



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
INGENIERÍA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**RESPUESTA METABÓLICA Y TRANSCRIPCIONAL DE  
*Escherichia Coli* RECOMBINANTE ANTE CONDICIONES  
CONSTANTES Y FLUCTUANTES DE CO<sub>2</sub> DISUELTO:  
UN ESTUDIO DE ESCALAMIENTO DESCENDENTE**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN INGENIERÍA**  
INGENIERÍA QUÍMICA - BIOSEPARACIONES

P R E S E N T A:

**ANTONINO BAEZ ROGELIO**

TUTOR:

**Dr. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH**

Junio 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.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

Secretario: Dr. JUAN ARANDA BARRADAS

Vocal: Dr. JUVENCIO GALÍNDEZ MAYER

1er. Suplente: Dr. EDUARDO BÁRZANA GARCIA

2do. Suplente: Dr. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INGENIERÍA DE BIOPROCESOS del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

TUTOR DE TESIS:

Dr. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH

---

FIRMA

Los estudios que conforman esta tesis se realizaron en el laboratorio No. 10 del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Se agradece a la Dra. Noemí Flores por su asesoría en las técnicas de qRT-PCR y a la M. en C. Vanessa Hernández por su apoyo técnico. Durante la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 183288 y de los proyectos 46408-Z Conacyt-Fondos Salud 69911, 44126 y DGAPA IN-223308. Además se contó con el Apoyo Integral para la formación de Doctores CONACyT 053406. Finalmente, se agradece al Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería por su financiamiento en dos congresos (uno Nacional y otro Internacional); así como a la Facultad de Química por recibirme como alumno.

A Miguel por su legado, ejemplo y carácter. A María por su  
amor, sacrificio y entrega.  
Gracias por ser mis Padres y por la familia que me dieron.

A Ingrid, mi Esposa por ser fuente de belleza y ternura que  
me  
motivan a enfrentar el dragón que guarda del castillo

A ustedes dos hijos que aún no conozco

A mi Señor por permitirme  
conocer a cada uno de  
ustedes que no  
menciono

Agradecimientos:

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por aceptarme como alumno, por su tiempo y recursos invertidos en mi formación, por su ejemplo como Investigador y por que con el paso del tiempo cruzó la línea Tutor-Alumno.

A cada uno de los alumnos del Grupo OTR, muchos ahora Doctores, por su papel fundamental en mi desarrollo Profesional. Por sus críticas tan certeras en los seminarios y fuera de ellos, por la camaradería y compañerismo. Cada uno de ustedes forman una parte especial en mi.

Al Staff OTR: Dra. Laura Palomares, M.C. Vanessa Hernández, Dra. Adriana Valdez, M.C. Ruth Pastor y por su puesto a Karin Levy quien desde mi perspectiva le da un toque especial al grupo ya que nos anima a convivir y confraternizar, independientemente de su excelente trabajo.

Al grupo EG por su disponibilidad e incondicional apoyo.

# Índice general

	<b>RESUMEN</b>	6
	<b>ABSTRACT</b>	7
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	8
<b>1.1</b>	<b>Introducción</b>	8
<b>1.2</b>	<b>Antecedentes</b>	9
1.2.1	<i>El biorreactor: punto central de un proceso biotecnológico</i>	9
1.2.2	<i>La acumulación del CO<sub>2</sub> en los biorreactores</i>	10
1.2.3	<i>Efectos tóxicos del CO<sub>2</sub> en los microorganismos y mecanismos propuestos</i>	12
1.2.4	<i>Escalamiento ascendente de biorreactores y sus implicaciones</i>	16
1.2.5	<i>Escalamiento descendente como una herramienta para estudiar la heterogeneidad ambiental de los biorreactores</i>	19
1.2.6	<i>Criterios utilizados para la selección de los genes evaluados</i>	23
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	25
<b>2.1</b>	<b>Hipótesis</b>	25
<b>2.2</b>	<b>Objetivo general</b>	25
<b>2.3</b>	<b>Objetivos específicos</b>	25
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
<b>3.1</b>	<b>Modelo biológico</b>	26
<b>3.2</b>	<b>Medio de cultivo</b>	27
<b>3.3</b>	<b>Banco celular e inóculo</b>	27
<b>3.4</b>	<b>Condiciones de cultivo</b>	28
3.4.1	<i>Cultivos a dCO<sub>2</sub> constantes</i>	28
3.4.2	<i>Cultivos con gradientes de dCO<sub>2</sub> y sistema de escalamiento descendente (SED)</i>	29
<b>3.5</b>	<b>Métodos analíticos</b>	32
3.5.1.	<i>Determinación de la concentración celular</i>	32

3.5.2.	<i>Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos en muestras de cultivos</i>	32
3.5.3.	<i>Monitoreo y cuantificación de la proteína recombinante</i>	33
3.5.4	<i>Extracción del ARN total en cultivos y síntesis de ADN complementario</i>	36
3.5.5	<i>Amplificación de ADN por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)</i>	39
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	40
<b>4.1</b>	<b>Cultivos a dCO<sub>2</sub> constantes</b>	40
4.1.1	<i>Respuesta metabólica de Escherichia coli recombinante a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub></i>	40
4.1.2	<i>Respuesta transcripcional de genes representativos a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub></i>	48
4.1.2.1	<i>Gen heterólogo (gfp) y genes involucrados en las vías anaplerótica y gluconeogénica</i>	49
4.1.2.2	<i>Genes involucrados en reacciones de descarboxilación</i>	50
4.1.2.3	<i>Genes involucrados en la producción y consumo de acetato</i>	52
4.1.2.4	<i>Genes involucrados en los sistemas de ácido resistencia (AR)</i>	54
4.1.3	<i>Conclusiones parciales</i>	58
<b>4.2</b>	<b>Cultivos con gradientes de dCO<sub>2</sub></b>	59
4.2.1	<i>Experimentos control</i>	59
4.2.1.1	<i>Fluctuaciones de dCO<sub>2</sub></i>	63
4.2.2	<i>Respuesta metabólica de E. coli recombinante ante gradientes de dCO<sub>2</sub></i>	67
4.2.3	<i>Respuesta transcripcional de Escherichia coli recombinante ante gradientes de dCO<sub>2</sub></i>	73
4.2.4	<i>Conclusiones parciales</i>	76
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	77
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	79



<b>Apéndice A1</b>	Curva de calibración interna típica utilizada en geles de SDS-PAGE	81
<b>Apéndice A2</b>	Correlación entre valores de fluorescencia y concentración de GFP	81
<b>Apéndice A3</b>	Amplificación del gen <i>ihfB</i> (housekeeping) por RT-PCR	82
<b>Apéndice A4</b>	Rendimiento máximo de acetato acumulado por gramo de glucosa consumido ( $Y_{ace/glu}$ ) y concentración máxima de formato	82
	<b>REFERENCIAS</b>	83
	<b>Nomenclatura y abreviaturas</b>	94
	<b>Producción científica</b>	95

## Índice de figuras

Figura 1.1	Perfil de acumulación de $dCO_2$ al incrementar la concentración celular en un cultivo tipo lote alimentado de <i>E. coli</i> BL21.	11
Figura 1.2	Diagrama esquemático de rutas metabólicas y reacciones donde participa el $CO_2$ .	15
Figura 1.3	Tiempos característicos de subprocesos celulares y físicos	19
Figura 1.4	Etapas del escalamiento descendente	20
Figura 3.1	Mapa genético del plásmido pV21	26
Figura 3.2	Sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos utilizado para simular gradientes $CO_2$ disuelto	31
Figura 3.3	Cromatograma típico de estándares de glucosa, ácidos orgánicos y etanol	33
Figura 3.4	Barrido de longitudes de onda de excitación y emisión en una muestra de células completas de <i>Escherichia coli</i> expresando GFP	33
Figura 3.5	Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% con muestras de fermentación que contienen GFP	35
Figura 3.6	Gel de agarosa al 2% con muestras de ARN total purificado	37
Figura 4.1	Perfil cinético y de control típicos de un cultivo de referencia	42

Figura 4.2	Perfil cinético y de control típicos de un cultivo mantenido a 70 mbar de $dCO_2$	43
Figura 4.3	Perfiles cinéticos típicos de cultivos a $dCO_2$ constantes	45
Figura 4.4	Comparación de la concentración máxima de biomasa (A), velocidad específica de crecimiento máxima (B), concentración máxima de GFP (C), rendimiento de GFP por gramo de célula (D), rendimiento máximo de biomasa (E), concentración máxima de acetato (F), velocidad específica de producción de acetato (G) y velocidad específica de consumo de acetato (H) bajo diferentes concentraciones de $dCO_2$ .	46
Figura 4.5	Niveles de transcripción de genes representativos de <i>E. coli</i> cultivada bajo diferentes concentraciones de $dCO_2$ , relativos a los cultivos de referencia	51
Figura 4.6	Perfil cinético de cultivos suplementados con L-glutamato mantenidos a 300 mbar de $dCO_2$	56
Figura 4.7	Perfiles de control de pH, TOD y evolución del $dCO_2$ en cultivos con y sin recirculación de medio	60
Figura 4.8	Perfil cinético de cultivos mantenidos a 300 mbar de $dCO_2$ con y sin recirculación de medio	61
Figura 4.9	Perfil del gradiente de $dCO_2$ generado en el SED a un $t_c$ de 50 s	64
Figura 4.10	Perfiles típicos del control de $dCO_2$ , pH y TOD obtenidos en el SED a un $t_c$ de 375 s	66
Figura 4.11	Cinéticas típicas de cultivos de <i>E. coli</i> recombinante expuestos a gradientes de $dCO_2$	68
Figura 4.12	Efectos de los gradientes del $dCO_2$ sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos	70
Figura 4.13	Perfil de concentración de biomasa y GFP en cultivos expuestos a gradientes de $dCO_2$ desde el momento de la inoculación y 3 h después de inocular	72

Figura 4.14	Niveles de transcripción en cultivos bajo gradientes de dCO <sub>2</sub>	74
-------------	--	----

## Índice de tablas

Tabla 1.1	Interdependencia entre parámetros de operación durante la aplicación del escalamiento ascendente	17
Tabla 3.1	Secuencia de oligómeros utilizados en la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (oligos antisentido u oligos b) y en la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (oligos sentido [oligos a] y antisentido [oligos b])	38
Tabla 4.1	Efectos del dCO <sub>2</sub> en las cepas BL21 y W3110 de <i>Escherichia coli</i>	48
Tabla 4.2	Comparación de cultivos de <i>E. coli</i> productora de GFP recombinante a 300 mbar de dCO <sub>2</sub> con y sin glutamato	57
Tabla 4.3	Parámetros cinéticos y estequiométricos de los experimentos control	63

## RESUMEN

Muchas proteínas de interés comercial que se expresan en *Escherichia coli* (*E. coli*), son producidas a escala industrial en cultivos de alta densidad celular. El CO<sub>2</sub> producido por el metabolismo aerobio, puede acumularse a altas concentraciones en dichos sistemas debido a la limitada capacidad de ventilación de los biorreactores de gran escala. En la primera parte de este trabajo, se estudió el desempeño de cultivos por lote de *E. coli* productora de la proteína verde fluorescente (GFP) recombinante, utilizando glucosa como fuente de carbono. Dichos cultivos fueron expuestos en forma continua a concentraciones constantes de CO<sub>2</sub> disuelto (dCO<sub>2</sub>) que pueden alcanzarse en biorreactores de gran escala (20 a 300 mbar). El dCO<sub>2</sub> afectó el crecimiento, la producción de proteína recombinante y estimuló una mayor acumulación de acetato en el medio de cultivo. La velocidad específica de crecimiento y la máxima concentración de GFP disminuyeron en un 42% y 40%, respectivamente a la más alta concentración de dCO<sub>2</sub> evaluada (300 mbar). En contraste, a esta misma condición de dCO<sub>2</sub> evaluada, el acetato acumulado aumentó en un 90% respecto al cultivo de referencia. A nivel molecular, el dCO<sub>2</sub> afectó los niveles de transcripción de algunos genes seleccionados. Para el cultivo mantenido a 300 mbar de dCO<sub>2</sub>, la expresión de los genes involucrados en las reacciones de descarboxilación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (*icdA*, *sucA* y *sucB*) disminuyeron en un 50%, 65% y 41%, respectivamente. En forma opuesta, los niveles de expresión de los genes *adiA*, *gadA* y *gadC* involucrados en los sistemas de ácido resistencia dependientes de arginina y glutamato, incrementaron hasta 2.1, 2.5 y 3.1 veces al aumentar el dCO<sub>2</sub>. Los niveles de transcripción de *poxB*, cuyo producto participa en una vía de producción de acetato, incrementaron al aumentar el dCO<sub>2</sub>. El aumento de la expresión de *poxB* en combinación con la disminución de la actividad de TCA, inferida del análisis transcripcional, explicaron el aumento en la acumulación de acetato a altas concentraciones de dCO<sub>2</sub>. Una menor actividad del ciclo del glioxilato inferida del aumento de la transcripción de *fadR* y la disminución de *aceA*, explicaron la disminución en la velocidad específica de consumo de acetato al incrementar la concentración de dCO<sub>2</sub>. Por otro lado, en el presente trabajo también se realizaron cultivos en lote donde se simuló la presencia de gradientes de dCO<sub>2</sub>, los cuales potencialmente pueden ocurrir en biorreactores de gran escala. Tales gradientes se simularon en un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos, en el cual se mantenía un dCO<sub>2</sub> alto en un reactor y un dCO<sub>2</sub> bajo en el otro mientras se recirculaba continuamente medio de cultivo con células entre ambos biorreactores. En general, los gradientes de dCO<sub>2</sub> resultaron poco perjudiciales para los cultivos en comparación con los cultivos mantenidos a concentraciones de dCO<sub>2</sub> constantes. La velocidad específica de crecimiento disminuyó en tan solo un 11%, mientras que la concentración máxima de acetato acumulado aumentó un 23.5% para el cultivo sometido al mayor gradiente de dCO<sub>2</sub> logrado (33 mbar en el tanque de bajo dCO<sub>2</sub> y 213 mbar en el de dCO<sub>2</sub> alto). Además, en comparación con la condición de referencia no se observaron cambios significativos en los niveles de transcripción de los genes seleccionados para los cultivos bajo condiciones de dCO<sub>2</sub> fluctuantes (de 33 a 50 mbar y de 33 a 95 mbar) llevadas a cabo a t<sub>c</sub> de 50s y 170 s, respectivamente. No obstante, se observaron cambios modestos en los niveles de expresión para el cultivo llevado a cabo con el mayor t<sub>c</sub> (375 s). La información generada en este trabajo resulta novedosa y valiosa para el desarrollo de estrategias de diseño y escalamiento ascendente de biorreactores, principalmente en aquellos sistemas donde la acumulación de dCO<sub>2</sub> que puede ocurrir. Por último, los resultados obtenidos son útiles para

explicar a nivel molecular los mecanismos probables de toxicidad del CO<sub>2</sub> en cultivos de *E. coli* recombinante.

## ABSTRACT

Many recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) are produced at large-scale through high cell density cultures in large fermenters. Carbon dioxide produced from cells metabolism can accumulate at high concentrations, particularly under elevated hydrostatic pressure and poor ventilation, typical of industrial scale fermenters. In the first part of this work, the behavior of *E. coli* culture expressing recombinant green fluorescent protein (GFP) was studied at elevated constant dissolved carbon dioxide (dCO<sub>2</sub>) concentrations as those that can occur in large-scale bioreactors (20 to 300 mbar). Growth and recombinant protein production were affected by dCO<sub>2</sub> and increasing acetate accumulation was observed at high dCO<sub>2</sub> concentrations. At the highest dCO<sub>2</sub> evaluated (300 mbar), specific growth rate and maximum GFP concentrations decreased by 42% and 40%, respectively. In contrast, at this same condition, acetate accumulated increased by 90% compared with reference culture. At molecular level, dCO<sub>2</sub> induced changes in transcription levels of some genes evaluated. The expression of genes involved in decarboxylation reactions of tricarboxylic acid (TCA) cycle (*icdA*, *sucA* and *sucB*) decreased by 50%, 65% and 41%, respectively. On the contrary, the transcription levels of genes involved in arginine- and glutamate-dependent acid resistance systems (*adiA*, *gadA* and *gadC*) increased up to 2.1-, 2.5- and 3.1-fold at increased dCO<sub>2</sub> concentrations. The expression levels of *poxB* gene (which codes for PoxB that produces acetate from pyruvate), increased when dCO<sub>2</sub> in the culture was increased. The increased acetate accumulation under high dCO<sub>2</sub> observed here, can be explained by an increase in *poxB* expression and a diminished TCA cycle activity, inferred from the transcriptional analysis performed. It is possible that a reduced glyoxylate shunt activity, as inferred from an increased transcription of *fadR* and decreased transcription of *aceA* caused the reduction in acetate consumption observed here. On the other hand, in the present work the presence of dCO<sub>2</sub> gradients, which potentially can occur in large-scale bioreactor, was also simulated. The dCO<sub>2</sub> gradients were simulated in a two-compartment scale down system, maintaining a low dCO<sub>2</sub> concentration in one compartment (B<sub>low dCO<sub>2</sub></sub>) and a high dCO<sub>2</sub> concentration in the second compartment (B<sub>high dCO<sub>2</sub></sub>). In this way, bacterial cells experienced fluctuations of dCO<sub>2</sub> concentration when circulating between both vessels. The dCO<sub>2</sub> gradients were less detrimental for the cultures compared with cultures maintained at constant dCO<sub>2</sub>. The specific growth rate decreased by 11% and maximum acetate concentration increased by 23.5% in the culture performed at the highest dCO<sub>2</sub> gradients generated (33 mbar in low dCO<sub>2</sub> compartment and 213 mbar in high dCO<sub>2</sub> compartment). Furthermore, in comparison with the reference conditions, no significant changes were observed in the transcription levels of genes evaluated under fluctuating dCO<sub>2</sub> conditions (from 33 to 55 mbar and from 33 to 95 mbar) performed at t<sub>c</sub> of 50 s and 170 s, respectively. Modest changes in expression levels were observed for the culture performed at the highest t<sub>c</sub> evaluated (375 s). The results shown in this work are important for developing improved scale-up strategies, where operation conditions can lead to accumulation of dCO<sub>2</sub>. Furthermore, the results obtained are useful for explaining, on the molecular level, probable toxicity mechanisms of CO<sub>2</sub> on recombinant *E. coli* cultures.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1 Introducción

La creciente demanda de productos que satisfagan las necesidades en los sectores de alimentos, servicios de salud, medio ambiente, y energía, representa un reto biotecnológico cada vez más importante. La manipulación genética de los microorganismos hace posible la disponibilidad de una serie de productos (antibióticos, aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas recombinantes de diagnóstico y uso terapéutico), que contribuyen a una mejor calidad de vida del ser humano. Sin embargo, para que estos productos estén a disposición del consumidor, es necesario transferir las tecnologías desarrolladas en los laboratorios a sistemas de escala industrial. No obstante, trasladar un bioproceso de una escala pequeña a una mayor puede implicar cambios, muchas veces no predecibles. Comúnmente existen diferencias en el desempeño de los microorganismos en una escala y otra. La eficiencia y calidad de las transformaciones que los microorganismos realizan en un biorreactor (fermentador) depende fuertemente de las condiciones ambientales locales, y éstas a su vez son determinadas por el mezclado. Normalmente el ambiente que prevalece en un biorreactor de laboratorio es homogéneo mientras que el de un biorreactor de gran escala es heterogéneo. Las deficiencias en el mezclado, propician que el caldo de cultivo contenido en un biorreactor, presente una distribución no homogénea de las principales variables de operación tales como la concentración de oxígeno disuelto, pH, dióxido de carbono disuelto ( $dCO_2$ ) y sustrato (Lara et al., 2006c). De tal manera que, cuando una bacteria transita dentro de un biorreactor, experimentará cambios en las condiciones ambientales las cuales pueden afectar su fisiología. En particular, el  $CO_2$  producido por el metabolismo celular puede acumularse hasta alcanzar niveles que resulten tóxicos para los cultivos, sobre todo en cultivos con alta densidad celular y en biorreactores cuya ventilación es deficiente. El efecto de los diferentes niveles de  $CO_2$  disuelto ( $dCO_2$ ) y las fluctuaciones de este parámetro en el desempeño de los cultivos de *Escherichia coli* productora de la proteína verde fluorescente (GFP) recombinante, es el tema que se abordará en las diferentes secciones de este trabajo.

