

**ESCALAMIENTO DESCENDENTE DEL PROCESO DE
PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA HETERÓLOGA POR
TERMO-INDUCCIÓN DE CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD
CELULAR DE *Escherichia coli*: ESTUDIO DE LA RESPUESTA
TRANSCRIPCIONAL AL CHOQUE TÉRMICO**

Tesis sometida al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México
para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Por

Luis Caspeta Guadarrama

Marzo del 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La investigación reportada en esta tesis se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM con la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich

Se agradece el apoyo financiero de los proyectos:

CONACYT NC-230 y 46408-Z y

UNAM/DGAPA IN223308

para la realización del presente trabajo.

Se contó con una beca para estudios de postgrado otorgada por CONACYT. También se agradece el apoyo económico otorgado por el CONACYT a través del programa de apoyo otorgado a ayudantes de investigadores con nivel III del Sistema Nacional de Investigadores.

Por su participación en el comité tutorial y en el comité tutorial ampliado, se agradece a la Dra. Elda Guadalupe Espin y los Drs. Rodolfo Quintero Ramírez, Francisco Bolívar Zapata, Sergio Sánchez Esquivel y Jorge Luis Folch Mallol.

Se agradece la camaradería del laboratorio del Dr. Ramírez y del Dr. Enrique Galindo Fentanes, también a la Dra. Noemí Flores y al laboratorio del Dr. Bolívar por el apoyo brindado durante la realización del análisis transcripcional.

A Arte, Alan y Fer

Luis Caspeta Guadarrama (2009). **Escalamiento descendente del proceso de producción de proteína heteróloga por termo-inducción de cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*: estudio de la respuesta transcripcional al choque térmico**

Resumen

El incremento de la temperatura para inducir la producción de proteínas recombinantes en cultivos a alta densidad celular de *Escherichia coli* es una estrategia frecuentemente utilizada debido a las ventajas que aporta a los procesos de fermentación y recuperación de la proteína. Sin embargo, hasta antes de este trabajo, el efecto de las diferencias en el aumento de la temperatura entre fermentadores industriales y de laboratorio sobre las respuestas fisiológicas de *E. coli* y la síntesis de la proteína recombinante, aún no habían sido evaluadas.

Las respuestas transcripcionales y metabólicas de *E. coli* al incremento de la temperatura para inducir la producción de preproinsulina humana recombinante (PIH) a velocidades de 6.0, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, fueron evaluadas en un sistema de escalamiento descendente diseñado para simular escenarios típicos de calentamiento de biorreactores de 0.1, 5, 20 y 100 m³, respectivamente. Conforme la velocidad de calentamiento se incrementó, la producción máxima de PIH disminuyó y la formación de productos de fermentación aumentó. A bajas velocidades de calentamiento, el estrés y sus efectos nocivos disminuyeron, como lo sugieren los datos del análisis transcripcional de genes característicos de la respuesta al choque térmico y otros estreses, así como los de la maquinaria transcripcional/traducciona. Estos resultados indican que las condiciones de calentamiento de fermentadores de gran escala para producir proteína recombinante termo-inducida son mejores que las correspondientes a la escala de laboratorio. Sin embargo, aun en las mejores condiciones de calentamiento, la producción de PIH y el crecimiento celular cesaron 2 o 3 horas después de inducir.

Para disminuir los efectos perjudiciales de la inducción constante a temperatura no óptima para el crecimiento, y mantener por más tiempo la sustentabilidad del proceso, se desarrollaron protocolos novedosos de inducción por oscilaciones de temperatura entre 42 y 37 o 30 °C. Con la implementación de esta estrategia basada en los datos transcripcionales, la producción máxima de PIH se incrementó de 1.2 a 1.6 veces respecto a los cultivos mantenidos a 42 °C constantes. Además, las células mostraron una velocidad específica de crecimiento constante, aunque menor a la obtenida antes del cambio de temperatura. Esto resultó en acumulaciones máximas de biomasa de entre 3 y 4 veces mayores que las obtenidas bajo inducción a temperatura constante, así como una mejor utilización de la glucosa suministrada bajo tres estrategias de alimentación durante la etapa de inducción, ya que la acumulación total de ácidos orgánicos fue de menos de la mitad de lo observado en los cultivos mantenidos a 42°C. La PIH producida durante la inducción a temperatura oscilante entre 37 y 42 °C constituyó hasta un 92 % de los cuerpos de inclusión formados, comparado con un 44 y 73 % observados cuando la inducción se realizó a 42 °C. Esto tiene ventajas importantes para el proceso ya que la PIH acumulada en estos agregados puede ser fácilmente recuperada por centrifugación. Así mismo, la escasa acumulación de proteínas contaminantes facilita su plegamiento *in-vitro*.

El escalamiento ascendente puede ser una actividad lenta y costosa debido a que las células no se comportan igual en la escala de laboratorio e industrial. La transferencia de calor y otros procesos físicos en biorreactores de gran escala son limitaciones que difícilmente se pueden resolver. Sin embargo, en la medida que se profundice en el análisis de las respuestas fisiológicas de *E. coli* a estas limitaciones, se estará en condiciones de revertirlas y generar procesos más robustos. Esta es la principal contribución de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Índice

Resumen	4
1. Introducción	13
2. Antecedentes	
2.1. Generalidades: proteínas recombinantes terapéuticas y sistemas para su expresión	15
2.2. Sistemas de expresión termo-inducidos	16
2.3. Transferencia de calor en fermentadores de escala industrial	17
2.4. Influencia de la temperatura sobre las respuestas celulares de <i>E. coli</i>	20
2.5. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	26
2.6. Escalamiento descendente	29
3. Hipótesis	33
4. Objetivos	34
5. Materiales y métodos	
5.1. Cepa bacteriana y plásmido	36
5.2. Medios de cultivo e inóculo	36
5.3. Cultivos a alta densidad celular	38
5.4. Sistema de escalamiento descendente para simular velocidades de calentamiento de biorreactores de escala industrial	39
5.5. Inducción a temperatura oscilante	40
5.6. Estrategias de alimentación durante la etapa de inducción	41
5.7. Métodos analíticos	
5.7.1. Concentración de biomasa	42
5.7.2. Aislamiento y cuantificación de la preproinsulina humana	
5.7.2.1. Preparación de los lisados celulares, fracciones solubles e insolubles	43
5.7.2.2. Extracción y purificación de cuerpos de inclusión	43
5.7.2.3. Dilución de cuerpos de inclusión y preparación de muestras para su análisis por SDS-PAGE y ensayos de Bradford	45
5.7.2.4. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida en	

condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	45
5.7.2.5. Análisis de la proteína total por ensayos de Bradford	45
5.7.3. Identificación y cuantificación de glucosa y metabolitos de fermentación por HPLC	46
5.8. Análisis transcripcional	
5.8.1. Toma de muestra, aislamiento del RNA y síntesis de cDNA	46
5.8.2. RT-PCR semicuantitativa	46
5.8.3. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de cada gen	47
6. Resultados y discusión	
6.1. Análisis de régimen	49
6.1.1. Cálculo de los tiempos característicos	
6.1.1.1. Mezclado	49
6.1.1.2. Transferencia de calor	49
6.1.1.3. Síntesis o degradación de proteínas de respuesta al estrés por choque térmico y estricta	50
6.1.2. Comparación de los tiempos característicos	51
6.2. Escalamiento descendente de las respuestas fisiológicas de <i>E. coli</i> al incremento de la temperatura a velocidades típicas de gran escala para inducir la producción de preproinsulina humana recombinante (PIH) en cultivos a alta densidad celular	
6.2.1. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre el crecimiento, la producción de PIH y el metabolismo	53
6.2.2. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la respuesta transcripcional	60
6.2.2.1. Efecto sobre la transcripción de genes de choque térmico	62
6.2.2.1.1. Operón <i>dnaK-dnaJ</i>	65
6.2.2.1.2. <i>clpB</i>	65
6.2.2.1.3. <i>groEL</i>	66
6.2.2.1.4. Operon <i>ibpA-ibpB</i>	67
6.2.2.2. Efecto sobre transcripción de genes reguladores de estrés	68
6.2.2.2.1. <i>rpoH</i>	68

6.2.2.2.2. <i>ftsH</i>	69
6.2.2.2.3. <i>spoT</i> y <i>relA</i>	70
6.1.2.2.4. <i>rpoS</i>	70
6.2.2.3. Genes de la maquinaria de transcripción/traducción	71
6.2.2.4. <i>PIH</i>	71
6.2.2.5. Conclusiones parciales	72
6.3. Mejoramiento de las respuestas celulares de <i>E. coli</i> y la producción de la proteína recombinante mediante la termo-inducción a temperatura oscilante	74
6.3.1. Producción de <i>PIH</i> en cultivos inducidos por oscilaciones de temperatura	78
6.3.2. Efecto de la estrategia de alimentación en la etapa de inducción	83
6.3.3. Conclusiones parciales	86
6.4. Efecto de las estrategias de inducción y alimentación durante la etapa de inducción en la agregación de la preproinsulina humana	88
6.4.1. Aislamiento y caracterización parcial de cuerpos de inclusión	89
6.4.2. Efecto de la velocidad de calentamiento en la agregación de proteínas	91
6.4.3. Efecto de las oscilaciones de temperatura en la agregación de proteínas	92
6.4.4. Efecto de la estrategia de alimentación en la etapa de inducción sobre la agregación de proteínas	94
6.4.5. Conclusiones parciales	95
7. Conclusiones generales	96
8. Perspectivas	97
Nomenclatura y Abreviaturas	99
Bibliografía	102
Apéndices	
A. Memorias de cálculo	114
A.1. Cálculo del tiempo necesario para incrementar la temperatura de 30 a 42 °C en biorreactores de distintos volúmenes.	114

B. Diagramas de flujo del software diseñado para controlar la estrategia de alimentación e inducción.	118
Productos generados durante el desarrollo del proyecto	121

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de un fermentador equipado con serpentín y chaqueta.	18
Figura 2. Efecto de la escala del fermentador sobre el cociente entre el área total de transferencia de calor y el volumen (A_T/V) (A) y sobre el incremento de la temperatura de 30 a 42 °C (B), para tanques provistos de chaqueta y serpentín, calentados con vapor de agua.	19
Figura 3. Esquema simplificado del metabolismo de una célula de <i>E. coli</i> .	21
Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la expresión génica y procesamiento post-traducciona en un célula de <i>E. coli</i> .	24
Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la expresión de genes de la respuesta al choque térmico, maquinaria celular de transcripción/traducción y heterólogo.	26
Figura 6. Influencia de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) de <i>E. coli</i> .	27
Figura 7. Estrategia de escalamiento descendente propuesta por Oosterhuis (1984).	30
Figura 8. Tiempos característicos de mezclado, transferencia de calor y de algunos procesos celulares.	31
Figura 9. Sistema de escalamiento descendente utilizado para este proyecto.	40
Figura 10. Efecto de la temperatura del agua transportada por el serpentín en la velocidad de calentamiento de biorreactores de 5 litros.	41
Figura 11. Estrategia de aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión.	44
Figura 12. Tiempos característicos de circulación y de transferencia de calor para biorreactores de varios volúmenes.	51
Figura 13. Comparación entre los tiempos característicos de transferencia de calor y las respuestas celulares (síntesis de proteínas de choque térmico y degradación de proteínas de la maquinaria de transcripción y traducción) al incremento de la temperatura a partir de 30 °C.	52
Figura 14. Cinéticas típicas de los principales parámetros del proceso de producción de preproinsulina humana (PIH) por cultivos a alta densidad celular de <i>E. coli</i> .	54
Figura 15. Perfiles de calentamiento para incrementar la temperatura desde 30 a 42 °C a velocidades típicas de biorreactores de 0.1, 5, 20 y 100 m ³ .	55

Figura 16. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la acumulación de biomasa (A), PIH (B) y metabolitos de fermentación (C, acetato; D, formato; y E, lactato) durante la fase de producción.	57
Figura 17. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre los valores finales (círculos negros) y máximos (círculos blancos) de acumulación de biomasa (A), PIH (B y C) y metabolitos de fermentación (D, E y F).	58
Figura 18. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre la respuesta transcripcional de <i>E. coli</i> .	63
Figura 19. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre la velocidad de acumulación de mRNA de genes de choque térmico y heterólogo.	64
Figura 20. Simulación del comportamiento esperado para la acumulación normalizada respecto a 30 °C, de mRNA de los genes de choque térmico y del gen heterólogo cuando la temperatura se oscila entre 42 y 37 °C a velocidad de calentamiento y enfriamiento de 0.4 °C/min.	75
Figura 21. Recuperación del crecimiento celular después de inducir la producción de PIH a 42 °C.	76
Figura 22. Estrategias de inducción por oscilaciones de temperatura.	77
Figura 23. Estrategias de alimentación en la fase de inducción.	78
Figura 24. Acumulación de biomasa, PIH y glucosa en cultivos inducidos a temperatura oscilante y constante, alimentados a tres estrategias de alimentación en la etapa de inducción.	79
Figura 25. Acumulación de acetato, formato, lactato y succinato en cultivos inducidos a temperatura oscilante y constante, alimentados a tres estrategias de alimentación en la etapa de inducción.	82
Figura 26. Comparación de la acumulación máxima de biomasa y PIH entre cultivos inducidos con oscilaciones y temperatura constante.	84
Figura 27. Comparación de la acumulación máxima de acetato, lactato, formato y succinato entre cultivos inducidos con oscilaciones y temperatura constante.	85
Figura 28. Perfiles de agregación de PIH y proteínas contaminantes durante la inducción a 42 °C efectuada a diferentes velocidades de calentamiento.	90
Figura 29. Perfiles de agregación de PIH y proteínas contaminantes durante la inducción	

a temperatura oscilante.	91
Figura 30. Cinéticas de agregación de proteína total (A) y PIH (B) en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a 42 °C mediante diferentes velocidades de calentamiento.	92
Figura 31. Cinéticas de agregación de proteína total (A) y PIH (B) en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a temperatura oscilante.	93
Figura 32. Cinéticas de agregación de proteína total y PIH en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a 42 °C, calentados a 0.4 °C/min y alimentados a las tres estrategias de alimentación durante la inducción.	94
Figura 33. Síntesis de metionina.	98
Figura B1. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la alimentación de la fase de lote alimentado e inducción de los cultivos.	118
Figura B2. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la velocidad de aumento de la temperatura a 0.8 y 0.4 °C/min.	119
Figura B3. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la inducción a temperatura oscilante.	120

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de <i>E. coli</i> seleccionados para el estudio transcripcional.	23
Tabla 2. Parámetros requeridos en las ecuaciones 2 y 3, para <i>E. coli</i> cultivada en medio rico y mínimo con glucosa. Datos obtenidos de Nielsen et al., (2003).	28
Tabla 3. Composición de los medios de cultivo.	37
Tabla 4. Estrategias de alimentación durante la inducción.	42
Tabla 5. Relación de genes y oligos utilizados para la qRT-PCR.	48
Tabla 6. Comparación entre los niveles relativos de mRNA de genes de choque térmico.	66

1. Introducción

Al descubrimiento de la estructura del DNA lo siguió el desarrollo de la ingeniería genética que hizo posible su manipulación; entonces, se pudo transferir DNA de un organismo a otro permitiendo la síntesis de proteínas terapéuticas humanas en *E. coli*, y con ello la aparición de la biotecnología moderna a principios de los años 70. Después, el acelerado desarrollo de métodos para la secuenciación de DNA ha puesto al descubierto numerosos genes (entre 20000 y 25000 en el genoma humano -International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) impulsando continuamente el número de proteínas humanas en espera de ser producidas (Walsh, 2000, 2003-a y b, 2004, 2005 y 2006; Robinson, 2002). Sin embargo, la capacidad de producción no ha crecido a la misma velocidad (Thiel, 2004; Robinson, 2002). Esto tal vez se debe a que en los últimos cuarenta años, sólo ha habido cambios moderados en el diseño y la operación de fermentadores de gran escala (Lidén, 2002). Especialmente, existe poca información del efecto de las condiciones no óptimas de mezclado y transferencia de masa y calor prevalecientes en fermentadores de escala industrial, sobre el desempeño de las células y la síntesis del producto (Lara et al., 2008). Es por esto que el traslado de los procesos de producción desde la escala de desarrollo en el laboratorio hasta fermentadores industriales suele ser un proceso muy lento y costoso.

Los sistemas de expresión termo-inducibles han evolucionado continuamente debido a las muchas ventajas que presentan para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Lieb, 1966; Remaut et al., 1981; Elvin et al., 1990; Makrides, 1996; Gupta et al., 1999; Menart et al., 2003; Jechlinger et al., 2005). Sin embargo, el protocolo habitual de inducción de la producción continúa siendo el incremento de la temperatura desde 28-30 °C hasta 42 °C, aún cuando el incremento de la temperatura en fermentadores de escala industrial sea poco eficiente debido a limitaciones de diseño y operación. Además la forma habitual de incrementar la temperatura activa respuestas fisiológicas negativas en *E. coli*, las cuales provocan la pérdida del crecimiento celular y producción de la proteína pocas horas después de inducir. Puesto que no existe información del efecto del incremento de la temperatura a escala industrial sobre las respuestas de *E. coli* recombinante, aún no es posible evaluar los inconvenientes del traslado y uso de los procesos termo-inducibles, que dejan de ser fácilmente reproducibles u operables a partir de fermentadores mayores de 100 litros (Caulcott y Rhodes, 1986).

El escalamiento descendente es una metodología que permite desarrollar y optimizar bioprocesos en laboratorio a las condiciones que prevalecen en fermentadores industriales (Oosterhuis, 1984; Palomares et al., 2004). Dicha metodología plantea la detección de la condición de operación ineficiente o limitante del proceso a escala industrial, la cual es simulada en fermentadores de laboratorio, donde se analiza su efecto sobre las células y sus productos. En esta etapa, también es posible optimizar el proceso de producción. Por último, el proceso es trasladado a fermentadores industriales con la certeza de que se ha desarrollado bajo condiciones más cercanas a las que prevalecen en estos.

En esta investigación, la metodología del escalamiento descendente con análisis de régimen fue utilizada para simular, en fermentadores de laboratorio, las velocidades de calentamiento típicas de fermentadores de escala industrial y evaluar su efecto sobre el metabolismo y la expresión genética de *E. coli* BL21 productora de preproinsulina humana inducida por incremento de la temperatura. Con estos resultados se diseñaron y evaluaron nuevos esquemas de inducción por oscilaciones de temperatura que permiten mantener la productividad el proceso por más tiempo, mejorándose el metabolismo y crecimiento celulares, así como la producción de la preproinsulina humana y su agregación selectiva en cuerpos de inclusión.

2. Antecedentes

2.1. Generalidades: proteínas recombinantes terapéuticas y sistemas para su expresión

El número y la cantidad de proteínas utilizadas como elementos de diagnóstico, enzimas y agentes terapéuticos incrementan constantemente. Tan sólo, el número de proteínas terapéuticas comercializadas se estima en alrededor de 200, y en 500 las que se encuentran en ensayos clínicos (Walsh, 2003-a y 2006); para el 2004 su mercado se estimaba en 33 mil millones de dólares, mientras que para el final del 2010 se cree que llegará a ser de 70 mil millones (Walsh, 2006). Se ha sugerido que de no aumentar la capacidad para su manufactura, la demanda podría rebasarla (Thiel, 2004; Robinson, 2002). La necesidad de procesos eficientes para la producción de proteínas recombinantes es, por lo tanto, muy evidente. Un proceso eficiente requiere de armonizar los tres elementos que componen el sistema de expresión: 1) la célula hospedera, 2) el material genético y 3) las condiciones de cultivo.

De las proteínas aprobadas y producidas en escala comercial hasta el 2006, alrededor del 32 % son producidas en *Escherichia coli*, incluyendo a la insulina humana cuya demanda es de alrededor de 4.6 toneladas anuales (la mayor de todas las proteínas terapéuticas), que representan un mercado de 7.9 mil millones de dólares (Walsh, 2003-a, 2005 y 2006). Los números anteriores acreditan a *E. coli* como uno de los hospederos más utilizados para albergar y replicar el gen o genes de otro organismo (genes heterólogos), así como para producir la proteína foránea (proteína recombinante o heteróloga), mientras esta no requiera modificaciones post-traduccionales complejas (por ejemplo, múltiples puentes disulfuro y/o glicosilaciones). Lo anterior se debe a que esta bacteria puede crecer rápidamente hasta altas densidades celulares en medios muy económicos, además de que está ampliamente caracterizada a nivel bioquímico y molecular, lo que facilita enormemente su manipulación a nivel genético.

Usualmente, los genes heterólogos están contenidos en plásmidos; estos también contienen otros elementos genéticos para controlar la transcripción, traducción y, en ocasiones, algunas modificaciones post-traduccionales. Estos procesos son necesarios para pasar del material genético a la proteína funcional (Makrides, 1996; Balbás, 2001). El inicio de la transcripción es uno de los procesos más importantes ya que delimita el inicio de la producción (inducción), y se puede controlar mediante secuencias de DNA llamadas promotores. El

promotor debe ser fuerte, es decir, que favorezca la transcripción del gen heterólogo sobre los oriundos, así como inducirse o inactivarse por cambios en las condiciones de operación del cultivo, como la adición o consumo de algún nutriente (por ejemplo, la adición de L-arabinosa, o agotamiento de fosfato, triptófano o glucosa) o la adición de algún compuesto químico (por ejemplo, IPTG), o por cambios en el pH o la temperatura del cultivo.

El fermentador es el equipo central del proceso para la producción de proteínas recombinantes. Los ensayos preliminares para evaluar el potencial del hospedero y sus modificaciones genéticas se realizan comúnmente en cultivos tipo lote utilizando matraces. Posteriormente, ya en fermentadores, los cultivos se rediseñan para ser operados en régimen de tipo lote alimentado (*fedbatch*), con lo cual se espera llegar a altas concentraciones celulares, antes de inducir la síntesis de la proteína recombinante. Este esquema de producción es muy utilizado en la industria para alcanzar altos rendimientos volumétricos debido a la posibilidad de acumular gran cantidad de células al momento de la inducción (Hyun et al., 2006).

2.2. Sistemas de expresión termo-inducidos

Los sistemas de expresión inducidos por incremento de la temperatura de cultivo son ampliamente utilizados para producir proteínas heterólogas en *E. coli* ya que poseen muchas de las cualidades antes mencionadas (Makrides, 1996). En particular, el sistema cI857/ λ pL posee un promotor fuerte derivado del bacteriófago lambda (λ pL), el cual es eficazmente inactivado a 30 °C por la proteína represora termo-sensible cI857 que es derivada de la proteína cI del mismo bacteriófago. Esto permite cultivar a la bacteria hasta alta densidad celular (> 50 g/L de células en peso seco), seguido por un incremento de la temperatura hasta 42 °C, para inactivar a cI857 y activar (inducir) la síntesis de la proteína recombinante. De tal forma, la inducción se realiza sin la necesidad de adicionar o esperar a que se agote algún componente del medio de cultivo, o sin agregar inductores químicos como el IPTG, cuya toxicidad hace indeseable su uso en la manufactura de proteínas terapéuticas (Makrides et al., 1996).

Sin embargo, el incremento de la temperatura presenta varios inconvenientes para el proceso: (1) en biorreactores de escala industrial, la transferencia de calor es ineficiente, por lo que el calentamiento es lento y se puede retrasar el cambio de la temperatura en comparación a lo que sucede en biorreactores piloto y de laboratorio; (2) el cambio de temperatura afecta de

manera importante la fisiología y el crecimiento de *E. coli*, reflejándose esto en la disminución drástica de su crecimiento y el cese de la producción de la proteína recombinante pocas horas después de inducir; y (3) el incremento de la temperatura de cultivo propicia la agregación de las proteínas tanto recombinantes como de algunas nativas en cuerpos de inclusión.

2.3. Transferencia de calor en fermentadores de escala industrial

La utilización de sistemas termo-inducibles para la producción de proteínas heterólogas requiere de un control exacto y preciso de la temperatura de cultivo para lograr alta productividad y mantener la eficiencia del proceso. En fermentadores de laboratorio, el control de la temperatura de cultivo se puede realizar, sin ningún inconveniente, mediante la transferencia de calor desde una mantilla eléctrica y/o un fluido caliente transportado por chaquetas o serpentines; estos últimos sumergidos en el caldo de cultivo. En la industria, sin embargo, la transferencia de calor generada por electricidad es prohibitiva debido a los costos tan elevados; por lo que entonces se realiza mediante vapor de agua transportado por serpentines sumergidos en el tanque y/o chaquetas soldadas a la pared externa del fermentador (figura 1).

El uso de chaquetas es adecuado en fermentadores de laboratorio y planta piloto hasta volúmenes de 100 litros, pero no para escala industrial (Caulcott y Rhodes, 1986; Brain y Man, 1989). Un biorreactor de geometría estándar posee una relación de uno entre la altura (H) y diámetro (D) ($\frac{D}{H} = 1$, por lo que $D=H$). De tal forma, conforme el volumen se incrementa en relación directa al cubo del diámetro ($V = \pi \frac{D^3}{4}$), el área solamente lo hace en relación al cuadrado del mismo ($A_T = \pi \frac{D^2}{2}$); por lo que el cociente del área de transferencia de calor y el volumen del tanque ($\frac{A_T}{V}$) decrece de manera importante a medida que la escala del fermentador se incrementa. Esto ocasiona que la velocidad de transferencia de calor, y por lo tanto, la velocidad de aumento de la temperatura ($\frac{\Delta T}{\Delta t}$) decrezcan con el incremento de la escala del fermentador de acuerdo con la ecuación 1.

$$\frac{\Delta T}{\Delta t} = \left(\frac{U}{c} \Delta T \right) \left(\frac{A_T}{V} \right) \dots\dots\dots(1)$$

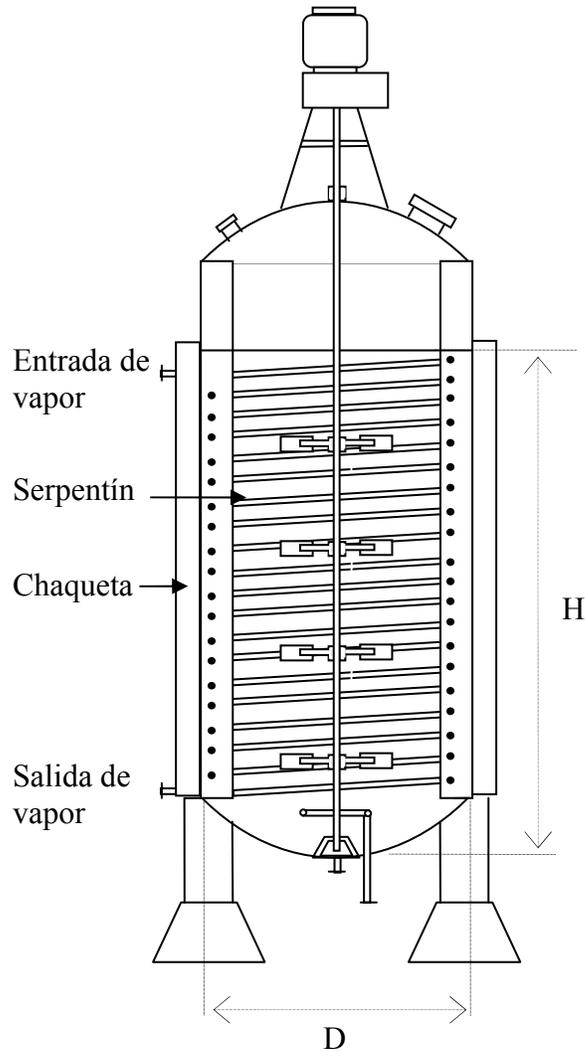


Figura 1. Esquema de un fermentador equipado con serpentín y chaqueta.

Para solucionar el problema anterior, el Ingeniero de Proceso opta por incrementar el área de transferencia de calor mediante la incorporación de serpentines sumergidos en el caldo de cultivo. Sin embargo, estas estructuras interfieren con el mezclado y la transferencia de masa, generando zonas estancadas y gradientes de flujo (Brain y Man, 1989), que perjudican el desempeño de las células para crecer y sintetizar el producto (Enfors et al., 2001), por lo que su uso, en general se evita. Por lo tanto, la relación entre el área de transferencia de calor y el

volumen del tanque decrece rápidamente conforme se incrementa la escala del biorreactor (figura 2A). Por supuesto, la velocidad de calentamiento para incrementar la temperatura, también decrece (figura 2B), pudiéndose observar un retraso de hasta 30 minutos en incrementar la temperatura desde 30 a 42 °C en un tanque de 100 m³, comparado con uno de 0.1 m³ (ver Apéndice A.1. para detalles del cálculo).

Hasta aquí, es relevante señalar que el abanico de capacidades de producción industrial disponibles para la síntesis de proteínas recombinantes utilizando sistemas microbianos es desde 0.25 hasta 150,000 m³ (Thiel, 2004). Capacidades tan elevadas como la última podrían ser alcanzadas mediante 3 fermentadores de 50 m³, o uno de 100 m³ y otro de 50 m³ (la gama de combinaciones es muy amplia). Sin embargo, es de nuestro conocimiento que Fermic cuenta con fermentadores de 90, 160 y 190 m³ para la producción de ácido clavulánico y algunas enzimas (comunicación personal con Roberto Gutiérrez, Fermic S.A. de C.V., Mexico). Fermentadores de alrededor de 0.1, 5 y 20 m³ se pueden encontrar fácilmente (Thiel, 2004). En este trabajo, entonces, se evaluaron las respuestas fisiológicas de *E. coli* productora de preproinsulina humana recombinante termo-inducida a las condiciones de calentamiento de fermentadores de 0.1, 5, 20 y 100 m³. Para esto se simularon velocidades de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, respectivamente para los volúmenes señalados (Figura 2B).

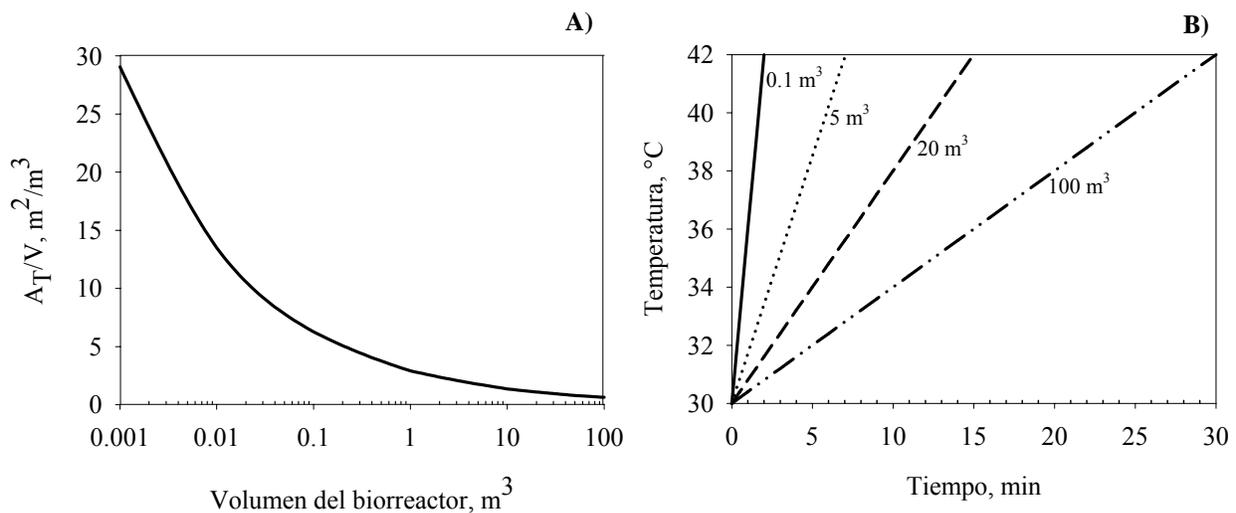


Figura 2. Efecto de la escala del fermentador sobre el cociente del área total de transferencia de calor y el volumen (A_T/V) (A) y sobre el incremento de la temperatura de 30 a 42 °C (B), para tanques provistos de chaqueta y serpentín, calentados con vapor de agua. Ver apéndice A.1. Estrategia de cálculo.

El retraso para incrementar la temperatura de biorreactores industriales puede ocasionar que las células activen las respuestas al estrés por choque térmico y carencia de nutrientes antes de inducir la producción de la proteína recombinante, ocasionando que los rendimientos y la calidad de la proteína producida difieran de los obtenidos en procesos de laboratorio. Dicha conjetura se sustenta en el hecho de que durante la activación de la respuesta celular al estrés por choque térmico, la síntesis de proteínas nativas con actividad de chaperona o proteasa incrementa compitiendo con la síntesis de la proteína recombinante. Además, las chaperonas y proteasas participan en el plegamiento y degradación de proteínas. El incremento de la síntesis de proteínas de choque térmico puede agotar los depósitos de energía y aminoácidos lo cual activa la respuesta estricta caracterizada por un incremento en la actividad proteolítica y la disminución de la síntesis proteica. En los siguientes apartados se abordará con más detalle las características de estas respuestas celulares al estrés causado por el incremento de la temperatura de cultivo. Sin embargo, es relevante señalar que sólo existe un reporte sobre el efecto de la velocidad de calentamiento en la sobre-expresión de *htpG*, un gen representativo de la respuesta al choque térmico (Heitzer et al., 1992). Dicho reporte presenta datos muy limitados y solamente a dos velocidades de calentamiento (0.08 y 2.5 °C/min), pero ninguno sobre la producción de proteína recombinante termo-inducida, tampoco sobre los mecanismos de regulación de la respuesta al estrés por choque térmico condicionada por la velocidad de calentamiento propia de fermentadores de escala industrial.

2.4. Influencia de la temperatura sobre las respuestas celulares de *Escherichia coli*

En condiciones favorables, una célula transporta los nutrientes del ambiente externo y los convierte en metabolitos precursores, los cuales son utilizados para la biosíntesis de ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos (figura 3). Mediante reacciones de polimerización, los productos anteriores son convertidos en macromoléculas, que a su vez se ensamblan en estructuras que dan origen a otras células. Referente a la composición celular, una célula típica de *E. coli* está formada principalmente de proteínas y de RNA, los cuales constituyen aproximadamente el 75 % del peso seco de la célula (55 y 20 %, respectivamente). Además, su biosíntesis consume aproximadamente el 90 % de ATP requerido para formar una célula (72 y 18 %, para la proteína y RNA, respectivamente), por lo que la biosíntesis de estas

macromoléculas es la actividad que más consume precursores y energía. Lo anterior pone en antecedente que la sobre-síntesis de la proteína recombinante debe causar un fuerte impacto en el metabolismo de *E. coli*.

