández V, Galindo E, Ramírez OT. 2003. Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase. *Enzyme Microb Technol.* 33: 689 - 697.
- De Lisa MP, Valdes JJ, Bentley WE. 2001. Quorum signaling via AI-2 communicates the "metabolic burden" associated with heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 75: 439-450.
- Delgado J, Liao JC. 1997. Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 13: 361-367.
- Díaz-Ricci, Regan L, Bailey JE. 1991. Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 38: 1318-1324.

- Dittrich CR, Vadali RV, Bennet GN, San KY. 2005a. Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ack-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate. *Biotechnol Prog.* 21: 627-631.
- Dittrich CR, Bennet GN, San KY. 2005b. Characterization of the acetate producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 21:1062–1067.
- Doran PM. *Bioprocess engineering principles*. 1998. Academic Press. San Diego, CA.
- Eiteman MA, Altman E. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.* 24: 530-536.
- Enfors S, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noissomit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol.* 85: 175-185.
- Farmer WR, Liao JC. 1997. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3205-3210.
- Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F. 2004. The role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems. *J Mol Microb Biotechnol.* 8: 209-221.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G Bolívar, F. 2005. Adaptation for fast growth by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng.* 7: 70-87.
- Gennis RB, Stewart V. 1996. Respiration. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhiparium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt FC (ed) pp 217-261. American Society for Microbiology Press: Washington, DC
- Georgellis D, Barlow T, Arvidson S, von Gabain A. 1993. Retarded RNA turnover in *Escherichia coli*: a means of maintaining gene expression during anaerobiosis. *Mol Microbiol.* 9: 375-381.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC. 2001. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* 292(5525):2314–2316.
- Gosset G. 2005. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb. Cell Factories.* 4:14.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Valle F, Gosset G. 2003. Expression of *galP* and *glk* in an *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 687-694.

- Hewitt C, Caron G, Axelsson B, McFarlane C, Nienow A. 2000. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol Bioeng.* 70: 381-39.
- Huisman GW, Kolter R. 1994. Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science* 265: 537-539.
- Ihssen J, Egli T. 2004. Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 150: 1637-1648.
- Jensen, E.B., Carlsen, S., 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1–11.
- Kabir MM, Ho PY, Shimizu K. 2005. Effect of *ldhA* gene deletion on the metabolism of *Escherichia coli* based on gene expression, enzyme activities, intracellular metabolite concentrations, and metabolic flux distributions. *Biochem Eng J.* 26: 1–11.
- Kayser A, Weber J, Hecht V, Rinas U. 2005. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiol.* 151: 693-703.
- King T, Ferenci T. 2005. Divergent roles of RpoS of *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol Lett.* 244:323–327.
- Koh, B.T., Nakashimada, U., Pfeiffer, M., Yap, M.G.S., 1992. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *Escherichia coli* K-12 strains. *Biotechnol. Lett.* 14: 1115–1118.
- Konz JO, King J, Cooney CL. 1998. Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnol Prog.* 14: 393-409.
- Kushner SR. 2002. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol.* 184: 4658-4665.
- Lapin A, Schmid J, Reuss M. 2006. Modeling the dynamics of *E. coli* populations in the three-dimensional turbulent field of a stirred-tank bioreactor- A structured-segregated approach. *Chem Eng Sci.* 61: 4783-4797.
- Lara AR, Leal LI, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez, OT. 2006 a. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng.* 93: 373-385.
- Lara AR, Vázquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, Ramírez OT. 2006b. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce by-product formation