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 *El biorreactor: punto central de un proceso biotecnológico*

La conversión de un sustrato en un producto de interés a través de un biocatalizador (células completas o sus componentes) se denomina bioproceso. El biorreactor tiene la función de contener el biocatalizador, en este caso los microorganismos, en un ambiente estéril y promover un continuo contacto con el sustrato bajo condiciones controladas de temperatura, pH y agitación. Además, en el biorreactor se provee el suministro de oxígeno y se propicia la salida de gases de desecho como el dióxido de carbono e hidrógeno. Desde el punto de vista comercial, la tarea principal del biorreactor es aumentar los rendimientos y productividad del bioproceso con una alta reproducibilidad (Lidén 2002). Definitivamente, el ambiente extracelular influye fuertemente en el desempeño de los microorganismos en un fermentador. El principal enfoque de las estrategias tradicionales de la bioingeniería para optimizar el desempeño de un bioproceso ha sido la manipulación del ambiente que rodea los microorganismos mediante el aumento de la intensidad del mezclado a través del diseño y operación del bioreactor. Sin embargo, el progreso de estas estrategias no ha cambiado mucho durante los últimos 40 años. Un enfoque distinto para optimizar un bioproceso ha sido investigar la interacción entre las variables físicas relevantes (concentración de sustratos, pH, temperatura, esfuerzo de corte, turbulencia) y la fisiología de los microorganismos (cambios en el transcriptoma, fluxoma y metaboloma celular). De esta manera, aunque aún son escasos los ejemplos, se han modificado por ingeniería genética cepas (optimización del biocatalizador) que contienen en forma robusta con las deficiencias del mezclado u otras limitaciones prevalecientes en los fermentadores de gran escala. Uno de los trabajos pioneros con este enfoque es el reportado por Khosla y Bailey (1988), en el cual clonaron una hemoglobina bacteriana en *E. coli* para mejorar la producción de proteína recombinante, el crecimiento y los rendimientos de los cultivos bajo condiciones microaeróbicas. Otro ejemplo del mejoramiento de cepas es el reportado por Lara et al. (2006b). En dicho trabajo se eliminaron las reacciones catalizadas por los productos de los genes *pflB*, *ldhA* y *poxB*, con el objetivo de reducir o eliminar la

producción de acetato, formato y lactato bajo condiciones oscilantes de oxígeno disuelto. La premisa de los autores fue que bajo condiciones heterogéneas de oxígeno disuelto *E. coli* no requiere necesariamente la activación de las vías de fermentación ácido-mixta. Como resultado obtuvieron una cepa triple mutante menos sensible a las fluctuaciones de oxígeno disuelto, con un menor desperdicio de esqueletos de carbono capaz de producir más biomasa y proteína recombinante. Sin embargo, hay otras heterogeneidades ambientales a las que un microorganismo se enfrenta dentro de un biorreactor, tales como los gradientes del  $dCO_2$ , y pH. No obstante, para lograr diseñar cepas que contiendan mejor ante altas concentraciones de  $dCO_2$ , es necesario primero caracterizar la respuesta celular ante dicho estrés, el cual es un campo aún muy fértil y poco explorado.

### ***1.2.2 La acumulación del $CO_2$ en los biorreactores***

En condiciones aerobias, el coeficiente respiratorio de los microorganismos es cercano a la unidad, cuando utilizan glucosa como fuente de carbono. Por lo tanto, por cada mol de oxígeno consumida, aproximadamente un mol de  $CO_2$  es excretada al medio. Para que la concentración de  $CO_2$  en el medio de cultivo se mantenga dentro de los niveles fisiológicos, éste debe ser continuamente removido del biorreactor. Cuando la velocidad de producción de  $CO_2$  en un cultivo bacteriano con una alta concentración de células metabólicamente activas excede la capacidad de desorción del biorreactor, los niveles de  $CO_2$  pueden aumentar rápidamente y alcanzar niveles tóxicos para el cultivo; particularmente en fermentadores de gran escala cuya capacidad de desorción de  $CO_2$  es limitada (El-Sabbagh et al., 2006). Idealmente, se esperaría que la corriente de aire que se burbujea en un biorreactor tuviera la capacidad de desorber los gases tóxicos como  $CO_2$  e  $H_2$ . Sin embargo, la presión de operación de los fermentadores y la carga hidrostática, aumentan la solubilidad del  $CO_2$  en el fermentador y dificultan su desorción. Hasta el presente, no conocemos ningún estudio que haya medido los perfiles de acumulación del  $dCO_2$  en cultivos de microorganismos en biorreactores de gran escala. Tan solo se conocen algunos reportes para cultivos de células de animales y bacterias, que se han restringido a medir la composición del  $CO_2$  en los gases de salida del biorreactor y con ello han estimado presiones parciales de  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) en el medio de cultivo. Mostafa y



Gu (2003) reportaron que la acumulación de  $\text{CO}_2$  en un cultivo de células CHO en un biorreactor de 1000-L, alcanzó una  $p\text{CO}_2$  de 179 mmHg (239 mbar); valor que superó por mucho los valores fisiológicos (30-50 mmHg o 40-67 mbar). En comparación, Gray et al. (1996) observaron valores de  $p\text{CO}_2$  hasta de 171 mmHg (228 mbar) en un cultivo en perfusión de células CHO en un biorreactor de 500-L. En el caso de bacterias, Knoll et al. (2007) midieron en los gases de salida de un biorreactor de 2 L, el  $\text{CO}_2$  producido por un cultivo tipo lote alimentado de *Escherichia coli*. La máxima  $p\text{CO}_2$  alcanzada fue de 96 mbar a una densidad celular de 41 g/l en peso seco, mientras que para un cultivo desarrollado en un biorreactor presurizado (11 bar), la  $p\text{CO}_2$  máxima alcanzada fue de 800 mbar, cuando la concentración de biomasa alcanzó los 110 g/L, en peso seco. En nuestro laboratorio realizamos un cultivo tipo lote alimentado de *E. coli* BL21 en un fermentador de 5 L en el cual medimos el perfil de acumulación del  $\text{CO}_2$  en el caldo de cultivo mediante un electrodo de  $\text{CO}_2$  disuelto. El  $d\text{CO}_2$  se acumuló en forma continua e incrementó conforme aumentó la concentración celular hasta alcanzar los 110 mbar a los 60 g/L en peso seco de biomasa (Figura 1.1).

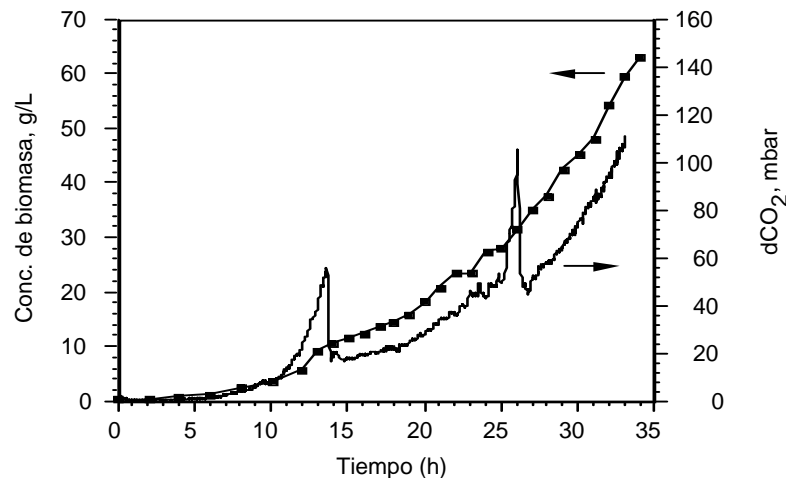


Figura 1.1. Perfil de acumulación de  $d\text{CO}_2$  al incrementar la concentración celular en un cultivo tipo lote alimentado de *E. coli* BL21 llevado a cabo a 30 °C y pH de 6.8, en un fermentador de 5 L con un volumen de trabajo inicial de 1.5 L. La disminución abrupta en la acumulación del  $d\text{CO}_2$  (poco antes de las 14 h) debido al agotamiento de la glucosa indicó el fin de la fase lote e inicio de la fase de alimentación de glucosa. El oxígeno disuelto fue controlado con la velocidad de agitación en 40% respecto a la saturación.

Con esta información y sabiendo que la solubilidad del CO<sub>2</sub> incrementa en forma lineal con la presión (Maalej et al., 2003), se puede estimar que la máxima concentración de dCO<sub>2</sub> en cultivos de gran escala (>100 m<sup>3</sup>) con alta densidad celular, puede alcanzar valores tan altos como 300 mbar, sobre todo en el fondo del tanque. Con base en este razonamiento, se decidió establecer el intervalo experimental de los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante realizados en este estudio, dado que no existen datos en la literatura sobre las concentraciones de dCO<sub>2</sub> prevalecientes en cultivos de gran escala.

### ***1.2.3 Efectos tóxicos del CO<sub>2</sub> en los microorganismos y mecanismos propuestos***

Altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> o altas presiones parciales de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) pueden causar efectos inhibitorios en el crecimiento y metabolismo de la mayoría de los microorganismos de importancia industrial (Jones y Greenfield, 1982; Mori et al., 1983; Dixon y Kell, 1989; McIntyre y McNeil;1997; Seáñez et al., 2001; Castan et al., 2002; El-Sabbagh et al., 2006; Bäumchen et al., 2007). Un diagrama esquemático de las rutas metabólicas y reacciones donde participa el CO<sub>2</sub> es presentado en la figura 1.2. Durante las últimas décadas, la industria de alimentos ha aprovechado las propiedades tóxicas del CO<sub>2</sub> para desarrollar métodos alternativos de pasteurización de alimentos a bajas temperaturas utilizando altas presiones de CO<sub>2</sub> (12 a 150 bar)(Ballestra et al., 1996; Spilimbergo y Bertucco, 2003; Garcia-Gonzalez et al., 2007). Para tales condiciones, se han propuesto algunos mecanismos hipotéticos para explicar los efectos perjudiciales del CO<sub>2</sub> sobre los microorganismos. En breve, el CO<sub>2</sub> disuelto puede difundir a través de la membrana celular e interactuar con la parte fosfolipídica de la membrana. El CO<sub>2</sub> acumulado en la fase lipídica puede modificar la estructura y por lo tanto la funcionalidad de la membrana, causando un fenómeno de anestesia y con ello un aumento en la permeabilidad (Garcia-Gonzalez et al., 2007). Bertoloni et al. (2006) demostraron que células de *E. coli* tratadas con altas presiones de CO<sub>2</sub> (85-150 mbar por 30-70 min) liberan una gran cantidad de moléculas intracelulares incluyendo enzimas. Al incrementar la permeabilidad de la membrana, el CO<sub>2</sub> puede penetrar con mayor facilidad

y acumularse en el citoplasma. Cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en el citoplasma es alta, la capacidad amortiguadora intracelular puede colapsarse y el pH podría disminuir considerablemente como lo reportaron Spilimbergo et al. (2005) quienes midieron el pH intracelular de *Bacillus subtilis* después de someter las células a un tratamiento de 80 bar de CO<sub>2</sub> por 5 min a una temperatura de 30 °C. Para contender con la acidificación del citoplasma, la célula gasta energía activando algunos mecanismos para mantener la homeostasis del pH, entre ellos el de la glutamato y arginina descarboxilasa (los cuales involucran los genes *gadA*, *gadC* y *adiA*, Fig. 1.2). Al cambiar el pH intracelular, la actividad de algunas enzimas clave del metabolismo central puede cambiar. Una alta concentración de CO<sub>2</sub> intracelular podría también causar inhibición por producto sobre las reacciones de descarboxilación (Spilimbergo y Bertucco, 2003; Garcia-Gonzalez et al., 2007). Algunas de ellas son la piruvato deshidrogenasa, isocitrato liasa y 2- $\alpha$ -ceto glutarato deshidrogenasa, cuyos genes son mostrados en la figura 1.2. Sin embargo, los mecanismos anteriores han sido propuestos para presiones de CO<sub>2</sub> muy altas (50 a 150 bar), y la evidencia experimental reportada (disminución del pH, liberación de enzimas intracelulares) es representativa de los efectos irreversibles del CO<sub>2</sub> inducidos por las muy elevadas presiones utilizadas. No obstante poco se conoce acerca de los mecanismos detrimentales del CO<sub>2</sub> bajo concentraciones relativamente bajas, tal como las que ocurren bajo condiciones de cultivo típicas. En ese sentido el presente trabajo es pionero en generar datos experimentales que elucidan los mecanismos perjudiciales del CO<sub>2</sub> a un nivel molecular.

Para el caso de cultivos sumergidos, el nivel inhibitorio del CO<sub>2</sub> depende del microorganismo y las condiciones de cultivo. Por ejemplo, niveles tan bajos como 15% de CO<sub>2</sub> en el gas de entrada al fermentador afectaron el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* (El-Sabbagh et al., 2006). En contraste, la velocidad específica de crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* fue estimulada a pCO<sub>2</sub> tan altas como 300 mbar cuando se empleó lactato como fuente de carbono, pero inhibida cuando se cultivó con glucosa (Bäumchen et al., 2007). Para el caso particular de cultivos de *Escherichia coli*, algunos estudios han reportado los efectos de altos porcentajes de CO<sub>2</sub> en el gas de entrada al fermentador sobre el crecimiento y rendimientos de biomasa sobre sustrato.

Los principales efectos perjudiciales reportados son la inhibición del crecimiento y la acumulación de acetato (Pan et al., 1987; Castan et al., 2002). Asimismo, Castan et al. (2002) observaron un ligero incremento en el rendimiento de biomasa al incrementar el porcentaje de CO<sub>2</sub> en el gas de entrada, aún cuando una mayor fracción de la fuente de carbono fue excretada en forma de acetato. Tal comportamiento fue atribuido a la fijación del CO<sub>2</sub> mediante las rutas anapleróticas. Sin embargo, los trabajos anteriormente citados se han limitado a evaluar los efectos del CO<sub>2</sub> a un nivel macroscópico (crecimiento y rendimientos) en cepas de *E. coli* no transformadas sin considerar el estrés fisiológico adicional impuesto a las células por la síntesis de una proteína heteróloga (Palomares et al., 2004; Hewitt et al., 2007). No obstante, los efectos de elevados niveles de CO<sub>2</sub> sobre *E. coli* han sido evaluados únicamente burbujeando en el fermentador aire enriquecido con una composición constante de CO<sub>2</sub>, pero sin medir ni controlar el dCO<sub>2</sub>. Lo anterior es importante ya que existe una relación compleja entre el dCO<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> en la fase gas, la cual no se puede predecir fácilmente debido a que ambas variables pueden cambiar con los parámetros operacionales tales como la velocidad de agitación, la velocidad del flujo del gas, la viscosidad y presión total, entre otros (Dahod 1993; McIntyre y McNeil, 1997; El-Sabbagh et al., 2006). Por lo tanto, para superar las limitaciones de los estudios hasta ahora reportados, en el presente trabajo se determinó por primera vez los efectos del CO<sub>2</sub> en una cepa recombinante de *E. coli*, tanto a un nivel macroscópico (parámetros cinéticos y estequiométricos) como a un nivel molecular (análisis transcripcional). Conjuntamente, se midió en línea y se controló el dCO<sub>2</sub> a un valor constante, aspecto que hasta ahora no se había reportado.

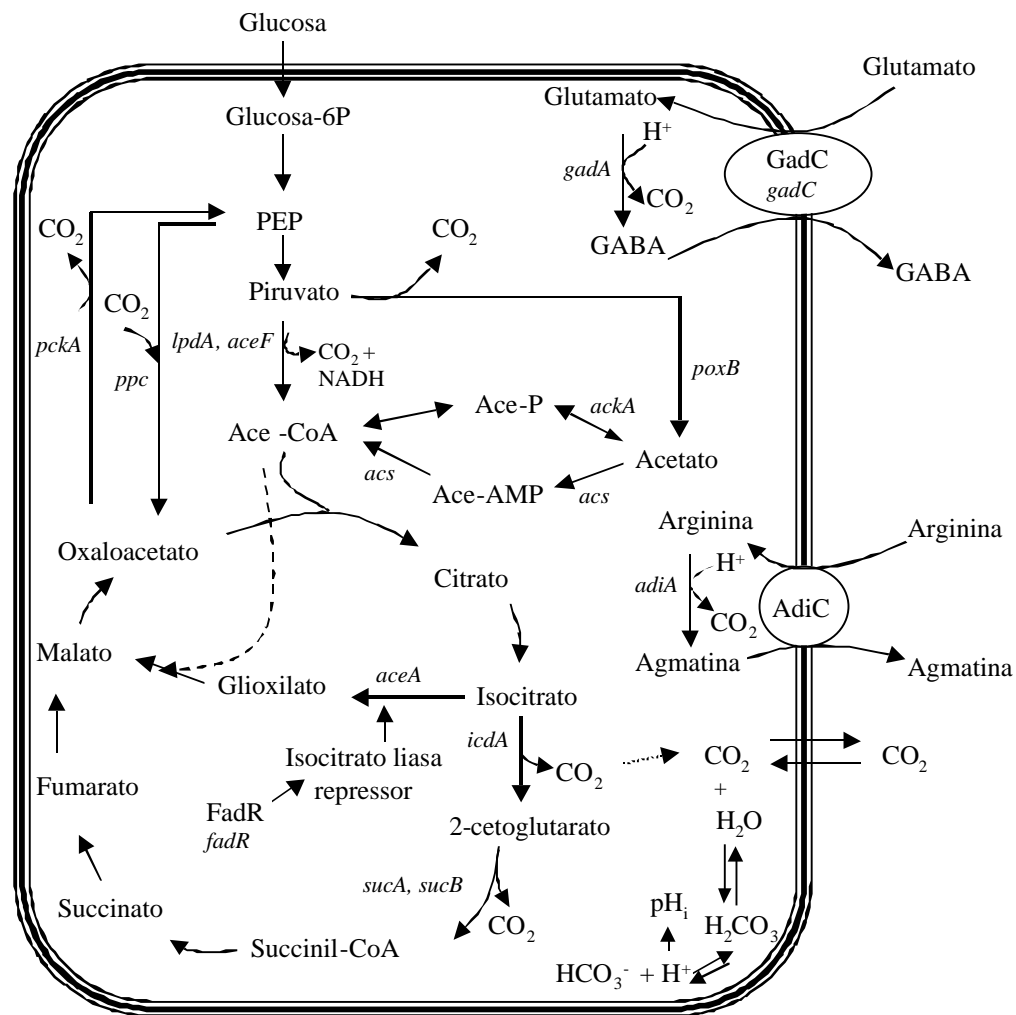


Figura 1.2 Diagrama esquemático de rutas metabólicas y reacciones donde participa el CO<sub>2</sub>. Los genes estudiados en este trabajo son mostrados en itálicas e incluyen aquellos que codifican para la fosfoenol piruvato carboxilasa (*ppc*), fosfoenol piruvato carboxilasa (*pckA*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), isocitrato liasa (*aceA*), las subunidades de los componentes E1(0) y E2(0) de la 2-α-cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA* y *sucB*), el componente E2 y E3 del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (*aceF* y *lpda*), acetato cinasa (*ackA*), piruvato oxidasa (*poxB*), el regulador dual transcripcional del metabolismo de los ácidos grasos (*fadR*), glutamato descarboxilasa (*gadA*), arginina descarboxilasa (*adiA*), acetyl-CoA sintetasa (*acs*). En un óvalo y en un círculo se representan los antitransportadores del glutamato:GABA (ácido gama amino butírico, codificado por *gadC*) y arginina:agmatina (*adiC*), respectivamente.