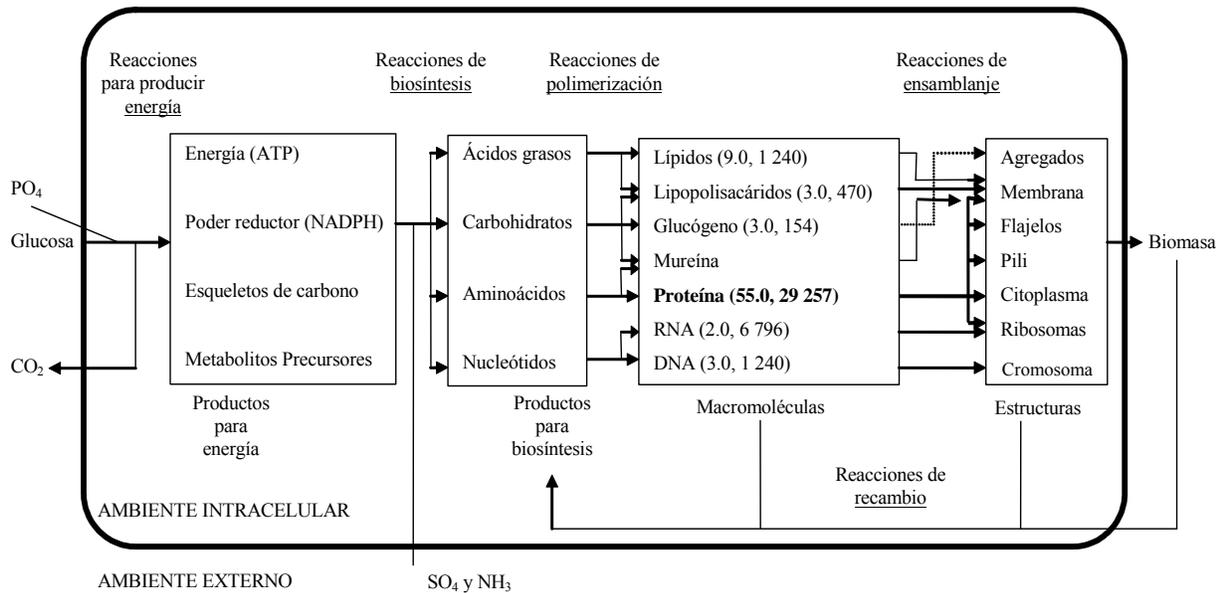


Figura 3. Esquema simplificado del metabolismo de una célula de *E. coli*. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje en peso de la macromolécula respecto a la célula completa y el número de moléculas de ATP necesarias para su síntesis, respectivamente. (Adaptado de Balbás, 2001)

La energía necesaria para realizar las actividades biosintéticas de la célula (anabolismo), tales como la biosíntesis de precursores, polimerización y ensamblaje se obtiene del catabolismo que además de rendir ATP, también provee poder reductor para biosíntesis (NADH), esqueletos de carbono y metabolitos precursores (por ejemplo, piruvato, oxaloacetato y eritrosa-4-fosfato para la biosíntesis de aminoácidos, y ribosa-5-fosfato y 3-fosfoglicerato para la síntesis de nucleótidos). Algunos de los metabolitos precursores pueden ser excretados o convertidos en otros metabolitos para su posterior excreción (por ejemplo el acetato, lactato y formato).

Además de las reacciones catabólicas y anabólicas, hay también otra categoría de procesos que tiene un papel fundamental en el desarrollo celular. En particular, la expresión de genes determina el desempeño celular. Mediante cambios en la expresión genética, la célula puede variar su actividad metabólica para contender con cambios en su ambiente externo. La

expresión genética determina cuales enzimas y proteínas estructurales van a estar presentes en la célula, por lo que se puede argumentar que la expresión genética controla todo el funcionamiento y, por lo tanto, el crecimiento celular. Sin embargo, hay una interacción muy fina entre el metabolismo y la expresión genética (la represión catabólica, por ejemplo).

De la adecuada conformación estructural depende la funcionalidad de una proteína, por lo que *E. coli* tiene un sistema de control estructural muy fino. En la tabla 1 se da una breve descripción de algunos genes y sus productos involucrados en los procesos celulares asociados a la expresión genética y el control estructural de proteínas mostrados en la figura 4; estos genes forman parte del análisis transcripcional realizado en este trabajo. En condiciones óptimas de crecimiento, *E. coli* transcribe primordialmente las secuencias de DNA que codifican para proteínas de mantenimiento o *house-keeping* utilizando la subunidad sigma 70 (σ^{70}) de la RNA polimerasa (RNAP). Posteriormente, las cadenas nucleotídicas transcritas en RNA mensajero (mRNAs) son traducidas a secuencias de aminoácidos (polipéptidos) por la maquinaria celular de traducción (ribosomas y factores de elongación como EF-TU, por ejemplo). Los polipéptidos recién sintetizados son asistidos por proteínas con actividad de chaperona: TF o DnaK-DnaJ, las cuales cubren las regiones hidrofóbicas expuestas a proteólisis y promueven el plegamiento del polipéptido a su conformación nativa (estructura funcional), o lo transfieren al complejo GroEL-GroES para completar su plegamiento (Baneyx y Mujacic, 2004). Los polipéptidos que no alcanzan una estructura funcional son degradados por proteínas con actividad de proteasa (Lon y ClpP, por ejemplo), se agregan formando cuerpos de inclusión o se adhieren al complejo de chaperonas IbpA-IbpB, el cual las estabiliza hasta que las chaperonas que asisten el plegamiento se encuentran disponibles. Por tal razón, el complejo IbpA-IbpB normalmente se encuentra presente en los cuerpos de inclusión. La formación de estos cuerpos de inclusión tiene consecuencias fisiológicas importantes para la célula, por lo que esta posee una maquinaria de desagregación proteica constituida principalmente por el complejo DnaK-DnaJ y la chaperona ClpB. Este complejo desagrega las proteínas agregadas y las vuelve a plegar o las transfiere al complejo GroEL-GroES o a las proteasas. Excepto TF, todas las otras chaperonas y las proteasas descritas aquí están codificadas en genes que forman parte del regulón de respuesta al estrés por choque térmico (Zhao et al., 2005) cuya transcripción es controlada por la subunidad sigma 32 (σ^{32}) de la RNAP (Straus et al., 1987).

Tabla 1. Genes de *E. coli* seleccionados para el estudio transcripcional.

Gen	Producto	Descripción
<i>clpB</i>	Proteasa	Junto con DnaK es capaz de solubilizar los agregados proteicos.
<i>dnaJ</i>	Proteína del sistema DnaK	Estimula la actividad ATPasa de DnaK.
<i>dnaK</i>	Proteína principal del sistema DnaK	Junto con DnaJ y GrpE, asiste un gran número de procesos citoplasmáticos que incluyen: plegamiento de las proteínas sintetizadas de novo, rescate de las proteínas mal plegadas, transporte de proteínas a través de la membrana, agregación y disgregación de complejos proteicos.
<i>ftsH</i>	Proteasa ubicada en la membrana	Degrada a σ^{32} y otras proteínas reguladoras como cII del bacteriófago lambda.
<i>groEL</i>	Chaperona	Junto con GroES, pliegan y translocan proteínas.
<i>ibpA</i>	Pequeñas proteínas de choque térmico	Se unen a las regiones hidrofóbicas de polipéptidos sin plegar, evitando así su degradación por las proteasas.
<i>INS</i>	Insulina humana	Varias funciones
<i>relA</i>	Sintetasa I de (p)ppGpp (RelA)	Sintetiza (p)ppGpp a partir de GDP y ATP.
<i>rpoA</i>	Unidad α de la RNA polimerasa (RNAP)	Forma parte del complejo RNAP que sintetiza RNA tomando como templado DNA.
<i>rpoH</i>	Subunidad σ^{32} de la RNAP	σ^{32} dirige la expresión de genes de la respuesta celular al choque térmico.
<i>rpoS</i>	Subunidad σ^{38} de la RNAP	σ^{38} dirige la expresión de genes de la respuesta general de estrés.
<i>spoT</i>	Sintetasa II de (p)ppGpp	Sintetiza (p)ppGpp a partir de GDP y ATP. Además tiene actividad de (p)ppGppasa.
<i>tig</i>	Trigger factor (TF)	Esta chaperona asiste el plegamiento de pequeñas cadenas polipeptídicas que recién se sintetizan.
<i>tufB</i>	Proteína EF-TU	Interviene en el proceso de traducción.

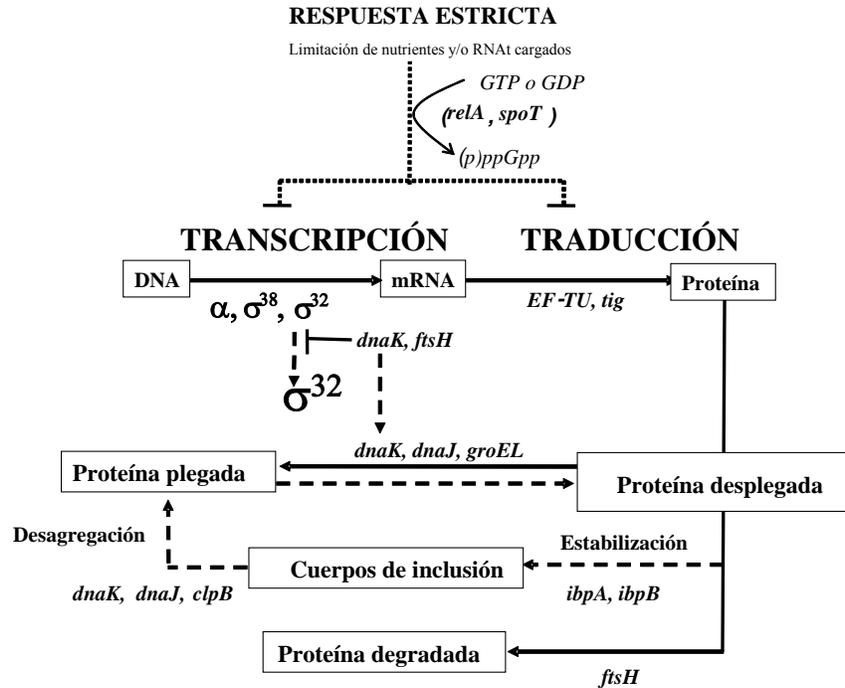


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la expresión genética y procesamiento post-traduccionales en un célula de *E. coli*. Las líneas continuas describen el desempeño de *E. coli* en condiciones de crecimiento balanceado; las discontinuas y punteadas a los procesos celulares activados durante las respuestas de choque térmico y astringente.

A 30 °C, los niveles intracelulares de σ^{32} están muy por debajo de los correspondientes a σ^{70} (50 moléculas contra 3000, respectivamente) (Engbaek et al., 1976). El aumento de la temperatura a 42 °C propicia la estabilidad y síntesis de σ^{32} (figura 4) por lo que sus niveles se incrementan continuamente hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 17 veces, 5-6 minutos después de incrementar la temperatura. De tal manera, el porcentaje de σ^{32} respecto a σ^{70} cambia de 1.6 a 28.6 % (siempre que los niveles de σ^{70} no cambien). Después de alcanzar un máximo, los niveles decrecen lentamente hasta que, 5-6 minutos después, alcanzan un estado estacionario con niveles de síntesis de aproximadamente 2.5 veces los observados a 30 °C, por lo que la acumulación de σ^{32} es transitoria (Straus et al., 1987; Yamamori y Yura, 1980). Lo anterior, por supuesto, favorece la sobre síntesis transitoria de chaperonas y proteasas (o de proteínas de choque térmico que se encuentran reguladas por σ^{32}) cuya velocidad de acumulación se incrementa entre 5 y más de 10 veces (Yamamori y Yura, 1980), lo que propicia un

incremento en la síntesis de proteína total de aproximadamente 1.5 veces (Yamamori et al., 1978). Sin embargo, incrementos menores en la temperatura, por ejemplo desde 30 °C a 33, 36 o 39 °C, resultan en velocidades de síntesis de proteínas de choque térmico del 7.8 %, 19.6 % y 33.3 % respecto a las máximas observadas cuando la temperatura se incrementa desde 30 a 42 °C (figura 5A). Esto sugiere que la temperatura crítica para inducir la sobre-síntesis de las proteínas de choque térmico es de 33 °C. Sin embargo, la síntesis de la proteína heteróloga se activa significativamente a temperaturas por arriba de 38 °C (figura 5B) (Villaverde et al., 1993). Lo anterior, por lo tanto, sugiere que si el incremento de la temperatura desde 30 a 42 °C para inducir la producción de la proteína heteróloga se retrasa lo suficiente, la síntesis de las proteínas de choque térmico comenzaría antes que la de la proteína heteróloga compitiendo con esta por la maquinaria de transcripción/traducción, así como por los precursores y la energía.

Debido a que la síntesis de proteína es el proceso celular más demandante de energía (figura 3), durante la sobre síntesis de proteínas de choque térmico el consumo de ATP aumenta aproximadamente 6 veces (Hoffmann et al., 2002). El consumo adicional de ATP perturba el metabolismo (figura 3), lo que se refleja en menores velocidades específicas de crecimiento de *E. coli* (Koebman et al., 2002) ya que se incrementa el catabolismo a expensas del anabolismo.

La sobre-síntesis de proteínas de choque térmico puede agotar las reservas de aminoácidos y carbono. Para proveer estos elementos, *E. coli* incrementa el recambio de proteínas, especialmente degradando la heteróloga y aquellas que forman a los ribosomas (Harcum and Bentley, 1993) (figura 3). Sin embargo, si esto no es suficiente, las células pueden experimentar carencia de aminoácidos que conlleva a la falta de RNAs de transferencia (tRNA) cargados con el aminoácido correcto, lo que ocasiona que la síntesis de proteínas se detenga ocasionando la formación de pirofosfato de guanosina ((p)ppGpp) (figura 4). El (p)ppGpp es una hormona que regula la respuesta estricta, astringente o de carencia de nutrientes y su síntesis es mediada por las enzimas RelA y SpoT. La respuesta astringente es caracterizada por el arresto en la acumulación de RNAt y RNAs ribosomales (rRNA), así como de la síntesis de proteínas involucradas en los procesos celulares de transcripción y traducción (Cashel et al., 1996; Lengeler et al., 1999; Lemaux et al., 1978). Es entonces evidente que las células detienen las actividades que le requieren un mayor costo de precursores y energía; esto, por supuesto, también incluye la producción de la proteína heteróloga.

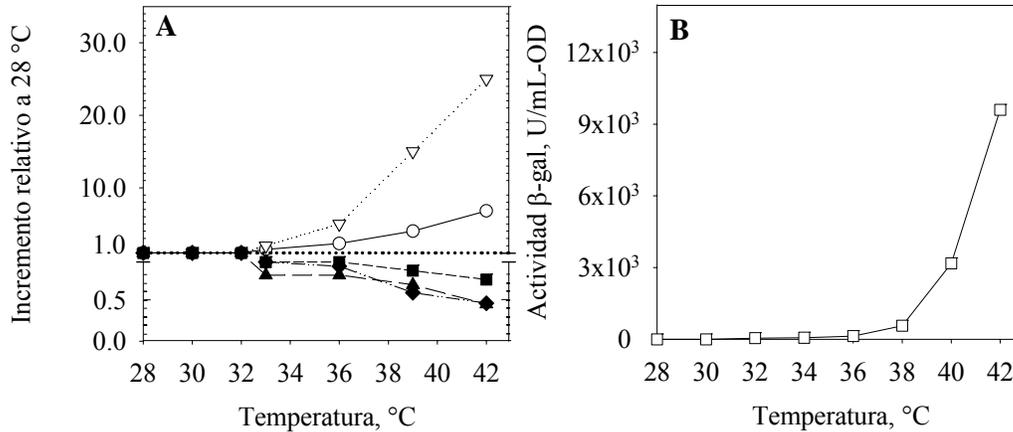


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la expresión de genes de la respuesta al choque térmico, maquinaria celular de transcripción/traducción y heterólogo. Genes de respuesta al choque térmico y de la maquinaria celular de transcripción/traducción (A). Actividad de LacZ, cuya expresión está controlada por los promotores fuertes λ_{PL} y λ_{PR} (colocados uno tras otro) en combinación con el represor termo-sensible cI857 (B). Proteínas de choque térmico: ClpB (∇) y GroEL (\circ); proteínas de la maquinaria celular de transcripción/traducción: EF-G (factor de elongación G, \blacksquare), RNAP- β (subunidad beta de la RNA polimerasa, \blacklozenge) y PheRS (fenilalanil-tRNA-sintetasa, \blacktriangle). Los datos de la figura A se obtuvieron tres minutos después de incrementar la temperatura desde 28 °C hasta la temperatura correspondiente a la posición del símbolo; mientras que los de la B son al estado estacionario. Datos obtenidos de Villaverde et al (1993), Lemaux et al (1978) y Yamamori y Yura (1980).

2.5. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

Debido a que la temperatura es una variable de proceso que tiene un fuerte impacto sobre la regulación de la expresión genética y el metabolismo celular, como se ha podido apreciar en la sección precedente, esta y el pH normalmente se mantienen constantes y en sus valores óptimos durante el cultivo; por lo que regularmente se les conoce como “parámetros de cultivo”, para distinguirlos de otros parámetros como la velocidad de agitación, la concentración de nutrientes y la velocidad de suministro de oxígeno, cuyos valores cambian durante toda fermentación. El efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) se puede modelar como se haría para la actividad de una enzima, es decir, primero hay un incremento continuo en la actividad conforme se incrementa la temperatura hasta cierto valor, donde la desnaturalización de la enzima comienza, seguido de una caída en la actividad por arriba de esta temperatura. De la

misma manera, la velocidad específica de crecimiento se incrementa continuamente desde temperaturas menores a la óptima (37 °C para *E. coli*), este comportamiento se puede modelar mediante la ecuación básica de Arrhenius, al igual que una reacción química típica:

$$\mu = A \exp\left(\frac{Ea}{RT}\right) \dots\dots\dots(2)$$

donde A es una constante y Ea es la energía de activación para el proceso de crecimiento. Sin embargo este modelo no predice la disminución de μ después de la temperatura óptima (figura 6).

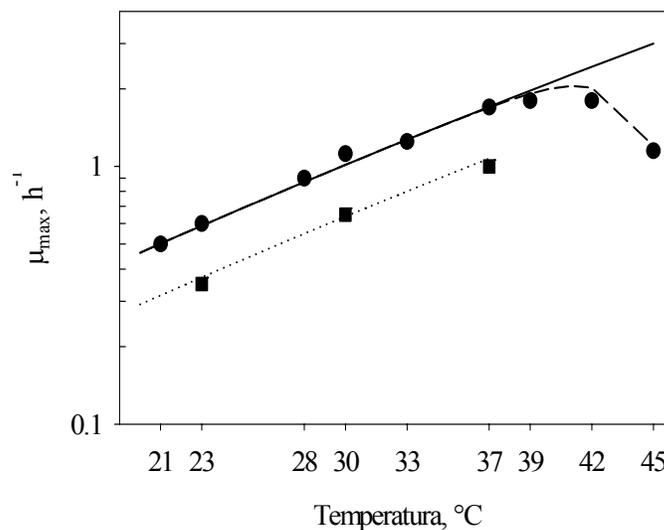


Figura 6. Influencia de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) de *E. coli*. La líneas continua y punteada representan el crecimiento en medios rico y mínimo con glucosa, respectivamente, modelado con la ecuación de Arrhenius; la línea interrumpida, el crecimiento en medio rico con glucosa, modelado con la ecuación de Arrhenius modificada para incorporar la influencia de la inactivación térmica de enzimas (modelo de Roels). Los círculos y cuadrados negros son datos experimentales del crecimiento en medios rico y mínimo con glucosa, respectivamente (datos de Herendeen et al., 1979).

Ahora, si se asume que la desnaturalización térmica de proteínas, como ocurre durante el incremento de la temperatura, es un proceso reversible con un cambio de energía libre de Gibbs (ΔG_d), y que las proteínas desnaturalizadas son inactivas, se puede proponer una expresión para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) en función de la temperatura

(Roels, 1983). Tal expresión está muy relacionada a la propuesta por Hougen y Watson para la catálisis de una reacción química clásica:

$$\mu_{\max} = \frac{A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right)}{1 + B \exp\left(\frac{-\Delta G_d}{RT}\right)} \dots\dots\dots(3)$$

donde A y B son constantes particulares del proceso.

En la figura 6 se muestran datos experimentales de μ_{\max} en función de la temperatura de cultivo, así como los valores calculados con la ecuación básica de Arrhenius y la de Roels utilizando los parámetros mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros requeridos en las ecuaciones 2 y 3, para *E. coli* cultivada en medio rico y mínimo con glucosa. Datos obtenidos de Nielsen et al., (2003).

Parámetro	Medio rico	Medio mínimo	Dimensiones
E_g	58	58	kJ/mol
ΔG_d	550	-	kJ/mol
A	$1.0 \cdot 10^{10}$	$6.3 \cdot 10^9$	h^{-1}
B	$3.0 \cdot 10^{90}$	-	-

En la figura 6 se observa un incremento lineal de μ_{\max} entre 21 y 38 °C, el cual es bien representado por los modelos de Arrhenius y Roels. Sin embargo, los valores de μ_{\max} decrecen a temperaturas por arriba de 39 °C en donde sólo el denominador de la ecuación de Roels puede dar una predicción adecuada. El modelo de Roels, por lo tanto, representa una interpretación física razonable de la influencia de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento máxima basada en la desnaturalización térmica e inactivación enzimática.

El modelo de Roels, sin embargo, no incluye la influencia de la temperatura sobre los procesos de mantenimiento y el recambio de proteínas, los cuales son fuertemente dependientes de la temperatura. Wallace y Holms (1986) calcularon los coeficientes de mantenimiento (m) y las velocidades de recambio de proteínas para la cepa de *E. coli* ML308 a temperaturas de 30, 37 y 42 °C. Ellos observaron un incremento de 1.5 y 7.0 veces en los valores de m cuando la temperatura se incrementó de 30 a 37 °C y de 37 a 42 °C, respectivamente, mientras que la

velocidad de recambio de proteínas se incrementó de manera semejante para ambos incrementos de temperatura (aproximadamente 1.8 veces). El incremento en los valores del coeficiente de mantenimiento es un reflejo de la alta demanda de ATP experimentada por las células inmediatamente después de incrementar la temperatura del cultivo (Hoffmann y Rinas, 2001; Hoffmann et al., 2002; Weber et al., 2002). La fuerte demanda de ATP está asociada a la reestructuración de la membrana de las células, el incremento en la degradación dependiente de ATP, de proteínas desnaturalizadas por el calor y, sobre todo, al incremento en la velocidad de síntesis de proteínas, ya que esta se incrementa alrededor de 2.5 veces a consecuencia de la sobre síntesis de proteínas características de la respuesta celular al estrés por choque térmico (Yamamori et al., 1978; Wallace y Holms, 1986; Weber et al., 2002; Hoffmann y Rinas, 2001).

2.6. Escalamiento descendente

Utilizando la metodología del escalamiento descendente uno puede diseñar una plataforma de experimentación en laboratorio y manipular la velocidad de incremento de la temperatura para simular las condiciones encontradas en fermentadores industriales y determinar su efecto sobre las respuestas celulares y la producción de la proteína.

Básicamente, el escalamiento descendente consiste en experimentar en escala de laboratorio a las condiciones de operación de la escala industrial. Oosterhuis (1984) añadió un análisis de régimen y propuso que la metodología se desarrollara en cuatro etapas (figura 7):

i) Análisis de régimen del proceso en la escala industrial para identificar los mecanismos limitantes que deberán estudiarse en la escala de laboratorio. Dicho análisis puede realizarse mediante la comparación de los tiempos característicos.

ii) Simulación de los mecanismos limitantes en sistemas desarrollados a escala de laboratorio, lo que implica el diseño y construcción de simuladores capaces de reproducir el mecanismo limitante del proceso en escala industrial.

iii) Optimización y modelamiento del proceso a escala de laboratorio.

iv) Escalamiento ascendente del bioproceso a la escala industrial utilizando el conocimiento generado en la etapa anterior.

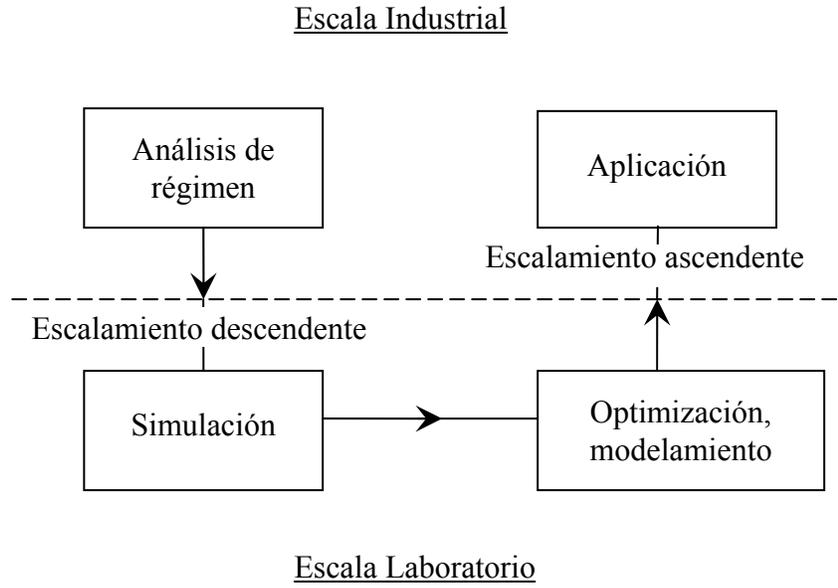


Figura 7. Estrategia de escalamiento descendente propuesta por Oosterhuis (1984).

El análisis de régimen se puede realizar comparando los mecanismos físicos (transferencia de masa, calor o momento) contra los celulares (crecimiento, transcripción y síntesis proteica o velocidades de reacción enzimática, por ejemplo) a través de sus tiempos característicos. El tiempo característico define la rapidez con la que un mecanismo provoca un cambio perceptible en el sistema y rigurosamente es definido mediante una ecuación de primer orden. Palomares et al. (2004), proponen varias maneras de calcular dicho parámetro. Tiempos característicos pequeños corresponden a mecanismos más rápidos que tiempos característicos mayores. Por lo tanto, mediante la comparación de los tiempos característicos es posible descubrir el o los mecanismos que limitan o definen el régimen del proceso (aquellos cuyos tiempos característicos son mayores), por lo que este análisis puede ser útil para identificar si los cambios en los mecanismos de transporte, conforme se incrementa la escala, cambian el régimen de las respuestas celulares y por lo tanto tienden a definir el rumbo del proceso (las células se desempeñan como el ambiente físico del fermentador se los permite).

Para ejemplificar lo anterior, en la figura 8 se muestra la escala de algunos tiempos característicos de mecanismos de transporte en fermentadores, así como de algunos procesos celulares. Como se puede apreciar, en la escala de laboratorio, la mayoría de los tiempos característicos de los mecanismos de transporte (líneas interrumpidas) son mas pequeños que los correspondientes a los mecanismos celulares, por lo que estos últimos controlan el proceso de

fermentación. Es por esta razón que las células generalmente se desempeñan mejor en escala de laboratorio y el diseño y la optimización de los procesos sólo dependen de las células y sus modificaciones. Sin embargo, en biorreactores industriales los tiempos característicos de transporte pueden ser más grandes que los celulares, ocasionando que los mecanismos de transporte se vuelvan controlantes, por lo que muy frecuentemente, los procesos en esta escala no se comportan igual que en la de laboratorio. Esto hace que el escalamiento ascendente de los procesos de fermentación sea una labor lenta y costosa.

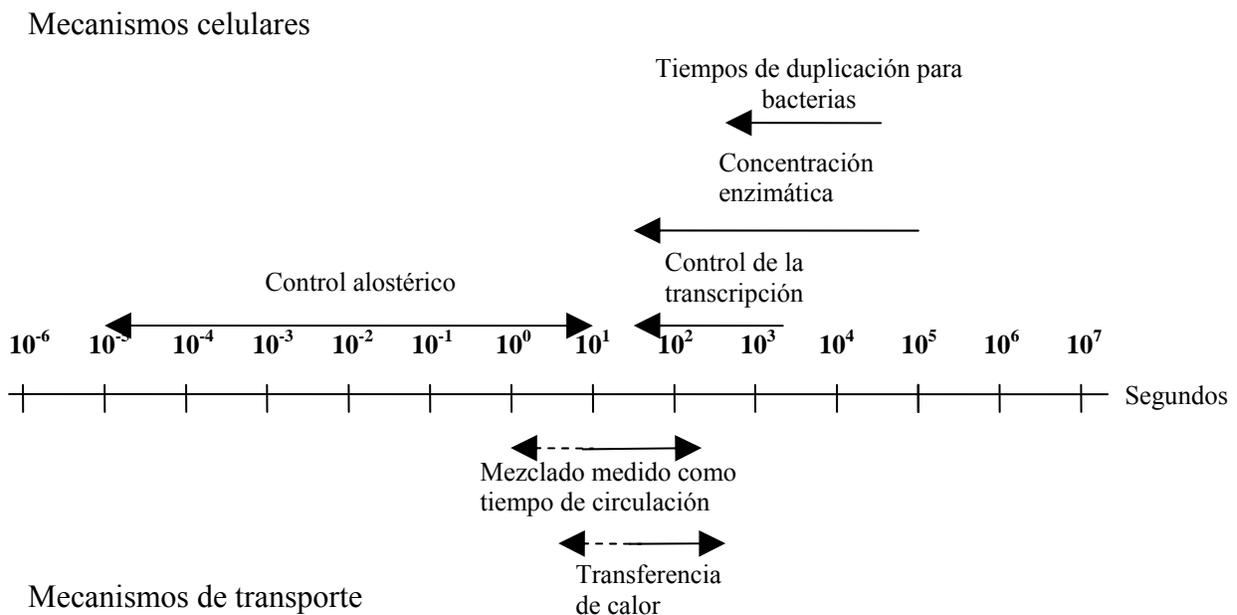


Figura 8. Tiempos característicos de mezclado, transferencia de calor y de algunos procesos celulares. Adaptado de Sweere *at al.*, 1987. Las líneas interrumpidas definen los tiempos característicos de los mecanismos de transporte en fermentadores de laboratorio, calculados para este trabajo (ver secciones de Resultados y Apéndices).

El análisis de régimen es la primera etapa de la metodología y también la más crítica ya que la eficiencia de la simulación, modelamiento y optimización del proceso dependen de este. En la etapa de simulación, fermentadores de laboratorio son adaptados para operar de tal manera que se asegure mantener la magnitud del tiempo característico del mecanismo limitante de la escala industrial. Durante la simulación, por lo tanto, se pueden evaluar los efectos de la operación de fermentadores de escala industrial sobre las respuestas celulares y la síntesis del

producto. Los resultados de la simulación pueden ser utilizados para optimizar el proceso de producción, por ejemplo, mediante modificaciones genéticas que permitan a las células contender con los ambientes físicos de biorreactores de gran escala (Lara et al., 2006a y b). En este trabajo, sin embargo el enfoque de optimización que se ha seguido es la atenuación de las respuestas celulares adversas mediante nuevos protocolos de inducción por temperatura, los cuales pueden ser fácilmente escalados al nivel industrial. En la cuarta etapa de la aplicación de la metodología del escalamiento descendente, el proceso de producción optimizado es trasladado a la escala de producción.

La transferencia de calor es uno de los principales problemas del diseño y la operación de fermentadores de gran escala. La falta de información sobre los eventos fisiológicos y moleculares que acompañan el retraso del incremento de la temperatura durante la inducción de la producción de proteínas recombinantes, limita la percepción de su magnitud e influencia sobre el proceso de producción. En este proyecto, entonces, utilizando la estrategia del escalamiento descendente se generó información útil para entender las respuestas fisiológicas de *E. coli* al incremento de la temperatura a velocidades típicas de fermentadores de escala industrial, y cómo esta afecta la producción de preproinsulina humana (como proteína recombinante modelo) y su agregación en cuerpos de inclusión. Con esta información se generó una estrategia novedosa de inducción por oscilaciones de temperatura que no solo mejora el crecimiento de *E. coli*, sino también la síntesis de la preproinsulina y su agregación en cuerpos de inclusión. También se evaluó el efecto de tres estrategias de alimentación de glucosa después de la inducción.

3. Hipótesis

La velocidad a la que se incrementa la temperatura en el sistema de expresión termo-inducible cI857/ λ pL afectará la calidad y cantidad de proteína recombinante y las respuestas transcripcional y metabólica de *Escherichia coli*.

4. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue determinar el estado fisiológico de *E. coli*, así como los niveles de expresión del gen que codifica para la proteína heteróloga y otros 14 genes seleccionados (tabla 1) de cultivos sometidos a un barrido de velocidades de calentamiento que simulen escenarios típicos de fermentadores industriales (figura 2). Con base en la información generada, desarrollar estrategias novedosas de inducción que mejoren no sólo el desempeño de *E. coli*, sino también la producción de la preproinsulina humana. Para esto se plantearon cinco objetivos particulares:

4.1. Aplicar la metodología del escalamiento descendente al desarrollo de un sistema experimental de laboratorio que permita, empleando fermentadores de 1 y 5 litros, estudiar el efecto del incremento de la temperatura desde 30 a 42 °C a velocidades de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min típicas de fermentadores industriales de 0.1, 5, 20 y 100 m³, sobre la producción termo-inducida de preproinsulina humana, el crecimiento de *E. coli* transformada con el sistema de expresión cI857/ λ pL y la excreción de productos del sobre flujo metabólico como acetato, lactato, formato y succinato.

4.2. Utilizar el sistema de escalamiento descendente para estudiar el perfil dinámico de transcripción del gen heterólogo y 14 genes nativos, durante el incremento de la temperatura desde 30 a 42 °C a velocidades de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min típicas de fermentadores industriales de 0.1, 5, 20 y 100 m³. Los genes nativos seleccionados son: 6 de respuesta al estrés por choque térmico, 5 de regulación de las respuestas celulares al estrés por choque térmico y carencia de nutrientes, y 3 de la maquinaria de transcripción/traducción.

4.3. Al cumplir los objetivos anteriores y con la información generada desarrollar un esquema de inducción novedoso mediante oscilaciones de temperatura y compararlo, mediante los principales parámetros de producción, contra la metodología de inducción tradicional a temperatura constante.