- during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 94: 1164-1175.
- Lara AR, Galindo E, Palomares AL, Ramírez OT. 2006c. Living with heterogeneous bioreactors: Understanding the effect of environmental gradients in cells. *Mol Biotechnol.* 34: 355-381.
- Larsson G, Törnkvist M, Stahl-Wernersson E, Trägårdh C, Noorman H, Enfors S-O. 1996. Substrate gradients in fed-batch bioreactors: origin and consequences. *Bioprocess Eng.* 14: 281-289.
- Lee, S.Y., 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14, 98–105.
- Lin HY, Neubauer P. 2000. Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 79: 27-37.
- Linch AS, Lin ECC. 1996. Responses to molecular oxygen. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular Biology, Neidhardt FC (ed) pp 206-216. ASM Press. Washington, DC
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Liu X, Ng C, Ferenci T. 2000. Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J Bacteriol.* 181: 4158-4164.
- Luli GW, Strohl WR. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1004-1001.
- Luyben KChAM. Regime analysis for the scale-down of biotechnological processes. En: Proceedings of the international symposium on bioreactor performance. Mortensen U y Norrman HJ (eds.). Denmark, 1993. Pp. 159-169.
- Majewsky RA, Domach MM. 1990. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 35: 732-738.
- Manfredini R, Cavallera V. 1983. Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. *Biotechnol Bioeng.* 25: 3115-3131.
- Martínez A, Ramírez OT, Valle F. 1998. Effect of growth rate on the production of β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fed-batch cultures. *Enzyme Microb Technol.* 22: 520-526.
- Mashego MR. Robust experimental methods to study in-vivo pre-steady state kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. 2005. PhD thesis, Delft University of Technology, The Netherlands.
- Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP. 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol.* 171: 342-348.

- Mijnbeek G, Oosterhuis NMG, Siebel MA, van Der Heijden RTJM. Bioreactor design and product yield. 1992. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Namdev PK, Irwin N, Thompson BG, Gray MR. 1993. Effect of oxygen fluctuations in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 41: 666-670.
- Nielsen J, Villadsen J, Lidén G. Bioreaction engineering principles. 2nd ed. Kluwer Academics. NY, 2005.
- Neubauer P, Häggstrom L, Enfors SO. 1995 Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *E. coli* glucose limited fed-batch fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 47: 139 - 146.
- Onyeaka H, Nienow AN, and Hewitt CJ. 2003. Further studies related to the scale-up of high cell density *Escherichia coli* fed-batch fermentation: the additional effect of a changing microenvironment when using aqueous ammonia to control pH. *Biotechnol Bioeng.* 84: 474-484.
- Oosterhuis NMG, Kossen NWF. 1984. Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 26: 546-550.
- Oosterhuis NMG. 1984. Scale-up of bioreactors, a scale-down approach. PhD thesis, Delft University of Technology. Delft, The Netherlands.
- Oosterhuis NMG, Kossen NWF, Olivier APC, Schenk ES. 1985. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxidans*. *Biotechnol Bioeng.* 27: 711-720.
- Palomares LA, Ramírez OT. 2000a. Bioreactor Scale-up. In *Encyclopaedia of Cell Technology*, Spier RD (ed) pp 183-201. New York: John Wiley & Sons
- Palomares LA, Ramírez OT. 2000b. Bioreactor Scale-down. In *Encyclopaedia of Cell Technology*, Spier RD (ed) pp 174-183. New York: John Wiley & Sons
- Palmeros B, Wild J, Szibalski W, Le Borgne S, Hernández-Chávez G, Gosset G, Valle F, Bolívar F. 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free-genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene.* 247: 255-264.
- Partridge JD, Scott C, Tang Y, Poole RK, Green J. 2006. *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobis to aerobis conditions. *J Biol Chem.* 281: 27806-27815.
- Pecher A, Blaschkowski HP, Knappe K, Bock A. 1982. Expression of pyruvate formate lyase of *Escherichia coli* from the cloned structural gene. *Arch Microbiol.* 132: 365-371.