#### ***1.2.4 Escalamiento ascendente de biorreactores y sus implicaciones***

El escalamiento ascendente puede definirse como el traslado de unidades productivas de laboratorio a unidades de mayor magnitud para la producción industrial, tomando como base las características de la unidad de desarrollo experimental. El predecir las condiciones de operación en la gran escala que aseguren que el desempeño de los cultivos sea similar a los desarrollados a nivel laboratorio o planta piloto, requiere un análisis minucioso de los principales procesos termodinámicos, cinéticos y de transporte, para evitar futuros problemas particularmente asociados con deficiencias en el mezclado. Existe una variedad de métodos para realizar el escalamiento ascendente de biorreactores, tales como los métodos fundamentales, semi-fundamentales, análisis dimensional, análisis de régimen y reglas heurísticas o de dedo, entre otros (Luyben, 1993). Precisamente, son éstos últimos los más comúnmente utilizados en la industria, de los cuales discutiremos a continuación. Cuando se traslada el proceso de operación de un biorreactor de escala laboratorio a otro de escala mayor, es necesario tener un criterio de escalamiento. Estos criterios son parámetros físicos relacionados con las variables de operación del biorreactor y en la tabla 1.1 se muestra como cambian cuando se hace el escalamiento manteniendo constante una sola variable de operación. Generalmente la elección del criterio de escalamiento se hace de manera semi-empírica (Palomares y Ramírez, 2000). Cuando se escala un proceso manteniendo el criterio de escalamiento constante (por ejemplo la velocidad de rotación del impulsor ( $N$ )), solo una variable permanece constante entre las dos escalas mientras que las demás cambian. A excepción de la velocidad de agitación, los otros criterios de escalamiento comúnmente empleados resultan en tiempos de circulación mayores y por lo tanto en mayores tiempos de mezclado. Cuando se utiliza el tiempo de circulación como criterio de escalamiento, el tiempo de mezclado permanece constante, sin embargo el suministro de potencia por unidad de volumen incrementa 25 veces, lo cual es prácticamente imposible de lograr en la gran escala.

Tabla 1.1. Interdependencia entre parámetros de operación durante la aplicación del escalamiento ascendente.  $t_m = 4t_c$  donde  $t_m$  es el tiempo de mezclado. Tomado de Lara et al., 2006c

Criterio de Escalamiento	Definición	Biorreactor de laboratorio de 80 L	Biorreactor de producción, 10 000 L			
			Po/V	N	N Di	Re
Potencia	Po	1	125	3125	25	0.2
Potencia volumétrica	Po/V	1	1	25	0.2	0.0016
Velocidad de agitación	N	1	0.34	1	0.2	0.04
Diámetro del impulsor	Di	1	5	5	5	5
Capacidad de bombeo del impulsor	Q	1	42.5	125	25	5
Tiempo de circulación	V/Q, $t_c$	1	2.94	1	5	25
Velocidad en la punta del impulsor	N Di	1	1.7	5	1	0.2
Número de Reynolds	$NDi^2\rho/\mu$	1	8.5	25	5	1

La eficiencia del mezclado puede estimarse mediante el tiempo de mezclado ( $t_m$ ), el cual hace referencia al tiempo requerido para lograr cierto grado de homogeneidad en el medio, generalmente mayor al 90% de la respuesta final después de un cambio escalonado en alguna propiedad (por ejemplo, pH) (Doran, 1998). De la tabla 1.1 se puede concluir que al incrementar el tamaño del biorreactor, inevitablemente el mezclado es menos eficiente y la homogeneidad del medio se deteriora (Vrábel et al., 2000).

Idealmente, se esperaría igualar o incluso mejorar los rendimientos y la calidad del producto generado en la gran escala, respecto al obtenido en el laboratorio. No obstante, ambos requerimientos dependen fundamentalmente del desempeño del cultivo y éste a su vez está estrechamente relacionado con la hidrodinámica imperante en el biorreactor (Mayr et al., 1994). La mayoría de los procesos fermentativos son desarrollados y optimizados en biorreactores de escala laboratorio, cuyo mezclado es altamente eficiente ( $t_m$  menores a los 5 s, Pederson et al., 1994). Las constantes de tiempo del mezclado y transferencia de masa de los biorreactores de laboratorio son suficientemente pequeñas en comparación con los subprocesos celulares (respiración, velocidad de consumo de sustrato, etc), por lo que pueden ser considerados como homogéneos. La homogeneidad

del medio de cultivo implicará que el desempeño de un microorganismo dentro de un biorreactor estará determinado por su propio régimen cinético y no por la disponibilidad de algún nutriente. Por el contrario, en la gran escala el desempeño de los microorganismos está comúnmente determinado por los fenómenos de transporte; particularmente el mezclado y la transferencia de masa. Al aumentar el tamaño del biorreactor las constantes de tiempo de mezclado e incluso las de transferencia de oxígeno u otros sustratos, llegan a ser mayores a las de las reacciones biológicas (velocidad de consumo de oxígeno y otros sustratos), propiciando así la aparición de gradientes espaciales de alguna variable de proceso. Por esta razón, los biorreactores de gran escala son considerados no-homogéneos y sus ( $t_m$ ) se encuentran alrededor de los 20 a los 250 s (Lara et al., 2006c).

El análisis de régimen es una herramienta práctica para predecir la existencia de gradientes en biorreactores. La técnica consiste en la identificación de los pasos limitantes (los más lentos) del proceso mediante la comparación de los tiempos característicos de los mecanismos relevantes. De esta manera, valiéndose del análisis de régimen, Sweere et al. (1987) hicieron una comparación de tiempos característicos de subprocesos celulares y procesos físicos, representada gráficamente en la figura 1.3. Los autores observaron que los tiempos característicos de inducción y control alostérico de enzimas y mecanismos de control del ARNm son del mismo orden de magnitud que el de algunos procesos físicos (e.j. tiempos de mezclado). De lo anterior, los autores pudieron inferir una posible interacción entre el microambiente que rodea a un microorganismo y la transcripción, flujos y metabolismo celular. Así que una distribución no homogénea del oxígeno disuelto, sustrato alimentado,  $dCO_2$  y pH en los cultivos de gran escala pueden afectar la fisiología de los microorganismos y con ello la productividad (Amanullah et al., 2001; Lara et al., 2006c). Existen reportes en la literatura que muestran evidencia experimental de la heterogeneidad ambiental prevaleciente en los biorreactores de gran escala. En algunos de ellos se determinaron gradientes de oxígeno disuelto (Oosterhuis y Kossen, 1984; Enfors et al., 2001), de sustrato limitante en cultivos alimentados (Larsson et al., 1996) y pH (Reuss et al., 1994). Una forma simplificada de evaluar los efectos de estas variaciones ambientales sobre la fisiología de los microorganismos es



mediante la metodología de escalamiento descendente, la cual será abordada en la siguiente sesión.

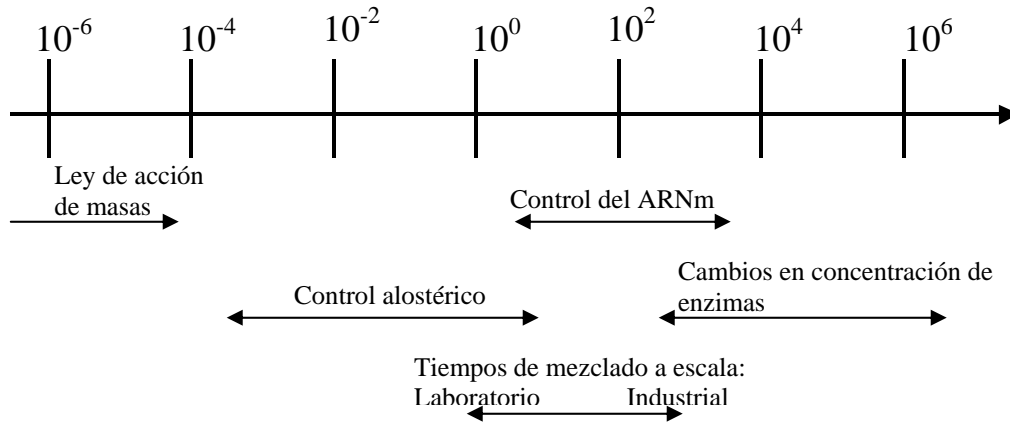


Figura 1.3. Tiempos característicos de subprocesos celulares y físicos (tomado de Sweere et al., 1987)

### ***1.2.5 Escalamiento descendente como una herramienta para estudiar la heterogeneidad ambiental de los biorreactores***

La eficiencia del mezclado en un biorreactor depende de la potencia entregada al líquido por el impulsor y la geometría del sistema. Un mezclado deficiente produce ambientes altamente heterogéneos dentro del biorreactor (Oosterhuis y Kossen, 1984; Humphrey, 1998; Vrabel et al., 2000). En forma muy simplificada, las heterogeneidades ambientales se han estudiado considerando dos principales regiones; una zona bien mezclada en las cercanías al impulsor y otra zona mal mezclada en las lejanías (Oosterhuis et al., 1985). Los elementos de fluido que salen de la zona de descarga de un impulsor recorren distintas trayectorias antes de regresar al punto de partida. Cada trayectoria tiene un tiempo de recorrido o tiempo de circulación ( $t_c$ ), por lo tanto, los elementos de fluido que circulan dentro de un biorreactor no tienen un único tiempo de recorrido si no que presentan una distribución característica de ( $t_c$ ). De tal forma que podemos definir  $t_c$  como el tiempo promedio que tarda una partícula en circular a través de las diferentes regiones de un biorreactor y regresar al punto de inicio. Si asumimos que esta misma

distribución de recorridos es similar para una célula bacteriana, dicha bacteria podría experimentar diferentes condiciones ambientales a lo largo de su recorrido dentro del biorreactor (Oosterhuis, 1984). Las regiones bien y mal mezcladas, y la distribución de trayectorias de circulación prevalecientes en las escalas de producción pueden ser simuladas en forma simultánea mediante un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos. En el caso de un sistema de dos compartimentos, el  $t_c$  promedio puede estimarse dividiendo el volumen total de cultivo entre el flujo con el cual se hace circular el medio de cultivo entre ambos compartimentos. Una correlación sencilla para estimar el  $t_c$  promedio a partir del tiempo de mezclado en un tanque agitado es  $t_c = \frac{t_m}{4}$  (Luyben, 1993). A través de la metodología de escalamiento descendente, inicialmente propuesta por Oosterhuis (1984), se busca determinar las condiciones que las células experimentarán en la gran escala para después simular dichas condiciones en el laboratorio, con la finalidad de diagnosticar posibles problemas (rendimientos bajos, menor crecimiento, etc) en la gran escala (ver sección 1.2.4). Una de las características más importantes del escalamiento descendente es la generación de datos experimentales bajo condiciones que asemejan las reales pero sin la necesidad de hacer ensayos a escala de producción. Brevemente, se describen las cuatro etapas principales sugeridas del método de escalamiento descendente (Figura 1.4) (Oosterhuis y Kosen, 1984; Palomares y Ramírez, 2000).

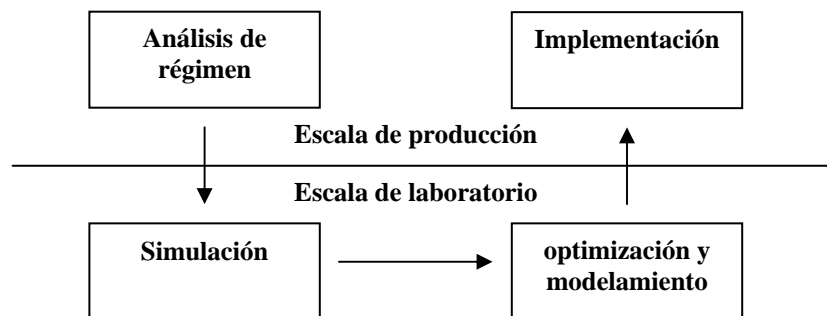


Figura 1.4. Etapas del escalamiento descendente (adaptado de Palomares y Ramírez, 2000).

1. Análisis de régimen del proceso a escala de producción, mediante el cuál se identifican los mecanismos o subprocesos limitantes que deberán ser evaluados en el laboratorio. Para ello se compararan los tiempos característicos de cada uno de los subprocesos que componen el sistema.
2. Simulación, en esta etapa se diseñan los arreglos experimentales de escala laboratorio para simular los mecanismos limitantes identificados mediante el análisis de régimen. Cabe mencionar que no es necesario simular en su totalidad el proceso de la gran escala, pero si se debe mantener constantes en ambas escalas los tiempos característicos de los mecanismo(s) limitante(s) del proceso.
3. Optimización y modelamiento. Después de tener identificados los mecanismos limitantes y establecida la simulación de éstos, se procede a optimizar el bioproceso mediante el ensayo experimental de un amplio intervalo de condiciones. Además, se generan modelos que describan mejor las cinéticas de crecimiento y metabolismo celular bajo las condiciones simuladas, normalmente gradientes ambientales típicos de la gran escala.
4. Implementación. La última etapa de la metodología de escalamiento descendente consiste en extrapolar el conocimiento obtenido en el laboratorio a la escala de producción.

Algunos grupos han recurrido a ésta metodología para estudiar los efectos de gradientes de oxígeno disuelto, glucosa y pH en el desempeño de los cultivos (Bylund et al., 1998; 1999; 2000; Hewitt et al., 2000, 2007; Amanullah et al., 2001; Enfors et al., 2001; Onyeaka et al., 2003; Sandoval-Basurto et al., 2005; Lara et al., 2006a,b). De los pocos estudios con modelos recombinantes podemos mencionar los de nuestro grupo (Sandoval-Basurto et al., 2005; Lara et al., 2006a, Caspeta et al., 2009). Sandoval-Basurto et al (2005) desarrollaron un simulador de gradientes de oxígeno disuelto de dos compartimentos y evaluaron el desempeño de cultivos de *E. coli* recombinante productora de pre-proinsulina ante fluctuaciones de este parámetro a  $t_c$  promedios de 20, 50, 90 y 180 s. Los autores reportaron que periodos de 13 s de exposición cíclica a condiciones anaerobias afectaron en forma negativa la producción y rendimiento de

proteína recombinante. Además observaron un mayor desvío de la fuente de carbono hacia la producción de metabolitos de fermentación ácido-mixta. De igual manera, Lara et al (2006a) simularon gradientes de oxígeno disuelto a un  $t_c$  promedio de 50 s. Los autores observaron una disminución en el crecimiento y producción de proteína recombinante, mientras que los metabolitos de fermentación ácido mixta (acetato, formato y lactato) se acumularon al doble. Además, estudiaron los niveles de expresión de los genes relacionados con el metabolismo aerobio/anaerobio de *E. coli*, y observaron que bajo condiciones oscilantes de oxígeno disuelto, la bacteria induce la expresión de genes de vías fermentativas. Con la información generada, los autores diseñaron cepas con deleciones en los genes que codifican para la piruvato oxidasa, lactato deshidrogenasa y piruvato formato liasa. Como resultado generaron una cepa que contiene mejor con los gradientes de oxígeno disuelto, produciendo una menor cantidad de metabolitos de fermentación y una mayor concentración de proteína heteróloga que su cepa progenitora (Lara et al., 2006b). Con la misma perspectiva de generar información de utilidad para mejorar el diseño de los bioprocesos, Caspeta et al. (2009) estudiaron la respuesta metabólica y transcripcional de *E. coli* productora de pre-proinsulina termo inducida bajo diferentes esquemas de inducción que asemejan las velocidades de calentamiento que ocurren a escala industrial. Con los mecanismos elucidados, los autores fueron capaces de proponer un nuevo esquema de inducción intermitente, con lo que mejoraron la producción de la proteína heteróloga.

Para el caso del  $dCO_2$ , no conocemos un solo reporte en el que se hayan medido la presencia de gradientes de este parámetro. Sin embargo como se describió en la sección **1.2.2**, es posible inferir que en los biorreactores de gran escala, la acumulación del  $CO_2$  ocurrirá sobre todo en el fondo del tanque debido a la carga hidrostática y a la presión de operación utilizada. También es razonable inferir que dicha acumulación del  $dCO_2$  no será homogénea en un biorreactor de gran escala, sino que se presentaran gradientes ambientales de dicho parámetro (ver sección **1.2.4**). Los gradientes de  $dCO_2$ , al igual que los de sustrato u oxígeno disuelto, pueden alterar el estado fisiológico y metabólico de las células, desencadenando una serie de reacciones no deseables que pueden afectar el crecimiento y formación de producto. En el presente trabajo se evaluará el desempeño de

cultivos de *E. coli* productora de la proteína verde fluorescente bajo condiciones oscilantes de  $dCO_2$  con la finalidad de generar información útil para el diseño de bioprocesos. Para ello se simularán mediante el enfoque del escalamiento descendente, gradientes espaciales de  $dCO_2$  que pueden ocurrir en los biorreactores de gran escala.

### ***1.2.6 Criterios utilizados para la selección de los genes estudiados***

Trabajos previos han reportado que elevados niveles de  $CO_2$  inhiben el crecimiento y estimulan la acumulación de acetato en los cultivos de *E. coli* (Castan et al., 2002; Pan et al., 1987). Sin embargo, existe poca evidencia experimental que describa los mecanismos que causan tales efectos y mucho menos cómo elevados niveles del  $CO_2$  afectan la producción de proteína heteróloga en cepas recombinantes. Además de estudiar el impacto de elevadas concentraciones de  $dCO_2$  en el metabolismo y desempeño de cultivos empleando un modelo recombinante, en el presente trabajo se realizó un análisis transcripcional de genes involucrados en las principales vías metabólicas donde participa el  $CO_2$ . La elección de los genes estudiados (Figura 1.2) se realizó considerando los siguientes aspectos: Dado que el  $CO_2$  estimula la acumulación de acetato, se decidió estudiar la expresión de algunos genes involucrados en las vías de producción (*ackA* y *poxB*) y consumo de acetato (*acs* y *aceA* del ciclo del glioxilato, ver figura 1.2). Los genes *adiA*, *gadA* y *gadC* involucrados en los principales mecanismos de resistencia a ácido de *E. coli* fueron incluidos considerando que las altas presiones de  $CO_2$  (12-150 bar) acidifican el citoplasma de los microorganismos (Spilimbergo et al., 2005). Algunos genes que codifican para las enzimas que catalizan las reacciones de descarboxilación en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y glicólisis (*icdA*, *sucA*, *sucB*, *lpdA* y *aceF*) también fueron estudiados ya que en éstas, el  $CO_2$  participa como producto de la reacción. El gen anaplerótico *ppc*, el cual codifica para la fosfoenol piruvato carboxilasa, fue estudiado por que se ha especulado que a elevadas concentraciones de  $CO_2$  *E. coli* podría fijar carbono a través de ésta enzima (Castan et al., 2002). Finalmente, el gen gluconeogénico *pckA* (que codifica para la fosfoenol piruvato carboxicinas) también fue incluido en este estudio por que se ha reportado que en *S. cerevisiae* se sobreexpresa a

elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Aguilera et al., 2005). En la segunda parte de este trabajo se estudiaron los efectos de los gradientes del dCO<sub>2</sub>, además de la transcripción de algunos de los genes antes mencionados, cuya expresión cambió significativamente a condiciones de dCO<sub>2</sub> constantes. Sabemos que se requieren otros tipos de análisis (actividad enzimática, transcripción, flujos metabólicos, proteómica, entre otros) para elucidar mecanismos de inhibición. Sin embargo, la información obtenida con el análisis transcripcional de este trabajo, permitió profundizar y avanzar las fronteras del conocimientos en la comprensión de los efectos tóxicos del CO<sub>2</sub> hasta ahora reportados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

Las fluctuaciones del  $d\text{CO}_2$  en los cultivos afectarán el desempeño de *E. coli* recombinante, cuyas respuestas celulares se reflejarán en la acumulación de metabolitos indeseables, cambios en los rendimientos y producción de proteína recombinante, así como cambios a nivel transcripcional.