4.4. Evaluar el efecto de tres velocidades de alimentación de glucosa en la etapa de inducción (2 exponenciales y una lineal) sobre la producción de la proteína recombinante, el crecimiento de *E. coli* y la acumulación de ácidos orgánicos de cultivos inducidos a temperaturas constante y oscilante.

4.5. Evaluar los perfiles de agregación de proteína total y preproinsulina humana en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a temperaturas constante y oscilante alimentados a las tres velocidades de adición de glucosa propuestas en el objetivo anterior.

5. Materiales y métodos

5.1. Cepa bacteriana y plásmido

Todos los experimentos reportados en esta tesis se realizaron con la cepa de *Escherichia coli* BL21 (Stratage, CA, Cat: 200133) transformada con el plásmido multicopia pV1rep1/PIH propiedad de Probiomed S.A. de C. V. El plásmido contiene la secuencia nucleotídica que codifica para la preproinsulina humana (PIH) colocada arriba de la secuencia promotora pL del bacteriófago lambda (λ). En el mismo plásmido también se localiza la secuencia que codifica para el represor termo-sensible cI857, por lo que es un plásmido autorregulado. Una característica importante respecto al genotipo de la cepa de *E. coli* utilizada (*E. coli* B F *dcm ompT lon hsdS* (*r_B⁻ m_B⁻*) *gal*) es que no expresa la proteasa Lon, lo que permite una mayor recuperación de proteína intacta, debido a que esta es la principal degradadora de la proteína recombinante.

5.2. Medios de cultivo e inóculo

La composición de los medios nutritivos utilizados para el cultivo de *E. coli* BL21:PIH se describe en la tabla 3. Para el cultivo en fase lote de matraces y biorreactores, el medio consistió de la misma composición y cantidad de nutrientes, excepto la glucosa cuya concentración fue de 12.0 y 17.5 g/L, respectivamente. Para la preparación del medio se disolvieron las cantidades requeridas de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y ácido cítrico en un volumen adecuado de agua destilada y se ajustó el pH a 6.9 con NaOH sólido, la solución se esterilizó por 30 minutos a 121 °C y 15 psi. Por separado, se prepararon soluciones stock de MgSO_4 , glucosa y metales traza y se esterilizaron por separado a 121 °C y 15 psi por 30 minutos. También se prepararon soluciones stock de tiamina-HCl y ampicilina y se esterilizaron por filtración. Todas las soluciones preparadas se mezclaron en las cantidades adecuadas para obtener el volumen requerido de medio de cultivo, al cual se le ajustó el pH a 6.8 con NH_4OH al 15 %.

Para preparar la solución de alimentación se disolvieron 480 gramos de glucosa en 0.75 litros de agua destilada y se esterilizaron a 121 °C y 15 psi por 30 minutos. Por separado se prepararon soluciones stock de MgSO_4 y metales traza y se esterilizaron por separado a 121 °C y 15 psi por 30 minutos. Las soluciones stock de tiamina-HCl y ampicilina se prepararon igual que

para el lote. Para preparar un litro de la solución de alimentación a 700 g/l de glucosa, las soluciones anteriores se mezclaron en las cantidades adecuadas. El antiespumante hecho a base de silicón se preparó mezclando 50-50 antiespumante:agua y se esterilizó a 121 °C y 15 psi por 20 minutos y se adicionó al caldo de cultivo en las cantidades requeridas.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo.

Componente	Matraz	Lote	Lote-alimentado
	g/L	g/L	g/L
Glucosa	12.0	17.5	700.0
KH ₂ PO ₄	13.3	13.3	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0	4.0	-
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.2	1.2	20.0
Ácido cítrico (Cit Sodio)	2.2	2.2	-
Elementos traza	mg/L	mg/L	Mg/L
EDTA-sodio	14.1	14.1	13.0
CoCl ₂ -6H ₂ O	2.5	2.5	4.0
MnCl ₂ -4H ₂ O	15.0	15.0	23.5
CuCl ₂ -2H ₂ O	1.5	1.5	2.3
H ₃ BO ₃	3.0	3.0	4.7
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	2.1	2.1	4.0
Zn(CH ₃ COO) ₂ -2H ₂ O	33.8	33.8	16.0
FE(III) Citrate	100.8	100.8	40.0
Tiamina-HCl	4.5	4.5	4.5
Ampicilina	50.0	50.0	90.0
Antiespumante		0.9 mL/L (sol. 50-50 V/V)	Lo necesario

Matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo se utilizaron para preparar el inóculo. A estos se les vertió el contenido de un criovial de cultivo de *E. coli* preservado a -65 °C en una mezcla 40 % de glicerol y 60 % de medio mineral con glucosa. Los cultivos se mantuvieron a 30 °C y 300 rpm en una incubadora con agitación orbital hasta alcanzar de 3 a 4 unidades de densidad óptica medidas a una longitud de onda de 600 nm. En este momento se tomaron 50 mL del caldo y se centrifugaron a 8,000g y 4 °C por 10 minutos; el sobrenadante se retiró y el pellet de biomasa se resuspendió en 10 o 15 mL de medio de cultivo fresco y se vertió en el reactor.

5.3. Cultivos a alta densidad celular

Los cultivos en la modalidad de lote alimentado para alcanzar alta densidad celular se realizaron en biorreactores de 1 o 5 litros. Estos comenzaron en modo lote con las siguientes condiciones iniciales: 17.5 g/l de glucosa, 0.3 o 1.7 litros de volumen inicial (dependiendo del volumen del biorreactor), flujo de aire de 0.15 o 0.85 L min⁻¹, velocidad de agitación 300 min⁻¹ y temperatura de 30 °C. El pH se controló a 6.8 mediante la adición de NH₄OH al 15 %, con lo cual también se cumplió con los requerimientos de nitrógeno. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) se mantuvo en 40 % a la saturación con aire (% sat/aire) mediante el incremento de la velocidad de agitación y el porcentaje de oxígeno disuelto en la composición del gas de entrada al biorreactor, utilizando un sistema de control en cascada. Una vez que la glucosa se consumió completamente (fin del lote), lo cual se deduce del aumento en la concentración del oxígeno disuelto y el pH, se inició la fase de alimentación del lote mediante un perfil exponencial del suministro de glucosa y otros nutrimentos para mantener la velocidad específica de crecimiento en 0.12 h⁻¹. La estrategia utilizada ha sido descrita previamente (Schmidt et al., 1999; Seeger et al., 1996). Para establecer la velocidad de alimentación de glucosa se utilizó el modelo siguiente:

$$G = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{set} + m \right] x_F V_F \exp [\mu_{set} (t - t_F)] \dots\dots\dots(4)$$

el cual es derivado de la ecuación básica de Monod que expresa la relación entre la velocidad de suministro del sustrato limitante (G) y la velocidad específica de crecimiento (μ). El software diseñado y desarrollado para controlar la alimentación se muestra en el apéndice B. Conociendo los valores del rendimiento de biomasa por sustrato ($Y_{X/S}$) y del coeficiente de mantenimiento (m), los cuales fueron tomados de la literatura (Schmidt et al., 1999), y de las condiciones finales del lote (concentración de biomasa (X_F), volumen (V_F) y tiempo de cultivo (t_F)) es posible preestablecer la velocidad de alimentación de glucosa (G) a un tiempo definido (t) para controlar la velocidad específica de crecimiento (μ_{set}) en 0.12 h⁻¹ hasta alcanzar concentraciones de biomasa entre 55 y 60 g/l de biomasa en peso seco (BPS), los cuales equivalen entre 110 y 120 unidades de DO a 600 nm.

5.4. Sistema de escalamiento descendente para simular velocidades de calentamiento de biorreactores de escala industrial

Para inducir la producción de preproinsulina humana en cultivos a alta densidad celular de *E. coli* por incremento de la temperatura de cultivo a velocidades de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, típicas de biorreactores de 0.1, 5, 20 y 100 m³, se diseñó y construyó un sistema de escalamiento descendente como el que se muestra en la figura 9. El corazón de dicho sistema lo constituyó un biorreactor el cual estuvo equipado con cuatro deflectores y dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas. Para el monitoreo y control del biorreactor se emplearon equipos y elementos de medición (sensores y amplificadores de pH, TOD y temperatura) y control (válvulas solenoides, bombas peristálticas y equipo de calentamiento) operados manual o automáticamente mediante una computadora personal programada por software diseñado y desarrollado durante este trabajo (apéndice B). El sistema de monitoreo estuvo integrado por una sonda esterilizable de vidrio (Metler Toledo, Columbus, OH) para sensar el pH, un electrodo polarográfico para sensar la TOD (Metler Toledo) y un termopar para sensar la temperatura del caldo de cultivo (New Brunswick Scientific). Las señales de estos tres elementos se transmitían a un computador mediante una interfase diseñada en el software Biocomand (New Brunswick Scientific). Las señales de pH y TOD ofrecieron información cualitativa acerca del crecimiento y metabolismo celular, por lo que estas fueron empleadas para controlar el inicio de la etapa de lote alimentado (apéndice B). Dicho inicio correspondió a los incrementos transitorios del pH y TOD del caldo de cultivo cuando se agota la glucosa de la fase lote. Esta señal sirvió para activar la bomba peristáltica e iniciar la alimentación constante con incremento exponencial o lineal de la solución de glucosa y otros nutrimentos (figura 9). Los valores óptimos de la temperatura del caldo de cultivo y las velocidades de calentamiento se controlaron mediante la mantilla de calentamiento y el sistema de recirculación de agua fría; este último estuvo constituido por un recirculador/enfriador conectado al serpentín del biorreactor por una manguera cuyo transporte del agua fría estuvo controlado por una válvula solenoide accionada por el software desarrollado. Debido a que el calentamiento con la mantilla eléctrica no era suficiente para incrementar la temperatura a velocidades mayores a 1.9 °C/min (figura 10), se requirió incorporar otro sistema de mangueras acopladas a un segundo serpentín, haciendo un circuito entre el biorreactor y un recipiente de agua o aceite de ricino, el cual era calentado por una parrilla antes de ser bombeado

por la bomba peristáltica. Con este último sistema se pudo incrementar la temperatura a velocidades mayores a $1.9\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, como las mostradas en la figura 10.

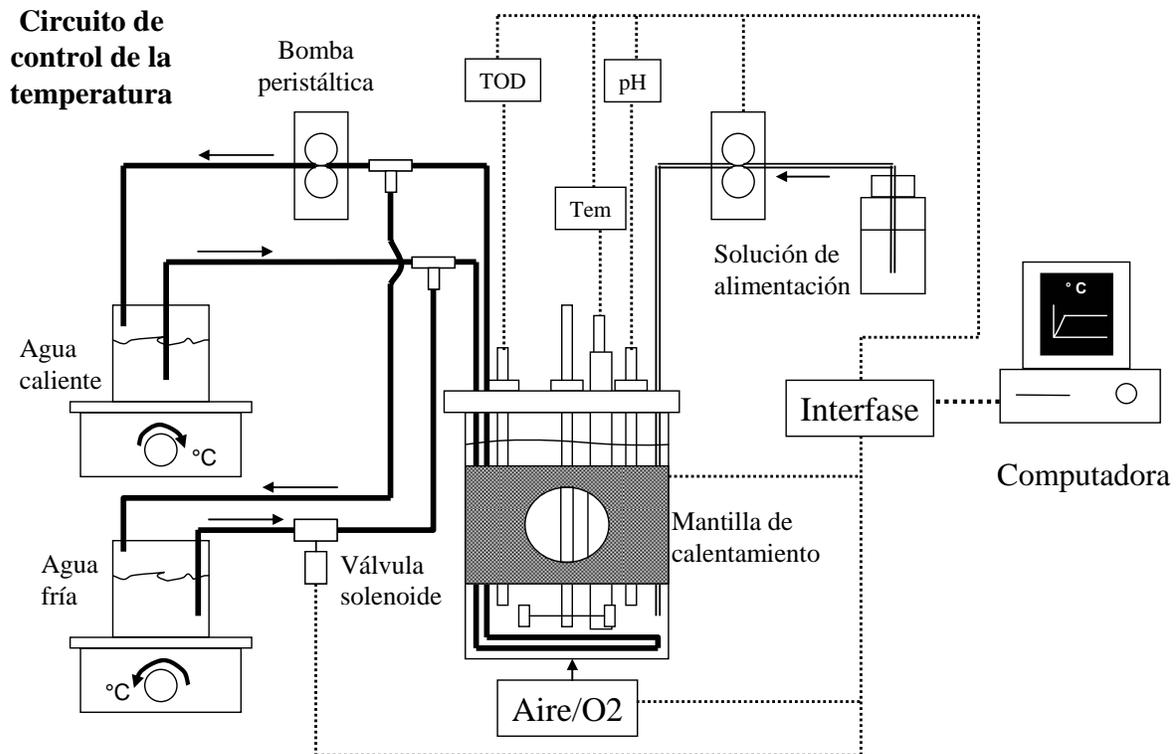


Figura 9. Sistema de escalamiento descendente utilizado para este proyecto. Las líneas interrumpidas indican las conexiones eléctricas de los equipos de muestreo y control, y las continuas las tuberías de alimentación y transporte de agua fría y caliente.

5.5. Inducción a temperatura oscilante

Cultivos a alta densidad celular fueron también inducidos con un novedoso esquema de inducción que consistió en oscilaciones de temperatura. Para oscilar la temperatura del cultivo entre $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 37 o $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con velocidades de $0.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, se empleó el sistema de escalamiento descendente sin el sistema de recirculación de fluido caliente (figura 9). Cuando se alcanzaron entre 55 y 60 g/L de biomasa en peso seco, la temperatura del cultivo se incrementó a una velocidad de $0.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, momento en el cual la temperatura se disminuyó a una velocidad de $0.4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, para regresar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando el cultivo estuvo en $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, nuevamente la temperatura se incrementó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las oscilaciones continuaron ininterrumpidamente hasta

cumplir 16 horas de inducción. Para esta amplitud (5 °C) y velocidad de cambio (0.4 °C/min), se calculó un periodo de oscilación de 1 hora.

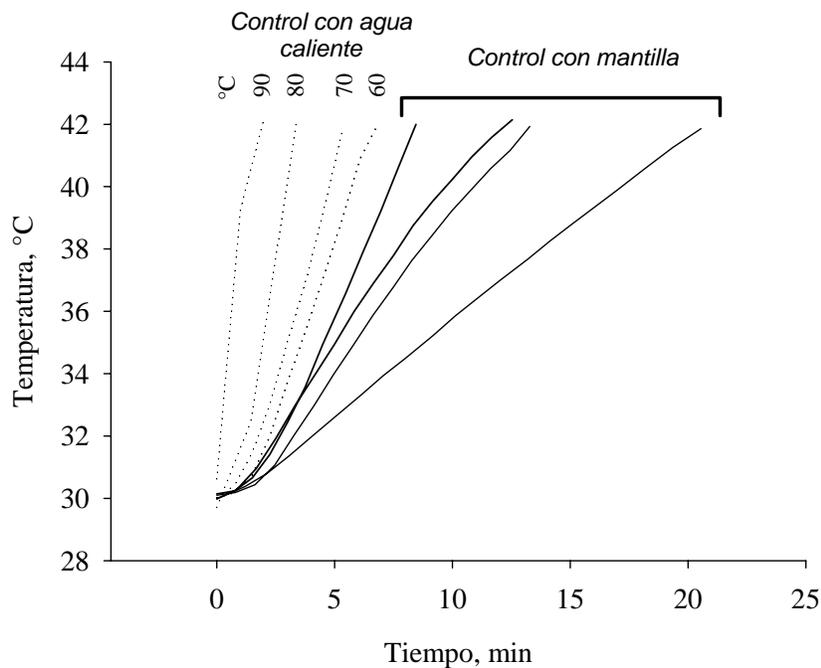


Figura 10. Efecto de la temperatura del agua transportada por el serpentín en la velocidad de calentamiento de biorreactores de 5 litros.

Un segundo esquema de oscilaciones se evaluó. Este consistió en incrementar la temperatura desde 30 °C hasta 42 °C a una velocidad de 0.4 °C/min hasta alcanzar los 42 °C. Esta temperatura se mantuvo por un periodo de 2 horas y después se disminuyó a una velocidad de 0.4 °C/min hasta el valor de pre-inducción (30 °C), el cual se mantuvo por otras 2 horas y después se incrementó nuevamente a 42 °C, y así sucesivamente hasta completar un periodo total de inducción de 16 horas. Bajo estas condiciones de oscilación, la amplitud se mantuvo en 12 °C y el periodo de oscilación en 4 horas.

5.6. Estrategias de alimentación durante la etapa de inducción

Inmediatamente después de iniciar la inducción de la producción de preproinsulina por incremento de la temperatura desde 30 a 42 °C a una velocidad de 0.4 °C/min, o por oscilaciones de temperatura, la estrategia de alimentación se mantuvo en uno de los tres perfiles siguientes: (1)

exponencial para mantener una velocidad específica de crecimiento teórica de 0.08 h^{-1} (exponencial-1 o baja); (2) lineal con una pendiente de 0.125 g/min de glucosa alimentada (lineal o baja); o (3) exponencial para mantener una velocidad específica de crecimiento teórica de 0.12 h^{-1} (la utilizada durante la etapa de lote-alimentado) (exponencial-2 o alta). En la tabla 4 se muestran los ajustes hechos a las principales variables y constantes del modelo estimador (ecuación 4). Nótese que el subíndice F , que anteriormente diferenciaba a los parámetros obtenidos al final de la fase lote del cultivo, ahora se cambió por Fa el cual refiere a los valores finales de la fase del lote-alimentado.

Tabla 4. Estrategias de alimentación durante la inducción.

Modelo estimador	Estrategia de Alim. durante la inducción	Variables
$G = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_{set} + m \right] x_{Fa} V_{Fa} \exp [\mu_{set} (t - t_{Fa})]$	Exponencial-1 (baja)	$\mu_{set}=0.08^{-1}$
	Lineal (media)	$\mu_{set}=0.12^{-1}$ y $t = t_{Fa}$
	Exponencial-2 (alta)	$\mu_{set}=0.12^{-1}$

5.7. Métodos analíticos

5.7.1. Concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó con base en la densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanómetros. Para esto se extrajeron muestras del biorreactor y se mezclaron con cantidades adecuadas de agua destilada para diluir a las concentraciones necesarias (diluciones entre 1:2 y 1:200). La densidad óptica de estas muestras se midió previa calibración del espectrofotómetro con agua destilada. También se determinaron las concentraciones de biomasa en peso seco de muestras de caldo de cultivo sin diluir. Para esto se tomaron de 1.5 a 6 mL de caldo de cultivo, se centrifugó a $12,000g$ por 10 minutos y

posteriormente, la biomasa se lavó con solución salina, se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones y se seco a 80 °C por al menos 24 horas hasta que las muestras se mantuvieron en peso constante. Con los datos de densidad óptica y biomasa en peso seco se construyó una curva estándar con la cual, los datos de DO se convertían en concentración de biomasa en peso seco. El sobrenadante de la primera centrifugación se guardó a -20 °C para posteriormente analizar y cuantificar los metabolitos de fermentación por HPLC.

5.7.2. Aislamiento y cuantificación de la preproinsulina humana

5.7.2.1. Preparación de los lisados celulares, fracciones solubles e insolubles

La preproinsulina producida se agregó en cuerpos de inclusión, por lo que para su extracción y purificación fue necesario lisar las células y separar la fracción soluble de la insoluble donde se encontraban dichos agregados. La preparación de los lisados celulares totales así como de las fracciones solubles e insolubles se realizó por sonicación y centrifugación en frío de las muestras, tal y como lo describe Seeger et al. (1996). Las muestras de caldo de cultivo tomadas en la fase de inducción fueron centrifugadas a 12,000g y 4 °C por 10 minutos, para después separar el sobrenadante del pellet de biomasa. A continuación, el pellet se resuspendió en una solución 50 mM de Tris-HCl a pH 7.0 hasta alcanzar una DO de 4 a una longitud de onda de 600 nm. Las células resuspendidas fueron sonicadas durante tres periodos de 10 segundos; las muestras se mantuvieron todo el tiempo en hielo. La suspensión de células lisadas se centrifugó a 15,000g por 45 minutos a 4 °C. Después se separó el sobrenadante del pellet que contenía las proteínas de membrana y los cuerpos de inclusión.

5.7.2.2. Extracción y purificación de cuerpos de inclusión

En este trabajo también se evaluó el efecto de las diferentes estrategias de inducción sobre la calidad de los agregados formados por la preproinsulina y proteínas del hospedero. Por tal motivo, también se aislaron y purificaron los cuerpos de inclusión por el método de De Bernardez et al. (1999), que se muestra en la figura 11.

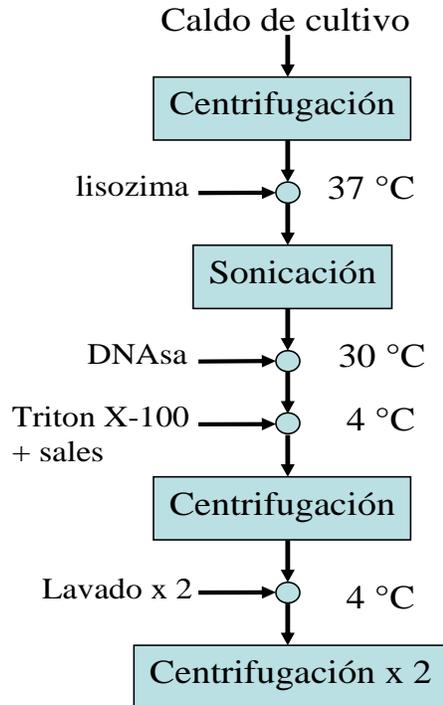


Figura 11. Estrategia de aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión. De Bernardez et al., 1999.

Brevemente, 50 μL de caldo de cultivo (aproximadamente 55 $\text{g}_{\text{BPS}}/\text{L}$) se centrifugaron a 12,000g y 4 °C por 10 minutos. El pellet se resuspendió en una solución 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones; esta operación se repitió una vez más para lavar completamente las células. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 300 μl de buffer de lisis (0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA) y se le agregaron 0.9 mg de lisozima. La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C y después se sonicó a las condiciones descritas en la sección anterior. La incubación con lisozima y la sonicación eficientaron el rompimiento celular. Después, para digerir el DNA, a la solución de células rotas se le agregaron DNAsa y MgCl_2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 3 mM, respectivamente) y la mezcla se incubó por 30 minutos a 25 °C. Posteriormente, para disolver las membranas y facilitar la remoción de las proteínas de membrana por centrifugación, se agregó EDTA (20 mM), Triton-x100 (2 %) y NaCl (0.5 M) y la mezcla se incubó a 4 °C por 30 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14,000g y 4 °C por 45 minutos; el sobrenadante se separó del pellet que contenía sólo los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se

resuspendieron en 2 ml de una solución 0.1 M Tris-HCl, pH 7, 20 mM EDTA y se centrifugaron. Este procedimiento de lavado se realizó dos veces más.

5.7.2.3. Dilución de cuerpos de inclusión y preparación de muestras para su análisis por SDS-PAGE y ensayos de Bradford

Para disolver las fracciones insolubles (que contenían cuerpos de inclusión y restos de membrana) o los cuerpos de inclusión puros, estos se resuspendieron en una solución 50 mM de NaPO₄ (pH 7) y se mezclaron (1:4) con buffer desnaturante (6 M Urea, 4.6% (w/v) de SDS, 10% (v/v) de β-mercaptoetanol, 20% (v/v) de glicerol y 10% (v/v) de Tris-base 0.25 M (pH 6.8)). Las mezclas se calentaron a 98 °C por 30 min.

5.7.2.4. Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las muestras solubilizadas de la fracción insoluble de los lisados celulares totales obtenidos después de lisar y centrifugar el caldo de cultivo, así como los cuerpos de inclusión, se cargaron en geles al 16 % de poliacrilamida con sulfato dodecácil de sodio (SDS-PAGE). Las muestras se corrieron a corriente constante de 30 mA por gel hasta que el frente de colorante salió del gel. Posteriormente las bandas de los geles se tiñeron con azul de comassie y el exceso de colorante se retiró con una solución de ácido acético:metanol:agua (10:5:85 % volumen-volumen). Después, los geles se escanearon y el área e intensidad de las bandas se determinaron mediante densitometría utilizando el analizador de imágenes ImageJ de la National Institute of Health (NIH Image 1.61/Fat software).

5.7.2.5. Análisis de la proteína total por ensayos de Bradford

La concentración de proteína contenida en las fracciones insolubles de los lisados celulares totales obtenidos después de lisar y centrifugar el caldo de cultivo, así como los cuerpos de inclusión se determinó con ensayos de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay: Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

5.7.3. Identificación y cuantificación de glucosa y metabolitos de fermentación por HPLC

La cuantificación de ácidos orgánicos y glucosa se realizó mediante un HPLC equipado con detectores de índice de refracción (IR) y de arreglo de diodos (UV), utilizando una columna Aminex HPX 87H (Biorad). Como fase móvil se utilizó una solución de H₂SO₄ 8 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a temperatura de 50 °C.

5.8. Análisis transcripcional

5.8.1. Toma de muestra, aislamiento del RNA y síntesis de cDNA

Cuando los cultivos alcanzaron entre 55 y 60 g_{BPS}/L, la temperatura se incremento desde 30 a 42 °C para inducir la producción de la preproinsulina humana. Antes y durante el aumento de la temperatura se tomaron muestras a 30, 38 y 42 °C. Las muestras se enfriaron rápidamente en 2 mL de RNALater™ (Ambion Inc., Austin TX) previamente empacado en hielo para proteger la integridad del RNA antes de la extracción. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5,000g y la extracción del RNA total se realizó rápidamente con el método del fenol caliente, auxiliándose siempre de solventes anti-RNAsas (Ambion Inc., Austin TX) para limpiar el material utilizado. Después de la extracción, el RNA se precipitó con una solución 3 M de acetato de sodio (pH 5.7) y etanol absoluto y se centrifugó a 14,000g y 4 °C por 15 minutos. El RNA se trató con DNasa I y su concentración se cuantificó cuidadosamente por densitometría en gel de azarosa y por la relación entre absorbancias a 280 y 260 nm. El cDNA se sintetizó por PCR utilizando los primers cuyas secuencias se encuentran en la tabla 5, y en la tabla 1 se da una breve descripción de los genes seleccionados. El cDNA sintetizado se usó como templado para los ensayos de PCR en tiempo real (RT-PCR).

5.8.2. RT-PCR semicuantitativa

Para los análisis de expresión, síntesis y degradación de mRNA se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), la cual ha demostrado su utilidad y precisión para el monitoreo de niveles de expresión de genes en cultivos bacterianos (Flores et

al., 2005). El cDNA obtenido sirvió como templado para la qRT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para cada gen estudiado (tabla 5). Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron de tal manera que el tamaño de los amplicones fuera de 101 pb. Los experimentos de RT-PCR se corrieron por triplicado para cada uno de los genes en cada condición, y además se corrieron controles individuales sin cDNA para cada gen. La qRT-PCR se realizó en un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer/Applied Biosciences, Boston, MA) usando SYBER green PCR Master MixTM. Las condiciones de amplificación se describen en Flores et al. (2005). La concentración de primer fue de 0.2 mM en un volumen total de 12 μ L. dicho volumen también contenía 5 ng del cDNA problema. Los ensayos se corrieron por triplicado y la desviaciones estándar fueron menores a 0.3 ciclos.

5.8.3. Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de cada gen

La cuantificación relativa de los niveles de expresión se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Shmittgen (2001). Para la normalización de los datos se revisó la expresión de varios genes, siendo la de *ihfB* la única que no variaba a las tres condiciones (30, 38 y 42 °C), por lo que este gen se utilizó como control interno para normalizar la expresión de genes a cada condición (primer Δ). La expresión de los genes seleccionados a la condición de 30 °C fue empleada como control para normalizar los datos de expresión a 38 y 42 °C (segundo Δ), por lo que los valores reportados son normalizados a 30 °C.

Tabla 5. Relación de genes y oligos utilizados para la qRT-PCR.

Genes	Oligos	Secuencias
<i>clpB</i>	clpBa	5'-GAACAAATGCGTGGAGGTGA-3'
	clpBb	5'-TGTTCCGGCTCGTTCGGTAA-3'
<i>dnaJ</i>	dnaJa	5'-AACAGCACCCGATTTTCGAG-3'
	dnaJb	5'-GGTCGGTACTTCGATTTTCGC-3'
<i>dnaK</i>	dnaKa	5'-ACGGTCTGGACAAAGGCACT-3'
	dnaKb	5'-GCCGTCAACTTCGTCGATTT-3'
<i>ftsH</i>	ftsHa	5'-TATTCCAGAGCTTTGGGCCC-3'
	ftsHb	5'-GATACGCGCTTCACGAACCT-3'
<i>groE</i>	groEa	5'-CTAAATCTGCTGGCGGCATC-3'
	groEb	5'-GCCATTTTCAAGGATACGGC-3'
<i>ibpA</i>	ibpAa	5'-TTTATCCCCGCTTTACCGTTC-3'
	ibpAb	5'-CGTTATACGGAGGGTAGCCG-3'
<i>ibpB</i>	ibpBa	5'-TTATCCCCACTGATGCGTCA-3'
	ibpBb	5'-TTCTCAATGTTGTACGGCGG-3'
<i>ihfB</i>	ihfBa	5'-GCCAAGACGGTTGAAGATGC-3'
	ihfBb	5'-GAGAAACTGCCGAAACCGC-3'
<i>ins</i>	Insa	5'-ATCATCACATGGGTCGTTTCG-3'
	Insb	5'-CGGCGTGTAGAAGAAGCCAC-3'
<i>relA</i>	relAa	5'-ACAATGTTGATCCGGCGAAG-3'
	relAb	5'-CATATCGATCGCACGAGTCG-3'
<i>rpoA</i>	rpoAa	5'-TCAACCTGAAAGGGCTGGC-3'
	rpoAb	5'-GGTGATATCGGCTGCAGTCA-3'
<i>rpoH</i>	rpoHa	5'-CAGTTGGCAACCTGGATTCC-3'
	rpoHb	5'-GCCATGGTAATGCAGCTTTTC-3'
<i>rpoS</i>	rpoSa	5'-GGACGCGACTCAGCTTTACC-3'
	rpoSb	5'-CGACATCTCCACGCAGTGC-3'
<i>spoT</i>	spoTa	5'-GGACGCGACTCAGCTTTACC-3'
	spoTb	5'-CGACATCTCCACGCAGTGC-3'
<i>Tig</i>	Tiga	5'-GCCGCCGTGTAACGATTACT-3'
	Tigo	5'-GCCGAAGCCGTCAATACGTA-3'
<i>tufB</i>	tufBa	5'-CAGAGCGTGCGATTGACAAG-3'
	tufBb	5'-GATACCGCGTTCTACACGACC-3'

6. Resultados y discusión

6.1. Análisis de régimen

Para aplicar la metodología del escalamiento descendente al estudio de las interacciones entre la velocidad de calentamiento de varias escalas de biorreactores y las respuestas fundamentales de *E. coli* productora de proteína recombinante, primero se realizó un análisis de régimen. Dicho análisis consistió en comparar los tiempos característicos del proceso de transferencia de calor de biorreactores de varias escalas y los tiempos característicos de las respuestas celulares a incrementos varios de temperatura. Las respuestas celulares evaluadas fueron la síntesis de proteínas de choque térmico y la degradación de proteínas de la maquinaria celular de transcripción/traducción, esta última como característica de la respuesta estricta.

6.1.1. Cálculo de los tiempos característicos

6.1.1.1. Mezclado

La constante de tiempo para el mezclado se puede expresar como el tiempo de circulación (Osterhuis, 1984) calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$t_c = \frac{V}{2D_i N \pi^2 D_t^2} \dots\dots\dots(5)$$

en esta ecuación se asocia la circulación de un volumen de líquido (V) con la capacidad de bombeo generada por la velocidad de agitación (N) de turbinas cuyo diámetro (D_i) se relaciona con el diámetro del biorreactor (D_t).

Durante el aumento de volumen, la velocidad a la que se pueden agitar los cultivos disminuye por las limitaciones físicas del biorreactor y las condiciones de operación (Nielsen *at al.*, 2003), por lo que el valor de t_c disminuye a medida que aumenta la escala (figura12).

6.1.1.2. Transferencia de calor

La constante de tiempo para la transferencia de calor (t_{HT}) se puede definir como el cociente de la capacidad calorífica del receptor (el caldo de cultivo) entre el flujo de calor que se

transfiere desde el calefactor (vapor en serpentín y chaqueta) (Oosterhuis, 1984), y se calcula con la siguiente ecuación:

$$t_{HT} = \frac{V\rho C}{UA} \dots\dots\dots(6)$$

de esta ecuación se deriva que la capacidad para transferir calor desde el elemento calefactor hasta un volumen de líquido (V) con densidad (ρ) y capacidad calorífica (C), depende del coeficiente global de transferencia de calor (U) y del área total de transferencia de calor (A). Dado que la relación V/A aumenta con la escala (figura 2, sección de antecedentes), se puede esperar que el valor de t_{HT} también aumente con la escala (figura 12).

6.1.1.3. Síntesis o degradación de proteínas de las respuestas al estrés por choque térmico y estricta

La síntesis o degradación de proteínas de las respuestas de choque térmico y estricta (figura 4, sección de antecedentes) se utilizaron para evaluar los procesos celulares de respuesta al aumento de la temperatura. Los perfiles cinéticos reportados para estos procesos corresponden a cinéticas de primer orden (Lemaux *et al.*, 1978; Yamamory y Yura, 1980; de Straus *et al.*, 1987), por lo que las constantes de tiempo para la síntesis (t_s) y degradación (t_d) se pueden calcular como:

$$t_s = \frac{[P_s]}{r_s} = \frac{1}{k_s} \dots\dots\dots(7)$$

$$t_d = \frac{[P_d]}{r_d} = \frac{1}{k_d} \dots\dots\dots(8)$$

de donde la constante de velocidad de síntesis (k_s) o degradación (k_d), se obtienen de la pendiente de la curva obtenida de graficar el logaritmo de la concentración de la proteína sintetizada ($[P_s]$) o degradada ($[P_d]$) contra el tiempo (t), tal y como se puede discernir de las siguientes ecuaciones que asocian la velocidad de síntesis (r_s) o degradación (r_d):

$$\frac{d[P_s]}{dt} = r_s = k_s [P_s] \dots\dots\dots(9)$$

$$-\frac{d[P_d]}{dt} = r_d = k_d [P_d] \dots\dots\dots(10)$$

6.1.2. Comparación de los tiempos característicos

En la figura 12 se comparan los valores de los tiempos característicos calculados para el mezclado y la transferencia de calor de fermentadores de varias escalas. La comparación entre los tiempos característicos de transferencia de calor de tanques con volúmenes de fermentación previamente seleccionados (sección 2.3) y la síntesis de las proteínas de choque térmico ClpB y GroEL, así como la degradación de las proteínas de la maquinaria celular de transcripción y traducción EF-G, RNAP- β y PheRS se presentan en la figura 13. Mediante la comparación de las constantes de tiempo se obtienen las siguientes conclusiones:

i. Los tiempos característicos para el mezclado son mucho más pequeños que los correspondientes para la transferencia de calor (figura 12), por lo tanto se puede esperar que no aparezcan gradientes de temperatura. Esto ha sido verificado experimentalmente en fermentadores de 19 y 112 m³ (Oosterhuis, 1984 ; Manfredini y Cavallera, 1983).