- Phue J-N, Shiloach J. 2004. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J Biotechnol.* 109: 21-30.
- Ponce E. 1999. Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J Biosc Bioeng.* 87: 775–780.
- Poole RK, Ingledwe WJ. 1987. Pathways of electron to oxygen. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhiparium*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt FC (ed) American Society for Microbiology Press. Washington, DC.
- Reuss M, Bajpai R. 1991. Stirred tanks models. In: *Biotechnology Vol. 4, Measuring, modelling and control.* Rehm HJ, Reed, G (eds.). pp. 299-348. New York: VCH Publishers.
- Reuss M, Schmalzreidt S, Jenne M. 1994. Structured modelling of bioreactors. In: *Advances in Bioprocess Engineering,* Galindo E, Ramírez OT (eds). 207-217. Kluwer Academics, Dordrecht, The Netherlands.
- Reuss M, Schmalzreidt S, Jenne M. 2000. Applications of computational fluid dynamics (CFD) to modelling stirred tank bioreactors. In: *Bioreaction Engineering. Modelling and Control.* Schügerl K, Bellgardt KH (eds). 207-246. Springer-Verlag, Berlin.
- Rodríguez C, Kwon O, Georgellis D. 2004. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187: 2085–2090.
- Salmon K, Hung S, Mekjian K, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP. 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem.* 278: 29837-29855.
- Sandoval-Basurto E, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2005. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng.* 89: 453-463.
- Schmalzriedt S, Jenne M, Mauch K, Reuss M. 2003. Integration of physiology and fluid dynamics. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 80, 19-68.
- Schweder T, Krüger E, Xu B, Jürgen B, Blomsten G, Enfors S, Hecker M. 1999. Monitoring genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnol Bioeng.* 65: 151-159.
- Steel R, Maxon WD. 1966. Dissolved oxygen measurements in pilot- and production-scale novobiocin fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 8: 97-108.

- Shiloach J, Fass R. 2005. Growing *E. coli* to high cell density- A historical perspective on method development. *Biotechnol Adv.* 23: 345-357.
- Svenson M, Hang L, Silfvesparre G, Häggström L, S-O Enfors. 2005. Control of endotoxin release in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Bioprocess Biosyst Eng.* 27: 91-97.
- Sweere APJ, Luybe KchAM, Kossen NWF. 1987. Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microb Technol.* 9: 386-398.
- Takayama K, Kjelleberg S. 2000. The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ Microbiol.* 2: 355-365.
- Touati D. 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J Bacteriol.* 170: 2511-2520.
- Tseng CP, Albretch J, Gunsalus RP. 1996. Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyoABCDE* and *cydAB*) and anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD*, and *dmsABC*) respiratory pathways genes in *Escherichia coli*. 1996. *J Bacteriol.* 178: 1094-1098.
- Tseng CP, Yu CC, Lin HH, Chang CY, and Kuo JT. 2001. Oxygen- and growth-rate dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB and FumC) activity. *J Bacteriol.* 183: 461-467.
- Uden G, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1320: 217-234.
- Vemuri GN, Minning TA, Altman E, Eiteman MA. 2005. Physiological response of central metabolism in *Escherichia coli* to deletion of pyruvate oxidase and introduction of heterologous pyruvate carboxylase. *Biotechnol Bioeng.* 90: 64-76.
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3653-3661.
- Vlaev D, Mann R, Loseev V, Vlaev SD, Zahradnik J, Seichter P. 2000. Macromixing and *Streptomyces fridae*. Modeling oxygen and nutrient segregation in an industrial bioreactor. *Trans. IChemE part A.* 78: 354-362.
- Voss C, Schmidt T, Schleaf M, Friehs K, Flaschel E. 2004. Effect of ammonium chloride on plasmid DNA production in high cell density batch culture for biopharmaceutical use. *J Chem Technol Biotechnol.* 79: 57-62.

- Wang Y, Liu CH, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, Brown PO. 2004. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Ntl Acad Sci.* 99: 5860-5865.
- Wolfe AJ. 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12-50.
- Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors S. 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 564-571.
- Yang YT, San KY, Bennet GN. 1999. Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion. *Metab Eng.* 1: 141-152.
- Yoon S, Han M, Lee S, Jeong K and Yoo J. 2003. Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnol Bioeng.* 81: 753-767.
- Zhu J, Shimizu K. 2004. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64:367–375.