### 2.2 Objetivo general

Mediante la metodología de escalamiento descendente, estudiar el impacto de los gradientes de  $d\text{CO}_2$  en la respuesta fisiológica y transcripcional de *E. coli* recombinante productora de la proteína verde fluorescente.

### 2.3 Objetivos específicos.

- Implementar un sistema de control del  $d\text{CO}_2$  y realizar cultivos a valores constantes de  $d\text{CO}_2$  (20, 70, 150 y 300 mbar).
- Evaluar los efectos del  $d\text{CO}_2$  sobre la fisiología y los niveles de expresión de genes clave mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real.
- Caracterizar un simulador de gradientes de  $d\text{CO}_2$  y establecer la amplitud máxima de las oscilaciones posibles.
- Estudiar el efecto de las fluctuaciones  $d\text{CO}_2$  sobre la fisiología del cultivo y la respuesta transcripcional a diferentes tiempos de circulación.
- Proponer estrategias de escalamiento y límites de operación segura de biorreactores con respecto a la presencia potencial de gradientes de  $d\text{CO}_2$ .

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Modelo biológico

En el presente estudio se utilizó la cepa W3110 (ATCC 27325) de *Escherichia coli* K-12 transformada con el plásmido pV21 donado por los Dr. Joel Ozuna IBT-UNAM. El pV21 fue construido a partir del plásmido pBCSK+ de Stratagene (La Jolla, CA), el cual contiene el gen de resistencia a espectinomicina. El plásmido pV21 contiene el gen para la producción de la proteína heteróloga (la proteína verde fluorescente, GFP) insertado entre los sitios de restricción NdeI y XhoI (Figura 3.1). La síntesis de GFP está regulada por el promotor *lac Z*, lo cual permite la inducción exógena, utilizando análogos de la lactosa como el isopropil-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG). El gene *gfp* (SuperGlo GFP, de Qbiogene, Montreal, Canadá) contiene algunas modificaciones para mejorar el uso de codones, así como para incrementar la brillantez, fluorescencia y la solubilidad de la GFP en el citoplasma de *E. coli* (Lara *et al*, 2006a, Baez *et al.*, 2009).

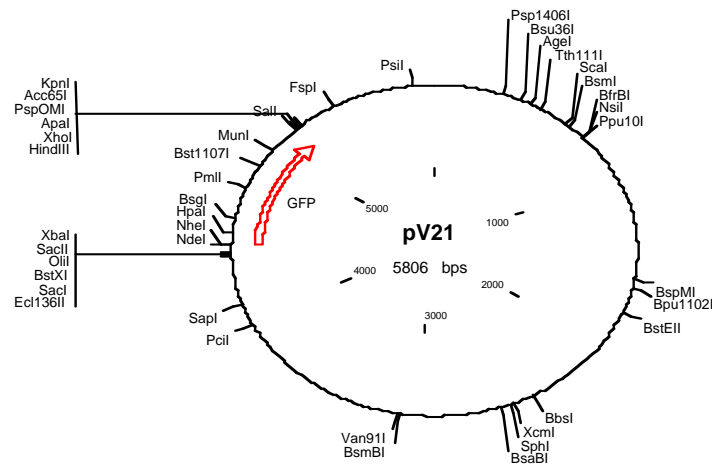


Figura 3.1 Mapa genético del plásmido pV21



### 3.2 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado en los biorreactores (tanto en cultivos a  $dCO_2$  constantes como con gradientes de  $dCO_2$ ) fue la siguiente, en gramos por litro:  $Na_2SO_4$  2.0;  $(NH_4)_2SO_4$  2.7;  $NH_4Cl$  0.5;  $K_2HPO_4$  14.6;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  4.0; citrato de sodio tribásico dihidrato 1.0. Por cada litro de medio se adicionaron los siguientes volúmenes de soluciones concentradas de: glucosa 12.5 mL, tiamina 1 mL,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mL, espectinomicina 1 mL, IPTG 1 mL y metales traza 3 mL. Las soluciones concentradas de tiamina (0.01 g/mL), IPTG (0.5 M) y espectinomicina (0.1 g/mL), se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22  $\mu m$  de diámetro de poro. Las soluciones concentradas de glucosa (0.4 g/mL),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.5 g/mL) y metales traza y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 min. La composición de la solución de elementos traza fue (en gramos por litro):  $CaCl_2 \cdot H_2O$  0.74;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.18;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.1; Na-EDTA 20.1;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  16.7;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.21. Una hora antes de inocular el biorreactor se adicionaron al medio previamente esterilizado las soluciones antes mencionadas. De esta manera, la inducción de la expresión de la proteína heteróloga se realizó desde el inicio de cada cultivo. Una vez adicionadas las soluciones al medio, el pH fue ajustado a 7.0 con NaOH 2M. La composición del medio de cultivo utilizado para los inóculos fue igual a la de los cultivos en biorreactor excepto que carecían del inductor (IPTG).

### 3.3 Banco celular e inóculo

Bacterias electrocompetentes de la cepa W3110 de *Escherichia coli*, amablemente donadas por el laboratorio del Dr. Francisco Bolivar, IBT-UNAM, fueron transformadas mediante electroporación a 2500 volts con el plásmido pV21. Para ello se adicionó en la celda de electroporación 40  $\mu L$  de células competentes y 1  $\mu L$  del plásmido previamente purificado por miniprep (Qiagen), el cual se encontraba resuspendido en buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). Después de ser transformadas, las bacterias se incubaron por 1.5 h a 37 °C en medio LB líquido y se inocularon tres cajas Petri, las cuales contenían medio LB sólido con 300 mg/L de espectinomicina como presión de

selección. Se seleccionaron algunas colonias para hacer estrías en placa (con 300 mg/L), y a partir de la estría seleccionada se propagó a 37 °C en medio LB líquido con 100 mg/L de espectinomicina hasta alcanzar un densidad óptica de 1, leída a 600 nm. Alícuotas de 0.5 ml de dicho cultivo suplementadas con 0.5 ml de una solución de glicerol al 80% fueron almacenadas a -70 °C y utilizadas como banco celular de trabajo. El contenido de un criovial proveniente del banco celular de trabajo fue utilizado para inocular un matraz Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 120 ml de medio definido (ver sección 3.2). Dicho volumen fue equivalente al 10% del volumen total utilizado en cada experimento. El matraz fue incubado a 37 °C y 350 rpm hasta alcanzar aproximadamente 3 unidades de densidades ópticas.

### **3.4 Condiciones de cultivo**

#### ***3.4.1 Cultivos a $dCO_2$ constantes***

Los efectos del  $dCO_2$  a valores constantes se estudiaron en cultivos por lote realizados en un sistema modular de fermentación BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, NJ). En cada condición evaluada (20, 70, 150 y 300 mbar de  $dCO_2$ ) se emplearon dos biorreactores iguales de 1 L, operados en forma simultánea con un volumen de trabajo de 0.6 L. Siempre que se evaluó una condición, un biorreactor fungió como cultivo de referencia (sin inyección externa, ni control de  $dCO_2$ ), mientras que en el otro el  $dCO_2$  fue controlado a un valor predeterminado constante mediante una mezcla de gases (Aire,  $N_2$ ,  $CO_2$ ). Cada condición evaluada se realizó al menos por duplicado, lo que implicó que al menos 4 cultivos se realizaron por cada condición estudiada, dos cultivos de referencia y dos cultivos a un determinado valor de  $dCO_2$ . De esta manera, los niveles de expresión del ARNm en cada condición de  $dCO_2$  evaluada siempre se compararon con su respectivo cultivo de referencia. En todos los casos, el inóculo para ambos biorreactores provino del mismo matraz, con el propósito de eliminar cualquier secuela en los niveles de expresión genética debida a la historia del inóculo. Ambos biorreactores (el de referencia y la condición de  $dCO_2$  evaluada) se controlaron bajo las mismas condiciones (600 rpm, 0.2 vvm, 37 °C, pH de 7.0, y tensión de oxígeno disuelto (TOD) en 20% respecto a la saturación con aire), excepto que en uno de ellos el  $dCO_2$  se mantuvo

constante. La TOD y pH se midieron mediante un electrodo polarográfico (Mettler Toledo, OH) y un electrodo de vidrio combinado (Mettler Toledo, OH), respectivamente. La adquisición de datos se realizó mediante el software de la interfase AFS-Biocommand Bioprocessing (New Brunswick Scientific, NJ). El sistema de medición, adquisición y control de  $d\text{CO}_2$  fue operado en forma independiente del sistema modular BioFlo 110. El  $\text{CO}_2$  disuelto se midió continuamente *in situ* mediante un electrodo de  $d\text{CO}_2$  potenciométrico (B&C Electronic, Milano, Italia) y se controló en forma manual manipulando el flujo del  $\text{CO}_2$  a través de un controlador de flujo másico (Brooks 5850 E series, Brooks Instrument, Hatfield, PA, USA). Los valores de  $d\text{CO}_2$  se desplegaron y adquirieron en línea en una computadora Macintosh II, mediante un programa escrito en Microsoft QuickBasic. El flujo de  $\text{CO}_2$  proveniente del controlador de flujo másico fue unificado con el flujo de la mezcla de aire- $\text{N}_2$  proveniente del mezclador de gases del sistema modular BioFlo 110 justo antes de entrar al biorreactor. Dado que la acción de control del  $d\text{CO}_2$  y TOD se ejecutaron en equipos diferentes, el flujo de la mezcla de gases a la entrada del biorreactor no fue constante a lo largo del cultivo, sin embargo tal acción no impidió el adecuado control de ambos parámetros. Las muestras de ARN para evaluar los niveles de transcripción, se tomaron simultáneamente en ambos biorreactores (cultivo de referencia y la condición de  $d\text{CO}_2$  evaluada) a las 6.2 h de cultivo y fueron procesadas inmediatamente como se describe en la sección 3.5.4. Con dicho tiempo de muestreo aseguramos que al menos 2 tiempos de duplicación (calculado con la  $\mu_{\text{max}}$  de la fig. 4.4B) transcurrieron para todas las condiciones evaluadas, y que los cultivos aún se encontraban en su fase exponencial de crecimiento.

#### ***3.4.2 Cultivos con gradientes de $d\text{CO}_2$ y sistema de escalamiento descendente (SED)***

Se realizaron cultivos por lote en un SED de dos compartimentos para evaluar los efectos de las fluctuaciones de  $d\text{CO}_2$  sobre el desempeño de *Escherichia coli* W3110 productora de GFP. El diseño del SED se basó en el descrito por Sandoval-Basurto et al. (2005), pero con algunas variantes para poder generar gradientes de  $d\text{CO}_2$ . El SED está conformado por dos biorreactores agitados mecánicamente, uno de absorción y uno de desorción de  $\text{CO}_2$ . Cada biorreactor (Virtis, Garnider, NY) es de 1.5 L de capacidad, y se

encuentran interconectados por tubería de silicón flexible a través de la cual se hizo circular el medio de cultivo con dos bombas peristálticas (Masterflex modelo 7592-40) de alto flujo (Figura 3.2). En un tanque se promovió la absorción del  $\text{CO}_2$  mediante el burbujeo de una mezcla de gases ( $\text{CO}_2$ -aire- $\text{N}_2$ ) rica en  $\text{CO}_2$  (20-30%), mientras que en el otro compartimento se promovió la desorción del  $\text{CO}_2$  a través del burbujeo de un alto flujo (1.0 a 3.0 vvm) de una mezcla aire- $\text{N}_2$ . El tanque de absorción simula la zona de alta concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto en biorreactores de gran escala (por ejemplo, zonas estancadas del fondo del tanque), mientras que el tanque de desorción simula la región de baja concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto (superficie del líquido y regiones cercanas a los impulsores). Los volúmenes de operación de cada biorreactor fueron de 0.4 L (compartimento de alto  $d\text{CO}_2$ ) y 0.8 L (compartimento de bajo  $d\text{CO}_2$ ), para los  $t_c$  de 50 y 170 s; mientras que para el  $t_c$  de 375 s, éstos fueron de 1.5 y 1.0 L, respectivamente. Cada tanque fue equipado con cuatro baffles, dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas, un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (Mettler toledo, OH), un electrodo de pH de vidrio combinado (Mettler toledo, OH) y un electrodo de  $d\text{CO}_2$  (B&C Electronic, Milano, Italia). El medio de cultivo circuló entre ambos compartimentos en forma continua a un flujo constante; así el tiempo de circulación promedio ( $t_c$ ) de cada experimento se estableció dividiendo el volumen total de medio entre el flujo de las bombas. La temperatura se controló a  $37^\circ\text{C}$ , TOD a 20% y el pH a 7.0, en ambos tanques del SED. El  $d\text{CO}_2$  se mantuvo en alrededor de 33 mbar en el compartimento de desorción y en 55, 95 y 213 mbar en el compartimento de absorción para los  $t_c$  de 50, 170 y 375 s, respectivamente. La magnitud del gradiente generado (la diferencia en  $d\text{CO}_2$  entre ambos compartimentos) aumentó al incrementar el  $t_c$ . Los parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con gradientes de  $d\text{CO}_2$  se compararon con un cultivo de referencia (con recirculación de medio pero sin hacer gradientes, ni controlando el  $d\text{CO}_2$  en ninguno de los dos tanques).

Antes de cada experimento, el medio de cultivo se recirculó a un determinado flujo por lo menos 30 min antes de inocular para estabilizar las condiciones del SED. El inóculo proveniente de un matraz bafleado se transfirió a uno de los tanques. El tiempo cero del

cultivo se consideró 5 minutos después de haber inoculado para asegurar que las condiciones entre ambos compartimentos fueran homogéneas. Los niveles de expresión genética bajo gradientes de  $d\text{CO}_2$  se compararon con los niveles de expresión obtenidos en los mismos cultivos antes de iniciar los gradientes de  $d\text{CO}_2$ . En resumen, durante las 3 primeras horas de cultivo no se adicionó  $\text{CO}_2$ , por lo que las condiciones en ambos compartimentos del SED fueron iguales y no existió gradiente de  $d\text{CO}_2$ . Bajo estas condiciones y cuando la concentración celular alcanzó 1 densidad óptica, se tomó la primera muestra para la extracción del ARN (entre las 3 - 4 h de cultivo); muestra que sirvió como condición de referencia. Inmediatamente después de tomar la primera muestra para purificar el ARN, se inició la inyección de  $\text{CO}_2$  en el compartimento de absorción para la generación de gradientes de  $\text{CO}_2$  disuelto. Después de dos horas (al menos un tiempo de duplicación, calculado con la  $\mu_{\text{max}}$  de la fig. 4.12B) de exponer el cultivo a las fluctuaciones de  $d\text{CO}_2$  se tomó una segunda muestra, cuyos niveles de expresión se compararon con los de la muestra de las 3 h. Ambas muestras se tomaron en la fase exponencial de crecimiento del cultivo.

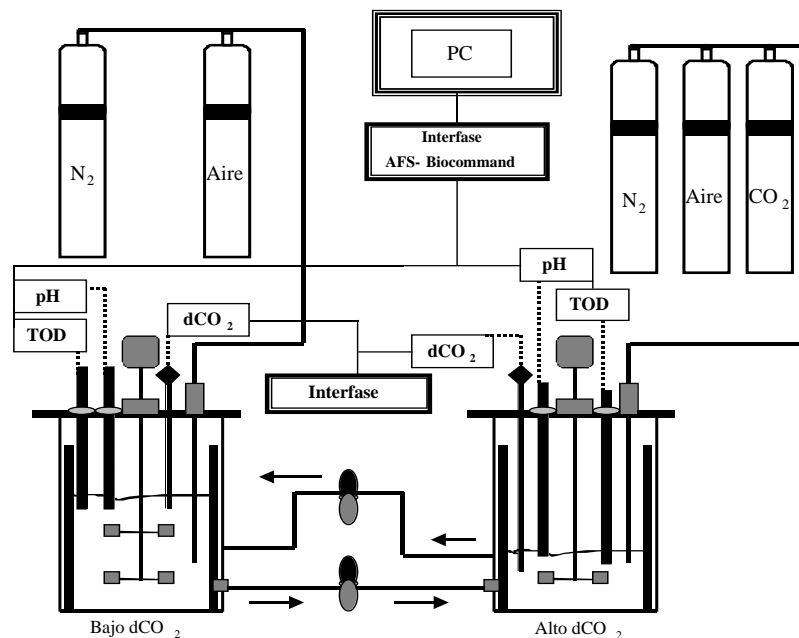


Figura 3.2 Sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos utilizado para simular gradientes de  $\text{CO}_2$  disuelto

### **3.5 Métodos analíticos**

#### ***3.5.1 Determinación de la concentración celular***

El crecimiento fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650) y su conversión a concentración celular en peso seco (g/L) se realizó mediante la construcción de una curva tipo que correlaciona la absorbancia con el peso seco. Para ello, se centrifugaron 6 mL de muestra en tubos para centrifuga de 1.5 mL, previamente puestos a peso seco constante. Una vez centrifugado dicho volumen, la muestra se secó durante toda la noche en un horno mantenido a 80° C. Una correlación lineal entre la densidad óptica y el peso seco fue obtenida cuyo factor de conversión fue de 0.43.

#### ***3.5.2 Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos en muestras de cultivos***

La concentración de glucosa y ácidos orgánicos fue determinada en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Waters) empleando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) mantenida a 50 °C. El sistema fue equipado con dos detectores acoplados en serie, índice de refracción y foto arreglo de diodos. Como fase móvil se utilizó una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min. El tiempo de retención de los metabolitos de interés se determinó mediante la inyección de estándares en muestras puras y en mezclas. Los compuestos utilizados como estándares fueron: etanol de Merck (Darmstadt, Germany), acético y fórmico de J.T. Baker (USA) y pirúvico, cítrico, succínico, láctico y glucosa de Sigma Chemical Co (USA). A partir de los cromatogramas de los estándares se correlacionó el área de integración con la concentración de la muestra inyectada para generar curvas de calibración que nos permitieron calcular la concentración de ácidos orgánicos en las muestras de fermentación. En la figura 3.3, se muestra un cromatograma típico de una mezcla de estándares. Las muestras de fermentación fueron centrifugadas a 14,000 rpm en una minicentrífuga y el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.22 µm de tamaño de poro antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

### 3.5.3 Monitoreo y cuantificación de la proteína recombinante

La producción de GFP en los biorreactores fue monitoreada por lecturas de fluorescencia en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 55 a una longitud de onda de 480 y 507 nm, para la excitación y emisión, respectivamente. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en muestras de caldo de cultivo frescas con células completas y se mantuvieron en el intervalo de 60 a 200 unidades de fluorescencia mediante diluciones con agua desionizada. Dichas longitudes de onda de excitación y emisión se determinaron haciendo un barrido de longitudes de onda en muestras de cultivo (Figura 3.4).