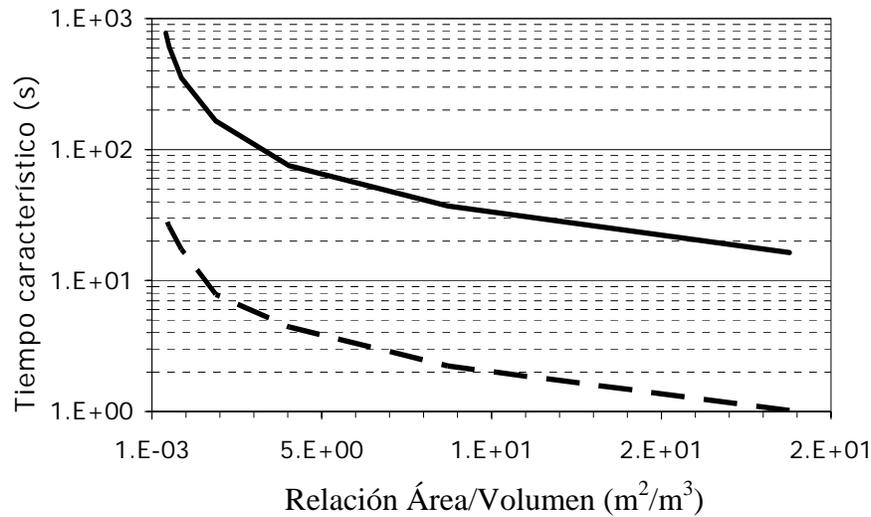


Figura 12. Tiempos característicos de circulación (---) y de transferencia de calor (—) para biorreactores de varios volúmenes.

ii. Los tiempos característicos para la transferencia de calor en fermentadores menores de 0.1 m³ son mas pequeños que los correspondientes a los mecanismos celulares de respuesta al aumento de la temperatura (síntesis de proteínas de choque térmico y degradación de la maquinaria de síntesis de RNA y proteína) (figura 13). Por lo tanto, la velocidad de transferencia de calor es mayor que la velocidad de los mecanismos celulares; de tal manera que estos últimos controlan el proceso en escala de desarrollo en el laboratorio. Sin embargo, las constantes de

tiempo para la transferencia de calor en fermentadores mayores o iguales a 0.1 m^3 son iguales o más grandes que las correspondientes a algunos de los mecanismos celulares activados a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ (síntesis de las proteínas de choque térmico ClpB y GroEL). Por lo tanto, la velocidad de aumento de la temperatura es menor que la velocidad de los mecanismos celulares, y se esperaría que antes de alcanzar la temperatura óptima de inducción ($42 \text{ }^\circ\text{C}$) en biorreactores mayores a 0.1 m^3 , los mecanismos celulares se encuentren adelantados y tengan influencia sobre la respuesta esperada del proceso global (rendimiento y calidad de la proteína heteróloga).

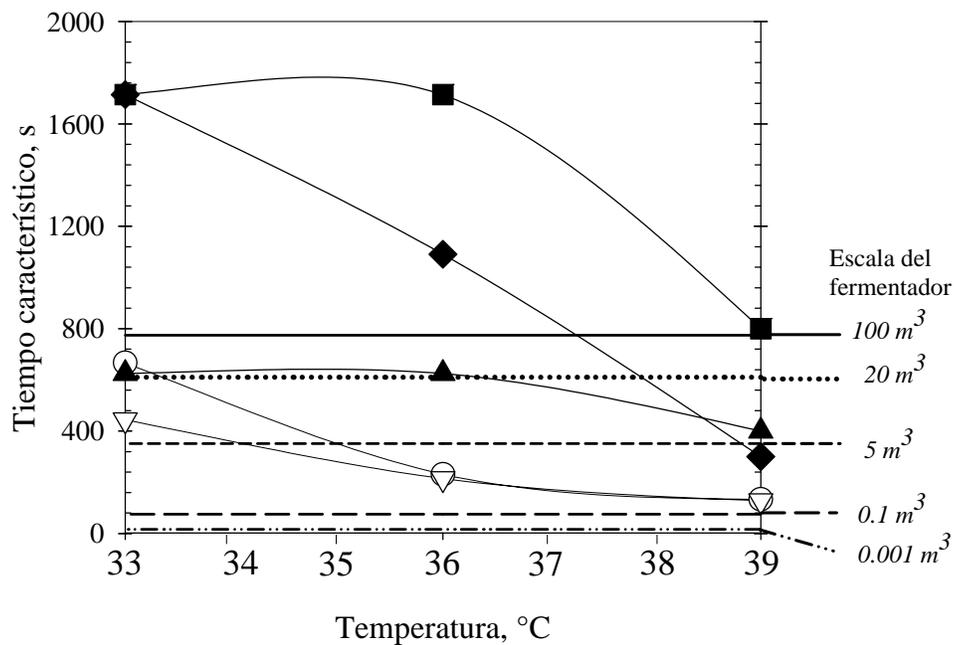


Figura 13. Comparación entre los tiempos característicos de transferencia de calor y las respuestas celulares (síntesis de proteínas de choque térmico y degradación de proteínas de la maquinaria de transcripción y traducción) al incremento de la temperatura a partir de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Las líneas paralelas al eje de las X's, corresponden a los tiempos característicos para fermentadores de volúmenes seleccionados (ver sección 2.3). Los tiempos característicos para la síntesis de las proteínas de choque térmico ClpB (círculos blancos) y GroEL (triángulo blanco invertido) y la degradación de proteínas de la maquinaria celular de transcripción/traducción: factor de elongación G, EF-G (cuadrados negros), subunidad β de la RNA polimerasa, RNAP- β (rombos negros) y fenilalanil-tRNA sintasa, PheRS (triángulos negros) se calcularon con las ecuaciones 7 y 8, utilizando datos cinéticos de trabajos previos (Strauss et al., 1987; Yamamory y Yura, 1980; Lemaux et al., 1978). En general, mientras los tiempos característicos de la velocidad de síntesis y degradación de las proteínas seleccionadas decrecen con el incremento de la temperatura (esto es que la velocidad de síntesis y degradación aumenta conforme se incrementa la temperatura), los correspondientes a la transferencia de calor permanecen constantes.

6.2. Escalamiento descendente de las respuestas fisiológicas de *E. coli* al incremento de la temperatura a velocidades típicas de gran escala para inducir la producción de preproinsulina humana recombinante (PIH) en cultivos a alta densidad celular

En esta sección se presentan los resultados de los experimentos dirigidos a investigar las respuestas fisiológicas de *E. coli* productora de preproinsulina humana termo-inducida a las condiciones de calentamiento que prevalecen en biorreactores de gran escala. Estas investigaciones se realizaron en un sistema de escalamiento descendente diseñado y construido con biorreactores de laboratorio (figura 9). En dicho sistema, se realizaron cultivos en modo de lote alimentado a 30 °C hasta alcanzar concentraciones celulares de entre 55 y 60 g_{BPS}/L; posteriormente, la producción de la preproinsulina humana se indujo por incremento de la temperatura hasta 42 °C empleando 4 velocidades de calentamiento características de biorreactores de 0.1, 5, 20 y 100 m³. Las muestras para el análisis de la respuesta transcripcional se tomaron exactamente a 30 °C (antes de inducir), y durante el incremento de la temperatura a 38 °C y justo al alcanzar los 42 °C. La inducción permaneció por 8 horas, durante las cuales se tomaron muestras para determinar la concentración de preproinsulina humana, biomasa en peso seco, glucosa y metabolitos de fermentación (acetato, lactato y formato).

6.2.1. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre el crecimiento, la producción de PIH y el metabolismo.

Las cinéticas típicas de un cultivo a alta densidad celular de *E. coli* para la producción termo-inducida de preproinsulina humana se muestran en la figura 14. Los cultivos se iniciaron con una fase en lote de aproximadamente 15 h, seguido de una fase en lote-alimentado en donde la glucosa se alimentó siguiendo un perfil de incremento exponencial hasta que se obtuvieron aproximadamente de 55 a 60 g_{BPS}/L, momento en el que se incrementó la temperatura de 30 a 42 °C, iniciándose la fase de producción; al mismo tiempo, el perfil de alimentación cambió de un flujo exponencial a uno constante.

En la fase lote, el crecimiento del cultivo se retrasó aproximadamente 3 h, seguido de un crecimiento exponencial a una velocidad específica (μ) de 0.45 h⁻¹; la acumulación de acetato y

formato comenzó después de 12 h, llegando a concentraciones menores de 0.5 g/L; el rendimiento de biomasa por sustrato se mantuvo en valores aproximados a 0.45 g_{BPS}/g.

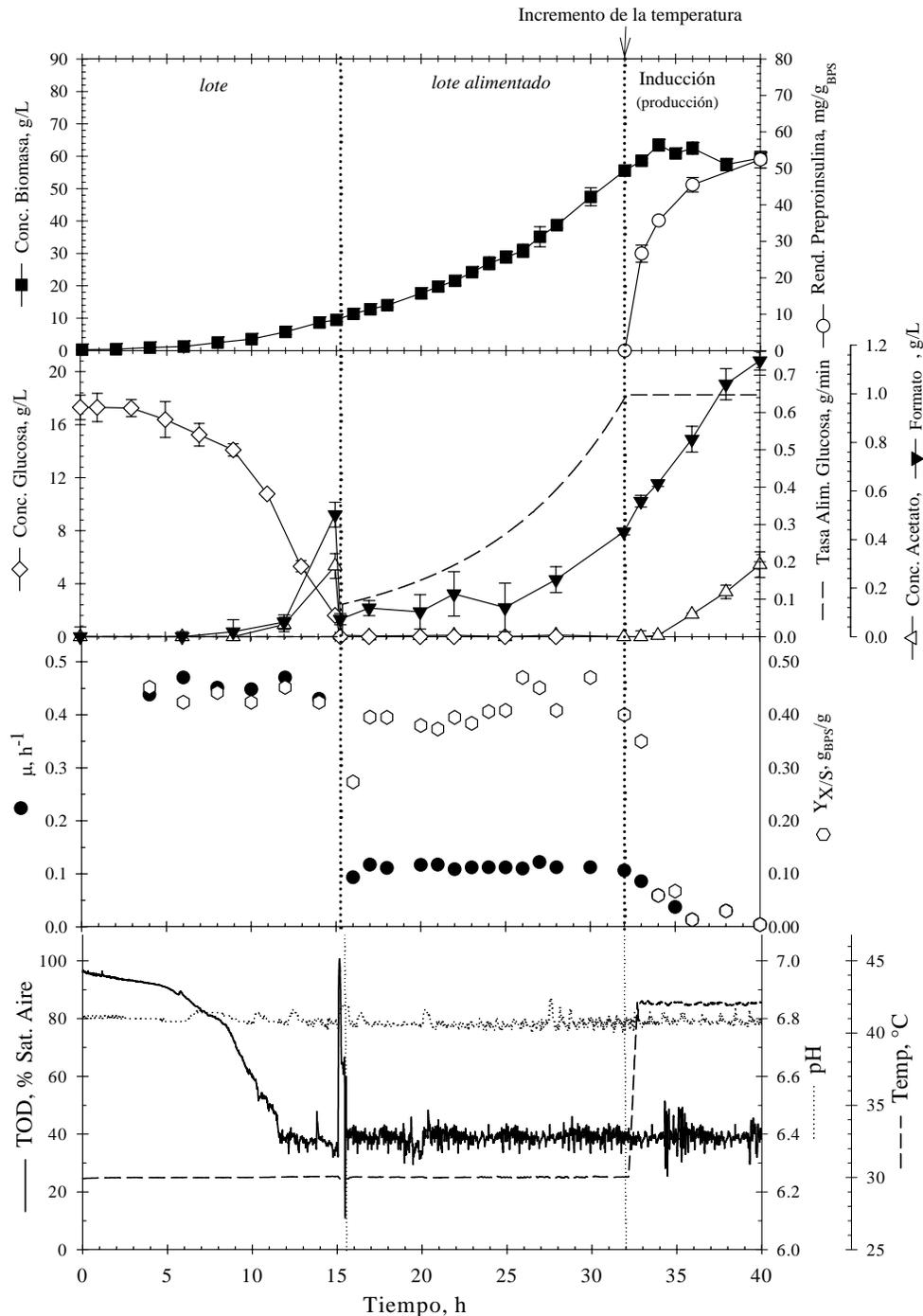


Figura 14. Cinéticas típicas de los principales parámetros del proceso de producción de preproinsulina humana (PIH) por cultivos a alta densidad celular de *E. coli*. La etapa de producción muestra datos de cultivos inducidos a una velocidad de calentamiento de 0.4 °C/min.

A la fase lote le siguió la fase de lote-alimentado. Cuando la glucosa se agotó, lo cual se dedujo de las perturbaciones en el control de la TOD y el pH (figura 14), se inició la alimentación de glucosa y otros nutrientes al caldo de cultivo a una tasa exponencialmente incrementada para mantener una μ de 0.12 h^{-1} . Durante toda la fase de lote alimentado que duró alrededor de 16 h, el rendimiento de biomasa por glucosa consumida se mantuvo entre 0.4 y $0.45 \text{ g}_{\text{BPS}}/\text{g}$; no se observó la acumulación de acetato y lactato, y el formato acumulado al final del *batch* se conservó.

Cuando se alcanzaron aproximadamente $55 \text{ g}_{\text{BPS}}/\text{L}$, la inducción de la síntesis de la preproinsulina humana se realizó incrementando la temperatura a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ a las 4 velocidades mostradas en la figura 15. Al mismo tiempo, la estrategia de alimentación de glucosa se cambió de exponencial a lineal (pendiente = $0.235 \text{ g}/\text{min}$) (figura 14). En todos los cultivos, las fases previas a la inducción (lote y lote alimentado) fueron muy similares con desviaciones menores al 10 %. Asimismo, los valores de TOD, pH y temperatura se mantuvieron muy cerca del valor esperado (figura 14), por lo que se asegura que los cambios durante la fase de inducción (producción) se debieron sólo a las diferencias en la velocidad de calentamiento.

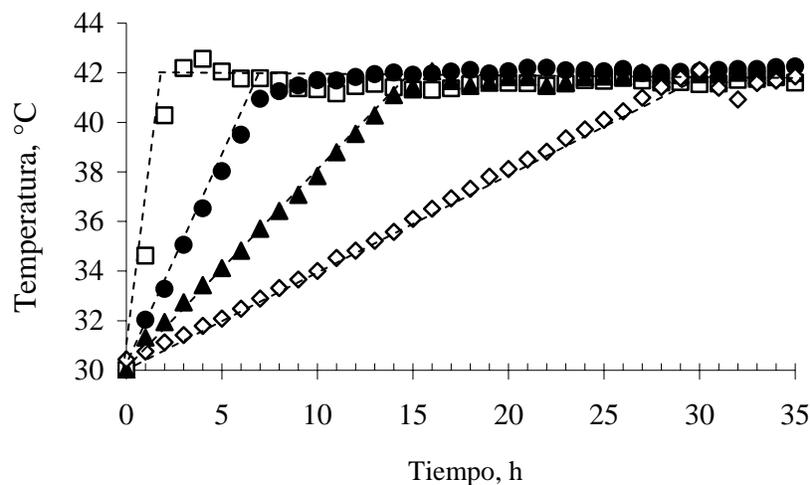


Figura 15. Perfiles de calentamiento para incrementar la temperatura desde 30 a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ a velocidades típicas de biorreactores de 0.1 , 5 , 20 y 100 m^3 . 0.1 m^3 , $6 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (cuadrados blancos); 5 m^3 , $1.7 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (círculos negros); 20 m^3 , $0.8 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (triángulos negros); y 100 m^3 , $0.4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (rombos blancos). Las líneas discontinuas denotan a los perfiles de calentamiento calculados y los símbolos a los perfiles de calentamiento experimentales.

En la figuras 16 y 17 se muestra el efecto de la velocidad de calentamiento sobre las variables de cultivo. El crecimiento celular cesó 2 ó 3 h después de incrementar la temperatura a cualquier velocidad (figura 16). Este fenómeno es comúnmente observado durante la etapa de inducción y es causado por la sobrecarga metabólica impuesta por la síntesis de la proteína heteróloga (Schmidt et al., 1999; Seeger et al., 1996; Wittmann et al., 2007), así como por la sobre síntesis de las proteínas nativas de respuesta al estrés por choque térmico (Hoffmann y Rinas, 2001) y la reducción de la capacidad biosintética de las células. Esto último es causa de la reducción en la síntesis de proteínas de la maquinaria celular de transcripción y traducción (Hoffmann et al., 2002; Rinas, 1996). No se observó un efecto de la velocidad de calentamiento en la acumulación máxima de biomasa (figura 17), por lo que el crecimiento es igualmente perturbado por todas las velocidades de calentamiento probadas. Se sugiere que la temperatura subóptima para el crecimiento (42 °C) y la producción de la PIH son las causantes de la incapacidad de las células para alcanzar un nuevo estado estacionario de crecimiento balanceado, dado que las concentraciones de ácidos orgánicos no alcanzaron valores tóxicos para las células en esta etapa.

La proinsulina humana (PIH) no se acumuló antes de inducir, por lo que se asume que la expresión del gen heterólogo fue eficazmente reprimida a 30 °C (figura 14). Cuando la temperatura se incrementó a 42 °C, la PIH se acumuló rápidamente durante las primeras 2 o 3 h, y después, la velocidad de síntesis disminuyó a pesar de que la temperatura de inducción se mantuvo y la alimentación de nutrientes continuó (figuras 14 y 16). Respecto a las concentraciones y rendimientos máximos de PIH, en general, estos disminuyeron a medida que la velocidad de calentamiento se incrementó (Figura 17). Específicamente, después de 8 h de inducción, los rendimientos de PIH fueron de 52 ± 4.5 , 35.1 ± 3.7 , 29.4 ± 4.5 y 30.4 ± 2.3 mg/g_{BPS} para los cultivos inducidos a 0.4, 0.8, 1.7 y 6.0 °C/min, respectivamente; valores que corresponden a concentraciones de 3.3 ± 0.2 , 2.2 ± 0.2 , 1.8 ± 0.1 y 1.9 ± 0.1 g/L, respectivamente. Dado lo anterior, la producción de PIH fue entre 1.5 y 1.8 veces mayor en los cultivos inducidos a 0.4 °C/min, la cual corresponde al aumento típico de temperatura esperado en un biorreactor de 100 m³. El peor caso resultó aquel sometido a velocidades típicas de calentamiento de biorreactores de laboratorio.

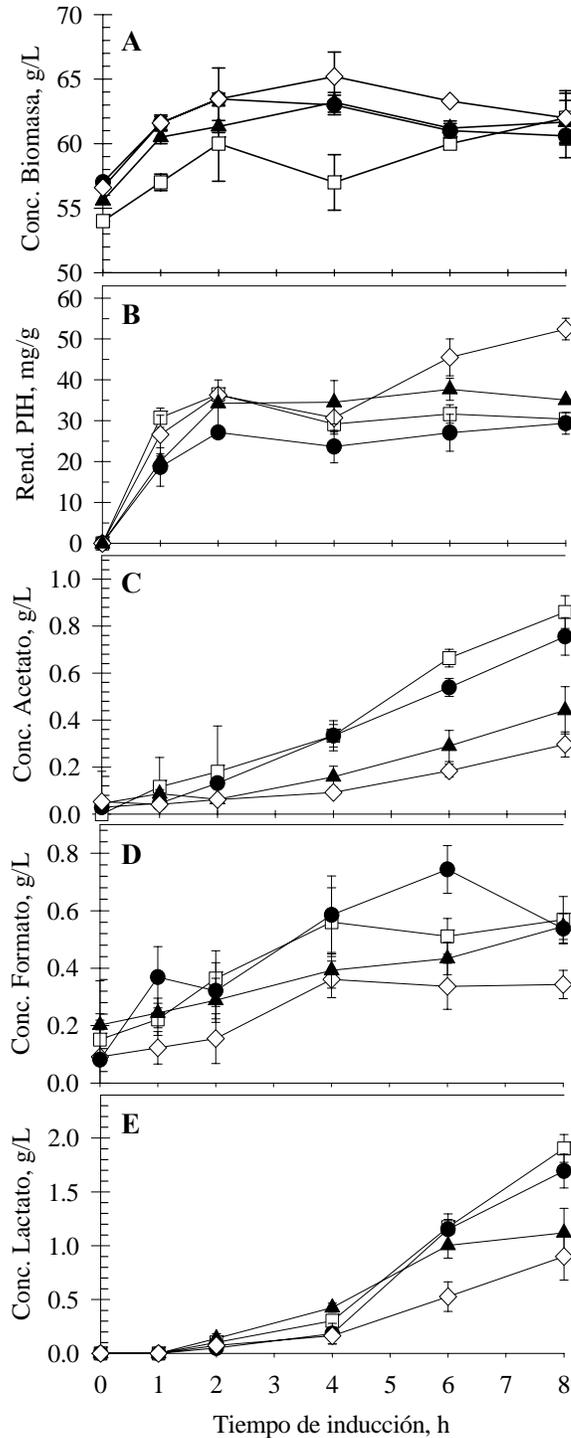


Figura 16. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la acumulación de biomasa (A), PIH (B) y metabolitos de fermentación (C, acetato; D, formato; y E, lactato) durante la fase de producción. La correspondencia de los símbolos es como sigue: 0.1 m³, 6 °C/min (cuadrados blancos); 5 m³, 1.7 °C/min (círculos negros); 20 m³, 0.8 °C/min (triángulos negros); y 100 m³, 0.4 °C/min (rombos blancos).

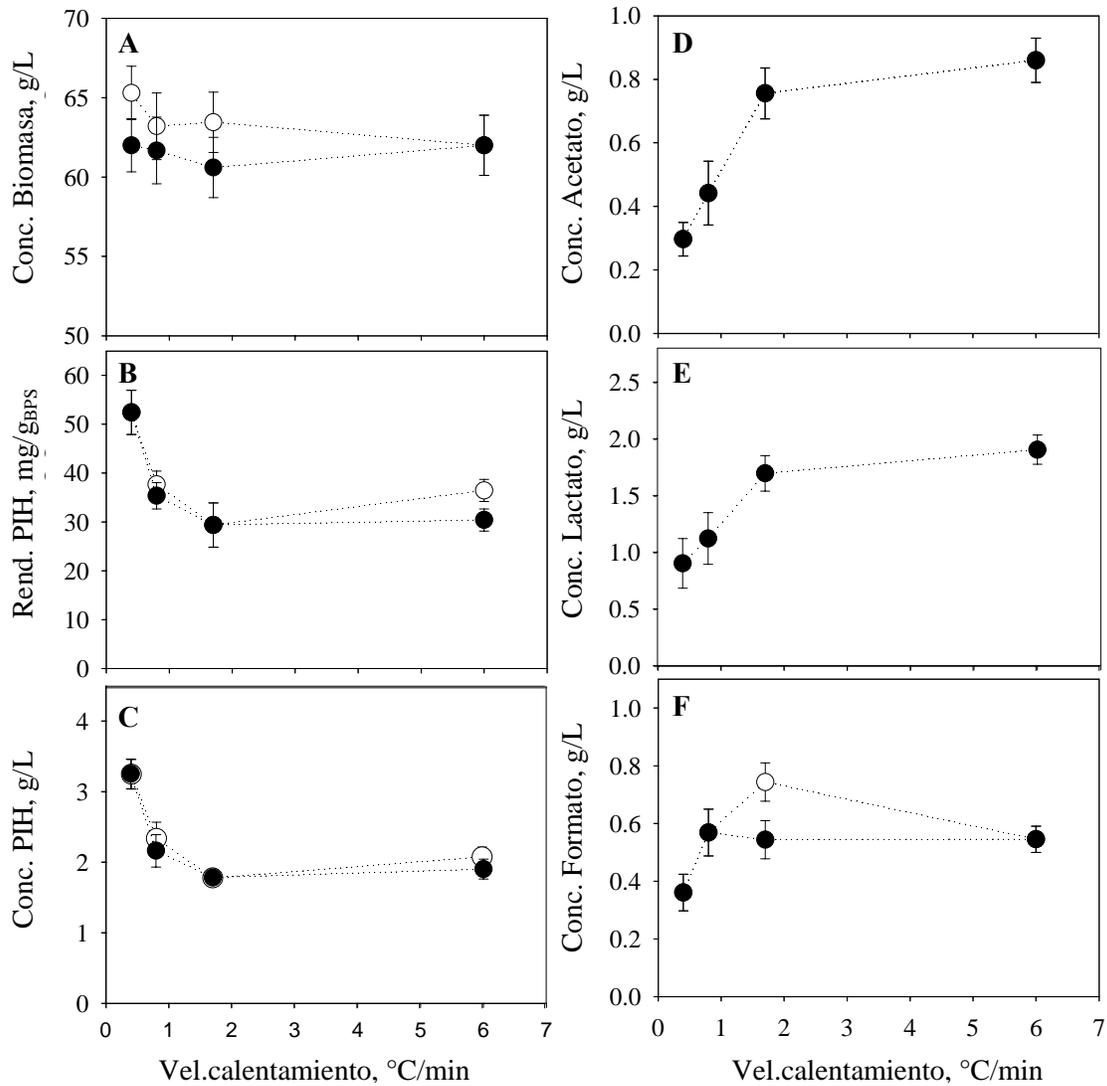


Figura 17. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre los valores finales (círculos negros) y máximos (círculos blancos) de acumulación de biomasa (A), PIH (B y C) y metabolitos de fermentación (D, E y F).

Durante el periodo de inducción, la concentración de glucosa en el caldo de cultivo permaneció en cero y la TOD en 40 % (figura 14). Sin embargo, hubo acumulación de productos de fermentación en todas las condiciones de calentamiento evaluadas (figura 16). El acetato se acumuló constantemente desde el inicio de la fase de producción y hasta el final del cultivo, alcanzando concentraciones menores a 1 g/L, las cuales no son inhibitorias para el crecimiento celular según el reporte de Luli y Strohl (1990). El formato, por su parte, se acumuló al final de la fase lote en concentraciones por debajo de 0.6 g/L (figura 14), las cuales se conservaron

relativamente constantes durante toda la fase de lote alimentado. En la etapa de producción, la concentración de formato se incrementó ligeramente alcanzando concentraciones menores de 0.8 g/L en los diversos cultivos. En contraste, el lactato comenzó a acumularse 2 h después de la inducción, para alcanzar concentraciones de 1 y 2 g/L al final de la fase de inducción (figura 17). Las concentraciones máximas de los tres ácidos orgánicos se incrementaron a medida que la velocidad de calentamiento se incrementó. De tal manera, los cultivos inducidos a 6.0 °C/min acumularon concentraciones de acetato, lactato y formato de alrededor de 2.9, 2.1 y 1.5 veces más altas que los cultivos calentados a 0.4 °C/min.

Es de resaltar que las concentraciones de acetato hayan sido menores a las de lactato, ya que el primero se acumula preferencialmente durante la producción de proteínas recombinantes (Wittmann et al., 2007). En el presente trabajo, sin embargo, usamos la cepa BL21 de *E. coli*, de la cual se sabe que consume eficientemente el acetato (Phue et al., 2005), por lo que este no alcanzó concentraciones tóxicas y su acumulación no se puede relacionar con la disminución de la velocidad específica de crecimiento encontrada en todas las condiciones de inducción. De tal forma, otro fenómeno pudo haber causado la disminución de μ , como por ejemplo, la sobre síntesis de las proteínas de choque térmico y la recombinante. La síntesis y excreción de formato, por su parte, ocurre principalmente en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, Bylund et al., (2000) reportaron mayores acumulaciones de este subproducto que de acetato, aún cuando la TOD fue controlada alrededor del 30 %. También, Sharma et al., (2007) observaron la acumulación de formato en cultivos mantenidos a 60 % de TOD. Los resultados anteriores indican que la acumulación de formato puede ocurrir también en condiciones aerobias. La formación de lactato puede ocurrir en condiciones aerobias a pH de 6.8 (Mat-Jan et al., 1989), valor de pH al que se mantuvieron las fermentaciones en este trabajo. Además, la expresión del gen que codifica para la D-lactato deshidrogenada está bajo el control del regulón de choque térmico (Zhao et al., 2005). La formación de lactato, además, ofrece ventajas a *E. coli* ya que su síntesis requiere NADH para oxidarlo y producir NAD⁺; esta última molécula acelera los flujos glicolíticos.

La acumulación de acetato y otros productos de fermentación está asociada a la producción termo-inducida de proteínas recombinantes en *E. coli* cultivada sin limitación de carbono (en lote) o con limitación (lote alimentado) (Wittmann et al., 2007). Lo anterior es consecuencia de la gran carga energética que experimentan las células tras inducir la producción

de la proteína recombinante (Weber et al., 2002; Hoffmann et al., 2002), ya que el sobre consumo de ATP tiene amplias implicaciones en el metabolismo celular. La disminución de los reservorios de ATP estimula fuertemente los flujos de carbono a través de glicólisis; esto ocasiona la disminución de las actividades anabólicas, reflejándose en la disminución de la velocidad específica de crecimiento y la producción de la proteína recombinante (Koebsmann et al., 2002; Wittmann et al., 2007). La síntesis de acetato, lactato y formato por la vía de la piruvato oixidasa y/o la fosfato acetil transferasa y acetato cinasa, piruvato formato liasa y D-lactato deshidrogenasa, respectivamente, compensan el desbalance metabólico causado por la reducción del flujo de carbono a través del ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), cuando el flujo glicolítico se acelera (Wittmann et al., 2007; Weber et al., 2002). Además, el incremento de la fosforilación a nivel de sustrato puede ser una alternativa para la producción de energía, con la salvedad de que también se produce acetato (Luli y Strohl, 1990). La mayor acumulación de ácidos orgánicos en los cultivos inducidos a las velocidades de calentamiento mas altas, sugiere que bajo estas condiciones, las células requirieron mayor cantidad de ATP para solventar la síntesis de proteínas de choque térmico y otros requerimientos relacionados al estrés causado por el incremento rápido en la temperatura, lo que pudo originar un mayor desbalance entre glicólisis y las actividades biosintéticas. Así, los bajos rendimientos y concentraciones de PIH encontrados cuando la temperatura se incrementa mas rápido pueden ser a causa de una mayor fracción de glucosa usada para la síntesis de ácidos orgánicos como consecuencia del mayor estrés experimentado por las células expuestas a condiciones de calentamiento rápido.

6.2.2. Efecto de la velocidad de calentamiento sobre la respuesta transcripcional

El análisis del efecto de la velocidad de calentamiento sobre la expresión del gen heterólogo y 14 genes endógenos representativos (6 de choque térmico, 5 de regulación de estrés y 3 de la maquinaria transcripcional-traducciona (tabla 1)) fue pieza central de los estudios realizados en esta tesis. El mRNA de muestras tomadas exactamente antes de inducir (30 °C), y a 38 y 42 °C fueron analizadas por qRT-PCR. Los resultados presentados, representan niveles relativos de mRNA de cada gen (15 genes), a cada condición (12 condiciones: 3 temperaturas y 4 velocidades de calentamiento) normalizados a la condición control a 30 °C, es decir a la

condición antes de inducir cuando todos los cultivos son semejantes. De aquí en adelante, a los niveles de mRNA así calculados se les designará como “niveles normalizados de mRNA”. Dado lo anterior, lo que los valores de la figura 18 representan, es cuantas veces se incrementó o disminuyó la expresión de un gen en particular respecto a los niveles antes de inducir, los cuales están indicados con la línea punteada en todos los paneles de la figura 18. Adicionalmente, los niveles de mRNA de los genes de choque-térmico se relativizaron con respecto a la expresión del gene de choque-térmico *groEL* (tabla 6), esto con el fin de comparar su expresión respecto a *groEL*, cuya expresión es la más abundante de los genes de choque térmico. De aquí en adelante, a los niveles de mRNA así calculados se les designará como “niveles relativos de mRNA”

En la figura 18 se muestra el efecto de las cuatro velocidades de calentamiento (0.4, 0.8, 1.7 y 6 °C/min) sobre la respuesta transcripcional de *E. coli* BL21:PIH. En general, se puede deducir rápidamente que los niveles relativos de mRNA de los genes seleccionados fueron significativamente afectados por la velocidad a la que se incrementó la temperatura. En particular, los genes de choque térmico y de regulación de estrés, así como el heterólogo, mostraron una importante sobre-expresión, mientras que los correspondientes a la maquinaria celular de transcripción/traducción disminuyeron.

Las diferencias más importantes en la transcripción de los genes de choque térmico ocurrieron cuando la temperatura se incrementó desde 38 a 42 °C (círculos negros, figura 18), sugiriendo que por arriba de 38 °C se suscita el mayor reacomodo de la expresión genética, que como se observa en la figura 18, es más sobresaliente en los cultivos calentados a 6, 1.7 y 0.8 °C/min, pero no cuando se calienta a 0.4 °C. Estos resultados sugieren que las células expuestas a cambios rápidos en la temperatura requieren de la expresión de novo de genes que le ayuden a contender con el estrés y recuperar la homeostasis, situación que no es evidente en las células expuestas a la velocidad más lenta de calentamiento.

Los niveles de mRNA de los tres genes de la maquinaria transcripcional-traducciona evaluados disminuyeron cuando la temperatura se incrementó a 6.0, 1.7 y 0.8 °C/min, pero no a 0.4 °C/min. En conjunto, estos resultados muestran que el tiempo de respuesta para sensar, procesar la señal, e inducir la expresión de los genes seleccionados ocurre en un periodo menor a 80 segundos, que es el tiempo necesario para incrementar la temperatura de 30 a 38 °C cuando el caldo de cultivo se calienta más rápidamente a 6 °C/min. Esto indica que se pueden encontrar diferencias en la expresión de los genes seleccionados aun en fermentadores tan pequeños como

de 100 L de capacidad. Los mecanismos de regulación de la expresión genética en *E. coli* son muy dinámicos, de tal manera que los niveles de transcripción pueden variar en cuestión de segundos cuando se expone a cambios tan dinámicos como los gradientes de oxígeno disuelto y glucosa (Lara et al., 2006-b; Schweder et al., 1999). Respecto al incremento de temperatura, esta dinámica se había evaluado solamente después de incrementarla súbitamente (Lemaux et al., 1978; Yamamori y Yura, 1980), pero hasta ahora, no existía reporte alguno que haya estudiado en detalle las diferentes dinámicas de calentamiento, como ocurre cuando se incrementa la escala del biorreactor, y que, como se pudo apreciar en los resultados mostrados, tienen un efecto importante en la forma en que se modula la expresión de los genes de choque térmico. Una mayor discusión se ofrece adelante.

6.2.2.1. Efecto sobre la transcripción de genes de choque térmico

Los niveles normalizados de acumulación de mRNA de los genes de choque térmico se incrementaron entre 1.5 y 40 veces cuando la temperatura se aumentó a velocidades mayores a 0.4 °C/min, siendo los mayores cambios a 42 °C (figura 18). A 0.4 °C/min, los niveles normalizados de mRNA se mantuvieron sin cambio, o sólo se observaron incrementos pequeños. Estos resultados son importantes para la optimización del proceso de producción de proteína recombinante, ya que la sobre síntesis de proteínas endógenas compite con la recombinante por la maquinaria celular, precursores y energía.

Resultados como los mostrados en la figura 5 (sección de antecedentes) fueron obtenidos para la acumulación de proteínas de choque térmico 5 minutos después de incrementar rápidamente la temperatura desde 30 a 42 °C (Lemaux et al., 1978; Yamamori y Yura, 1980; Yamamori et al., 1978). Yamamori et al., (1978) reportaron que la síntesis de proteínas de choque térmico se incrementa por un factor de 7, alcanzando niveles de síntesis de alrededor del 21 % del total de la proteína sintetizada. Yamamori y Yura (1980), reportaron que la sobre-expresión de proteínas de choque térmico después de incrementar la temperatura de cultivo de 30 a 42 °C pasa por una fase lag de aproximadamente 60 s, por lo que los niveles bajos de mRNA de los genes de choque térmico encontrados a 6 °C/min en este trabajo pueden ser consecuencia del poco tiempo de exposición a temperaturas por arriba de 33 °C (la temperatura crítica para inducir la respuesta de choque térmico) y debajo de 42 °C.

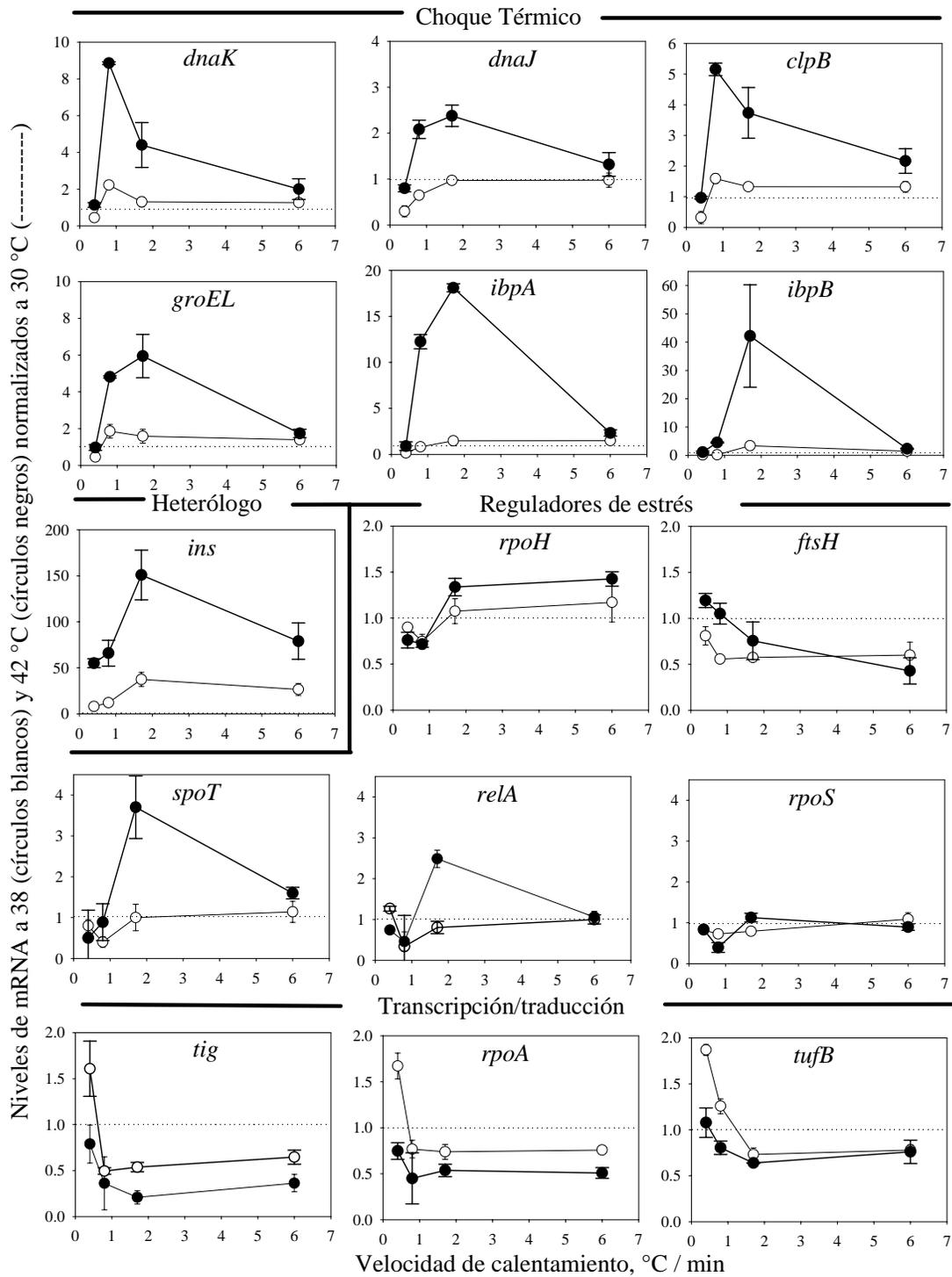


Figura 18. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre la respuesta transcripcional de genes selectos de *E. coli*. Los círculos negros y blancos denotan los niveles normalizados de mRNA a 38 y 42 °C, respectivamente.

Lo anterior sugirió la necesidad de evaluar los resultados de transcripción de los genes de choque térmico mediante una representación dinámica; esto es, mediante representaciones graficas que relacionen la velocidad de acumulación de mRNA contra las diferentes velocidades de calentamiento. Esta representación se muestra en la figura 19. Excepto para *dnaK*, las velocidades de transcripción de los otros genes se incrementaron con la velocidad de calentamiento hasta 1.7 °C/min, y después, solamente la insulina siguió aumentando a 6 °C/min. Estos resultados sugieren que las bacterias expuestas a 1.7 °C/min tienen tiempo de desarrollar esta respuesta en su totalidad, es decir, a niveles similares a los obtenidos cuando la temperatura se incrementa de 30 a 42 °C (Lemaux et al., 1978; Yamamori y Yura, 1980). Estos resultados también son consistentes con los obtenidos por Heitzer y colaboradores (1992), quienes encontraron que la velocidad de síntesis de la proteína de choque térmico HtpG se incrementó con la velocidad de calentamiento cuando la temperatura de los cultivos se incrementó de 37 a 42 °C a velocidades de 2.5 y 0.08 °C/min.

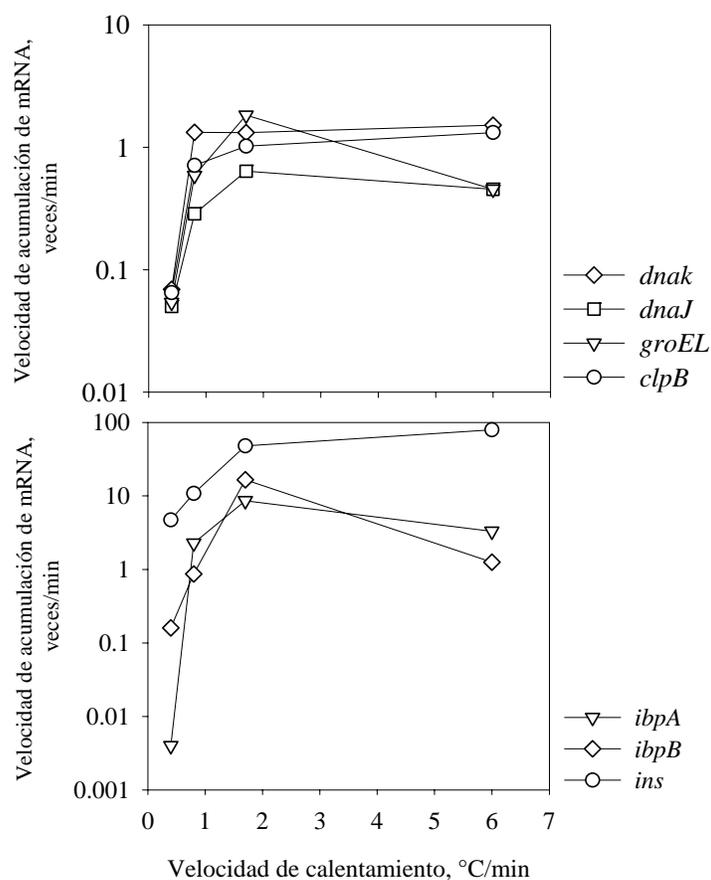


Figura 19. Influencia de la velocidad de calentamiento sobre la velocidad de acumulación de mRNA de genes de choque térmico y heterólogo.

6.2.2.1.1. Operón *dnaK-dnaJ*

Los genes *dnaK* y *dnaJ* forman un operón cuya transcripción está controlada por tres promotores dependientes del factor sigma 32 (*dnaKp1*, *dnaKp2* y *dnaKp3*) (Cowing et al., 1985). Sin embargo, se observaron diferencias en sus niveles normalizados y relativos (tabla 6), así como en sus velocidades de acumulación (figura 19). Los niveles relativos de *dnaK* fueron los segundos más abundantes de los genes de choque térmico a todas las temperaturas y velocidades de calentamiento experimentadas, mientras que los menores fueron los de *dnaJ* (tabla 6). Además, los niveles normalizados de mRNA de *dnaK* se incrementaron de 2 a 9 veces a 38 y 42 °C, con los niveles máximos a 0.8 °C/min (figura 18). En contraste, los niveles de mRNA de *dnaJ* sólo se incrementaron entre 1.3 y 2.4 veces a 42 °C, y disminuyeron en un 20 % cuando los cultivos se calentaron a 0.4 °C/min. Tanto el producto de estos genes como el de *GrpE* son componentes del sistema de chaperonas DnaK, el cual asiste en una gran variedad de procesos celulares, por ejemplo, en el plegamiento de péptidos recién sintetizados, en el rescate de proteínas desnaturalizadas, translocación de péptidos a través de la membrana, ensamble y desensamble de complejos proteicos y en el control de la actividad de muchas proteínas reguladoras, entre ellas σ^{32} (Buchberger et al., 1996; Mogk et al., 1999; Liberek et al., 1995; Teter et al., 1999). En condiciones *in-vitro*, se requiere de una relación 1:0.2:0.1 de DnaK:DnaJ:GrpE para prevenir la agregación de proteínas después de un choque-térmico (Mogk et al., 1999). Esta relación es semejante a la requerida para que esta misma función se realice *in-vivo* (10:1:3), ya que, al parecer, DnaJ y GrpE controlan el ciclo del sistema DnaK mediante uniones transitorias de estas a la proteína DnaK (Pierpaoli et al., 1998). Estas observaciones sugieren que *E. coli* requiere pequeñas cantidades de DnaJ para mantener el sistema DnaK funcional, por lo que regula diferencialmente la expresión de *dnaK* y *dnaJ*, explicando parcialmente la diferencia en la transcripción de ambos genes.

6.2.2.1.2. *clpB*

Los niveles relativos de acumulación de mRNA de *clpB* fueron mayores a los de *ibpA* e *ibpB*, pero menores a los de *dnaK* y *groEL* (tabla 6). Estos resultados son consistentes con los niveles proteicos reportados por Mogk et al. (1999), quienes midieron las concentraciones

citoplasmáticas de ClpB, DnaK, HtpG, GroEL e IbpA/IbpB de *E. coli* sometida a un cambio en la temperatura de cultivo desde 30 a 42 °C. Ellos observaron mayores niveles de ClpB que de IbpA/IbpB, pero menores niveles de ClpB que de DnaK y groEL. En otro estudio, Herendeen et al., (1979) observaron que los niveles a 37 °C de la proteína identificada como F84.1 (mas tarde identificada como ClpB) fueron la mitad que a 30 °C, sin embargo, no hubo diferencia entre 30 y 42 °C. En nuestro estudio, los niveles normalizados de mRNA de este gen en los cultivos inducidos a 0.4 °C/min decrecieron en 68 % a 38 °C y no se observó cambio alguno a 42 °C (figura 18). En contraste, estos niveles se incrementaron entre 1.3 y 5 veces en los cultivos inducidos a velocidades mayores. Resulta curioso que la velocidad de acumulación de transcritos de *clpB*, junto con dos genes que forman parte del complejo DnaK/DnaJ/GrpE sea muy similar (figura 19). Esto puede explicarse por el hecho de que estas cuatro proteínas revierten la agregación de proteínas desnaturalizadas en cuerpos de inclusión, tanto *in-vivo* como *in-vitro* (Mogk et al., 1999; Zolkiewski, 1999).

Tabla 6. Comparación entre los niveles relativos de mRNA de genes de choque térmico. Los valores de mRNA de cada gen fueron normalizados contra *ihfB* y posteriormente relativizados con respecto a *groEL*. Los intervalos mostrados corresponden a los niveles relativos máximos y mínimos observados a todas las velocidades de calentamiento analizadas.

		Gen de choque térmico					
		<i>groEL</i>	<i>dnaK</i>	<i>clpB</i>	<i>ibpA</i>	<i>ibpB</i>	<i>dnaJ</i>
*Gen ChT							
<i>groEL</i>		1	0.5-0.8	0.3-0.6	0.2-0.6	0.1-0.5	0.2-0.4

* gen de choque térmico

6.2.2.1.3. *groEL*

La chaperona GroEL, junto con GroES, es esencial para el plegamiento de un gran cantidad de proteínas endógenas (Kusukawa et al., 1989; Kerner et al., 2005). Se ha observado que al menos 85 proteínas citoplasmáticas requieren forzosamente de GroEL para un plegamiento apropiado, de esas, 13 son esenciales para la sobrevivencia de *E. coli* (Kerner et al., 2005). Por lo anterior, es posible que GroEL sea la chaperona más abundante (Mogk et al., 1999), y en acuerdo

con estos resultados, los niveles relativos de mRNA de *groEL* fueron los más altos de todos los genes de choque-térmico bajo todas las condiciones estudiadas en este trabajo (tabla 6). Los niveles normalizados de mRNA de este gen se incrementaron por arriba de 6 veces, y sus velocidades de acumulación fueron similares a *dnaK*, el segundo gen de choque térmico más abundante (figuras 18 y 19). En la figura 18 se observa que los niveles de mRNA de *groEL* decrecieron considerablemente cuando el cultivo se indujo a 6 °C/min, lo que sugiere que la transcripción de este gen presenta una fase lag significativa, lo cual es acorde a lo reportado por Yamamori y Yura (1980).

6.2.2.1.4. Operon *ibpA-ibpB*

Las proteínas de asociación a cuerpos de inclusión A y B (IbpA e IbpB, por sus siglas en inglés) fueron inicialmente aisladas de cuerpos de inclusión formados durante la expresión de proteína heteróloga (Allen et al., 1992), por lo que la expresión de estos genes se asocia al estrés causado por la producción de proteínas recombinantes y la agregación de proteínas en cuerpos de inclusión (LeThanh et al., 2005). En este trabajo, los niveles normalizados de mRNA de estos genes fueron los más altos de todos los evaluados (figura 18), en particular, los transcritos de *ibpB*. Algunas situaciones favorecen la mayor transcripción de estos genes: (1) el tamaño del transcrito es pequeño (429 pb, comparado con 1917 o 2574 bp de *dnaK* y *clpB*); (2) la alta afinidad del promotor *ibpABp* con la secuencia consenso de σ^{32} ; y (3) la presencia de un promotor adicional regulado por el factor sigma 54 (σ^{54}), cuya transcripción también la regula σ^{32} . Se ha observado que cuando *E. coli* sobre expresa *ibpA* e *ibpB*, es más resistente al estrés térmico y oxidativo (Kuczynska-Wisnik et al., 2004), por lo que es probable que la sobre-expresión de estas proteínas sea la causa de una mayor capacidad para contender con el estrés causado por la sobre-expresión de proteínas recombinantes (LeThanh et al., 2005). Durante la sobreproducción del factor de crecimiento de fibroblastos por *E. coli* termo-inducida, la síntesis de IbpA/IbpB se incrementó considerablemente (Rinas, 1996). En conjunto, estos resultados encontrados en la literatura son consistentes con los resultados del estudio de transcripción reportado en este documento, los cuales muestran cuantiosos incrementos a 0.8 y 1.7 °C/min. Sin embargo, cuando se comparan los niveles relativos a *groEL*, los niveles de *ibpA* e *ibpB* son entre 2 y 10 veces menores (tabla 6).

6.2.2.2. Efecto sobre la transcripción de genes reguladores de estrés

Las respuestas a estrés por choque térmico, estrés general y estrés por carencia de nutrientes (respuesta estricta) pueden coexistir durante la sobre producción de proteínas recombinantes inducidas por incremento de la temperatura del cultivo. Las respuestas de choque-térmico y estrés general están principalmente reguladas a nivel transcripcional, mientras que la respuesta de estrés relacionada a carencia de nutrientes depende de la acumulación de la alormona (p)ppGpp. En este trabajo se analizó la transcripción de los genes cuyos productos controlan la respuesta de choque-térmico (*rpoH* y *ftsH*) y la respuesta general de estrés (*rpoS*), así como los que codifican para las enzimas RelA y SpoT, las cuales controlan los niveles de (p)ppGpp. Debe de notarse que tanto *rpoH* como *ftsH* pueden ser considerados elementos del regulón de choque térmico, sin embargo, su función regulatoria y los niveles de expresión observados en este estudio los colocan mas como elementos clave en la regulación de la respuesta de choque térmico, al menos en las condiciones experimentales de este trabajo.

6.2.2.2.1. *rpoH*

La transcripción de *rpoH* que codifica al regulador general de la respuesta al estrés por choque térmico σ^{32} , esta fuertemente regulada por al menos tres factores sigma: σ^{70} , σ^{24} y σ^{54} . Respecto a los niveles de σ^{32} , se ha observado que se incrementan hasta en 17 veces cuando la temperatura se incrementa súbitamente; a estos incrementos los siguen los de las proteínas de choque-térmico (Straus et al., 1987). Sin embargo, y a pesar de que los niveles de transcrito de genes de choque térmico se incrementaron de manera importante como se puede observar en los resultados del presente trabajo, sólo se observó cambios muy pequeños en los niveles de mRNA de *rpoH* (figura 18). Estos resultados son muy interesantes porque sugieren que el incremento en los niveles de σ^{32} , necesarios para soportar el incremento en la transcripción de genes de choque térmico, no depende de la transcripción de novo del gen que lo codifica, sino de su estabilización, así como de la traducción de transcritos presentes antes del incremento de la temperatura, como lo indica el estudio de Kanemori et al., (1994). La estabilización de este regulador depende de la disponibilidad de DnaK y FtsH (figura 4), las cuales son requeridas por las proteínas termo-desnaturalizadas durante el incremento de la temperatura del cultivo, evitando que estas se unan a σ^{32} y lo inactiven y/o degraden, promoviendo así su estabilidad (Kanemori et al., 1994).

6.2.2.2.2. *ftsH*

La metaloproteasa de membrana dependiente de ATP FtsH (también referida como HflB) es una proteína esencial para *E. coli* ya que está implicada en un gran número de funciones, como el transporte de proteínas a través de la membrana, la degradación de mRNA y el recambio de proteínas clave, como λ cII y σ^{32} (Akiyama et al., 1994; Banuett et al., 1986; Granger et al., 1998; Herman et al., 1995; Tomoyasu et al., 1993). λ cII está involucrada en la transición entre la actividad lítica y lisogénica del bacteriófago lambda. Por su parte, σ^{32} controla la expresión de los genes de choque-térmico, incluyendo a *ftsH* (Banuett et al., 1986; Herman et al., 1995; Tomoyasu et al., 1993).

Los promotores de *ftsH* e *ibpB* comparten la misma secuencia nucleotídica (Cowing et al., 1985), sin embargo, en este trabajo, la acumulación de transcritos de ambos genes fue muy diferente (figura 18). Los niveles normalizados de *ibpB* mostraron los cambios más importantes a 42 °C respecto a 30 °C, mientras que los de *ftsH* disminuyeron en todas las condiciones, excepto a 0.4 y 0.8 °C/min. Estos resultados se pueden explicar conociendo la manera en que se regula la transcripción de *ftsH*. A 30 °C, la transcripción del operon, que incluye a *ftsH*, es controlada principalmente por el promotor *ftsJp1* cuya secuencia nucleotídica es reconocida por la subunidad sigma 70 de la RNA polimerasa, mientras que a 42 °C es controlada por σ^{32} que reconoce la secuencia del promotor *ftsJp2*. De acuerdo a lo anterior, cuando la temperatura se incrementa de 30 a 42 °C, el cambio de control transcripcional también ocurre, sin embargo, la transición es lenta debido a impedimentos estéricos causados por la proximidad de ambos promotores. Esto ocasiona un retraso en la transcripción de *ftsH*, el cual se ha calculado en 6 minutos (Herman et al., 1995), periodo en el que también se observa la máxima síntesis y acumulación de proteínas de choque térmico (Straus et al., 1986). El mecanismo anterior de regulación de la transcripción de *ftsH* permite la acumulación de σ^{32} en cantidades suficientes para responder al estrés por choque térmico, lo cual es crucial para la sobrevivencia de las células a este evento (Zhou et al., 1988), pero también permite la degradación de σ^{32} una vez que la célula alcanza un nuevo estado estacionario de crecimiento balanceado. Este último aspecto es muy importante ya que la sobre-acumulación de σ^{32} en mutantes en *ftsH* es letal para la viabilidad celular (Herman et al., 1995).

6.2.2.2.3. *spoT* y *relA*

Las enzimas SpoT y RelA junto con Gpp y Ndk controlan los niveles de la alormona (p)ppGpp que a su vez controla la intensidad de la respuesta por carencia de nutrientes (Cashel et al., 1996; Lengeler et al., 1999). Las primeras dos enzimas son responsables de la síntesis de (p)ppGpp, mientras que Gpp convierte pppGpp en ppGpp. SpoT también es responsable de la degradación de esta alormona en GDP o GTP. La concentración de ppGpp puede modular la afinidad de la RNA polimerasa por los factores sigma alternativos (Artsimovitch et al., 2004). Altas concentraciones de ppGpp favorecen la afinidad de σ^{32} y σ^{38} , sobre σ^{70} por la RNAP (Jishage et al., 2002). Dado lo anterior, se puede esperar que los mecanismos de expresión de *spoT* y *relA* deban regularse de manera muy fina, tal y como lo sugiere el trabajo de Flores et al., 2008. En este trabajo, no se encontraron incrementos importantes en la expresión de *relA* y *spoT*, excepto cuando los cultivos se calentaron a 1.7 y 6 °C/min (figura 18). En concordancia con estos resultados, Harcum y Haddadin (2006) reportaron que no hubo incremento en la expresión de *relA* después de incrementar la temperatura. En otro trabajo, Justesen et al., (1986) demostraron que la concentración de RelA no se incrementa aún cuando se incrementa, de manera importante, la concentración de (p)ppGpp. Esto sugiere que la acumulación de esta alormona no requiere de la síntesis de RelA, fenómeno que fue elegantemente demostrado por Wendrich et al., (2002). Por su parte, se ha reportado que SpoT degrada a (p)ppGpp durante el desarrollo de la respuesta estricta causada por la carencia de aminoácidos. Sin embargo, las células no sobre expresan a *spoT*, dado que aparentemente los niveles citosólicos son suficiente para revertir la acumulación de (p)ppGpp (Sarubbi et al., 1989). Estos resultados correlacionan bien con los obtenidos en este trabajo.

6.2.2.2.4. *rpoS*

Los niveles de expresión de *rpoS* que codifica para σ^{38} , no mostraron cambios significativos, excepto en los cultivos inducidos a 0.8 °C/min, donde se observó una ligera disminución, indicando que en nuestras condiciones experimentales, la respuesta de choque térmico y general de estrés no se sobrelapan. Harcum y Haddadin (2006) tampoco reportan un incremento de transcritos de *rpoS* después de incrementar la temperatura de cultivo. Sin embargo,

Schweder et al., (2002) demostraron que la respuesta general de estrés es suprimida durante la producción de proteína recombinante, dado que también observaron una disminución en los mRNAs de *rpoS*. La sobre-expresión de σ^{38} puede competir con σ^{32} impactando negativamente en la acumulación de proteínas de choque térmico necesarias para responder al cambio de temperatura. Estas consecuencias negativas han sido observadas cuando se propició la estabilidad de σ^{38} en una mutante de *E. coli* en *clpP*, la proteasa que selectivamente degrada a σ^{38} (Schweder et al., 2002).

6.2.2.3. Genes de la maquinaria de transcripción/traducción

La expresión de genes de la maquinaria celular de transcripción/traducción típicamente disminuye después de incrementar la temperatura de cultivos de *E. coli* tanto recombinante como no recombinante (Lemaux et al., 1978; Rinas, 1996). En concordancia con estos resultados, la mayoría de los niveles normalizados de mRNA de los genes de la maquinaria celular de transcripción/traducción disminuyeron a 38 y 42 °C cuando la temperatura se incrementó a 6, 1.7 y 0.8 °C/min, pero no cuando el calentamiento se realizó a 0.4 °C/min (figura 18). Los niveles de transcrito del gen *rpoA* (que codifica para la subunidad α de la RNA polimerasa) y de *tufB* (que codifica para el factor transcripcional B) decrecieron a lo sumo en un 50 %. Particularmente, los niveles más bajos de transcritos fueron observados para *tig* (el cual codifica para el factor de disparo, TF, por sus siglas en Inglés), los cuales disminuyeron a valores cercanos al 25 % de los observados a 30 °C en cultivos calentados a 1.7 °C/min. La proteína TF es una de las tres principales chaperonas (las otras son DnaK y GroEL) implicadas en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas. TF interactúa con pequeños polipéptidos mientras que DnaK lo hace con polipéptidos más grandes (> 30 kDa). Sin embargo, la función de TF parece no ser crítica dado que es probable que DnaK también tenga la capacidad de interactuar con polipéptidos pequeños cuando TF está ausente (Teter et al., 1999).

6.2.2.4. PIH

Los niveles normalizados de mRNA del gen de la preproinsulina humana se muestran en la figura 18. La expresión de este gen mostró perfiles muy similares a los observados para la

expresión de los genes de choque térmico, es decir, un perfil transitorio de acumulación con máximos a 1.7 °C/min y mínimos a 0.4 y 6 °C/min. Este fenómeno puede ser explicado por la manera en que se desarrollan los mecanismos de regulación de los sistemas $cI857/\lambda_{PL}$ y $\sigma^{32}/DnaK$. En el primer caso, la proteína represora $cI857$ es activa a 30°C y cumple su función de bloquear la transcripción del gen heterólogo. Al incrementar la temperatura de cultivo a 42 °C, $cI857$ se desnaturaliza y pierde su capacidad para interactuar con el DNA, resultando en la expresión constitutiva, y en altos niveles, de la proteína recombinante de interés. Estos mecanismos de inducción son de alguna manera análogos a los observados para activar la respuesta de choque térmico, ya que el incremento de la temperatura inhibe la interacción de $DnaK$ con σ^{32} , por lo que este queda libre para interactuar con el DNA y propiciar la sobre-expresión de genes del regulón de choque térmico. Los niveles normalizados de PIH a las velocidades de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min mostraron incrementos de 79, 151, 66 y 55 veces cuando los cultivos alcanzaron los 42 °C. Además, los cultivos inducidos a 1.7 °C/min acumularon entre 1.9 y 2.7 veces más transcrito que los otros, y sin embargo, no produjeron cantidades mayores de PIH, lo que sugiere que las actividades post-transcripcionales limitan el proceso de producción. Este resultado es congruente con los mayores decrementos en la acumulación de transcritos de los genes de la maquinaria celular de transcripción/traducción (figura 18).

6.2.2.5. Conclusiones parciales

En este trabajo se ha demostrado que la velocidad a la que se incrementa la temperatura en fermentadores de gran escala tiene un impacto importante en el metabolismo, la respuesta transcripcional, el estrés fisiológico y la producción de preproinsulina humana en *E. coli* transformada con un sistema de expresión termo inducible. Por lo anterior, y del análisis de régimen del proceso de calentamiento, se concluye que es posible encontrar diferencias en la producción de proteína recombinante inducida por choque térmico cuando este se escala a volúmenes de interés comercial. Desde el punto de vista de la productividad del proceso, lo más importante de esta información es que las mejores condiciones de calentamiento son las lentas, es decir, aquellas que ocurren en biorreactores de gran escala (100 m³), lo que facilitaría el proceso

de escalamiento ascendente, ya que estas velocidades de calentamiento se pueden, fácilmente reproducir en fermentadores de laboratorio, como se demostró en este trabajo.

Que se hayan obtenido los mejores rendimientos a la velocidad de calentamiento más baja, se explica por el mejor comportamiento metabólico y transcripcional de las células sometidas a esta condición, y es que durante las velocidades altas de calentamiento, las células mostraron un mayor desbalance entre glicólisis y TCA, así como una mayor inestabilidad fisiológica como revelan los resultados de transcripción. Además, y desde el punto de vista básico, los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento de los mecanismos de regulación de *E. coli* sometida a diferentes dinámicas de incremento de la temperatura de cultivo, que para nuestro conocimiento, no habían sido evaluadas. Estos resultados, deberán ser útiles en el establecimiento de criterios más racionales de escalamiento ascendente y para la optimización en la operación de biorreactores de gran escala, así como en el diseño de nuevas estrategias de inducción con el propósito de optimizar la productividad de los procesos y la estabilidad en la síntesis de la proteína recombinante y el crecimiento celular; por ejemplo, mediante la atenuación de las respuestas de estrés que limitan a las bacterias para alcanzar un nuevo estado estacionario de crecimiento balanceado. Este último aspecto se explora en las siguientes secciones de esta tesis.

6.3. Mejoramiento de las respuestas celulares de *E. coli* y la producción de la proteína recombinante mediante la termo-inducción a temperatura oscilante.

Sin importar la velocidad de calentamiento a la que se indujo la producción de la preproinsulina humana, ambos, el crecimiento y la síntesis de la misma disminuyeron drásticamente pocas horas después de incrementar la temperatura desde 30 a 42 °C (figura 16). Puesto que la acumulación de ácidos orgánicos no alcanzó los niveles reportados como inhibitorios del crecimiento o de la producción de proteína heteróloga, y el incremento en la síntesis de las proteínas de choque térmico por sí sólo no resulta en la inhibición total del crecimiento, entonces es posible que la sobre-síntesis de la proteína recombinante por sí sola cause la inhibición del crecimiento y la pérdida de la productividad del proceso pocas horas después de inducir. Varios autores han observado la pérdida del crecimiento celular después de termo-inducir la expresión del gen heterólogo (Schmidt et al., 1999; Seeger et al., 1996; Hoffmann et al., 2002), pero no tras incrementar la temperatura en cultivos con células no recombinantes (Hoffmann et al., 2002). Aparentemente, la acumulación masiva de proteínas sin función (gratuitas) ocasiona que las bacterias activen mecanismos que limitan la biosíntesis de mRNAs y proteínas (respuesta estricta). A diferencia de otras condiciones de estrés, como el cambio de medio de cultivo o el incremento o la disminución de la temperatura, la sobre-síntesis de proteínas recombinantes no se asocia a una reprogramación de la velocidad de crecimiento debido principalmente a la destrucción de ribosomas y de la maquina transcripcional y traduccional (Kurland and Dong, 1996, Vind et al., 1993).

En el análisis transcripcional mostrado en el apartado anterior se observó que la velocidad de acumulación de mRNA del gen heterólogo es mayor que las velocidades correspondientes a los genes de choque térmico (figura 19). Estas diferencias son más notables cuando la velocidad de calentamiento es de 0.4 °C/min donde por cierto, la acumulación de transcrito de genes de respuesta al choque térmico incrementa muy poco (figura 18). Sin embargo, adviértase que al mantener la temperatura en 42 °C, como sucede en todos los experimentos (figura 15), la transcripción de genes de choque térmico alcanzaría los valores máximos (figura 20). Lo anterior, causaría, en un momento dado, que las células estuviesen expuestas a niveles máximos de síntesis de proteínas de respuesta al choque térmico y de proteína recombinante, causando la pérdida

de la viabilidad y la disminución en la síntesis de la proteína recombinante, tal y como se observa en la figura 16.