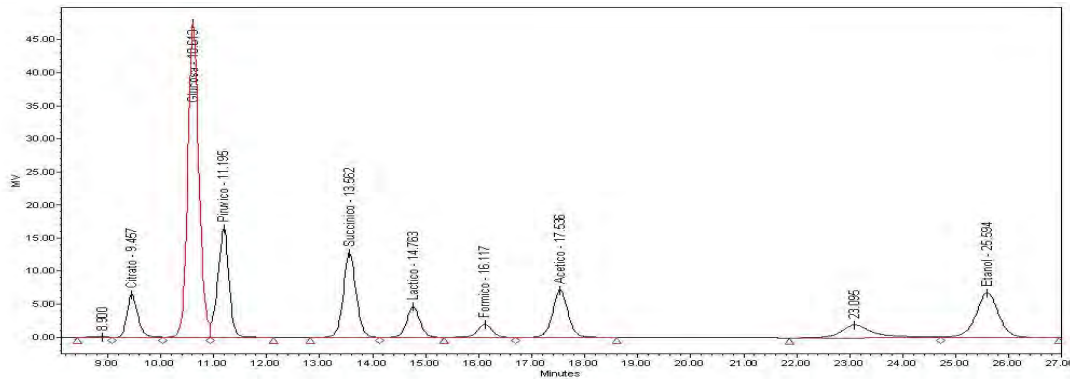


Figura 3.3 Cromatograma típico de estándares de glucosa, ácidos orgánicos y etanol

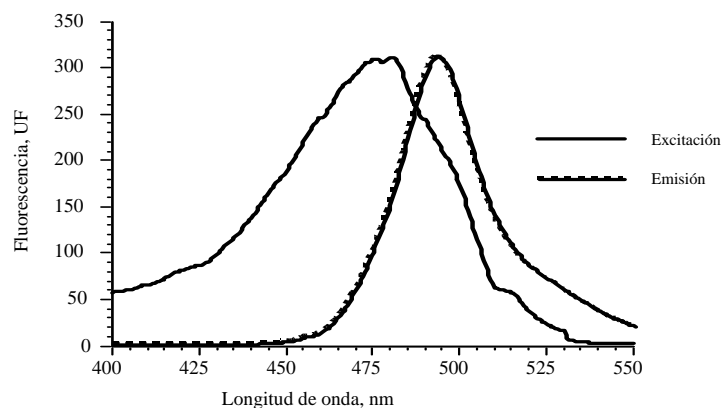


Figura 3.4 Barrido de longitudes de onda de excitación y emisión en una muestra de células completas de *Escherichia coli* expresando GFP

La concentración de GFP contenida en las muestras del caldo de fermentación se determinó mediante el análisis densitométrico en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Las muestras obtenidas durante la fermentación se congelaron y a partir de estas se obtuvieron células lisadas por sonicación. Para ello se colocaron 0.3 mL de caldo de cultivo en tubos para centrifuga de 0.6 mL; cada muestra se sometió a ruptura en un sonicador Vibra Cell (Sonics & Materials Inc) con dos pulso de 9 s a una amplitud de 28%. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min y del sobrenadante se tomaron 30  $\mu$ L de muestra y se mezclaron con 30  $\mu$ L de buffer Laemli 2X. Dicha mezcla fue calentada a 95 °C por 10 min en un Thermo star plus (Eppendorf AG), después de ello se centrifugó por 10 s a 12,000 rpm para precipitar los condensados del tubo. Después del tratamiento, se cargaron 15  $\mu$ L de muestra en cada uno de los pozos del gel y las proteínas de la muestra fueron separadas a 15 mA constantes por gel. En cada gel, se cargaron 0.8, 1.5 y 3.0  $\mu$ L de una solución concentrada y semi-purificada de proteína verde fluorescente de concentración conocida (estándar de cuantificación). Además, se cargaron 2  $\mu$ L de una escalera de pesos moleculares de proteína para identificar la banda correspondiente a la GFP (peso molecular de aproximadamente 27 kDa). Un gel típico con muestras provenientes de distintos tiempos de cultivo se muestra a continuación en la figura 3.5. Para determinar por densitometría la cantidad de proteína recombinante presente en cada banda del gel se utilizó el programa de análisis de imágenes Image J de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA (NIH Image 1.61). Mediante este programa fue posible comparar el área y la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés en cada uno de los carriles en una imagen digitalizada (píxeles).



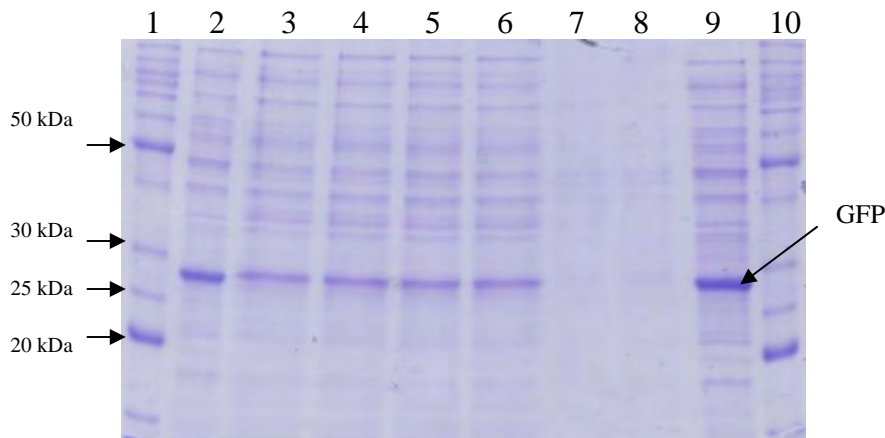


Figura 3.5. Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% con muestras provenientes del sobrenadante de lisados de caldo de fermentación de un cultivo de referencia. Cada carril corresponde a: 1 Marcador, 2 Estándar de cuantificación de GFP (3 $\mu$ L), 3 Muestra de 9.5 h de cultivo, 4 Muestra de 10.5 h de cultivo, 5 Muestra de 11.5 h de cultivo, 6 Muestra de 12.5 h de cultivo, 7 Muestra de 3 h de cultivo, 8 Muestra de 9.5 h de cultivo, 9 Estándar de cuantificación de GFP (6 $\mu$ L), 10 Marcador.

Para cada gel, se construyó una curva interna de calibración correlacionado el producto del (área) por (intensidad) con los microgramos de GFP contenidos en el estándar de cuantificación (Ver apéndice A1). De esta manera fue posible correlacionar los valores de fluorescencia obtenidos de los biorreactores con la concentración de GFP determinada por densitometría. Los valores de intensidad de fluorescencia por debajo de 5500 unidades de fluorescencia (UF) y la concentración de GFP siguieron una relación lineal (ver apéndice A2), la cual fue dependiente de las condiciones de cultivo.

### ***3.5.4 Extracción del ARN total en cultivos y síntesis de ADN complementario***

Muestras de aproximadamente 20 mL de caldo de cultivo con una concentración celular equivalente a 1.5-2 densidades ópticas fueron colectadas en un tubo estéril y libre de nucleasas mantenido en hielo, conteniendo 1 mL del reactivo *RNAlater*<sup>TM</sup> (Ambion, Austin, TX) el cual estabiliza y protege el ARN. La extracción del ARN total se realizó mediante el método de fenol caliente, el diseño de oligonucleotidos específicos y la síntesis de ADN complementario se llevaron a cabo como se describió en Caspeta et al. (2009) y Flores et al. (2005). Antes de los ciclos de extracción con fenol equilibrado en agua, las muestras fueron tratadas con una solución de sacarosa/acetato de sodio (0.3 M/0.1 M) y una solución de acetato de sodio/SDS (0.01 M /2%) para liberar el ARN total de las células y precipitar los lípidos. Después de la extracción, el ARN fue precipitado con acetato de sodio 3M y etanol a temperatura ambiente. Finalmente las muestras de ARN fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, adicionada con 1  $\mu$ L de inhibidor de ribonucleasas (Ambion, USA) para evitar una posterior degradación. El ARN total obtenido fue tratado con DNAsa (Turbo DNA-free<sup>TM</sup>, Ambion, Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN purificado fue confirmada en geles de agarosa al 2% y su concentración fue determinada por la relación de absorbancia 260/280 nm. En la figura 3.6 se muestra un gel típico que permite apreciar la integridad del ARN total purificado.

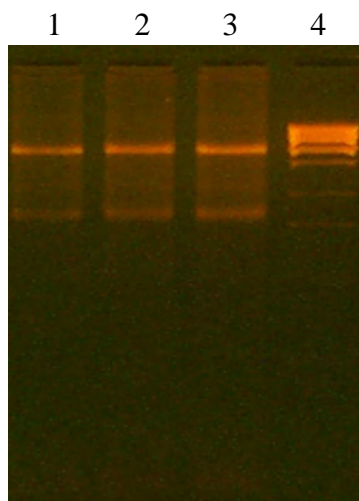


Figura 3.6. Gel de agarosa al 2% con diferentes volúmenes de muestras de ARN total extraídas de un cultivo mantenido a 70 mbar de dCO<sub>2</sub>. Carril 1: 6  $\mu$ L, carril 2: 8  $\mu$ L, carril 3: 10  $\mu$ L, carril 4: marcador de peso molecular.

La síntesis de la primera cadena de ADN complementario a partir de un templado de ARN fue llevada a cabo por una Transcriptasa Reversa con baja actividad de RNasa H (RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Inc.), utilizando los oligómeros b descritos por Flores et al. (2005) excepto los descritos en la tabla 3.1. Las secuencias fueron diseñadas con el programa Primer Express Software (PE Applied Biosystems), el cual optimiza el oligómero para que amplifique específicamente con el gen seleccionado. El tamaño de los productos de amplificación con los oligómeros diseñados fue de 101 pares de bases.

Tabla 3.1 Secuencia oligómeros utilizados en la síntesis de la primera cadena de ADN

complementario (oligos antisentido u oligos b) y en la reacción de PCR semi cuantitativa en tiempo real (oligos sentido [oligos a] y antisentido [oligos b])

<b>Gene</b>	<b>producto del gene</b>	<b>Oligómero sentido (a)</b> <b>Oligómero antisentido (b)</b>
<i>aceA</i>	Monómero de isocitrato liasa	5-ACATGGGCGGCAAAGTTTTA-3 (5-AACCAGCAGGGTTGGAACG-3)
<i>aceF</i>	Componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa	5-GTCGTATCCTGCGCGAAGAC-3 (5-CAGCATGCCAGGGATAACCAC-3)
<i>ackA</i>	Acetato cinasa	5-CTGGTTCTGAACTGCGGTAGTTC-3 (5-GGCAGGTGGAAACATTTCGG-3)
<i>acs</i>	acetil-CoA sintetasa	5-GTGCGTAAAGAGATTGGCCC-3 (5-CGCAGAATACGGCGCATAAT-3)
<i>adiA</i>	arginina descarboxilasa	5-AAATATGCCGCACGCGTATT-3 (5-TTATCGGTCATGCAAGCCTG-3)
<i>fadR</i>	Regulador transcripcional del metabolismo de los ácidos grasos	5-CGCTGGGCTTCTACCACAAA-3 (5-AATCTCGCCACTCTCATGCC-3)
<i>gadA</i>	glutamato descarboxilasa	5-ATCGCGGAGTCAAAACGATT-3 (TTCTGACGAGCGTTGCCAT-3)
<i>gadC</i>	Antiportador glutamato:ácido gama aminobutírico	5-GCAGTTTGGTGGCACGAAAT-3 (5-AAATAGCCGCTAATGCGATCA-3)
<i>gfp</i>	Proteína verde fluorescente	5-CGTGGCCAACCCTAGTCACT-3 (5-GGGCATGGCACTCTTGAAAA-3)
<i>icdA</i>	isocitrato deshidrogenasa	5-GACCGAAGCGGCTGACTTAA-3 (5-GCAGTTTAGCGCCATCCATC-3)
<i>lpdA</i>	Componente E3 del complejo de la piruvato deshidrogenasa	5-GGTGGTGCGATTGTCGGTAC-3 (5-TGGATGGTCAGTGCGATGTC-3)
<i>pckA</i>	Fosfoenol piruvato carboxicinasa	5-ACATGTTTATTCGCCCGAGC-3 (5-CTGTTCTTTCCACTGCGGGT-3)
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa	5-AAAAGCCGATCGCAAGTTTC-3 (5-GGTGAATGGCTTTCTCGCTC-3)
<i>ppc</i>	Fosfoenol piruvato carboxilasa	5-CAGAAATCACCGTCAGCAGC-3 (5-CATAATGCGACGCCAGCTCT-3)
<i>sucA</i>	Componente E1 de la 2- $\alpha$ -ceto glutarato deshidrogenasa	5-GCGGCAAAGAAACCATGAAA-3 (5-TTCGGTGCTGGTAATGTGCA-3)
<i>sucB</i>	Componente E2 de la 2- $\alpha$ -ceto glutarato deshidrogenasa	5-GCAGTACGGTGAAGCGTTTG-3 (5-CTTCCGGGTAACGTTTCAGG-3)

### 3.5.5 Amplificación de ADN por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

El ADN complementario descrito en la sección anterior fue utilizado como templado en la amplificación específica en la reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real, y se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando el kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron descritas por Flores et al. (2005), excepto que el volumen total de la mezcla de reacción fue de 12  $\mu\text{L}$ , la concentración final de oligómeros específicos fue de 0.42  $\mu\text{M}$  y la concentración de ADN complementario (templado) empleada fue de 0.42  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Siempre se incluyó para cada gen un control sin el templado pero con toda la mezcla de reacción (SYBR Green, oligómeros específicos y agua libre de nucleasas). El tratamiento matemático de la RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando el método del doble delta  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) descrito por Livak y Schmittgen (2001). En resumen, se realizaron dos normalizaciones, en la primera la cantidad de ARNm de los genes clave (tabla 3.1) fueron normalizadas respecto a la expresión del gene *ihfB* utilizado como gene de control interno "housekeeping" (Flores et al., 2005). Dado que *ihfB* es un control interno su expresión no cambia con las condiciones de cultivo (ver perfiles de amplificación típicos por PCR en tiempo real, apéndice A3). En la segunda normalización se comparó el nivel de transcripción de los genes de cada muestra obtenida a cada condición problema (e.j. a un elevado  $d\text{CO}_2$ ), relativo a una muestra proveniente de la condición de referencia (cuyo valor de expresión fue asignado como uno).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La descripción y discusión de los resultados de este trabajo fue dividido en dos secciones principales. En la primera se abordó una serie de experimentos a valores de  $d\text{CO}_2$  constante, dirigidos a estudiar los efectos del  $\text{CO}_2$  disuelto desde dos perspectivas: una macroscópica (crecimiento, rendimientos, producción de proteína recombinante y excreción de metabolitos) y la otra a nivel molecular (cambios en la expresión de ARNm de genes clave). La segunda parte describe los experimentos enfocados al estudio de los efectos de los gradientes de  $d\text{CO}_2$  mediante un sistema de escalamiento descendente, y desde la perspectiva macroscópica y molecular al igual que en la sección anterior.

### 4.1 Cultivos a $d\text{CO}_2$ constantes

#### 4.1.1 Respuesta metabólica de *Escherichia coli* recombinante a elevadas concentraciones de $d\text{CO}_2$

Los efectos del  $\text{CO}_2$  disuelto en el desempeño de *E. coli* expresando la proteína verde fluorescente fueron evaluados en cultivos tipo lote, controlando dicho parámetro a un valor constante. Las concentraciones de  $d\text{CO}_2$  evaluadas fueron 20, 70, 150 y 300 mbar; cada condición se comparó con su respectivo cultivo de referencia. En la figura 4.1 se resume el comportamiento típico de uno de los cultivos de referencia. En la figura 4.1A se observa el control de la tensión de oxígeno disuelto a un valor constante del 20 % con respecto a la saturación del aire y la evolución del  $d\text{CO}_2$  producido por el metabolismo de las bacterias. El  $d\text{CO}_2$  se acumuló en forma continua hasta alcanzar un valor máximo de 12 mbar alrededor de las 8 h de cultivo, sin embargo al agotarse la glucosa la acumulación del  $d\text{CO}_2$  disminuyó notoriamente (ver figura 4.1A y C). Mientras no hubo una limitación de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno, oxígeno, etc.) la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  debida al metabolismo celular ( $0.02 \text{ mol CO}_2/\text{L h}$ , calculada para  $2 \text{ gCel/L}$  en peso seco y una  $q_{\text{CO}_2}$  de  $0.01 \text{ mol CO}_2/\text{gCel h}$  correspondiente a una velocidad

de crecimiento de  $0.36 \text{ h}^{-1}$ , Schmidt et al., 1999), excedió la capacidad de desorción del biorreactor ( $0.005 \text{ mol CO}_2/\text{L h}$ , calculada a partir del  $k_{\text{laCO}_2}$  de desorción descrito en la sección 4.2.1.1 pág. 74). Como resultado el  $d\text{CO}_2$  incrementó durante las primera 8 h de cultivo. Al agotarse la glucosa, la respiración celular disminuye drásticamente y entonces la velocidad de desorción del  $\text{CO}_2$  supera la velocidad de producción originando la disminución en el  $d\text{CO}_2$ . En cuanto al pH, éste se mantuvo constante en un valor 7.0 mediante la adición de  $\text{NaOH } 2\text{N}$ , el perfil del control se muestra en la figura 4.1A. El acetato fue acumulado desde el inicio del cultivo hasta alcanzar una concentración máxima de  $1.1 \text{ g/L}$  (8 h de cultivo, figura 4.1C). Después de agotarse la glucosa el acetato fue completamente consumido, aunado a este consumo, un aumento en el pH fue observado (Figura 4.1A). A partir de este momento, una solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4 \text{ 3M}$  fue adicionada por el sistema de control de pH para mantenerlo en un valor de 7.0.

En la figura 4.1B se muestra la cinética de crecimiento y el perfil del de producción de proteína recombinante (GFP); en promedio la biomasa alcanzó una concentración máxima en peso seco de  $2.15 \pm 0.11 \text{ g/L}$ . Ya que el IPTG (a una concentración final de  $0.5 \text{ mM}$ ) fue adicionado al biorreactor antes de inocular, la inducción de la expresión de la proteína recombinante ocurrió desde el inicio del cultivo. La concentración máxima promedio de proteína recombinante en los cultivos de referencia fue de  $0.32 \pm 0.039 \text{ g/L}$ . Para el caso de los cultivos donde el  $d\text{CO}_2$  fue controlado a un valor constante, la figura 4.2A muestra el perfil típico del control de un cultivo mantenido a  $70 \text{ mbar}$  de  $d\text{CO}_2$ , así como el control de pH y la TOD. Aunque las rutinas de control de la TOD y el  $d\text{CO}_2$  se ejecutaron en forma independiente en módulos distintos, el control de ambas variables resultó satisfactorio. En la figura 4.2B se muestra la cinética de crecimiento y el perfil de producción de proteína recombinante.