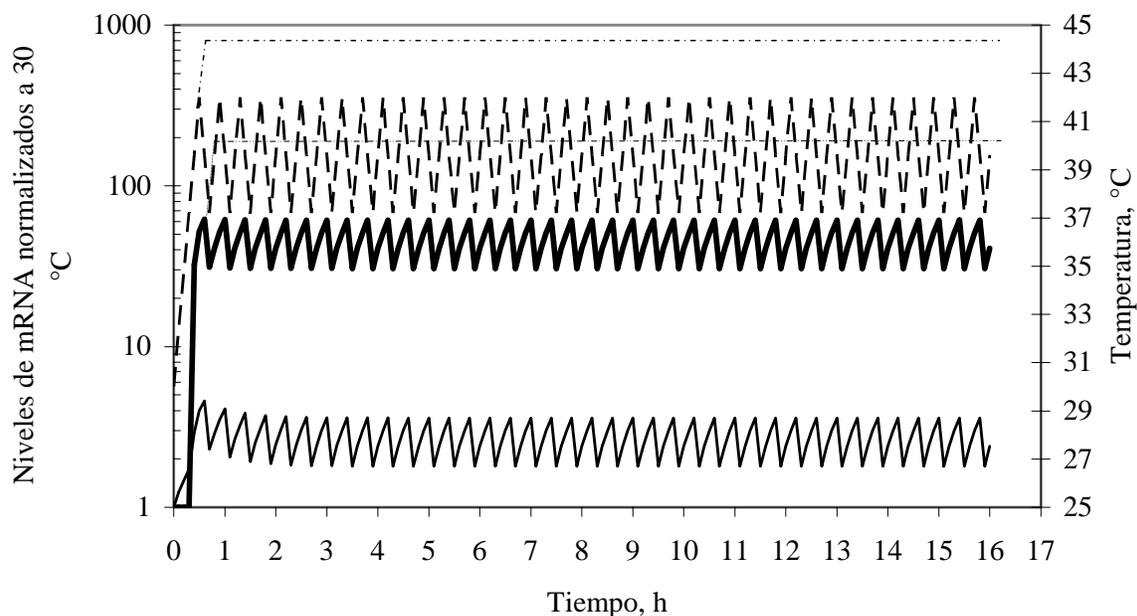


Figura 20. Simulación del comportamiento esperado para la acumulación normalizada respecto a 30 °C, de mRNA de los genes de choque térmico (— · — · — · —) y del gen heterólogo (—) cuando la temperatura se oscila entre 42 y 37 °C a velocidad de calentamiento y enfriamiento de 0.4 °C/min (— · — · — · —). También se muestra la acumulación esperada de mRNA de los genes de choque térmico (— · — · — · —) y del gen heterólogo (—) si la temperatura se mantiene constante a 42 °C. Esta es una simulación simple del efecto de las oscilaciones de temperatura sobre la acumulación de mRNA, ya que no se toma en cuenta la sobre-expresión de genes de choque térmico ocasionada por la acumulación de la proteína recombinante sin plegar, así como por la formación de agregados proteicos.

Para disminuir los efectos nocivos que ocasiona la sobre-síntesis de las proteínas de choque térmico y la proteína recombinante a la viabilidad celular, en este trabajo también se propuso evaluar una estrategia novedosa de inducción por oscilaciones de temperatura. Dicha estrategia consistió en oscilar la temperatura entre 42 y 37 °C a velocidades de calentamiento y enfriamiento de 0.4 °C (figura 20), es decir, a la condición que causa la menor acumulación de transcrito de los genes de choque térmico (figura 18). Con estas oscilaciones, se esperaba que la acumulación de transcritos de los genes de choque térmico y del gen heterólogo disminuyera cuando la temperatura descendiera a 37 °C (figura 20). La acumulación de mRNA de los genes de choque térmico disminuiría a niveles muy cercanos a los observados para 30 °C, mientras que, y lo más importante, los niveles de acumulación de transcritos del gen heterólogo se mantendrían

alrededor de 30 veces los observados a 30 °C (figura 20). En un esquema como este, la síntesis de las proteínas de choque térmico se mantendría a niveles cercanos a 30 °C, mientras que los de PIH en valores 30 veces mayores que a 30 °C. Esto sería útil para mejorar la viabilidad celular así como la capacidad biosintética de las células respecto a cuando se exponen de forma permanente a 42 °C, por lo que la productividad se mantendría por un periodo más largo.

Una segunda estrategia de inducción por oscilaciones de temperatura resultó de experimentos realizados en matraz. Esencialmente, *E. coli* BL21:PIH se cultivó a 30 °C en matraces hasta una densidad óptica de 1.5, después, la temperatura se incrementó hasta 42 °C para inducir la síntesis de la PIH. La temperatura de inducción se mantuvo por 2 h seguida de su disminución a 30 °C (figura 21). Durante la primera hora a 42 °C, la síntesis de PIH fue máxima y el crecimiento continuó, después el crecimiento cesó seguido de una caída en la velocidad de síntesis. Cuando los cultivos regresaron a 30 °C, el crecimiento celular se recuperó 2 horas después mientras que la PIH acumulada en la fracción insoluble del lisado celular no disminuyó de manera importante. Con estos resultados se diseñó una segunda estrategia de oscilaciones de temperatura entre 42 y 30 °C con periodo de 4 h (figura 22).

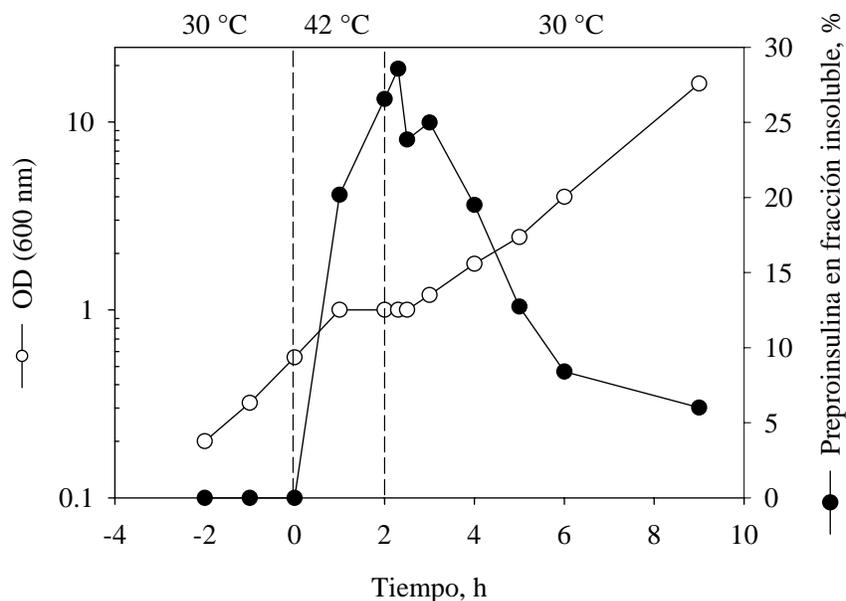


Figura 21. Recuperación del crecimiento celular después de inducir la producción de PIH a 42 °C. Cultivos en matraz agitado.

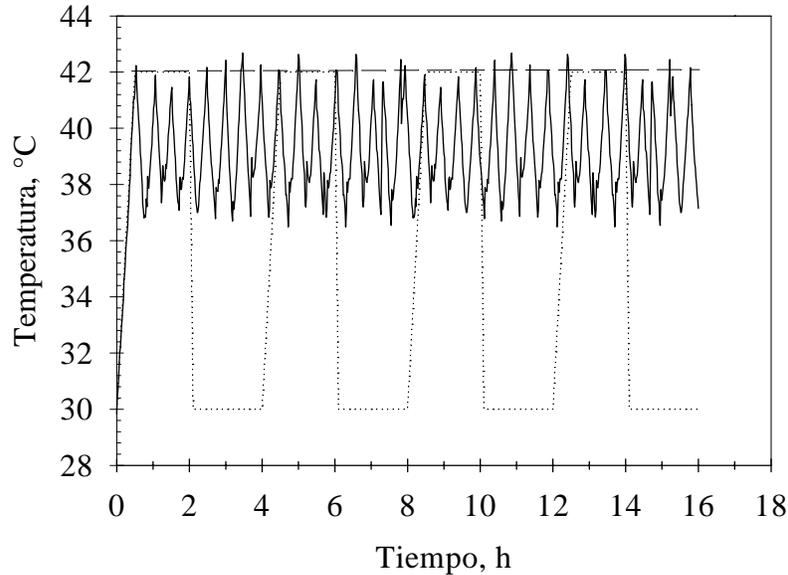


Figura 22. Estrategias de inducción por oscilaciones de temperatura. Temperatura oscilante entre 42 y 37 °C (línea continua); 42 y 30 °C (línea punteada); e inducción a temperatura constante de 42 °C (línea interrumpida).

Cuando se induce la producción de la proteína recombinante a 42 °C, el consumo de glucosa disminuye como resultado de la disminución en la capacidad biosintética y crecimiento celulares (Weber et al., 2002), es por eso que la velocidad de alimentación se disminuye durante la fase de inducción (figura 14). Sin embargo, si las oscilaciones de temperatura propuestas en este trabajo son útiles para mejorar la síntesis de la proteína recombinante y el crecimiento celular, entonces sería necesario evaluar otras estrategias de alimentación de glucosa durante la etapa de inducción, ya que bajas velocidades de alimentación podrían ser insuficientes para proveer el suministro de glucosa en la fase de inducción a temperatura oscilante. Sin embargo, velocidades mayores a las requeridas podrían resultar en sobreflujo metabólico con la subsiguiente formación de ácidos orgánicos. Debido a lo anterior, también se decidió evaluar el efecto de tres estrategias de alimentación durante la fase de inducción. La primera consistió en conservar el incremento exponencial de alimentación para mantener una velocidad específica de crecimiento teórica de 0.12 h^{-1} (la misma de la fase de lote alimentado). La segunda consistió en disminuir la alimentación, pero aún manteniendo un perfil exponencial para mantener una velocidad específica de crecimiento teórica de 0.08 h^{-1} (exponencial-1). La tercera consistió en disminuir la alimentación manteniendo un perfil lineal de suministro de glucosa (con pendiente de 0.125

g/min) (ver figura 23 y tabla 4 de la sección de Materiales y Métodos). Por simplicidad, a la primera estrategia de le llamará exponencial-2, a la segunda, exponencial-1; y a la tercera, lineal.

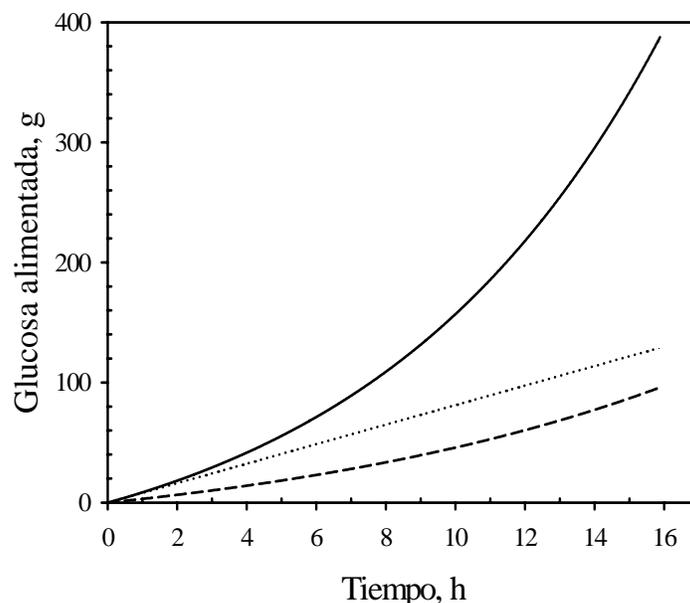


Figura 23. Estrategias de alimentación en la fase de inducción. Exponencial-1 (línea interrumpida); lineal (línea punteada); exponencial-2 (línea continua).

6.3.1. Producción de PIH en cultivos inducidos por oscilaciones de temperatura

En las figuras 24 y 25 se muestran las cinéticas, durante la etapa de inducción, de los principales parámetros de producción de PIH en cultivos a alta densidad celular de *E. coli* BL21:PIH inducidos a temperatura constante (símbolos negros) y oscilante (símbolos blancos). Estos cultivos fueron alimentados utilizando tres estrategias independientes de adición de nutrientes: exponencial-1 (exp-1), lineal y exponencial-2 (exp-2).

La inducción mediante oscilaciones de temperatura benefició de manera importante la producción de PIH y biomasa (figura 24). Con esta estrategia de inducción, la velocidad de síntesis de la PIH disminuyó entre 1.4 y 1.8 veces respecto a la obtenida en cultivos inducidos a temperatura constante, esto por supuesto, prolongó el tiempo de producción de los cultivos oscilados resultando en rendimientos de PIH entre 1.3 y 1.7 veces más que en los cultivos inducidos a 42 °C. La menor tasa de síntesis de PIH de los cultivos inducidos a temperatura

oscilante se reflejó en una mayor capacidad de *E. coli* para mantener su crecimiento, dando como resultado una acumulación de biomasa de entre 2.5 y 4.0 veces mayor que los cultivos inducidos a temperatura constante de 42 °C.

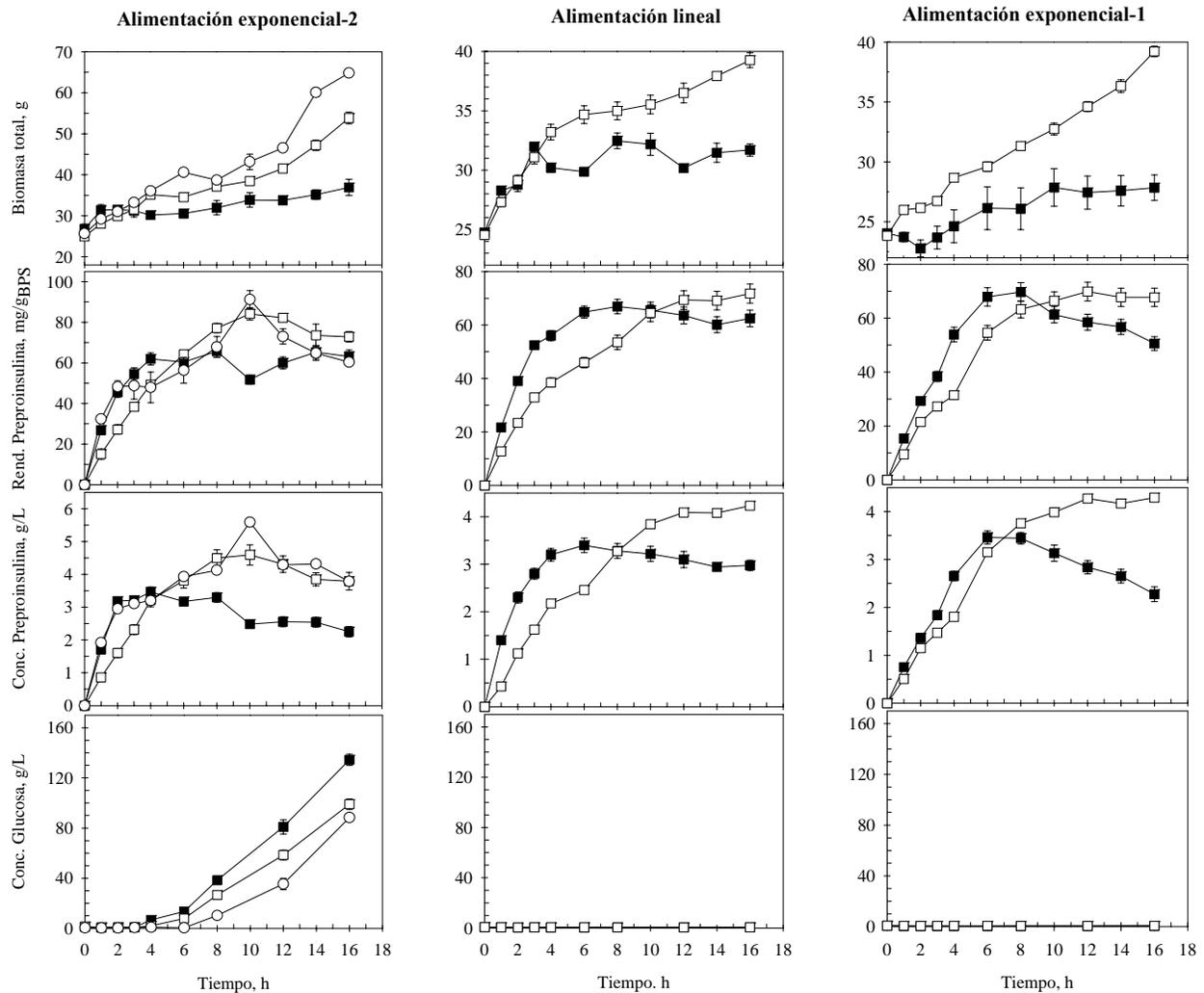


Figura 24. Acumulación de biomasa, PIH y glucosa en cultivos inducidos a temperatura oscilante y constante, alimentados a tres estrategias de alimentación durante la etapa de inducción. Cultivos a temperatura constante (cuadrados negros); temperatura oscilante entre 42 y 37 °C (cuadrados blancos); y temperatura oscilante entre 42 y 30 °C (círculos blancos). Las estrategias de alimentación durante la etapa de inducción se señalan encima de las columnas. En los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 42 y 30 °C sólo se evaluó la estrategia de alimentación exponencial-2. Por lo que no existen datos de esta estrategia empleando los otros dos perfiles de alimentación.

Los resultados anteriores indican que fue posible disminuir la inhibición del crecimiento celular mediante la inducción con oscilaciones de temperatura. Esto pudo deberse a las menores velocidades de síntesis de la PIH observadas en estos cultivos, ya que se ha demostrado que la intensidad de estas respuestas negativas depende de la intensidad de expresión del gen recombinante (Jones y Keasling, 1998; Medina et al., 2002; Grabherr et al 2002). Por ejemplo, después de inducir la expresión de *lacZ*, el crecimiento celular cayó en un 27 % cuando *lacZ* se incorporó en un plásmido multicopia, comparado con una disminución del 12 % cuando éste se encontraba en un plásmido de bajo número de copias (Jones y Keasling, 1998). Medina et al. (2002) observaron mayores velocidades de síntesis de la proteína recombinante y una mayor degradación proteica e inhibición del crecimiento al promover condiciones ambientales que favorecían mayores cantidades de plásmido. La producción de la superóxido dismutasa humana controlada por la adición continua y en pequeñas cantidades de IPTG (0.9 mmol/g_{BPS}) fue útil para disminuir la sobrecarga metabólica, lo cual se reflejó en una menor formación del activador de la respuesta por carencia de nutrientes ppGpp. Esto ocasionó que la producción de la proteína recombinante se duplicara respecto a la obtenida cuando se adicionó un único pulso de IPTG, en cuyo caso la acumulación de ppGpp fue 3 veces mayor (Grabherr et al., 2002). En conjunto, estos resultados de la literatura y los obtenidos en este trabajo señalan que reduciendo la tasa de síntesis de la proteína recombinante, es posible disminuir la sobrecarga metabólica, lo que permite a las células manejar, de manera más eficiente, las respuestas de estrés y con esto retener la productividad del proceso y lograr mayores rendimientos del producto de interés.

Durante la producción de proteína recombinante inducida por incremento de la temperatura de 30 a 42 °C, las células reajustan sus actividades metabólicas de acuerdo a los requerimientos energéticos a costa de sacrificar las actividades biosintéticas y su crecimiento (Wittmann et al., 2007; Weber et al., 2002; Hoffmann and Rinas, 2001; Hoffmann et al., 2002). Inmediatamente después de incrementar la temperatura para inducir la producción del factor humano de crecimiento de fibroblastos, la velocidad de consumo de oxígeno y de producción de CO₂ aumentaron alrededor de 1.6 veces, por lo que alrededor de un 70% del carbono consumido se utilizó para la producción de CO₂ (comparado con 40 % utilizado antes de incrementar la temperatura) y el restante para actividades biosintéticas, de manera que la velocidad específica de crecimiento disminuyó de 0.12 a 0.03 h⁻¹ (Hoffmann et al., 2002). En las condiciones de los experimentos reportados aquí, los cultivos inducidos a 42 °C requirieron de mayores porcentajes

de oxígeno puro en la corriente de entrada al biorreactor para controlar la demanda del mismo, sugiriendo una mayor actividad respiratoria de los cultivos mantenidos a 42 °C. Esto debió favorecer la utilización de glucosa para la producción de energía en detrimento del crecimiento, especialmente en los cultivos alimentados a la velocidad de alimentación más baja (exponencial-1), en donde se observó un decremento en la biomasa acumulada (figura 24). Por el contrario, la concentración de biomasa total de cultivos oscilados siguió acumulándose durante todo el cultivo, encontrándose un crecimiento sostenido a velocidades específicas de crecimiento entre 0.06 y 0.04 h⁻¹, comparadas con velocidades de alrededor de 0.01 h⁻¹ observadas en los cultivos a 42 °C.

El mayor crecimiento y producción de la proteína recombinante de los cultivos oscilados también se reflejó en una menor formación de productos de fermentación (figura 25). En general, el acetato, lactato y succinato comenzaron a acumularse a mayor velocidad en los cultivos inducidos a 42 °C, por lo que el acetato alcanzó concentraciones de entre 1.5 y 3.2 g/L en los cultivos oscilados, mientras que aquellos mantenidos a 42 °C alcanzaron entre 3.2 y 4.2 g/L. En el caso del lactato, este se acumuló a concentraciones máximas de 1.5 hasta 3.6 g/L en los cultivos oscilados, comparado con valores de 3 a 3.6 g/L obtenidos a 42 °C. El succinato sólo se detectó en concentraciones significativas en los cultivos inducidos a 42 °C alimentados a la tasa de alimentación exponencial-2. El formato, como anteriormente se había reportado, comenzó a formarse desde antes de inducir. Comparando los rendimientos específicos de formación de estos productos de fermentación, las células inducidas mediante las oscilaciones de temperatura sintetizaron solamente entre 48 y 62 % de los productos fermentación formados por las células inducidas a temperatura constante.

Exceptuando al formato, todos los otros ácidos orgánicos comenzaron a acumularse poco tiempo después de que la síntesis de PIH decayó (figuras 24 y 25). Así, la formación de subproductos de fermentación comenzó alrededor de 2 a 6 h después de inducir a 42 °C, mientras que en los oscilados esta se observó después de alrededor de 6 a 10 h. La acumulación de subproductos de fermentación después de inducir, está relacionada al redireccionamiento de los flujos de carbono cuando la glucosa ya no se utiliza para la síntesis del producto y/o el crecimiento celular (Schmitd et al., 1999). Las adaptaciones metabólicas que llevan al sobreflujo metabólico pueden explicarse por los altos requerimientos de ATP que experimentan las células después de ser inducidas a producir la proteína recombinante, ya que el sobre consumo de ATP causa un sobre flujo de carbono a través de glicólisis (Koebmann et al., 2002). El inconveniente

de esto, es que los flujos de carbono a través de TCA disminuyen, al igual que los de la vía de las pentosas fosfato, resultando todo esto en el direccionamiento del carbono hacia la síntesis de acetato y otros productos de fermentación (Wittmann et al., 2007).

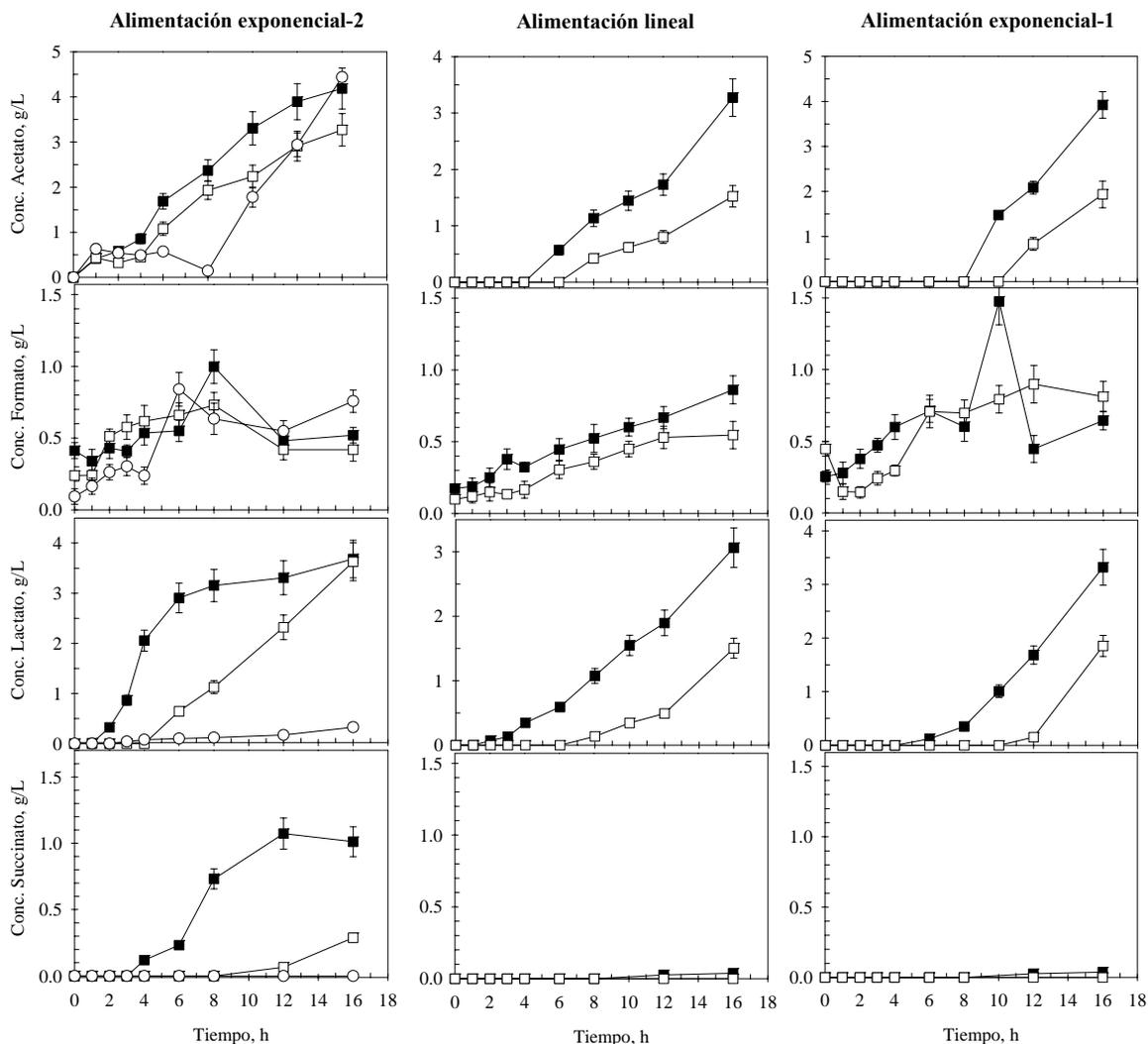


Figura 25. Acumulación de acetato, formato, lactato y succinato en cultivos inducidos a temperatura oscilante y constante, alimentados a tres estrategias de alimentación durante la etapa de inducción. Cultivos a temperatura constante (cuadrados negros); temperatura oscilante entre 42 y 37 °C (cuadrados blancos); y temperatura oscilante entre 42 y 30 °C (círculos blancos). Las estrategias de alimentación durante la etapa de inducción se señalan enzima de las columnas. En los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 42 y 30 °C sólo se evaluó la estrategia de alimentación exponencial-2. Por lo que no existen datos de esta estrategia empleando los otros dos perfiles de alimentación.

6.3.2. Efecto de la estrategia de alimentación en la etapa de inducción

El efecto de tres estrategias de alimentación sobre la producción de la PIH y el crecimiento de *E. coli* inducida mediante oscilaciones y temperatura constante de 42 °C se muestra en las figuras 26 y 27. Cuando la producción de PIH se indujo a 42 °C, la estrategia de alimentación de nutrientes tuvo un efecto importante en el crecimiento celular al observarse un incremento de la biomasa total de 1.45 y 2.7 veces cuando la velocidad de alimentación subió de exponencial-1 a lineal y exponencial-2, respectivamente, y sin embargo no tuvo efecto en la acumulación de PIH (figura 26). Para el caso de cultivos inducidos por oscilaciones de temperatura, no se observó ninguna diferencia en los cultivos alimentados a la velocidad exponencial-1 ni a la lineal, pero los cultivos alimentados a la tasa más alta (la exponencial-2) acumularon mayor cantidad de PIH y biomasa. Wong et al., (1998) evaluaron el efecto de seis estrategias de alimentación durante la etapa de inducción sobre la producción de un bioadhesivo y el crecimiento de *E. coli*: (1) una exponencial conservando la tasa de alimentación de la fase de lote alimentado, (2) una utilizando la estrategia de pH-stat, (3) una a tasa de alimentación constante, (4) y tres estrategias de alimentación lineal con diferentes pendientes. Ellos encontraron que la estrategia de alimentación no afectaba el crecimiento celular, pero sí la producción de la proteína recombinante, parámetro en el cual encontraron una importante disminución a velocidades bajas de alimentación (estrategia de alimentación con perfil constante). Esto sugirió que tasas bajas de alimentación pueden limitar la fuente de carbono de tal manera que disminuya la síntesis de la proteína recombinante. Sin embargo, ellos también observaron altas concentraciones de glucosa acumulada cuando utilizaron la tasa de alimentación que mantuvieron desde la etapa de lote alimentado.

En este trabajo, la alimentación del cultivo durante la fase de inducción utilizando el perfil de alimentación de la fase de lote alimentado, propició la acumulación de glucosa a valores cercanos a los 100 g/L, sin embargo no se afectó drásticamente el crecimiento (figura 24). Lo anterior se debe a que la cepa de *E. coli* BL21 (la usada en este trabajo) es capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa (Phue et al., 2005). Nuestros resultados, en conjunto, sugieren que las bacterias expuestas a velocidades de alimentación en el intervalo de la exponencial-1 y la lineal, experimentan limitación de carbono, especialmente las inducidas a 42 °C constantes. Sin embargo, cuando se uso la velocidad de alimentación de glucosa utilizada en la etapa de lote

alimentado, se propició la acumulación de glucosa en el medio, por lo que se deduce que las células no recuperan totalmente el crecimiento observado en la fase de lote alimentado (0.12 h^{-1}). No obstante, bajo tales condiciones crecen hasta 4 veces más rápido que las bacterias expuestas a temperatura constante de $42 \text{ }^\circ\text{C}$ (figura 26).

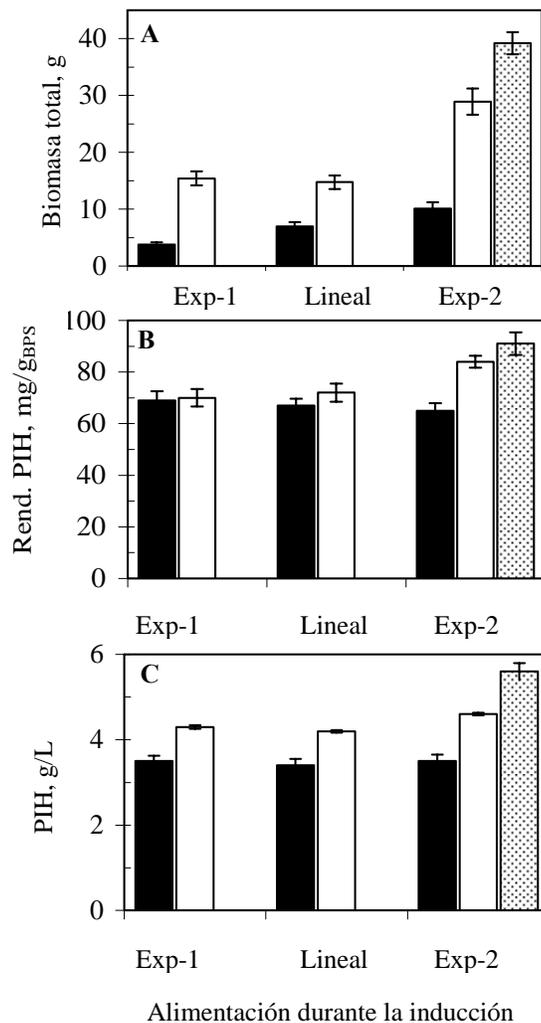


Figura 26. Comparación de la acumulación máxima de biomasa y PIH entre cultivos inducidos con oscilaciones y temperatura constante. Cultivos a temperatura constante (barras negras); temperatura oscilante entre 42 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (barras blancas); y oscilante entre 42 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (barras punteadas). Estrategias de alimentación durante la inducción: exponencial-1 (Exp-1); lineal; y exponencial-2 (Exp-2). En los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 42 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sólo se evaluó la estrategia de alimentación Exp-2. En los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 42 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sólo se evaluó la estrategia de alimentación exponencial-2. Por lo que no existen datos de esta estrategia empleando los otros dos perfiles de alimentación.

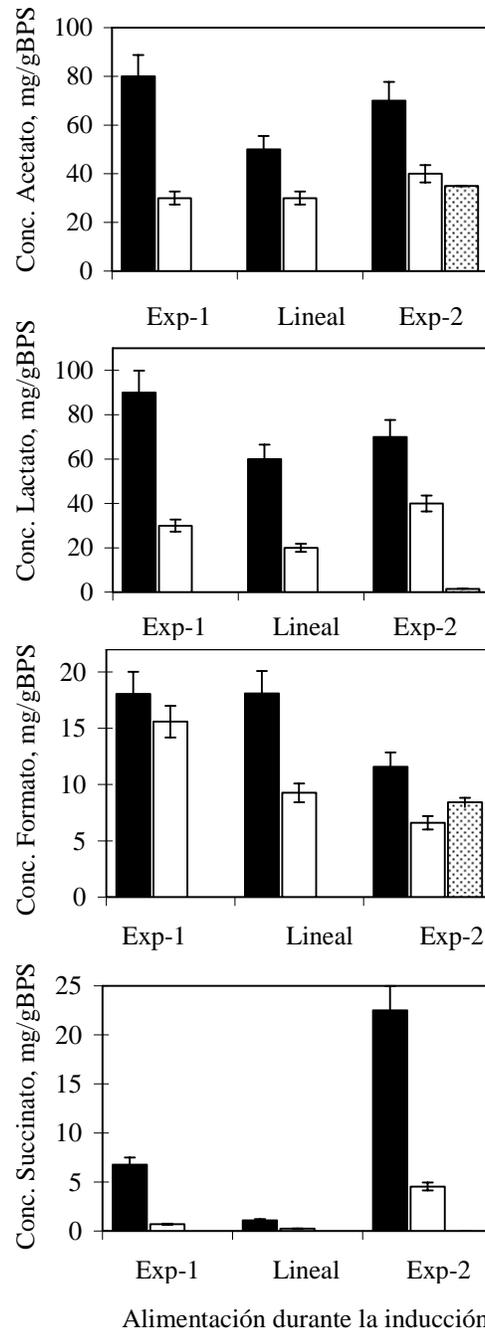


Figura 27. Comparación de la acumulación máxima de acetato, lactato, formato y succinato entre cultivos inducidos con oscilaciones y temperatura constante. Cultivos a temperatura constante (barras negras); temperatura oscilante entre 42 y 37 °C (barras blancas); y temperatura oscilante entre 42 y 30 °C (barras punteadas). Estrategias de alimentación durante la inducción: exponencial-1 (Exp-1); lineal; y exponencial-2 (Exp-2). En los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 42 y 30 °C sólo se evaluó la estrategia de alimentación exponencial-2. Por lo que no existen datos de esta estrategia empleando los otros dos perfiles de alimentación.