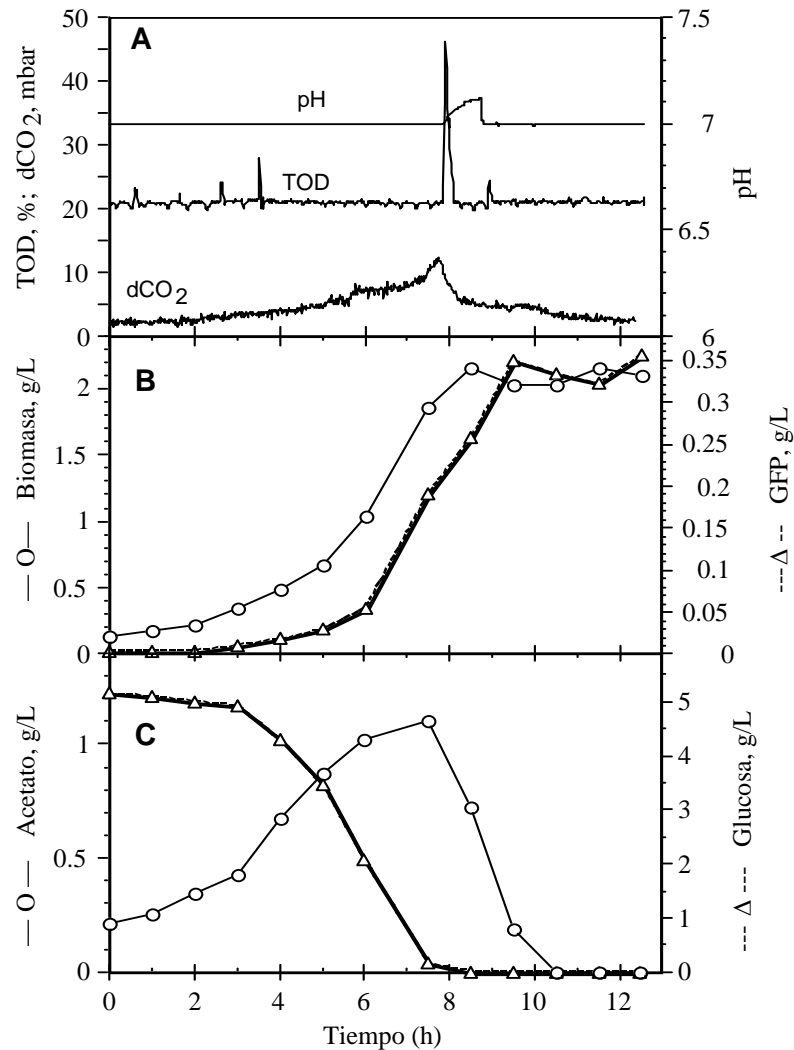


Figura 4.1 Perfil cinético y de control típicos de un cultivo de referencia. (A) Muestra el perfil del control del pH y la TOD, y la evolución del dCO<sub>2</sub>. (B) Cinética de crecimiento y producción de proteína recombinante. (C) Perfil de consumo de glucosa y acumulación de acetato

En este caso, la biomasa alcanzó una concentración máxima promedio en peso seco de  $2.03 \pm 0.16$  g/L, lo cual representa una disminución en un 6% respecto al cultivo de referencia, mientras que la concentración máxima de proteína recombinante fue de  $0.315 \pm 0.036$  g/L, muy similar al cultivo de referencia. La figura 4.2C muestra el perfil



típico de consumo de glucosa y la acumulación de acetato a una elevada concentración de  $dCO_2$  (70 mbar). La glucosa fue consumida en su totalidad alrededor de las 8 h. Al igual que los cultivos de referencia, el acetato primeramente se acumula, para después consumirse al agotarse la glucosa (Figura 4.2C).

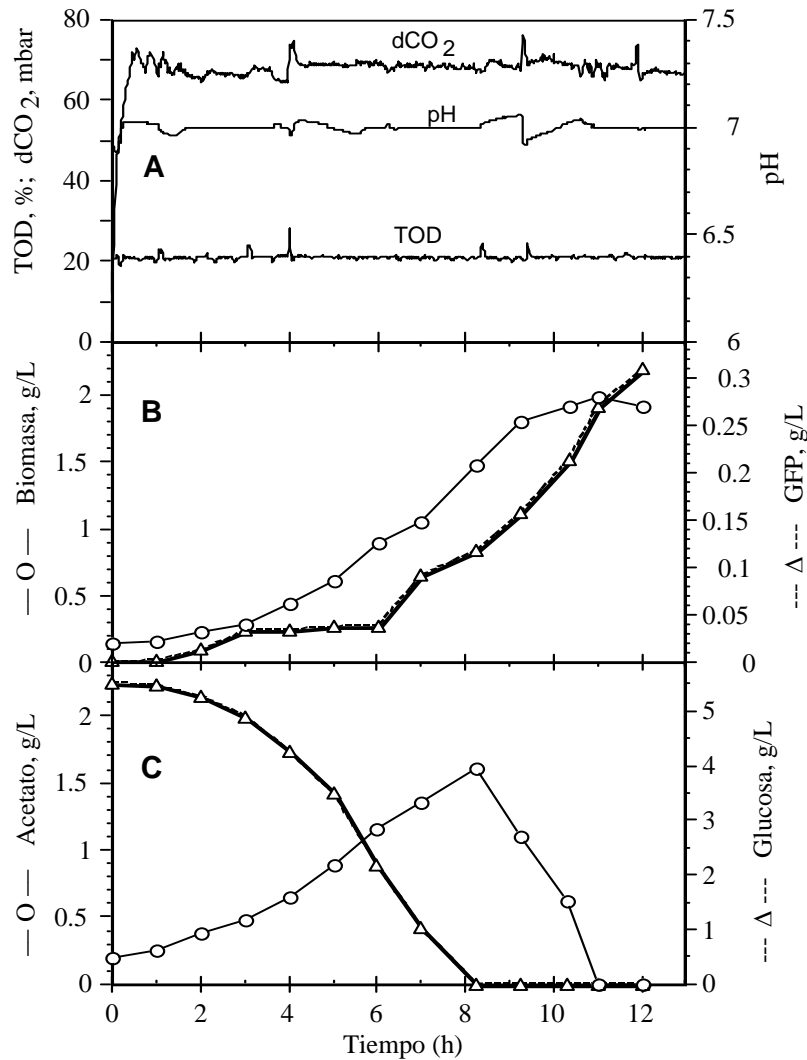


Figura 4.2 Perfil cinético y de control típicos de un cultivo mantenido a 70 mbar de  $dCO_2$ . (A) Perfil del control del pH, TOD y el  $dCO_2$ . (B) Cinética de crecimiento y producción de proteína recombinante. (C) Perfil de consumo de glucosa y acumulación de acetato.

En la figura 4.3 se muestra un resumen de los perfiles cinéticos típicos de crecimiento, producción de proteína recombinante, consumo de glucosa y acumulación de acetato para todas las condiciones evaluadas. Un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento fue observado a medida que se incrementó el  $dCO_2$  (Figura 4.3A). La GFP fue producida desde el inicio del cultivo, ya que el IPTG estuvo presente antes de inocular, y continuó acumulándose incluso una o dos h después de que el crecimiento celular cesó y la concentración celular máxima fue lograda (Figuras 4.2B y 4.3B). La acumulación de GFP presentó un retraso muy notorio al incrementarse el  $dCO_2$  (Figura 4.3B). No obstante, las concentraciones máximas de GFP alcanzadas fueron muy similares en todas las condiciones de cultivo evaluadas, excepto para 300 mbar. Una correlación lineal entre la concentración de GFP y la intensidad de la señal de fluorescencia fue observada en todas las condiciones evaluadas (Apéndice A2), sin embargo, la pendiente de tales correlaciones disminuyó hasta un 50% al aumentar el  $dCO_2$  (de  $8 \times 10^{-5}$  g/L-FU para el cultivo de referencia a  $4 \times 10^{-5}$  para el cultivo mantenido a 300 mbar de  $dCO_2$ ). Cabe mencionar que la fluorescencia emitida por la GFP es dependiente del estado de maduración del cromóforo. La proteína debe estar correctamente plegada para después sufrir una ciclización autocatalítica y una oxidación del tripéptido Ser65-Tyr66-Gly67 (cromóforo) (Huang et al., 2007). En el presente trabajo se observó que para una concentración de GFP dada, los valores de fluorescencia máxima aumentaron al incrementar el  $dCO_2$ , tal comportamiento indicó que el proceso de maduración de la molécula de GFP mejoró al aumentar el  $dCO_2$ .

Los perfiles de consumo de glucosa obtenidos fueron parecidos en todas las condiciones investigadas, aunque el tiempo en el cual se agotó la glucosa incrementó al aumentar el  $dCO_2$  (Figura 4.3C). Se determinó en el sobrenadante la concentración de metabolitos de fermentación ácido mixta (acetato, formato, lactato, succinato y etanol) y piruvato; de los cuales sólo acetato y formato fueron detectados. Tales ácidos orgánicos se produjeron a pesar de que todos los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones de TOD no limitantes (20%). Bajo condiciones aerobias y con un exceso de glucosa en el medio, *E. coli* produce una gran cantidad de acetato debido al sobreflujo metabólico (O'Beirne y Hamer, 2000). En todas las condiciones de cultivo, se observó una concentración inicial

de acetato (aprox. 0.2 g/L) proveniente del inóculo, la cual incrementa hasta antes de agotarse la glucosa (Figura 4.3D y C).

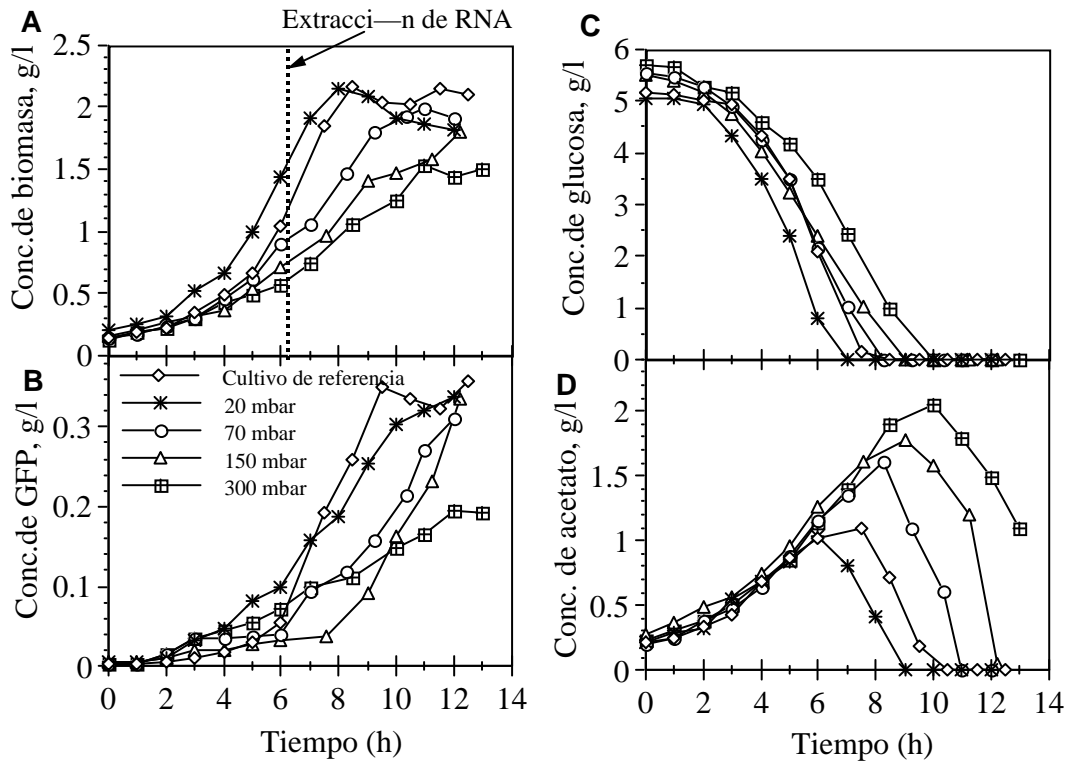


Figura 4.3 Perfiles cinéticos típicos bajo condiciones de  $dCO_2$  constantes (A) Perfil de concentración de biomasa (B) Perfil de concentración de proteína recombinante (C) Perfil de concentración de glucosa. (D) Perfil de concentración de acetato

Para cada experimento realizado se determinaron parámetros cinéticos y estequiométricos relevantes, los cuales se resumen en la figura 4.4. Al aumentar el  $dCO_2$  se observó un importante decremento en la concentración máxima de biomasa y en la velocidad específica de crecimiento (Figuras 4.4A y B).

Comparado con el cultivo de referencia, la concentración máxima de biomasa y la velocidad específica de crecimiento disminuyeron en un 30% y 40%, respectivamente, al aumentar el  $dCO_2$  hasta la máxima concentración evaluada.

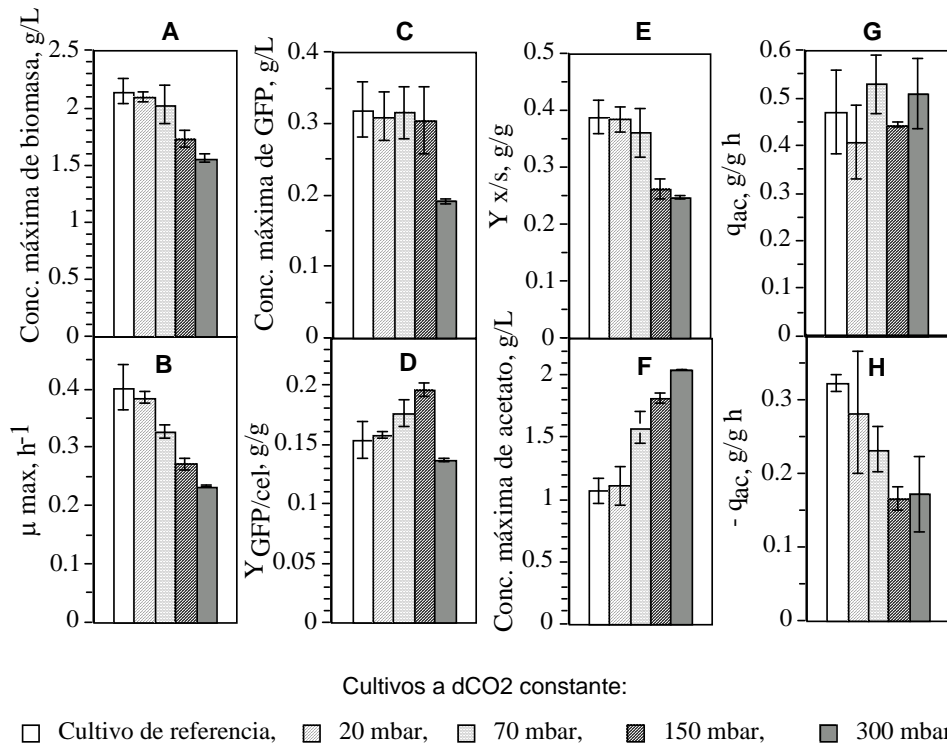


Figura 4.4 Comparación de la concentración máxima de biomasa (A), velocidad específica de crecimiento máxima (B), concentración máxima de GFP (C), rendimiento de GFP por gramo de célula (D), rendimiento máximo de biomasa (E), concentración máxima de acetato (F), velocidad específica de producción de acetato (G) y velocidad específica de consumo de acetato (H) bajo diferentes concentraciones de  $dCO_2$ . Las barras de error ilustran la desviación estándar, a excepción de 150 y 300 mbar que representan la diferencia entre dos cultivos.

En contraste, un efecto adverso sobre la concentración máxima de GFP y el rendimiento sobre la biomasa ( $Y_{GFP/X}$ ) solo se observó para los cultivos mantenidos a 300 mbar de  $dCO_2$  (Figuras 4.4C y D). El  $Y_{GFP/X}$  incrementó un 15% y 28% para los cultivos de 70 y 150 mbar comparado con el cultivo de referencia. Además, el máximo rendimiento de

GFP sobre glucosa ( $Y_{GFP/S}$ ) no cambió por más de  $\pm 10\%$  respecto al cultivo de referencia (0.06 g/g) (datos no mostrados). El máximo rendimiento de biomasa sobre glucosa ( $Y_{X/S}$ ) fue similar para el cultivo de referencia, 20 mbar y 70 mbar, pero disminuyó alrededor de un 35% en cultivos mantenidos a 150 y 300 mbar de  $dCO_2$  (Figura 4.4E). El acetato fue el principal subproducto detectado y un notorio incremento en su acumulación fue observado al aumentar el  $dCO_2$  (Figura 4.4F). En este caso, comparado con 1.1 g/L obtenido en el cultivo de referencia, la concentración máxima de acetato incrementó 1.5, 1.7 y 1.9 veces en los cultivos mantenidos a 70, 150 y 300 mbar de  $dCO_2$ , respectivamente. En concordancia, Castan et al. (2002) observaron que la concentración máxima de acetato acumulado en un cultivo mantenido con un 20% de  $CO_2$  en el gas de entrada, aumentó al doble respecto a un cultivo de referencia (con aire únicamente). Un hecho interesante de este trabajo se presentó en el cultivo mantenido a 70 mbar, aunque el acetato máximo acumulado fue un 50% mayor que en el cultivo de referencia, los rendimientos de biomasa en ambos cultivos fueron muy similares. Otro parámetro cinético determinado fue la velocidad específica de producción de acetato ( $q_{ac}$ ), el cual se calculó durante la fase de consumo de glucosa. Los valores de  $q_{ac}$  resultaron ser muy similares (alrededor de 0.5 g/g h) para todas las condiciones evaluadas (Figura 4.4G). No obstante, después de agotarse la glucosa, el acetato fue consumido a una velocidad específica ( $-q_{ac}$ ) que fue negativamente afectada por el  $dCO_2$ . Comparado con el cultivo de referencia,  $-q_{ac}$  disminuyó hasta un 45% en el cultivo mantenido a 300 mbar (Figura 4.4H). Otro metabolito de fermentación ácido mixta producido fue el formiato, cuyas concentraciones máximas alcanzadas estuvieron por debajo de 0.1 g/L en todas las condiciones evaluadas (datos no mostrados).

El efecto inhibitorio observado aquí (disminución en  $\mu$ ) ocurrió a niveles de  $CO_2$  más bajos (70 mbar) que los reportados en trabajos previos. Por ejemplo,  $pCO_2$  por arriba de los 300 mbar inhibieron el crecimiento de la cepa B 54125 de *E. coli* (Pan et al., 1987) y por arriba de los 100 mbar el de la cepa K-12 W3110 (Castan et al., 2002). Tales resultados sugieren que la sensibilidad al  $dCO_2$  puede variar entre las diferentes cepas de *E. coli*, y que en particular, las cepas derivadas de *E. coli* B parecen ser menos sensibles en comparación con las derivadas de K-12. Tal comportamiento, fue corroborado en este

trabajo cultivando a 150 mbar dos cepas (BL21 derivada de *E. coli* B vs W3110 derivada de K-12) transformadas con el mismo plásmido y bajo la misma condición de cultivo (descrita en la sección de Materiales y Métodos). Comparado con su respectivo cultivo de referencia, la  $\mu_{\max}$  de BL21 disminuyó tan sólo en un 8.5%, mientras que para la cepa W3110, la  $\mu_{\max}$  disminuyó en un 33% (Tabla 4.1). Además la concentración máxima de acetato incrementó respecto al cultivo de referencia 5 y 1.7 veces en las cepas BL21 y W3110, respectivamente.

Tabla 4.1 Efectos del dCO<sub>2</sub> en las cepas BL21 y W3110 de *Escherichia coli*

	Cepa W3110		Cepa BL21	
	Cultivo de referencia	150 mbar de dCO <sub>2</sub>	Cultivo de referencia	150 mbar de dCO <sub>2</sub>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.403	0.271	0.505	0.462
Conc. máxima de acetato (g/L)	1.07	1.81	0.15	0.75

#### 4.1.2 Respuesta transcripcional de genes representativos a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub>

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos responsables de los efectos perjudiciales del CO<sub>2</sub> sobre las células de *E. coli*, bajo condiciones de cultivo típicas, son escasamente comprendidos. Hasta ahora, tales efectos han sido evaluados únicamente sobre variables macroscópicas como la velocidad de crecimiento y rendimientos. Como un esfuerzo para desarrollar conocimiento que contribuya a elucidar las causas de los efectos tóxicos del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento y metabolismo, se realizó un estudio transcripcional de 16 genes representativos en función del dCO<sub>2</sub> mediante la técnica de qRT-PCR. Los niveles de transcripción de los genes estudiados en los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante son mostrados como valores relativos a los niveles de expresión de sus respectivos cultivos de referencia en el mismo tiempo.

#### 4.1.2.1 Gen heterólogo (*gfp*) y genes involucrados en las vías anaplerótica y gluconeogénica

El perfil de acumulación de GFP, la máxima concentración de GFP y el  $Y_{GFP/X}$  fueron afectados por el  $dCO_2$ , sobre todo a la máxima concentración de  $dCO_2$  evaluada (Figura 4.3B, 4.4C y 4.4D). Sin embargo, a nivel transcripcional no se observaron efectos del aumento del  $dCO_2$  entre 20 y 300 mbar sobre el gen heterólogo (*gfp*) (Figura 4.5A). Tales resultados indican que el  $CO_2$  actúa sobre la producción de la proteína heteróloga a nivel post-transcripcional, incluyendo los efectos sobre el proceso de maduración de la GFP discutidos anteriormente. Una importante disminución en la productividad de GFP sin una correspondiente disminución en los niveles de expresión de *gfp* también fueron observados por Lara et al. (2006a) en cultivos de *E. coli* bajo condiciones de TOD fluctuantes. Los autores concluyeron que algún evento post-transcripcional como la disponibilidad de aminoácidos debió haber limitado la producción de proteína recombinante en los cultivos. Como se discutirá más adelante, la posible disminución de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) a elevadas concentraciones de  $dCO_2$  y por lo tanto una limitada disponibilidad de precursores, pueden explicar dicho resultado.

Dos genes involucrados en las vías anaplerótica y gluconeogénica, *ppc*, que codifica para fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa y *pckA*, que codifica para PEP carboxicinas, fueron estudiados ya que existen evidencias para otros microorganismos distintos a *E. coli* en los cuales los niveles de transcripción y los productos de los genes de estas vías incrementan a altos niveles de  $CO_2$ . Por ejemplo, Aguilera et al. (2005) reportaron que la actividad de la PEP carboxicinas (codificada por el gen *pckA*) y el nivel de transcripción de su gen incrementaron considerablemente cuando *S. cerevisiae* fue expuesto a altos niveles de  $CO_2$ . Además, Castan et al. (2002) han sugerido que el incremento en el rendimiento máximo de biomasa de *E. coli*, observado a altas concentraciones de  $CO_2$ , resulta de la participación de las reacciones anapleróticas, las cuales son esenciales para reponer intermediarios en el TCA. En el caso de *E. coli*, la principal reacción anaplerótica durante el crecimiento sobre glucosa es catalizada por la enzima PEP carboxilasa (codificada por

el gen *ppc*) (March et al., 2002; Yang et al., 2003). Con estos antecedentes, la expresión de los genes que codifican para estas dos enzimas fueron estudiados a diferentes concentraciones de  $dCO_2$  y los resultados se muestran en la figura 4.5A. Los niveles de expresión representados por las barras corresponden al promedio de las replicas de los cultivos. No se observaron cambios en la expresión de *ppc* cuando el  $dCO_2$  fue incrementado, mientras que los niveles de expresión de *pckA* incrementaron ligeramente a 1.3, 1.7, y 1.4 veces para los cultivos mantenidos a 20, 70 y 150 mbar de  $dCO_2$ , respectivamente. Es importante hacer notar que cambios por debajo del 30% están dentro del error experimental de la técnica de qRT-PCR empleada (Flores et al., 2005).

#### 4.1.2.2 Genes involucrados en reacciones de descarboxilación

Reportes anteriores han hipotetizado que el dióxido de carbono puede afectar las reacciones de descarboxilación por la inhibición de la expresión de un gen específico o por la inhibición de la actividad de la proteína ya expresada (Jones y Greenfield, 1982; Dixon y Kell, 1989). En el ciclo de TCA hay dos reacciones de descarboxilación catalizadas por isocitrato deshidrogenasa (codificada por *icdA*) y el complejo multienzimático  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (codificada por *lpdA*, *sucA* y *sucB*) (Figura 1.2). Otra reacción de descarboxilación que no forma parte de TCA es la catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (Pdh), la cual incluye los componentes E2 y E3 codificados por los genes *aceF* y *lpdA*, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, los niveles de transcripción de tales genes fueron determinados. Es importante resaltar que aunque el componente E1 de la Pdh posee la actividad descarboxilasa, su transcripción es controlada por el mismo promotor que el componente E2 (Quail et al., 1994). Como se puede observar en la figura 4.5B, los niveles de transcripción de *icdA*, *sucA* y *sucB* disminuyeron en forma significativa al aumentar los niveles de  $dCO_2$ . La expresión de *icdA* disminuyó por arriba del 50% para los cultivos mantenidos a 150 y 300 mbar, mientras que para la expresión de los genes *sucA* y *sucB* un decremento del 65% y 52% fue observado para los cultivos mantenidos a 70, 150 y 300 mbar de  $dCO_2$ . Estos resultados sugieren que la concentración de las enzimas correspondientes puede ser afectada por el  $dCO_2$ . Como consecuencia, altas



concentraciones de  $dCO_2$  pueden resultar en una limitación de intermediarios, desde que se ha reportado que la 2- $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (codificada por *sucA* y *sucB*) es la enzima que determina la velocidad del ciclo de TCA (Li et al., 2006). De acuerdo con lo anterior, la actividad del ciclo de TCA puede ser reducida desde niveles de  $dCO_2$  tan bajos como 70 mbar y es consistente con el ligero aumento en los niveles de expresión de *pckA* observados a altos  $dCO_2$ . Esta observación concuerda con Wittmann et al. (2007) quienes reportaron un aumento en el flujo de carbono de oxaloacetato a PEP y una disminución en la actividad del TCA durante la producción de proteína recombinante comparado con un cultivo no inducido. Los niveles de transcripción de *lpdA* y *aceF* no presentaron cambios significativos, indicando que el efecto del  $CO_2$  ocurrió principalmente a nivel de TCA y no de la Pdh.

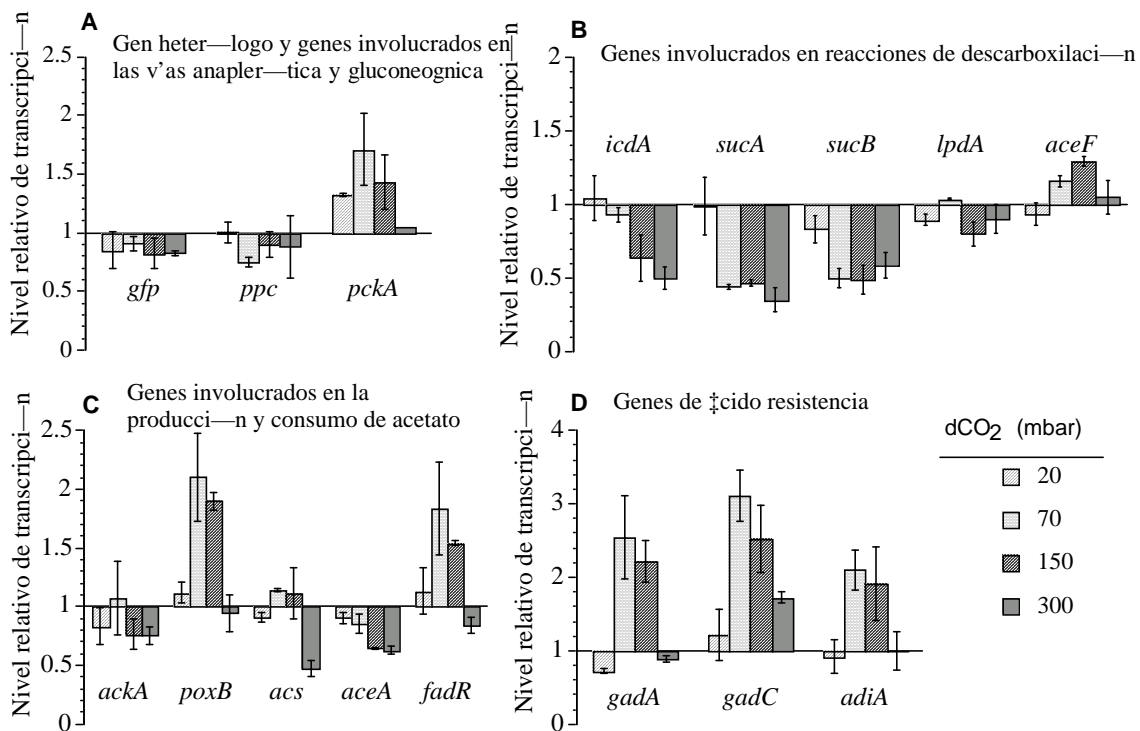


Figura 4.5. Niveles de transcripción de genes representativos de *E. coli* cultivada bajo diferentes concentraciones de  $dCO_2$ , relativos a los cultivos de referencia (cuyo valor de transcripción en el gráfico es 1). Mediante la técnica qRT-PCR es posible cuantificar cuantas veces más o cuantas veces menos se expresa un gen bajo una condición problema respecto a una condición control (Niveles relativos).

#### 4.1.2.3 Genes involucrados en la producción y consumo de acetato

Al igual que en este trabajo, otros autores han reportado que el aumento en los niveles del CO<sub>2</sub> promueven la acumulación de acetato en los cultivos (Pan et al., 1987; Castan et al., 2002). Sin embargo, hasta el momento no existe una explicación de tal fenómeno. Con la intención de generar información que contribuya a elucidar desde una perspectiva molecular las causas de la acumulación de acetato a altas concentraciones de dCO<sub>2</sub>, se analizaron los niveles de transcripción de genes representativos involucrados en las vías de producción y consumo de acetato. Hay dos principales vías de producción de acetato catalizadas por las enzimas fosfotransacetilasa - acetato cinasa (codificadas por los genes *pta-ackA*, respectivamente) y mediante la enzima piruvato oxidasa (codificada por *poxB*) (Figura 1.2). Como se puede apreciar en la figura 4.5C, los niveles de transcripción de *ackA* no cambiaron significativamente al aumentar el dCO<sub>2</sub>. Sin embargo para *poxB* los niveles de expresión incrementaron 2.1 y 1.9 veces para los cultivos mantenidos a 70 mbar y 150 mbar, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, el aumento en la acumulación de acetato a altos dCO<sub>2</sub> observados en este estudio (Figura 4.4F) tiene dos explicaciones. Primero, por el aumento en el nivel de expresión de *poxB*; y segundo, por una disminución en la actividad de TCA, discutido anteriormente, lo cual implicaría una mayor concentración intracelular de acetil-CoA y piruvato. Se debe notar en la figura 1.2, que al incrementar el flujo de carbono vía PEP carboxicinasa (inferido por el aumento de la expresión de *pckA*) y PoxB, se podría reducir aún más la actividad del ciclo de TCA, dado que disminuiría la cantidad de oxaloacetato intracelular disponible para la primera reacción del ciclo. Una disminución en la actividad del ciclo de TCA podría resultar en una limitación de aminoácidos, provocando el aumento en los niveles de la alarmona ppGpp y la consecuente expresión del factor sigma S (RpoS) (Kvint et al., 2000; Artsimovich et al., 2004; Flores et al., 2008). Dado que *poxB* es transcrito por RpoS bajo condiciones de estrés, y parece estar acoplado a la cadena de transporte de electrones, la transformación de piruvato en acetato vía PoxB, puede proveer energía a las células (Chang et al., 1994) mientras reduce la pérdida de carbono, comparado con la oxidación

completa del piruvato a través del ciclo de TCA (Flores et al., 2004; 2008; Moreau, 2004).

En cuanto a las vías de consumo de acetato, *E. coli* tiene la capacidad de transformar el acetato extracelular en acetil-CoA mediante la enzima acetil-CoA sintetasa (codificada por *acs*) y mediante la acción inversa de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa (Phue y Shiloach, 2004; Lin et al., 2006). Dado que la asimilación de acetato fue afectada por el dCO<sub>2</sub> (Figura 4.4H), los niveles de transcripción de *acs* también fueron determinados. Sin embargo, como se muestra en la figura 4.5C, no se observaron cambios en la expresión de *acs* excepto para la condición de 300 mbar de dCO<sub>2</sub>, en donde disminuyó el 53%. A través del ciclo del glioxilato, *E. coli* metaboliza el acetato extracelular para generar energía e intermediarios requeridos para la biosíntesis de otras macromoléculas (Phue y Shiloach, 2004; Phue et al., 2005). El ciclo del glioxilato ha sido propuesto como una vía para metabolizar el acetil-CoA proveniente del acetato en *E. coli* (Phue et al., 2005). La enzima isocitrato liasa (ICL) (codificada por el gen *aceA*) es parte del ciclo del glioxilato y sus niveles de expresión fueron determinados en este estudio ya que el acetato acumulado a elevados niveles de dCO<sub>2</sub> puede ser re-asimilado a través de este ciclo. Como se muestra en la figura 4.5C, los niveles de expresión de *aceA* disminuyeron respecto al cultivo de referencia en 1.5 y 1.6 veces, para los cultivos mantenidos a 150 y 300 mbar de dCO<sub>2</sub>, respectivamente. La proteína reguladora del metabolismo de los ácidos grasos (FadR), codificada por *fadR*, activa la expresión del represor de la isocitrato liasa, el cual inhibe la expresión del operón del ciclo del glioxilato (Phue et al., 2005). En la figura 4.5C, se puede apreciar que los niveles de transcripción de *fadR* incrementaron 1.8 y 1.5 veces para los cultivos mantenidos a 70 y 150 mbar de dCO<sub>2</sub>, respectivamente. Estos resultados indican, como era esperado, que la asimilación de acetato no ocurre cuando *E. coli* se encuentra creciendo en presencia de glucosa, sino hasta que ésta es agotada (Flores et al., 2004, 2005; Phue et al., 2005). Es posible que una disminución en la actividad del ciclo del glioxilato, inferido del aumento en la transcripción de *fadR* y la disminución de la expresión de *aceA* (Figura 4.5C), cause la disminución en el consumo de acetato (Figura 4.4h) a través de acetil-CoA (Phue y Shiloach, 2004).

#### 4.1.2.4 Genes involucrados en los sistema de ácido resistencia (AR)

La acidificación del citoplasma se ha propuesto como el principal mecanismo de inactivación microbiana a altas presiones de CO<sub>2</sub> (12 a 150 bar) (Ballestra et al., 1996; Spillimbergo y Bertucco, 2003; Garcia-Gonzalez et al., 2007). Aunque las concentraciones de CO<sub>2</sub> alcanzadas en un biorreactor de gran escala son mucho menores a los niveles anteriormente citados, es posible que las concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto prevaletientes en sistemas de fermentación industrial generen algún tipo de respuesta a estrés ácido en las células bacterianas. Cuando se alcanza una alta concentración de CO<sub>2</sub> en la película de líquido adyacente a la pared celular de la bacteria, la difusión del CO<sub>2</sub> intracelular hacia el exterior es cada vez más difícil. Altas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el interior de la célula pueden generar una gran cantidad de ácido carbónico y por ende disminuir el pH intracelular. *E. coli* tiene algunos mecanismos para contender con la acidificación intracelular, incluyendo los sistemas de ácido resistencia (AR) dependientes de glutamato y arginina (Figura 1.2) (Slonczewski y Foster, 1996; Castanie-Cornet et al., 1999). Para determinar si las concentraciones de dCO<sub>2</sub> típicas de biorreactores de gran escala inducen alguna respuesta a estrés ácido, los niveles de transcripción de los genes involucrados en los sistemas de AR dependientes de glutamato y arginina fueron analizados y se muestran en la figura 4.5D. Entre los sistemas de AR, el dependiente de glutamato es el más eficiente para contender con el estrés ácido. Este sistema requiere glutamato extracelular e incluye dos isoformas de la glutamato descarboxilasa (GadA y GadB) y el antiportador glutamato: ácido gama aminobutírico (GadC) (Castanie-Cornet et al., 1999; Ma et al., 2003; Richard y Foster, 2004) (Figura 1.2). En forma análoga, el sistema de AR dependiente de arginina requiere arginina extracelular, la arginina descarboxilasa ácido-inducible (AdiA) y el antiportador arginina: agmantina (AdiC). Como se observa en la figura 4.5D, los niveles de expresión de *gadA* incrementaron 2.5 y 2.2 veces para los cultivos mantenidos a 70 mbar y 150 mbar, respectivamente; mientras que a 20 y 300 mbar este gen fue transcrito al mismo nivel que el cultivo de referencia. Además, la expresión de *gadC* incrementó 3.1, 2.5 y 1.7 veces para los cultivos a 70, 150 y 300 mbar de dCO<sub>2</sub>, respectivamente. La sobre expresión de los genes *gadA* y *gadBC* se

induce en ambientes extremadamente ácidos (valores de pH 2.5-3.0) (Castanie-Cornet et al., 1999; Ma et al., 2003), sin embargo, una importante respuesta a estrés ácido fue observado aquí, a pesar de que el pH del medio de cultivo fue mantenido a un valor de 7.0. Para el sistema de ácido resistencia dependiente de arginina, los niveles de expresión de *adiA* también incrementaron al aumentar el dCO<sub>2</sub>, en este caso los incrementos fueron de 2.1 y 1.9 veces para las condiciones de 70 mbar y 150 mbar, respectivamente.

Arnold et al. (2001) observaron un aumento en los niveles de expresión de *gadA*, *gadB* y *gadC*, cuando cultivos de *E. coli* a pH de 7.0 fueron tratados con 8.2 g/L de acetato de sodio. Como se muestra en la figura 4.5D, altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> a pH neutral, también pueden inducir una respuesta a estrés ácido. Tal respuesta no fue causada por cambios en la concentración de acetato, debido a que los niveles de transcripción de *gadA*, *gadC* y *adiA* fueron dos o tres veces más altos en el cultivo a 70 mbar comparado con el de 20 mbar, aun cuando la concentración de acetato fue similar en ambos cultivos (alrededor de 1.0 g/L) al momento de tomar la muestra (6.2 h) para el análisis de qRT-PCR. Además, se ha reportado que los niveles de expresión y la actividad de PoxB incrementan bajo condiciones de pH ácido (Dittrich et al., 2005). De acuerdo con lo anterior, el aumento en los niveles de expresión de *poxB* (Figura 4.5C) observados hasta 150 mbar en este trabajo sugieren que altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> acidifican el citoplasma de *E. coli*. Sin embargo, a pesar de la alta concentración de dCO<sub>2</sub> en la condición de 300 mbar, los niveles de expresión de los genes de ácido resistencia y *poxB* no cambiaron respecto al cultivo de referencia. Al respecto, Ma et al. (2003) mostraron que la inducción de la expresión del sistema *gadA/BC* ocurre durante la fase exponencial y que incrementa entrando en la fase estacionaria del cultivo. En forma similar, la expresión de *poxB* generalmente incrementa durante la fase estacionaria, dado que este gen es regulado por RpoS, el cual es preferencialmente inducido durante la fase estacionaria de crecimiento (Chang et al., 1994). Esto puede explicar por qué los niveles de expresión de los genes de ácido resistencia y *poxB* no incrementaron a la máxima concentración de dCO<sub>2</sub> (300 mbar) evaluada. Es decir, bajo tal condición, la velocidad específica de crecimiento del cultivo disminuyó substancialmente, de tal manera que al momento de tomar la muestra para el análisis de qRT-PCR, las bacterias aún se

encontraban en la fase exponencial temprana de crecimiento. En contraste, para las otras condiciones de  $d\text{CO}_2$  evaluadas, las bacterias se encontraban ya en la fase exponencial media-tardía de crecimiento durante la toma de muestra para la extracción del ARN.