En todas las condiciones de inducción, la acumulación de los subproductos de fermentación aumentó conforme se incrementaba la velocidad de alimentación de glucosa (figura 25). Conforme se incrementa la velocidad de alimentación, las células tienen la posibilidad de consumir una mayor cantidad de glucosa, lo que puede ocasionar sobre flujo metabólico, tal y como lo observamos en el trabajo reportado por Lara et al., (2008). En este trabajo, a pesar de las diferencias en el inicio de la formación de subproductos de fermentación encontradas a las diferentes estrategias de alimentación, no hubo diferencia significativa en las concentraciones máximas de acetato y lactato en los cultivos inducidos a 42 °C (figura 27). Las bacterias expuestas a las oscilaciones de temperatura, sin embargo, formaron mayores cantidades de ácidos orgánicos cuando la alimentación fue mayor.

Los resultados anteriores sugieren que la mayor síntesis de productos de fermentación se origina por efecto del estrés causado por la sobre-síntesis proteica mas que por el sobre flujo metabólico en los cultivos inducidos a 42 °C, y por sobreflujo metabólico en los cultivos oscilados. Los cultivos oscilados entre 42 y 30 °C no acumularon lactato. El succinato solo fue observado en los cultivos a 42 °C y alimentados a la tasa alta, mientras que el formato se observó desde el final de la fase lote y sus niveles permanecieron por debajo de 1 g/L en todas las condiciones de cultivo. Varios autores han reportado el efecto de la estrategia de alimentación durante la etapa de inducción sobre la formación de ácidos orgánicos. Por ejemplo, la adición de glucosa en un perfil constante durante la producción de β -galactosidasa inducida por incremento de la temperatura de cultivo, no favoreció la formación de acetato durante 8 h de inducción (Strandberg and Enfors, 1991). En otro trabajo, sin embargo, la reducción de la velocidad de alimentación exponencial para mantener una μ de 0.12 a una de 0.08 h⁻¹ no fue suficiente para evitar la formación de acetato, el cual se acumuló en concentraciones de alrededor de 3.5 g/L (Schmitd et al., 1999). Wong et al., (1998) reportaron concentraciones de acetato por debajo de 3 g/L durante la producción de un bioadhesivo utilizando 6 estrategias de alimentación durante la inducción.

6.3.3. Conclusiones parciales

Se diseñó y evaluó una nueva estrategia de inducción por oscilaciones de temperatura para reducir el impacto negativo que tiene la inducción a temperatura constante. Esta estrategia

consistió en inducir la producción de la proteína recombinante mediante oscilaciones de temperatura, ciclando entre la óptima para el crecimiento y la inducción de la proteína recombinante. Con esta estrategia, la velocidad inicial de síntesis de la PIH disminuyó entre 1.4 y 1.8 veces la observada a inducción constante de 42 °C, por lo que se incrementó el periodo de producción que al final resultó en concentraciones de la PIH de entre 1.3 y 1.7 veces mayores en los cultivos oscilados, respecto a los inducidos a 42 °C. Estas mejoras se reflejaron también en mayores acumulaciones de biomasa, al obtenerse entre 2.3 y 4.9 veces más biomasa en los cultivos inducidos mediante oscilaciones de temperatura, respecto a los cultivos inducidos a 42 °C. Esta mejora del desempeño de las bacterias sometidas a temperatura oscilante, también se reflejó en un mejor consumo y utilización de la fuente de carbono. Los cultivos oscilados y alimentados a las tres estrategias de alimentación de nutrientes acumularon entre 3 y 5 veces menos subproductos de fermentación que las bacterias sometidas a 42 °C constantes.

Estos resultados demuestran que es posible mejorar los rendimientos del proceso de producción de proteínas recombinantes mediante la explotación de los hospederos en límites tolerables. Los esquemas de inducción por oscilaciones de temperatura, sin embargo, requieren de mayores periodos de inducción lo cual debe ser evaluado para delimitar su factibilidad.

6.4. Efecto de las estrategias de inducción y alimentación en la etapa de inducción en la agregación de la preproinsulina humana

La alta temperatura utilizada para inducir la producción de la proteína recombinante también favorece la agregación de proteínas en cuerpos de inclusión. La formación de estos depósitos proteicos tiene algunas ventajas para el proceso ya que entre un 50 o más del 90 % de la proteína acumulada en ellos, es proteína recombinante, la cual puede ser fácilmente recuperada por centrifugación de los lisados celulares (Rudolph y Lilie 1996). No obstante, los cuerpos de inclusión también sirven de depósito para proteínas nativas que contaminan los cuerpos de inclusión y dificultan el plegamiento *in-vitro* de la proteína recombinante, ya que promueven su agregación (De Bernardez et al., 1999; Middelberg, 2002).

La temperatura y el pH del cultivo, así como el sistema de expresión utilizado, son factores cuyo efecto sobre la agregación proteica ha sido evaluado. Por ejemplo, temperaturas por arriba de 37 °C favorecen la deposición de proteínas contaminantes (Valax y Georgiou, 1993), por lo que es muy probable que la expresión de proteínas recombinantes utilizando sistemas de inducción termo inducibles favorezca una mayor deposición de proteínas contaminantes en cuerpos de inclusión. Sin embargo, en nuestro conocimiento no existe ningún reporte que avale tal conjetura. El antecedente más cercano es el trabajo de Strandberg y Enfors (1991), quienes mostraron que las cinéticas de deposición de proteínas recombinantes cambiaba si la inducción se hacía a temperatura constante (42 °C) o escalonada (42 °C por 2 h, seguido de 39 °C). Sin embargo, en tal trabajo no se hace un estudio más detallado de la agregación (Strandberg y Enfors, 1991).

El incremento de la temperatura, como se ha discutido ampliamente, favorece la desnaturalización de proteínas. Cuando las proteínas son desnaturalizadas sus conformaciones secundaria y terciaria son alteradas y tienden a exhibir regiones hidrófobas que son estabilizadas por la maquinaria de plegamiento celular o degradadas por proteasas (figura 4). Las células no recombinantes tienen la capacidad de sintetizar las suficientes chaperonas y proteasas para contender con las proteínas desnaturalizadas y alcanzar la homeostasis. Sin embargo, durante la síntesis de proteína recombinante utilizando promotores termo-inducibles muy fuertes, las células son incapaces de proveerse de suficiente maquinaria de control estructural, por lo que tanto la proteína recombinante y las nativas recién sintetizadas o desnaturalizadas, tienen pocas

probabilidades de interactuar con la maquinaria de plegamiento y alcanzar un plegamiento adecuado, por lo que terminan depositándose en los cuerpos de inclusión (Baneyx and Mujacic, 2004). Esto puede explicar la mayor deposición de proteínas nativas en cuerpos de inclusión durante la síntesis de proteínas recombinantes conducida a temperaturas de 42 °C en comparación con 37 °C (Valax y Georgiou, 1993; Chalmers et al., 1990).

Durante el desarrollo de los experimentos reportados en esta tesis, cultivos a alta densidad celular de *E. coli* BL21/PIH fueron inducidos mediante varios esquemas de inducción: incremento de la temperatura de cultivo desde 30 a 42 °C a 6.0, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min para simular escenarios típicos de calentamiento de biorreactores de 0.01, 5, 25 y 100 m³, respectivamente. También fue evaluado el efecto de un nuevo esquema de inducción por oscilaciones de temperatura entre 42°C y 30 o 37 °C. Durante la aplicación de estas estrategias de inducción, también fue evaluado el efecto de tres estrategias de alimentación: exponencial-1, lineal y exponencial-2. En esta parte del documento se reporta sobre el aislamiento y análisis de cuerpos de inclusión aislados de los cultivos realizados mediante estas estrategias.

6.4.1. Aislamiento y caracterización parcial de cuerpos de inclusión

En la figuras 28 y 29 se muestran los perfiles de agregación de PIH y proteínas contaminantes de cultivos inducidos a 42 °C a velocidades de calentamiento de 6.0, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, así como de los cultivos inducidos con oscilaciones de temperatura entre 42 °C y 37 o 30 °C, respectivamente. El tratamiento de los lisados celulares con Triton-X100 y alta concentración de sales (figura 28, B y C) fue útil para remover la mayor cantidad de proteínas de membrana presentes en la fracción insoluble sin este tratamiento (figura 14, A). Sin embargo, en todas las condiciones experimentales se detectan bandas que migran a una altura característica de las proteínas de membrana OmpA y OmpC una hora antes de iniciar la inducción, lo cual sugiere la formación de cuerpos de inclusión anclados a membrana. Esto tal vez fue favorecido por los altos niveles de expresión del represor termo sensible cI857 en combinación con la ausencia de las proteasas OmpT y Lon del fondo genético de *E. coli* BL21. La lisozima encontrada en los cuerpos de inclusión se debe a la falta del lavado, más que de su deposición en estos, tal conjetura resultó después de retirar la lisozima con dos lavados más de los cuerpos de inclusión.

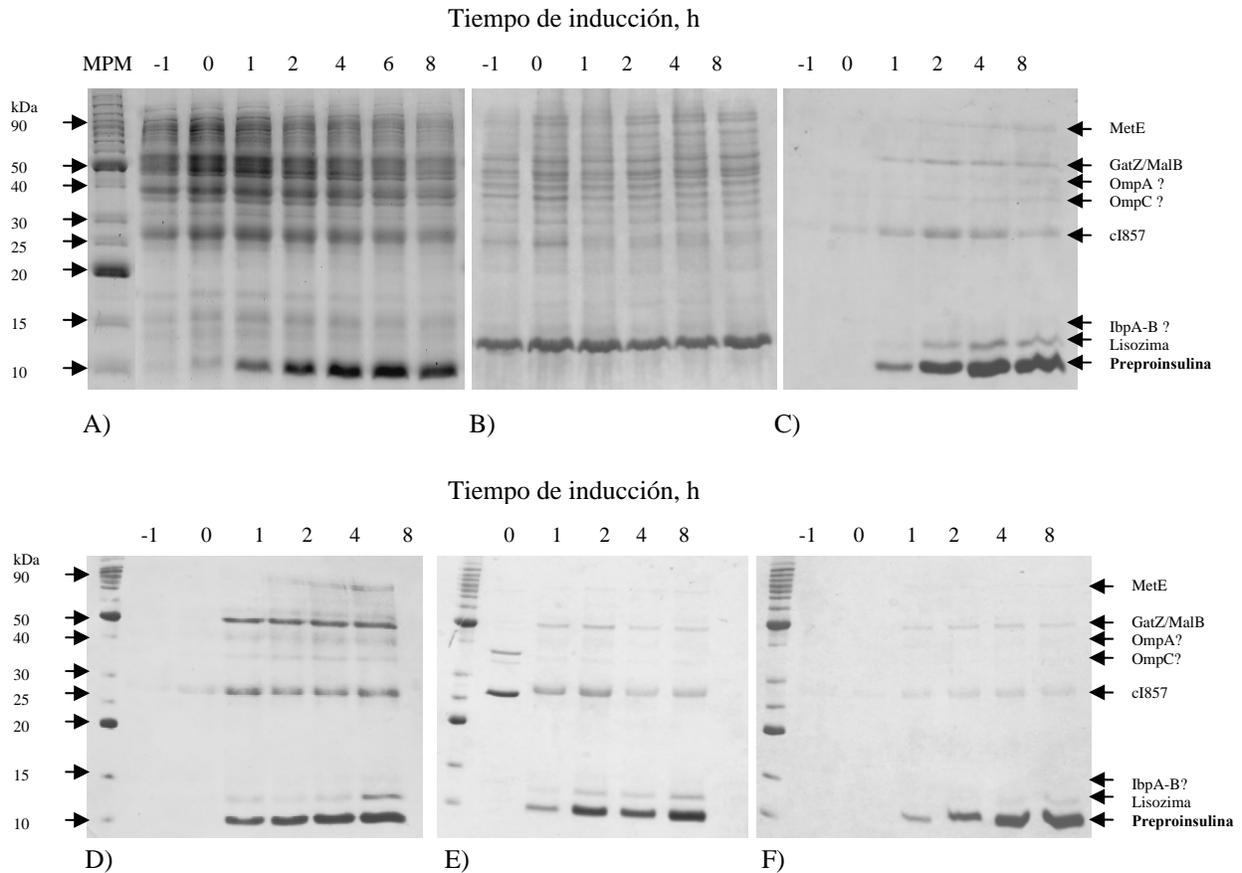


Figura 28. Perfiles de agregación de PIH y proteínas contaminantes durante la inducción a 42 °C efectuada a diferentes velocidades de calentamiento. La temperatura se incrementó a: 6 °C/min, A, B y C; 1.7 °C/min, D; 0.8 °C/min, E; y 0.4 °C/min, F. Los cuerpos de inclusión fueron aislados y purificados de acuerdo al proceso descrito en los Materiales y Métodos. En la figura se comparan la fracción insoluble de los lisados celulares sin tratamiento, A; y la fracción soluble e insoluble de los lisados a los que se les trató con sales y Triton-X100, B y C, respectivamente. La migración y el peso molecular del marcador se muestran a la izquierda de cada serie horizontal y la identidad de las bandas contaminantes a la derecha. El signo “?” indica que la identidad de la banda es sólo putativa y basada en su migración en el gel.

Las dos bandas superiores que aparecen en todos los gels corresponden a la metionina sintasa II (MetE) y una mezcla de tagatosa 6-P cinasa + maltoporina B (GatZ-MalB), respectivamente, como se pudo identificar por Electro spray LC-MS/MS (servicio realizado por la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM). La agregación o mutación de enzimas de la vía de síntesis de metionina ha sido catalogada como responsable de la disminución de la capacidad de crecimiento de *E. coli* sometida a altas temperaturas (Gur et al., 2002). Por lo tanto, la agregación de MetE desde la primera hora en los cultivos inducidos a 42 °C, puede ser

responsable, al menos parcialmente, de la pérdida del crecimiento en estos. A diferencia de los cultivos oscilados entre 42 y 37 °C, los cuales crecieron constantemente y no acumularon MetE o lo hicieron hasta las 12 horas (figura 29). Las dos bandas inferiores podrían corresponder, con base a su peso molecular, a las pequeñas proteínas de choque térmico IbpA e IbpB, ya que suelen agregarse junto con la proteína recombinante (Allen et al., 1992).

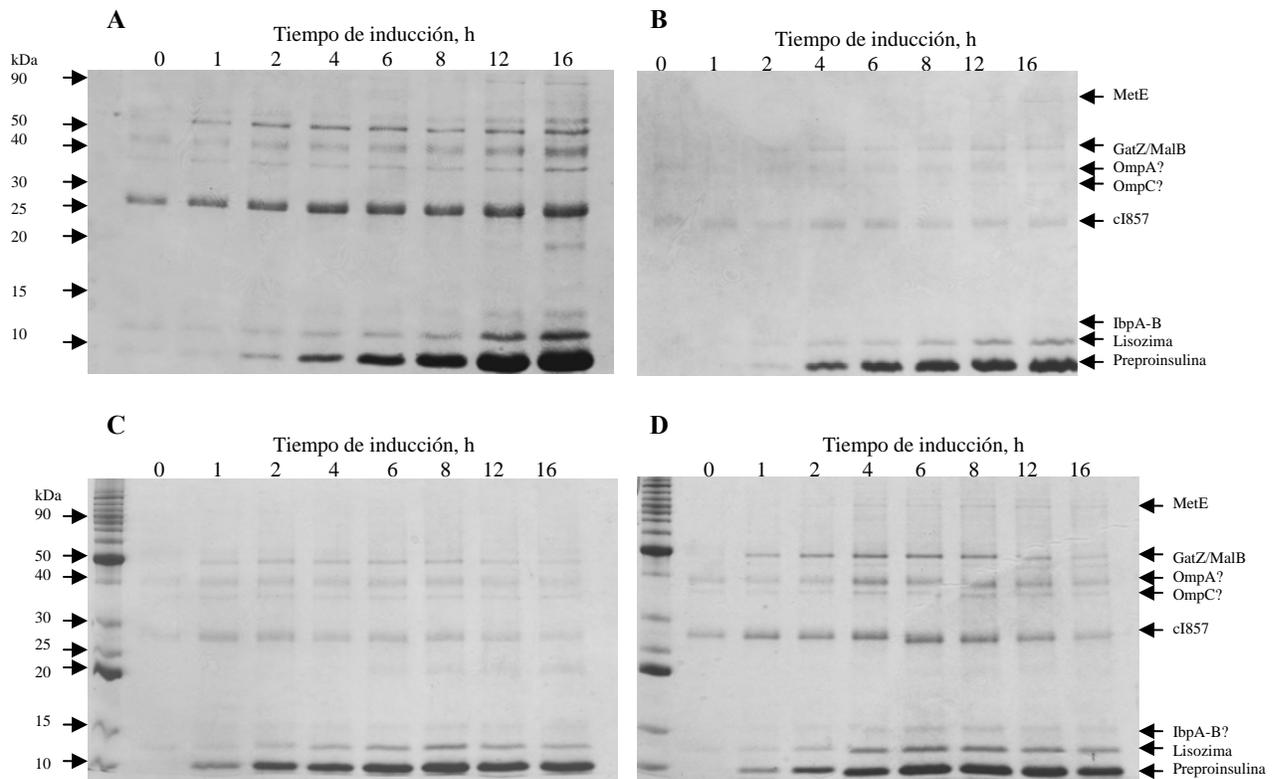


Figura 29. Perfiles de agregación de PIH y proteínas contaminantes durante la inducción a temperatura oscilante. Temperatura oscilante entre 42 y 37 °C y tasas de alimentación de glucosa: exponencial-1, A; lineal, B; exponencial-2, C. Para la inducción a temperatura oscilante entre 42 y 30 °C se utilizó una velocidad de alimentación (exponencial-2), D. La migración y el peso molecular del marcador se muestran a la izquierda de cada serie horizontal y la identidad de las bandas contaminantes a la derecha. El signo “?” indica que la identidad de la banda es sólo putativa y basada en su migración en el gel.

6.4.2. Efecto de la velocidad de calentamiento en la agregación de proteínas

En la figura 30 se muestra el comportamiento cinético de la proteína total agregada en cuerpos de inclusión y de la PIH contenida en los mismos. En general, la velocidad de agregación

de proteína total fue máxima durante las dos primeras horas (36, 43, 31 y 28 mg/g_{BPS}-h, para los cultivos calentados a 6.0, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, respectivamente), y cesó después de 4 h. Estos tiempos corresponden también a las velocidades de producción máximas de la PIH mostradas en la figura 16, por lo que sugiere que la mayor acumulación de proteínas se debe a la agregación de la PIH, tal y como se observa en la figura 30.

Los cuerpos de inclusión aislados de los cultivos inducidos a 0.4 °C/min fueron ligeramente más puros, ya que se acumularon con mayor selectividad a la PIH (hasta en un 73 %), aunque también se observaron menores rendimientos de la proteína total agregada desde el inicio de la fase de producción. En conjunto, estos datos sugieren que el calentamiento lento, como ocurriría en fermentadores de gran escala (100 m³), favorece la agregación selectiva de la PIH respecto a las nativas. Estos resultados son congruentes con la mayor producción de PIH en los cultivos inducidos a 0.4 °C/min.

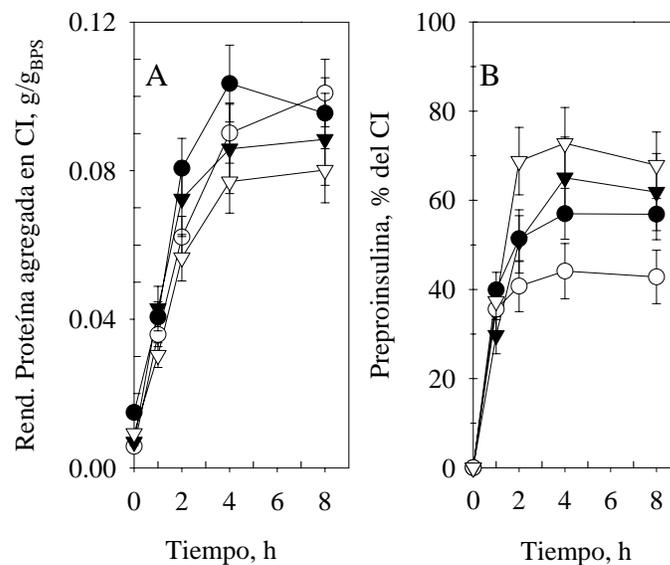


Figura 30. Cinéticas de agregación de proteína total (A) y PIH (B) en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a 42 °C mediante diferentes velocidades de calentamiento. Incremento de la temperatura a: 6.0 (círculos negros), 1.7 (círculos blancos), 0.8 (triángulos negros) y 0.4 (triángulos blancos) °C/min.

6.4.3. Efecto de las oscilaciones de temperatura en la agregación de proteínas

En la figura 31 se muestra el efecto de la inducción a temperatura oscilante sobre la agregación de proteínas totales y PIH en cuerpos de inclusión. De esta figura es posible

determinar que la velocidad inicial de agregación de proteína total de cultivos alimentados mediante la estrategia exponencial-2 fue de 20 mg/g_{BPS}-h, comparada con los 10 y 5 mg/g_{BPS}-h de los cultivos alimentados con las estrategias lineal y exponencial-1, respectivamente. Sin embargo, la agregación de proteína total en los cultivos alimentados con la estrategia exponencial-2 cesó después de 8 h de inducción, mientras que en los cultivos alimentados con las estrategias lineal y exponencial-1 continuó hasta el final del cultivo. Los cultivos oscilados entre 42 y 37 °C agregaron con mayor selectividad a la PIH, ya que en los cuerpos de inclusión extraídos de estas condiciones contuvieron entre un 80 y 92 % de PIH (figura 31B). La menor acumulación de PIH en los cuerpos de inclusión de los cultivos inducidos mediante oscilaciones de temperatura entre 42 y 30 °C se puede deber al mayor tiempo de exposición de las células a 42 °C (2 h) (ver figura 22), lo cual pudo haber propiciado una mayor desnaturalización de proteínas nativas.

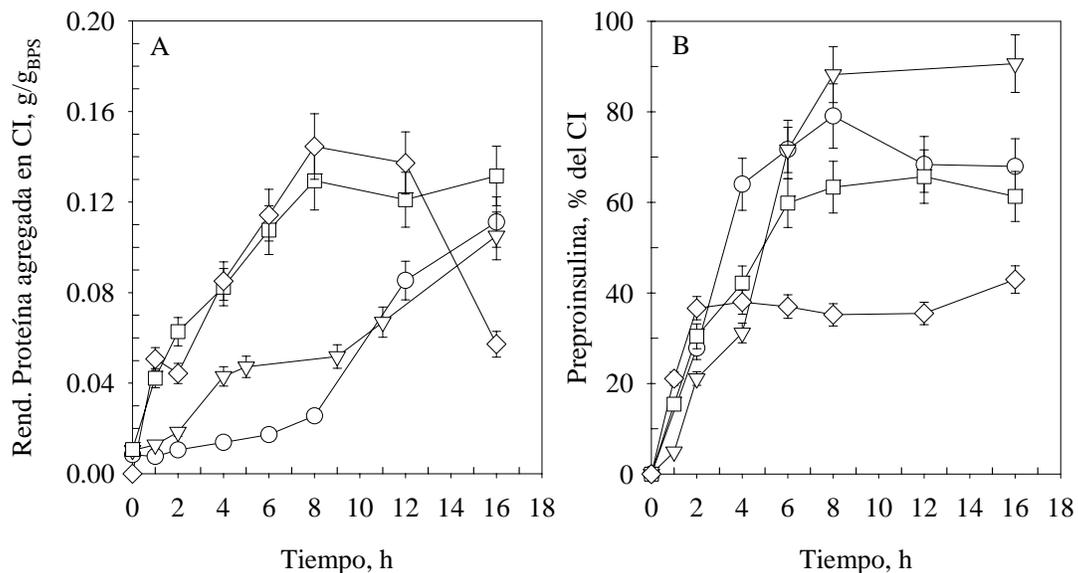


Figura 31. Cinéticas de agregación de proteína total (A) y PIH (B) en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a temperatura oscilante. Temperatura oscilante entre 42 y 37 °C alimentados mediante la estrategia: exponencial-1 (círculos), lineal (triángulos) y exponencial-2 (cuadrados). Temperatura oscilante entre 42 y 30 °C alimentados mediante la estrategia exponencial-2 (rombos)

6.4.4. Efecto de la estrategia de alimentación en la etapa de inducción sobre la agregación de proteínas

También se evaluó el efecto de la estrategia de alimentación sobre los perfiles de agregación de cultivos inducidos a 0.4 °C/min (figura 32). Para este caso no se encontraron diferencias importantes en la cinética y cantidad de proteína total agregada (figura 32A); pero si en el porcentaje de PIH agregado en cuerpos de inclusión (figura 32B), ya que este fue menor durante las primeras 4 h cuando los cultivos se alimentaron a la velocidad mas baja (exponencial-1), aunque después de 8 h, el porcentaje de PIH fue similar al de los cultivos alimentados mediante la estrategia exponencial-2 y lineal. Estos resultados correlacionan con la menor velocidad de síntesis de PIH durante las primeras horas de los cultivos alimentados a la tasa baja (figura 24), es decir, la velocidad de desnaturalización de proteínas nativas podría ser mayor a la de síntesis de la heteróloga promoviendo la mayor agregación de las primeras durante el inicio de la fase de producción.

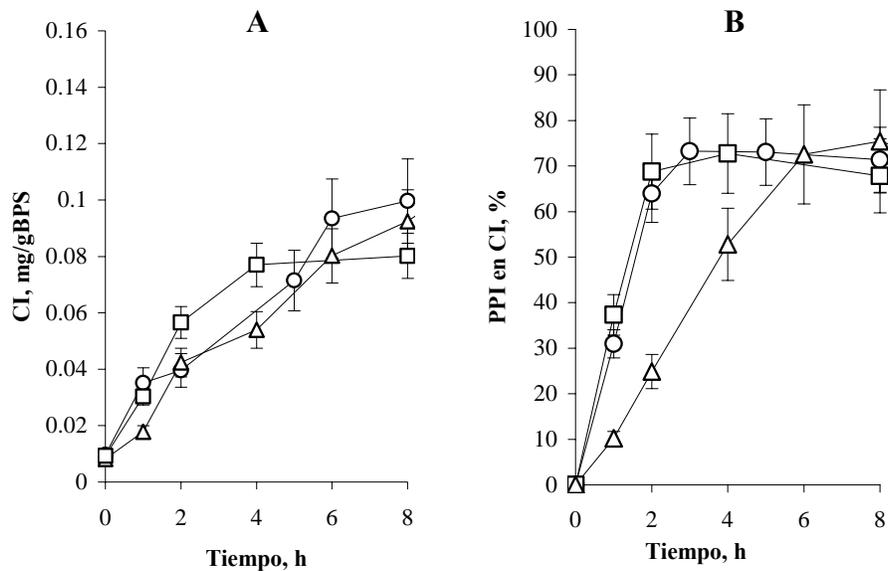


Figura 32. Cinéticas de agregación de proteína total y PIH en cuerpos de inclusión de cultivos inducidos a 42 °C, calentados a 0.4 °C/min y alimentados a las tres estrategias de alimentación en la etapa de inducción. Proteína total agregada en cuerpos de inclusión (A) y porcentaje de PIH contenida en estos (B). La velocidad de alimentación al momento de la inducción se fijó en tres valores: exponencial-1 (triángulos), lineal (círculos); o exponencial-2 (cuadrados).

La estrategia de alimentación también tuvo un efecto importante en los cultivos inducidos con oscilaciones, ya que las bacterias expuestas a las tasas de alimentación exponencial-1 y lineal exhibieron una menor agregación de proteínas durante las 10 primeras horas de producción, por lo que acumularon entre un tercio y un quinto de lo observado en los alimentados a exponencial-2 (figura 31). Esto probablemente favoreció la formación de cuerpos de inclusión hasta con un 92 % de PIH en los cultivos oscilados y alimentados con la estrategia lineal, que son los más puros obtenidos de todas las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo. Aun no es claro porqué los cultivos alimentados a la velocidad más alta acumulan mayores cantidades de proteína total y menores de la heteróloga. Una posibilidad es que los cultivos a mayor alimentación, al no carecer de la fuente de carbono, sintetizen mayores cantidades de proteína nativa y heteróloga de manera que la proteína sintetizada no pueda interactuar con la maquinaria de plegamiento celular, por lo que terminan agregándose más rápidamente. La inducción mediante oscilaciones de temperatura entre 42 y 30 °C manteniendo una tasa alta de alimentación, a pesar de que favorece más el crecimiento celular, no es útil para la manufactura de cuerpos de inclusión más puros, aún cuando la agregación de proteínas es comparable con la de los cultivos oscilados entre 42 y 37 °C y alimentados con la misma estrategia.

6.4.5. Conclusiones parciales

La agregación proteica y la especificidad en la acumulación de la preproinsulina humana fueron afectadas tanto por el esquema de incremento de la temperatura como por el perfil de alimentación. Los cultivos inducidos a temperatura oscilante entre 37 y 42 °C y alimentados con la estrategia lineal fueron los mejores para obtener de cuerpos de inclusión más puros (hasta con un 92 % de PIH). La identidad de las proteínas contaminantes fue la misma en todas las condiciones experimentales, por lo que la co-agregación de estas es común a la de la preproinsulina. En especial, la agregación de MetE es interesante ya que podría estar involucrada con la pérdida del crecimiento de *E. coli* y productividad de la preproinsulina. Este es el primer trabajo en donde se evalúa el efecto del perfil de alimentación sobre la agregación de proteínas en cuerpos de inclusión; obviamente, también es el primero donde se evalúa el efecto de las condiciones de temperatura oscilante propuestas en este trabajo.

7. Conclusiones generales

La transferencia de calor es uno de los principales problemas del diseño y de operación de biorreactores de gran escala. Empleando la metodología del escalamiento descendente se evaluó el desempeño de cultivos a alta densidad de *E. coli* a incrementos de la temperatura característicos de fermentadores de gran escala para inducir la síntesis de preproinsulina humana. Los resultados del análisis transcripcional a las diferentes velocidades de incremento de la temperatura revelaron que el calentamiento lento, como sucede en biorreactores de gran escala (100 m³), atenúa tanto la expresión del gen heterólogo como la activación de respuestas de estrés al incremento de la temperatura. Estas características favorecieron la síntesis de PIH a expensas de una menor formación de ácidos orgánicos; además fueron aprovechadas para proponer y evaluar un nuevo esquema de inducción por oscilaciones de temperatura. Esta estrategia fue útil para mejorar el desempeño de las bacterias no sólo para crecer, sintetizar PIH y disminuir de manera importante la cantidad de ácidos orgánicos acumulados, sino también para mejorar la especificidad de la agregación de PIH en cuerpos de inclusión, característica deseada en los procesos subsiguientes a la fermentación.

Los resultados generados en este proyecto muestran que el estudio de las respuestas fisiológicas a nivel molecular y macroscópico es útil para entender los mecanismos de respuesta y adaptación del hospedero a problemas básicos de ingeniería y generar nuevos esquemas de producción para incrementar la productividad y sustentabilidad de los bioprocesos.

8. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo serán útiles para mejorar el diseño y la operación de procesos de fermentación para la producción de proteínas recombinantes inducidas por incremento de la temperatura. Estas mejoras pueden ser expandidas hacia eficientar la agregación de la proteína recombinante, con el objetivo de disminuir los esfuerzos de purificación y ensamblaje *in-vitro*.

El enfoque propuesto en este proyecto, puede ser aplicado al estudio de otros parámetros relevantes como pH, presión y CO₂ disuelto.

Aún es necesario profundizar en el análisis de las respuestas fisiológicas de *E. coli* a las oscilaciones de temperatura. Este análisis debería incluir respuesta transcripcional y cuantificación de metabolitos intracelulares.

Igualmente, será importante evaluar el esquema de inducción a temperatura oscilante durante la síntesis de proteínas que no tiendan a agregarse; profundizar en el estudio proteómico de los cuerpos de inclusión para identificar y cuantificar las proteínas nativas agregadas; evaluar otras estrategias de alimentación a fin de encontrar la óptima. En esta última propuesta se debe proveer la fuente de carbono necesaria para sintetizar la proteína recombinante sin ocasionar sobre flujo metabólico. La estrategia de OD-pH stat o la alimentación lineal con una pendiente mayor a la evaluada en este trabajo pueden ser alternativas.

Hasta el momento, no existe en nuestro conocimiento, un proceso de producción continua de proteínas recombinantes inducido por temperatura, debido a la pérdida de la capacidad de crecimiento de las bacterias después de inducir. Con los resultados obtenidos a partir de la nueva estrategia de inducción por oscilaciones de temperatura, se pueden diseñar sistemas de producción continuos ya que las bacterias, cuando se someten a estas condiciones, no pierden su capacidad de crecimiento. Para esto, deberá evaluarse el periodo de tiempo máximo que pueden seguir creciendo las células bajo un esquema de inducción por oscilaciones de temperatura.

La disponibilidad de metionina es importante para que las células puedan contender con el estrés causado por el incremento de la temperatura de cultivo (Gur et al., 2002; Gage y Neidhardt, 1993). El gen *glyA* codifica para la enzima encargada de la síntesis de glicina a partir de serina y tetrahidrofolato, esta reacción es crucial para reciclar el precursor de la síntesis de metionina, el 5-metil tetrahidrofolato (figura 33). Mutaciones en *glyA* generan fenotipos deficientes para crecer a cualquier temperatura, en especial a 42°C (Gage y Neidhardt, 1993). La agregación de la primera enzima de la vía de síntesis de metionina, la homoserina succinil transferasa (HTS) limita el crecimiento de *E. coli* a 44 °C. En nuestro trabajo, observamos la acumulación de MetE en cuerpos de inclusión, especialmente en los cultivos inducidos a 42 °C. Esta enzima participa en la conversión de homocisteina en metionina. Por lo anterior, se sugiere la utilización de herramientas de la ingeniería metabólica para generar cepas de *E. coli* eficientes en la síntesis de metionina, en especial generar mutantes de MetE y HTS resistentes a la agregación.

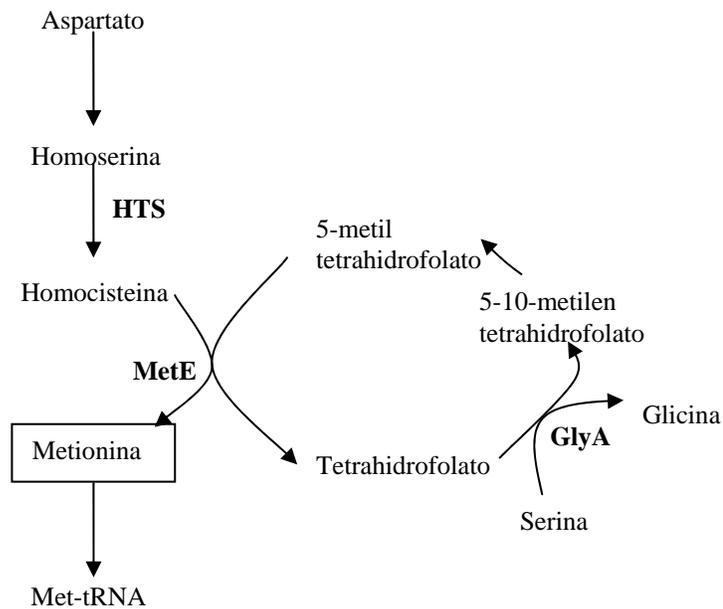


Figura 33. Síntesis de metionina.

Nomenclatura y Abreviaturas

(p)ppGpp: Pirofosfato de guanosina	
A: Constante	
A_T : Area total de transferencia de calor	[m ²]
ATP: Adenosín trifosfato	
B: Constante	
bp: Pares de bases	
BPS: Biomasa en peso seco	
C : Calor específico del fluido caliente	[cal/g-°C]
c: Calor específico del fluido frío (caldo de cultivo)	[cal/kg-°C]
d : Diámetro exterior del serpentín	[m]
D: Como subíndice indica degradación	
D: Diámetro del fermentador	[m]
Di: Diámetro del impulsor	[m]
DNA: Ácido desoxinucleico (por sus siglas en Inglés)	
DO: Densidad óptica	
d_t : Diámetro exterior del tubo del serpentín	[m]
Ea: Energía de activación	[kJ/mol]
F : Flujo de alimentación de la solución de glucosa	[L / h]
F: Como subíndice indica final	
G : Gasto de alimentación de glucosa	[g / min]
G_d : Energía libre de Gibbs para la degradación térmica	[KJ/mol]
GDP: Difosfato de guanosina	
GTP: Trifosfato de guanosina	
h : Altura del serpentín	[m]
H: Altura del fermentador	[m]
h_c : h_{io} : Coeficiente de transferencia de calor referido al diámetro exterior del tubo	[cal/h-m ² -°C]
h_d : Altura entre vueltas subsecuentes del serpentín	[m]
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión	

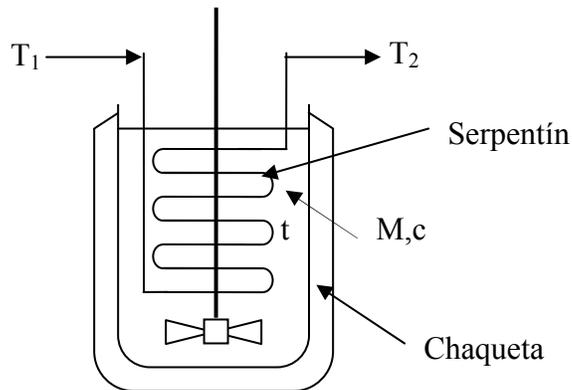
IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido	
j_H : Factor de transferencia de calor	
k : Conductividad térmica	[cal/h-m ² -°C/m]
k : Velocidad específica de síntesis o degradación	[g/min]
L : Longitud del área de transferencia	[m]
M : Masa del líquido a calentar	[kg]
MLTD : Media logarítmica de la diferencia de temperatura	[°C]
N : Revoluciones por minuto de agitación	[min ⁻¹]
N : Velocidad de agitación	[rpm]
NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido	
P : Concentración de producto	[g/L]
PIH: Preproinsulina humana	
Q : Flujo de calor	[kcal / h]
R : Constante de los gases ideales	[Kj/mol-°K]
r : Velocidad de síntesis o degradación	[g/min]
Re : Número de Reynols	
RNA: Ácido desoxiribonucleico (por sus siglas en Inglés)	
RNA _m : RNA mensajero	
RNA _p : RNA polimerasa	
RNA _r : RNA ribosomal	
RNA _t : RNA de transferencia	
S : Como subíndice indica síntesis	
T : Temperatura	[°C]
T : Temperatura en el serpentín	[°C]
t : Temperatura en el tanque	[°C]
t : Tiempo	[t]
t_c : Tiempo de circulación	[s]
TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	
t_D : Tiempo característico de degradación	[s]
t_{HT} : Tiempo característico de transporte de calor	[s]
t_m : Tiempo de mezclado	[s]

TOD: Tensión de oxígeno disuelto	[%]
t_s : Tiempo característico de síntesis	[s]
U, U_D , U_C : Coeficientes totales de transferencia de calor, coeficiente limpio y de diseño respectivamente	[cal/h-m ² -°C]
V : Volumen del fermentador	[m ³ o L]
vvm : Flujo volumétrico de gas por volumen de medio	[L / L-min]
W : Peso del flujo del fluido caliente	[kg/h]
X: Concentración de biomasa	[gBPS]
$Y_{X/S}$: Rendimiento de biomasa por glucosa consumida	[gBPS/g]
μ_{max} : Velocidad específica de crecimiento máxima	[h ⁻¹]
Δ : Incremento	
λ : Longitud de onda	[nm]
λ : Capacidad calorífica latente	[kcal/kg]
μ : Viscosidad	[kg/m-h]
μ : Velocidad específica de crecimiento	[h ⁻¹]
θ : Tiempo	[h]
ρ : Densidad	[kg/m ³]

Apéndices

A. Memorias de cálculo

A.1. Cálculo del tiempo necesario para incrementar la temperatura de 30 a 42 °C en biorreactores de distintos volúmenes.



Para calcular el tiempo necesario para incrementar la temperatura de 30 °C a 42 °C en biorreactores de distintos volúmenes, se contó con lo siguiente:

- 1) Se tomaron los siguientes volúmenes nominales de biorreactores: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 y 100 m³.
- 2) Los volúmenes de operación son el 75% del volumen nominal.
- 3) Las dimensiones de los biorreactores, así como de las unidades de calentamiento (serpentín y chaqueta), son calculados a partir de datos típicos encontrados en la literatura.
- 4) Como fluido calefactor se utilizó vapor sobrecalentado.
- 5) Los valores reológicos y fisicoquímicos de los fluidos utilizados se obtienen de tablas encontradas en bibliografía especializada.
- 6) El cálculo de las rpms para cada escala se realizó escalando los biorreactores con el criterio de potencia suministrada constantemente.

Estrategia del cálculo

Balance de calor

La temperatura del biorreactor (*t*) a cualquier tiempo (θ) se puede calcular a partir de un balance de calor como sigue:

$$Mc \frac{dt}{d\theta} = U_D A \Delta T + Q_{\text{Agitación}} + Q_{\text{Reacción}} - Q_{\text{Aireación}} \dots\dots\dots(11)$$

de donde, $U_D A \Delta T$ es el flujo de calor transferido desde el vapor que pasa por el serpentín y chaqueta, al caldo de cultivo en el biorreactor. $Q_{\text{Agitación}}$, es el calor transferido por la agitación del caldo de cultivo, el cual se tomó constante e igual a 86,040 Kcal h⁻¹ (Nielsen et al., 2003). $Q_{\text{Reacción}}$, es el calor generado por el metabolismo celular y $Q_{\text{Aireación}}$ es el calor removido por la aireación del biorreactor. Pasando la capacidad calorífica por masa de líquido (Mc) al divisor del término de la derecha del signo igual, la velocidad de calentamiento del biorreactor se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\frac{dt}{d\theta} = \frac{U_D A \Delta T + Q_{\text{Agitación}} + Q_{\text{Reacción}} - Q_{\text{Aireación}}}{Mc} \dots\dots\dots(12)$$

Cálculo del término $U_D A \Delta T$

El coeficiente total de transferencia de calor de diseño (U_D) se calculó como sigue:

$$U_D = \frac{U_c h_d}{U_c + h_d} \dots\dots\dots(13)$$

Se utilizó un valor típico del coeficiente de transferencia de calor de diseño (h_d) de 0.093 Kcal/(h m² °C) (Kern, 1997). El cálculo del coeficiente limpio de transferencia de calor (U_c), se realiza como sigue:

$$U_c = \frac{h_c h_{oi}}{h_c + h_{oi}} \dots\dots\dots(14)$$

de donde, el cálculo del coeficiente de transferencia de calor en la película de fluido en la pared del serpentín y/o chaqueta (h_c) se calcula como:

$$\frac{h_c D_j}{k} = 0.74 \left(\frac{L^2 N \rho}{\mu} \right)^{\frac{2}{3}} \left(\frac{c \mu}{k} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\mu}{\mu_w} \right)^{0.14} \dots\dots\dots(15)$$

de donde, el factor de transferencia de calor adimensional, j_H , se obtiene gráficamente (Kern, 1997) relacionándolo con el régimen del flujo del caldo de cultivo al interior del tanque:

$$jH = \frac{h_c D_j}{k} \left(\frac{c\mu}{k} \right)^{-\frac{1}{3}} \left(\frac{\mu}{\mu_w} \right)^{-0.14} \text{ vs } Re = \left(\frac{L^2 N \rho}{\mu} \right) \dots\dots\dots(16)$$

El coeficiente de transferencia de calor referido al diámetro exterior del tubo (h_{oi}), se calcula utilizando la temperatura de la película de vapor en contacto con la superficie de transferencia, para lo cual se supuso que la temperatura fue la misma que la del vapor al centro del tubo/chaqueta, y constante durante toda la longitud de la unidad de transferencia (serpentin y/o chaqueta). Para el cálculo, se tomó el valor de la temperatura y el valor del factor $L*\Delta T$, que sirve para incluir en el cálculo, los efectos de la caída de presión en la condensación del vapor en la unidad de transferencia de calor.

Para calcular el área total de transferencia de calor (A), se utilizaron geometrías y relaciones geométricas típicas del diseño de biorreactores, las cuales se encuentran en libros de texto especializados.

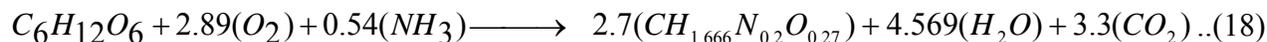
Cálculo de $Q_{Reacción}$

El calor cedido al caldo de cultivo por el metabolismo celular ($Q_{Reacción}$), se puede calcular mediante un balance de calor entre el calor de combustión de reactantes y productos como sigue:

$$Q = \sum_j Y_{sj} (-\Delta H_{cj}) - \sum_i Y_{pi} (-\Delta H_{ci}) = \sum_j Y_{sj} Q_{cj} - \sum_i Y_{pi} Q_{ci} \dots\dots\dots(17)$$

de donde Y es el coeficiente estequiométrico de la especie química y Q es su calor de combustión. Los subíndices S y P , denotan sustrato y producto, respectivamente.

El balance estequiométrico del cultivo de *E. coli* recombinante a concentraciones celulares de 60 g/L, creciendo en condiciones aeróbicas, con glucosa como fuente de carbono y NH_3 como fuente de nitrógeno ($Y_{X/S} = 0.5 \text{ g g}^{-1}$; $RQ = 0.85 \text{ gCO}_2 \text{ gO}_2^{-1}$) (Hoffman y Rinas, 2001 y 2002), se muestra en la siguiente ecuación.



Cálculo de $Q_{Aireación}$

El calor removido por la aireación del medio de cultivo, se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$Q_{\text{Aireación}} = X\lambda \dots\dots\dots(19)$$

de donde, X es la fracción de agua en el aire a la temperatura de proceso (30 °C). El valor de la capacidad calorífica latente (λ) fue de 263 Kcal Kg⁻¹ (Kern, 1997).

B. Diagramas de flujo del software de control diseñado para establecer la estrategia de alimentación e inducción.

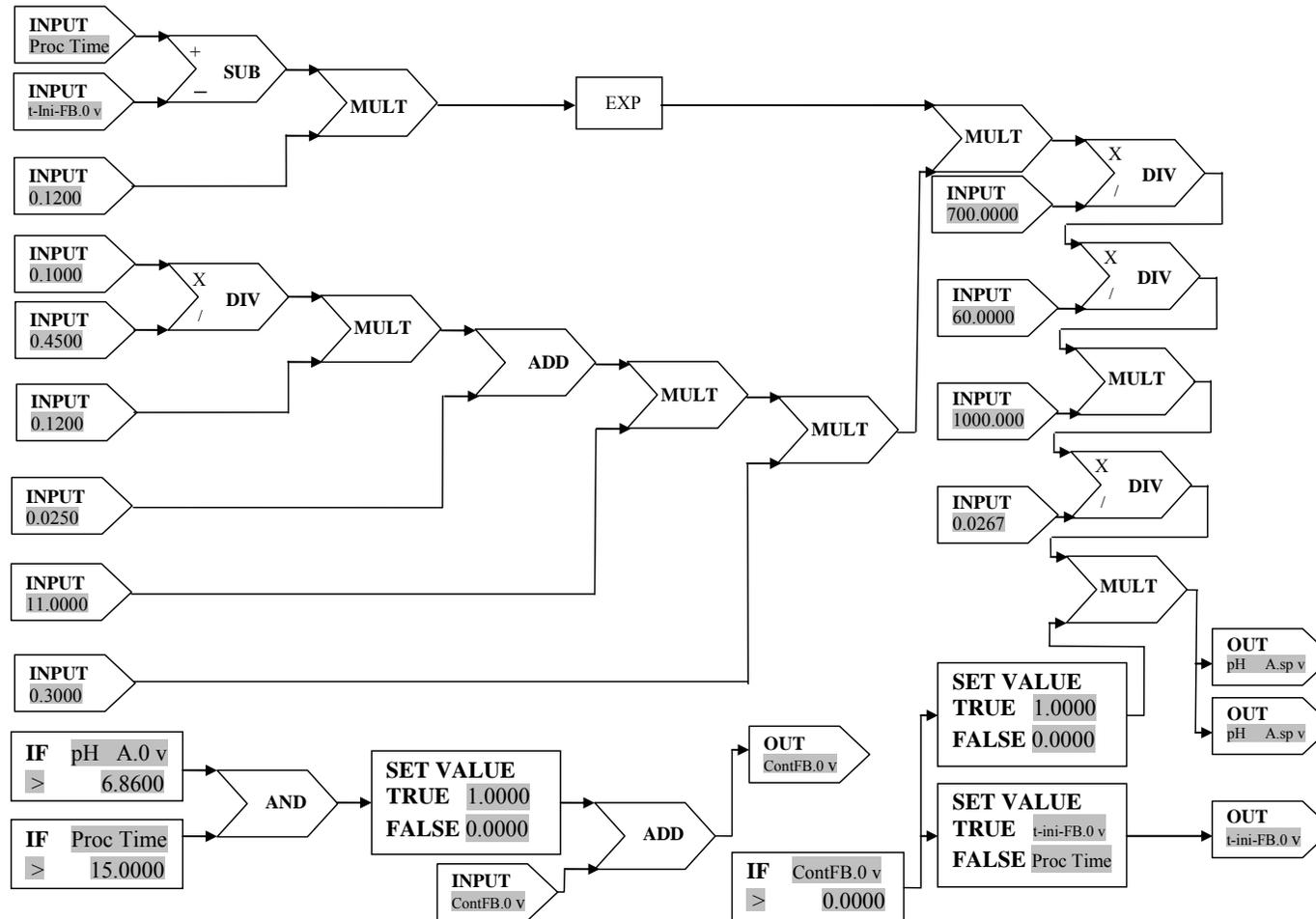


Figura B1. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la alimentación de la fase de lote alimentado e inducción de los cultivos.

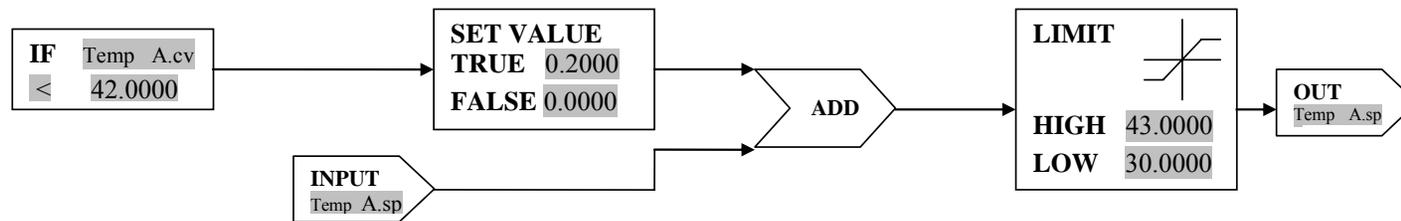


Figura B2. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la velocidad de aumento de la temperatura a 0.8 y 0.4 °C/min

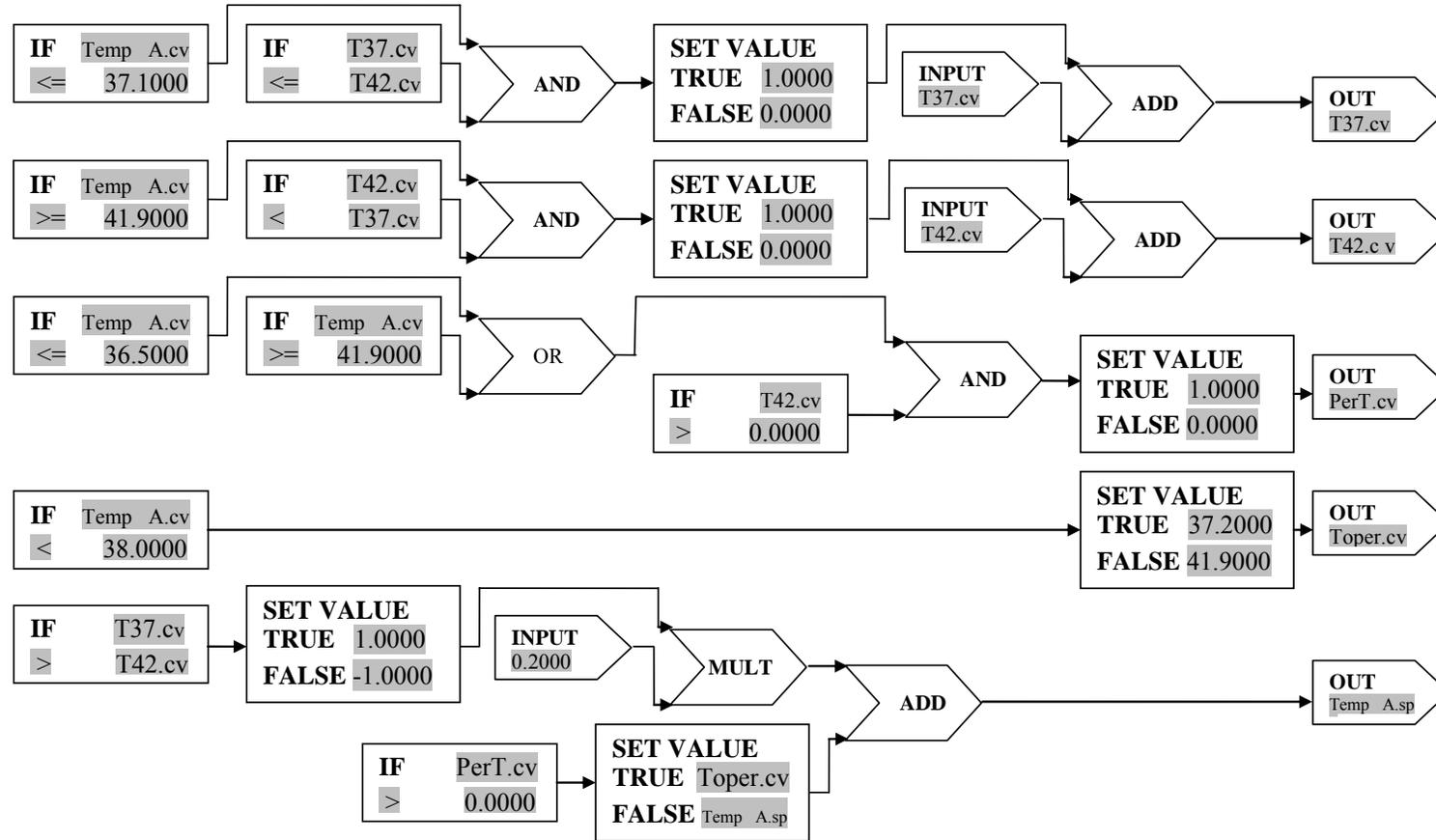


Figura B3. Diagrama de flujo del programa desarrollado para controlar la inducción a temperatura oscilante.

Productos generados durante el desarrollo del proyecto

Los artículos publicados y en preparación son:

1.- **Caspeta L**, Flores N, Pérez NO, Bolívar F, Ramírez OT. 2009. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol Bioeng* 102: 468-482.

2.- Lara AR, **Caspeta L**, Gosset G, Bolívar F, and Ramírez OT. 2008. 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* 99:893-901.

3. **Caspeta L**, Ramírez OT. Improvement of growth and recombinant protein production by a novel induction strategy of temperature oscillations in high-cell density cultures of *Escherichia coli*. En preparación.

4. **Caspeta L**, Ramirez OT. The effect of feeding rate and temperature profile during induction on protein aggregation in *Escherichia coli* overproducing human preproinsulin. En preparación.

Las 5 presentaciones del presente trabajo en foros internacionales son.

Caspeta L, Noemí F, Bolivar F, Ramírez OT. Transcriptional and metabolic analysis of scale-down studies for bioprocess improvement: the case of recombinant protein production induced by temperature. *Metabolic Engineering VII*, Puerto Vallarta, Jalisco, México. September **2008**.

Lara A, **Caspeta L**, Gosset G, Bolivar F, Ramírez OT. High cell density accumulation of engineered *Escherichia coli* without external glucose feeding for the production of

biopharmaceuticals: overcoming overflow metabolism in batch cultures. Metabolic Engineering VII, Puerto Vallarta, Jalisco, México. September **2008**.

Caspeta L, Flores N, Pérez NO, Bolivar F, Ramírez OT. Transcriptional and metabolic responses in high-cell density cultures during temperature-induced synthesis of recombinant protein in *Escherichia coli*: a scale-down study. 2007AIChE's Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, E. U. November **2007**.

Caspeta L, Flores N, Gosset G, Bolivar F, Ramírez OT. *Escherichia coli* Transcriptional and metabolic responses in high-cell density cultures during temperature up-shifts for induction of recombinant protein. Biochemical Engineering XV Conference, Quebec City, Canada. July **2007**.

Lara AR, **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 Conference, Quebec City, Canada. July **2007**.

Las 2 presentaciones del presente trabajo en foros nacionales son:

Caspeta L, Ramírez OT. Análisis de regimen y escalamiento descendente del proceso de producción de proteína recombinante en cultivos a alta densidad de *Escherichia coli* termo-inducida. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), XII congreso, Morelia, México. Junio **2007**.

Caspeta L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Respuestas transcripcionales de *Escherichia coli* termo-inducida en un sistema de escalamiento descendente. SMBB, XII congreso, Mérida, México. Junio **2007**.

Bibliografía

Akiyama Y, Ogura T, Ito K. 1994. Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. I. Mutations that reduce retention efficiency of a cytoplasmic reporter. *J Biol Chem* 269: 5218-5224.

Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM. 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 6938-6947.

Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, Vassylyeva MN, Hosaka T, Ochi K, Yokoyama S, Vassylyev DG. 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117: 299-310.

Balbás P. 2001. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 19:251-267.

Banuett F, Hoyt MA, McFarlane L, Echols H, Herskowitz I. 1986. hflB, a new *Escherichia coli* locus regulating lysogeny and the level of bacteriophage lambda cII protein. *J Mol Biol* 187: 213-224.

Baneyx F, Mujacic M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22: 1399-1408.

Brain TJS, Man KL. 1989. Heat transfer in stirred tank bioreactors. *Chem Eng Progress* July: 76-80.

Buchberger A, Schroder H, Hesterkamp T, Schonfeld HJ, Bukau B. 1996. Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J Mol Biol* 261: 328-333.

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.

Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D. 1996. The stringent response. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella* –cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p 1433-1458.

Caulcott CA, Rhodes M. 1986. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *Trends Biotechnol* 4: 142-146.

Chalmers JJ, Kim E, Telford JN, Wong EY, Tacon WC, Shuler ML, Wilson DB. 1990. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing β -Lactamase or human epidermal growth factor. *App Enviromental Microbiol*, 56: 104-111.

De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* 309: 217-236.

Cowing DW, Bardwell JC, Craig EA, Woolford C, Hendrix RW, Gross CA. 1985. Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc Natl Acad Sci* 82: 2679-2683.

Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, Hendry P, Stamford NPJ, Lilley E, Dixon NE. 1990. Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 87:123-126

Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-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, Hoeks F, Lin HY, Neubauer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius A. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol* 85:175-185.

Engbaek F, Gross C, Burgess RR. 1976. Biosynthesis of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits upon release of rifampicin inhibition. *Mol Gen Genet* 143: 297-299.

Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. 2008. New insights into the role of sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14: 176-192.

Flores N, Flores S, Escalante A, De Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F. 2005. Adaptation for fast growth on glucose 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.

Gage DJ, Neidhardt FC. 1993. Modulation of the heat shock response by one-carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 1961-1970.

Granger LL, O'Hara EB, Wang RF, Meffen FV, Armstrong K, Yancey SD, Babitzke P, Kushner SR. 1998. The *Escherichia coli* mrsC gene is required for cell growth and mRNA decay. *J Bacteriol* 180: 1920-1928.

Grabherr R, Nilsson E, Striedner G, Bayer K. 2002. Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 77:142-147.

Gupta JC, Jaisani M, Pandey G, Mukherjee KJ. 1999. Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λ pL promoter. *J Biotechnol* 68:125-134.

Gur E, Biran D, Gazit E, Ron EZ. 2002. In vivo aggregation of a single enzyme limits growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Mol Microbiol* 46:1391-1397.

Harcum SW, Bentley WE. 1993. Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*: Implications for heterologous protein yield. *Appl Biochem Biotechnol* 80: 23-37.

Harcum SW, Haddadin FT. 2006. Global transcriptome response of recombinant *Escherichia coli* to heat-shock and dual heat-shock recombinant protein induction. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 801–814.

Heitzer A, Mason CA, Hamer G. 1992. Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 22: 153-169.

Herendeen SL, VanBogelen RA, Neidhardt FC. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J Bacteriol* 139: 185-194.

Herman C, Thevenet D, D'Ari R, Bouloc P. 1995. Degradation of σ_{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3516-3520.

Hoffmann F, Rinas U. 2001. On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng* 76: 333-340.

Hoffmann F, Weber J, Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng* 80: 313-19.

Hyun ChJ, Chang KK, Lee SY. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli* *Chem Engin Science* 61: 876 – 885

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.

Jechlinger W, Glocker J, Haidinger W, Matis A, Szostak MP, Lubitz W. 2005. Modulation of gene expression by promoter mutants of the lambda cI857/pRM/pR system. *J Biotechnol* 116:11-20.

Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nyström T. 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16: 1260-1270.

Jones KL, Keasling JD. 1998. Construction and characterization of F plasmid-based expression vectors. *Biotechnol Bioeng* 59: 659-665.

Justesen J, Lund T, Skou-Pedersen F, Kjeldgaard NO. 1986. The physiology of stringent factor (ATP:GTP 3'-diphosphotransferase) in *Escherichia coli*. *Biochimie* 68: 715-722.

Kanemori M, Mori H, Yura T. 1994. Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 5648-5653.

Kern, D. 1997. *Procesos de Transferencia de Calor*. 8ª Impresión, Ed CECSA, México.

Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang HC, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, Hartl FU. 2005. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122: 209-220.

Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Solem C, Pedersen MB, Nilsson D, Michelsen O, Jensen PR. 2002. The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Mol Biol Rep* 29: 41-45.

Kuczyńska-Wiśnik D, Żurawa-Janicka D, Narkiewicz J, Kwiatkowska J, Lipińska B, Laskowska E. 2004. *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies. *Acta Biochim Pol* 51: 925–931.

Kurland CG, Dong H. 1996. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol Microbiol.* 21:1-4.

Kusukawa N, Yura T, Ueguchi C, Akiyama Y, Ito K. 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* 8: 3517-3521.

Lara AR, Caspeta L, Gosset G, Bolivar F, Ramírez OT. 2008. 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* 99: 893-901.

Lara AR, Galindo E, Palomares LA, Ramírez OT. 2006a. Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol Biotechnol* 34: 355-381.

Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolivar F, Ramírez OT. 2006b. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng* 93: 372-385.

Lemaux PG, Herendeen SL, Bloch PL, Neidhardt FC. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. *Cell* 13: 427-434.

Lengeler JW, Drows G, Schleggel HG. 1999. The RelA/SpoT modulon controls anabolic pathways and macromolecule biosynthesis. In: *Biology of the prokaryotes*. Blackwell Science, New York, NY, USA, pp. 505-509.

LeThanh H, Neubauer P, Hoffmann F. 2005. The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb Cell Fact* 4: 6.

Liberek K, Wall D, Georgopoulos C. 1995. The DnaJ chaperone catalytically activates the DnaK chaperone to preferentially bind the sigma 32 heat shock transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci 92: 6224-6228.

Lieb M. 1966. Studies of heat-inducible lambda bacteriophage, 1. Order of genetic sites and properties of mutant prophages. J. Mol Biol 16: 149-163.

Lidén G. 2002. Understanding bioreactor. Bioprocess Biosystems Engineering 24: 273-279.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25: 402-408.

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: 1004-1011.

Makrides SC. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 60: 512-538.

Manfredini, R., Cavallera, V. 1983. Mixing and oxygen transfer in conventional stirred fermentors. Biotechnol. Bioeng. 25: 3115-3131.

Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP. 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. J Bacteriol 171: 342-348.

Medina MG, Carbonell X, Villaverde A. 2002. Connection between gene dosage and protein stability revealed by a high-yield production of recombinant proteins in an *E. coli* LexA1(Ind^r) background. Biotechnol Bioeng 78: 722-730.

Menart V, Jevsevar S, Vilar M, Trobi A, Pavko A. 2003. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong pR, pL promoters from phage lambda. *Biochem Biotechnol* 83:181-190.

Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rudiger S, Roder D, Langen H, Bukau B. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J* 18: 6934-6949.

Nielsen J, Villadsen J, Gunnar L. 2003. Scale-Up of bioprocesses. In: 2nd. Ed. *Bioreaction Engineering Principles*. New York: LidenKluwer Academic/Plenum Publishers. p 477-517.

Middelberg AP. 2002. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20:437-443.

Oosterhuis, N.M.G. 1984. Scale-up of bioreactors, a scale-down approach. Ph.D. thesis. Delft, The Netherlands: Delft University of Technology.

Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 267: 15-52.

Phue JN, Noronha SB, Hattacharyya R, Wolfe AJ, Shiloach J. 2005. Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biochem Biotechnol* 90: 805-820.

Pierpaoli EV, Sandmeier E, Schönfeld HJ, Christen P. 1998. Control of the DnaK chaperone cycle by substoichiometric concentrations of the co-chaperones DnaJ and GrpE. *JBC* 273: 6643–6649.

Remaut E, Stanssens P, Fiers W. 1981. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the pL promoter of *E. coli* phage lambda. *Gene* 15:81-93.

Rinas U. 1996. Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 12: 196-200.

Robinson K. 2002. An industry comes of age. *BioPharm* November: 20-24.

Rudolph R, Lilie H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* 10: 49-56.

Sarubbi E, Rudd KE, Xiao H, Ikehara I, Kalman M, Cashell M. 1989. Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264: 15074-15082.

Schmidt M, Babu KR, Khanna N, Marten S, Rinas U. 1999. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 68: 71-83.

Schweder T, Kruger E, Xu B, Jurgen B, Blomsten G, Enfors SO, Hecker M. 1999. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnol Bioeng* 65: 151-159.

Schweder T, Lin HY, Jürgen B, Breitenstein A, Riemschneider S, Khalameyzer V, Gupta A, Büttner K, Neubauer P. 2002. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:330-337.

Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG, Deckwer WD, Rinas U. 1996. Comparison of temperature- and isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enz Microb Technol* 17: 947-953.

Sharma SS, Campbell JW, Frisch D, Blattner FR, Harcum SW. 2007. Expression of two recombinant chloramphenicol acetyltransferase variants in highly reduced genome *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Bioeng* 98:1056-1070.

Straus DB, Walter WA, Gross CA. 1987. The heat shock response of *Escherichia coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature* 329: 348-351.

Strandberg L, Enfors SO. 1991. Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 13: 609-614.

Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU. 1999. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* 97: 755-765.

Thiel KA. 2004. Biomanufacturing, from bust to boom...to bouble?. *Nat Biotechnol* 22:1365-1372.

Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Mori H, Yamanaka K, Niki H, Hiraga S, Ogura T. 1993. The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. *J Bacteriol* 175: 1344-1351.

Valax P, Georgiou G. 1993. Molecular characterization of 8-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnol Prog* 9: 539-547.

Villaverde A, Benito A, Viaplana E, Cubarsi R. 1993. Fine regulation of cI857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Appl Environ Microbiol* 59: 3485-3487.

Wallace RJ, Holmes WH. 1986. Maintenance coefficients and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML308 at different growth temperatures. *FEMS Microbiol Letters* 37: 317-320.

Vind J, Sørensen MA, Rasmussen MD, Pedersen S. 1993. Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. *J Mol Biol* 231: 678-688.

Walsh G. 2000. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol*. 18:831-833.

Walsh G. 2003-a. Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nat Biotechnol* 21:865-870.

Walsh G. 2003-b. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *EJPB* 55: 3-10.

Walsh G. 2004. Second-generation biopharmaceuticals. *EJPB* 55: 3-10.

Walsh G. 2005. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:151-159.

Walsh G. 2006. Biopharmaceutical benchmarks-2006. *Nat Biotechnol* 24:769-776.

Weber J, Hoffmann F, Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol Bioeng* 80: 320-330.

Wendrich TM, Blaha G, Wilson DN, Marahiel MA, Nierhaus KH. 2002. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Molecular Cell* 10: 779-788.

Wittmann C, Weber J, Betiku E, Krömer J, Böhm D, Rinas U. 2007. Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 132: 375-384.

Wong HH, Kim YC, Lee SY, Chang HN. 1998. Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioengin* 60: 271-276.

Yamamori T, Ito K, Nakamura Y, Yura T. 1978. Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J Bacteriol* 134: 1133-1140.

Yamamori T, Yura T. 1980. Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control. *J Bacteriol* 142: 843-851.

Zhao K, Liu M, Burgess RR. 2005. The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced sigma 32 protein involves sigma 32 regulon activation followed by inactivation and degradation of sigma 32 in vivo. *J Biol Chem* 280: 17758-17768.

Zhou YN, Kusukawa N, Erickson JW, Gross CA, Yura T. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor sigma 32. *J Bacteriol* 170: 3640-3649.

Zolkiewski M. 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation, a novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274: 28083-28086.