El sistema de AR de la glutamato descarboxilasa de *Escherichia coli* requiere glutamato extracelular, y se ha reportado que cuando se adiciona glutamato en el medio de cultivo en concentraciones del intervalo de 0.7 a 1.6 mM, el desempeño de los cultivos bajo condiciones ácidas mejora (Ma et al., 2003; Richard y Foster, 2004).

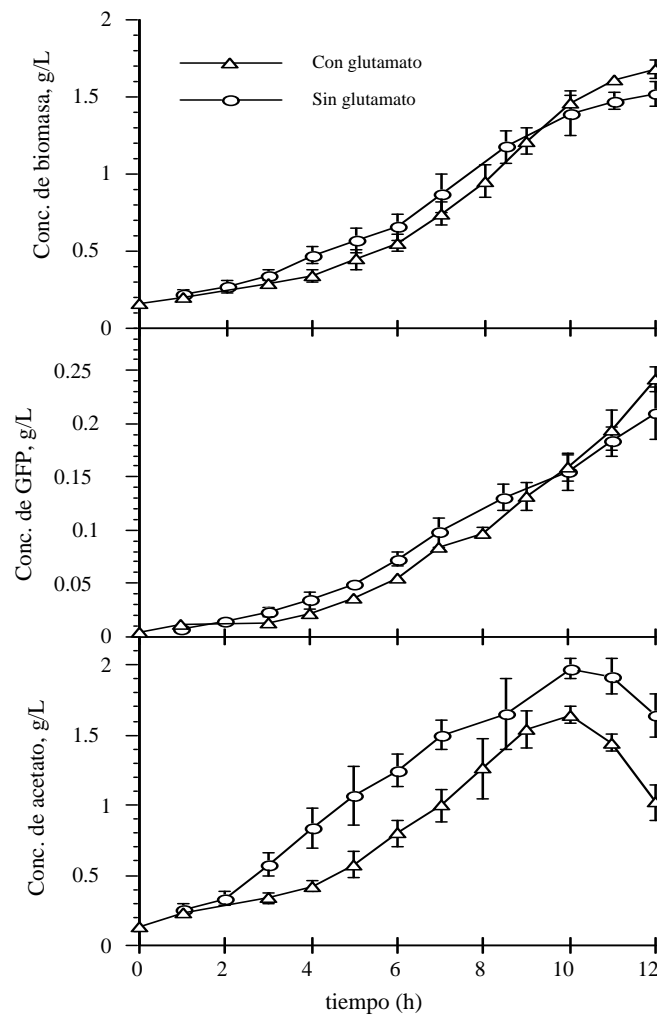


Figura 4.6. Perfiles cinéticos de dos cultivos de *E. coli* expresando GFP a 300 mbar de  $d\text{CO}_2$ . Uno de los cultivos fue suplementado con 3.2 mM de L-glutamato y el otro no. Las barras representan el error de las replicas de los cultivos.

Con base en lo anterior, para evaluar el sistema de AR dependiente de glutamato, se cultivó la cepa recombinante W3110 con 3.2 mM de glutamato a 300 mbar de dCO<sub>2</sub> y se comparó con otro cultivo mantenido a 300 mbar de dCO<sub>2</sub>, pero sin la adición de glutamato (Figura 4.6). La velocidad específica de crecimiento incrementó en un 5%, mientras que la acumulación de acetato se redujo en forma importante (23%) y el rendimiento máximo de biomasa sobre glucosa aumentó en un 21% comparado con el cultivo sin la adición de glutamato (Tabla 4.2). Estos resultados indicaron que el aumento en los niveles de transcripción del sistema de AR dependiente de glutamato (Figura 4.5D) permitieron a *E. coli* a contender con la disminución del pH y confirma que altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> acidifican el citoplasma. Además este resultado indica que la adición de glutamato puede ser una estrategia para revertir, aunque sea parcialmente, los efectos negativos del alto dCO<sub>2</sub>.

Tabla 4.2 Comparación de cultivos de *E. coli* productora de GFP recombinante a 300 mbar de dCO<sub>2</sub> con y sin glutamato. Y<sub>X/S</sub> es el rendimiento máximo de biomasa sobre sustrato.  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento calculada en la fase exponencial.

	Sin glutamato	Con 3.2 mM de glutamato
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.233±0.009	0.245±0.004
Conc. máxima de acetato	2.13±0.088	1.64±0.06
Y <sub>X/S</sub>	0.228±0.022	0.276±0.006

Como se discutió anteriormente e inferido del aumento en los niveles de expresión de los genes que son inducidos en ambientes ácidos (Figura 4.5D), el CO<sub>2</sub> puede acidificar el citoplasma. Esta acidificación, puede causar que *E. coli* gaste una cantidad importante de energía expulsando protones para mantener la homeostasis del pH (Figura 1.2). Parte de esta energía drenada para mantener el pH intracelular constante, podría ser necesitada para la producción de proteínas y otros procesos celulares importantes. Aunado al gasto energético, una limitación de precursores provenientes de TCA para la síntesis de amino ácidos podrían explicar la disminución del crecimiento, concentración de biomasa y proteína recombinante a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub> (Figura 4.3 y 4.4). En concordancia con lo anterior, Dixon y Kell, (1989) reportaron que un elevado gasto de

energía para mantener la homeostasis del pH podría explicar el efecto inhibitorio del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de *K. aerogenes*.

#### 4.1.3 Conclusiones parciales

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta los efectos del dCO<sub>2</sub> sobre el metabolismo y producción de proteína heteróloga en una cepa recombinante de *E. coli*. Una disminución en la concentración de biomasa máxima y crecimiento fue observada al incrementar el dCO<sub>2</sub> a valores por arriba de los 70 y 20 mbar, respectivamente. La concentración máxima de GFP recombinante fue afectada solo a valores por arriba de los 150 mbar, mientras que un retraso en la acumulación de proteína recombinante fue observado a valores tan bajos como 70 mbar de dCO<sub>2</sub>. Además la concentración máxima de acetato en el medio de cultivo incrementó al aumentar el dCO<sub>2</sub>. Se realizó un análisis transcripcional de genes relevantes para explicar desde una perspectiva molecular los efectos negativos del dCO<sub>2</sub> observados. Tal análisis reveló que el CO<sub>2</sub> puede inducir una respuesta a nivel transcripcional. Es bien conocido que los reguladores transcripcionales globales pueden responder a condiciones ambientales tales como anoxia, estado redox y concentración de la fuente de carbono. Sin embargo, este es el primer estudio que describe en *E. coli* cambios en la expresión de genes debido a la exposición a altas concentraciones de dCO<sub>2</sub>. En particular, se observó que la transcripción de genes de estrés ácido incrementó al aumentar el dCO<sub>2</sub>, lo cual indicó que el pH intracelular fue acidificado por el CO<sub>2</sub>. Tanto la acidificación del pH como el dCO<sub>2</sub> por sí mismo podrían ser parámetros responsables de los cambios en la expresión de los genes estudiados. El aumento en el gasto de energía, necesario para mantener la homeostasis del pH, puede ser parcialmente responsable de la disminución en la biomasa máxima y rendimientos de GFP recombinante a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub>. Altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> propiciaron la disminución de la expresión de genes de TCA y el aumento de la expresión de *poxB* con lo cual se explicó el aumento en la acumulación de acetato. La concentración máxima de GFP disminuyó a la más alta concentración de dCO<sub>2</sub> evaluada, a pesar de que los niveles de transcripción de *gfp* fueron similares en todas las condiciones. En combinación con la disminución de la expresión de los genes



de TCA, tales resultados indican que el retraso en la producción de GFP y el decremento en la concentración máxima de GFP, probablemente se debió a una limitada disponibilidad de aminoácidos. El trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido profundizar en la comprensión de respuestas específicas y revelar posibles mecanismos responsables de los efectos negativos observados a altas concentraciones de  $dCO_2$ . Es importante conocer tales mecanismos para poder desarrollar de mejores estrategias de escalamiento ascendente en procesos de producción de proteína recombinante cuyas condiciones de operación puedan propiciar la acumulación de  $dCO_2$ .

## 4.2 Cultivos con gradientes de $dCO_2$

En esta sección se describen los cultivos realizados en un sistema de escalamiento descendente (SED) de dos compartimentos, el cual consiste en dos biorreactores agitados mecánicamente interconectados entre sí, a través de los cuales el medio fue recirculado para generar los gradientes de  $dCO_2$  (Ver detalles en la sección 3.4.2). Se realizaron cultivos con gradientes de  $dCO_2$  a tres diferentes tiempos de circulación promedio ( $t_c$ ) (50, 170 y 375 s) y se compararon con un cultivo de referencia (con base en parámetros cinéticos y estequiométricos). En éste cultivo de referencia, el medio fue recirculado entre ambos tanques pero sin generar gradientes de  $dCO_2$ . La magnitud del gradiente de  $dCO_2$  generado para el  $t_c$  de 50 s fue de 22 mbar (fluctuando el  $dCO_2$  entre 33 y 55 mbar), para el  $t_c$  de 170 s el gradiente fue de 62 mbar (fluctuando el  $dCO_2$  entre 33 y 95 mbar) y para el  $t_c$  de 375 s de 180 mbar (fluctuando el  $dCO_2$  entre 33 y 213 mbar). Bajo tales condiciones, se estudió la respuesta metabólica y transcripcional de *E. coli* expresando la proteína verde fluorescente.

### 4.2.1 Experimentos control

Se realizaron dos tipos de ensayos control para descartar posibles efectos atribuibles a la hidrodinámica del sistema de escalamiento descendente (SED), y de esta manera asegurar que los efectos observados en los cultivos con gradientes de  $dCO_2$  fueron debidos a las fluctuaciones del  $dCO_2$  y no a factores hidrodinámicos. En el primer tipo de ensayos control (experimento A de la tabla 4.3), se compararon las replicas de dos cultivos, uno

con y el otro sin la recirculación del medio de cultivo a un  $t_c$  de 50 s (en cada experimento el  $t_c$  fue establecido dividiendo el volumen total de medio entre el flujo de las bombas), ambos sin la adición externa ni control del  $\text{CO}_2$ . Los dos cultivos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y TOD, de tal manera que la única diferencia entre ambos fue la hidrodinámica generada en los cabezales de las bombas durante la circulación del caldo de cultivo. La acumulación del  $\text{dCO}_2$  generada por el metabolismo celular, fue continuamente medida a través de un electrodo de  $\text{dCO}_2$  inmerso en el caldo de cultivo. Los perfiles de acumulación de  $\text{dCO}_2$  de ambos cultivos resultaron muy similares, lo mismo que el tiempo en el cual se agotó la glucosa inicial, inferido por el aumento del oxígeno disuelto y pH, así como la disminución del  $\text{dCO}_2$  (Figura 4.7).

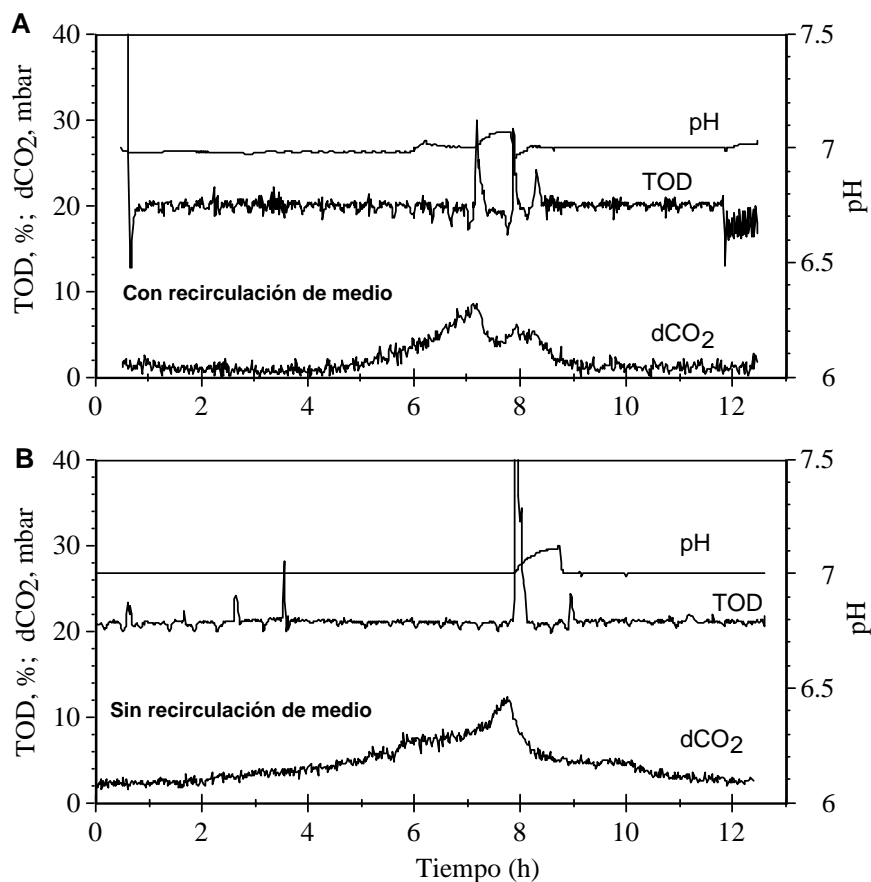


Figura 4.7. Perfiles de control de pH, TOD y evolución del  $dCO_2$  en cultivos sin adición ni control de  $CO_2$ , llevados a cabo con recirculación de medio de cultivo (A) y sin recirculación (B).

En cuanto a los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados para éstos cultivos, no se observaron diferencias como se muestra en la tabla 4.3 (experimento A). La velocidad específica de crecimiento fue ligeramente menor en el cultivo con recirculación de medio, pero dentro del error experimental. Al cultivo recirculado sin adición de  $dCO_2$  y por tanto sin gradiente se le denominará cultivo de referencia en toda la sección 4.2 y es diferente al cultivo de referencia de la sección 4.1. En el segundo tipo de ensayo control (experimentos B) se compararon las replicas de dos cultivos, uno con y el otro sin la recirculación del medio de cultivo, en ambos controlando el  $dCO_2$  a 300 mbar (Figura 4.8).

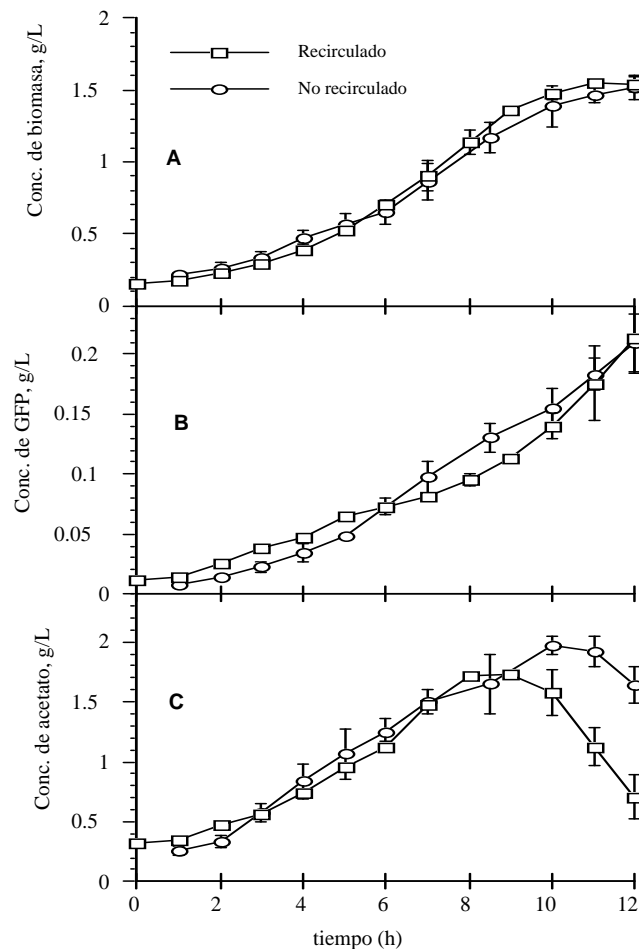


Figura 4.8. Comparación del perfil cinético de los cultivos mantenidos a 300 mbar de  $dCO_2$  con y sin recirculación de medio de cultivo. A) Perfil de concentración de biomasa, B) Perfil de concentración de GFP, C) Perfil de concentración de acetato.

Los perfiles de concentración de biomasa (Figura 4.8A) y GFP (Figura 4.8B) resultaron muy similares en ambos cultivos, alcanzando una concentración de biomasa máxima de 1.5 g/L y de GFP de 0.21 g/L. Sin embargo, la concentración máxima de acetato acumulado fue mayor en el cultivo no recirculado (Figura 4.8C).

Hewitt et al. (1998) demostraron que el estrés hidrodinámico generado dentro de un biorreactor operado altas velocidades de agitación (1200 rpm) y elevadas potencias volumétricas (20-30 kW/m<sup>3</sup>) no afectó la integridad de la membrana de *E. coli* ni el desempeño de los cultivos. Sin embargo, bajo el arreglo experimental del presente trabajo, además de los esfuerzos de corte generados en los cabezales de las bombas las bacterias estuvieron expuestas a altas concentraciones de  $dCO_2$ . Debido a que las altas concentraciones de  $CO_2$  pueden modificar la fluidez y permeabilidad de la membrana de los microorganismos (Garcia-Gonzalez et al., 2007) y por lo tanto la sensibilidad al estrés mecánico, se decidió realizar experimentos control adicionales (Experimentos B). El desempeño del cultivo a 300 mbar de  $dCO_2$  con circulación de medio resultó ligeramente mejor que el cultivo sin circulación de medio, dado que la  $\mu_{max}$  incrementó un 18% y el acetato acumulado fue menor en un 15% (Experimentos B de la tabla 4.3). Estos resultados sugirieron que el estrés mecánico e hidrodinámico producidos en el SED no tuvieron ningún efecto negativo apreciable en el desempeño de los cultivos. El ligero aumento en el crecimiento y la disminución del acetato acumulado en el cultivo mantenido a 300 mbar de  $dCO_2$  con recirculación de medio podría atribuirse a la desorción del  $dCO_2$  que probablemente ocurre durante el trayecto del medio de cultivo por las mangueras de silicón del SED. Al exponer las bacterias a una menor concentración de  $dCO_2$  (durante el paso por las mangueras), resultó en una menor acumulación de acetato en el medio de cultivo (Figura 4.8C y experimento B de la Tabla 4.3) propiciando un ambiente menos tóxico para el crecimiento de las bacterias.

Tabla 4.3. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los experimentos control. A: cultivos sin suministro de CO<sub>2</sub>, B: cultivos a 300 mbar de dCO<sub>2</sub> sin gradiente entre compartimentos.

Cultivo	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g/g)	Acetato max (g/L)	$Y_{GFP/cel}$ (g/g)	$Y_{GFP/S}$ (g/g)	Máxima conc. de GFP (g/L)
No-circulado A	0.40±0.037	0.39±0.03	1.07±0.1	0.15±0.015	0.06±0.006	0.32±0.04
circulado A	0.38±0.011	0.39±0.014	0.86±0.03	0.16±0.004	0.07±0.004	0.35±0.03
No-circulado B	0.23±0.001	0.247±0.003	2.04±0.001	0.14±0.002	0.03±0.001	0.19±0.004
circulado B	0.27±0.01	0.244±0.002	1.73±0.034	0.14±0.018	0.03±0.004	0.20±0.01

#### 4.2.1.1 Fluctuaciones de dCO<sub>2</sub>

Los gradientes de dCO<sub>2</sub> se llevaron a cabo manteniendo una baja concentración de dCO<sub>2</sub> en un compartimento ( $B_{\text{bajo dCO}_2}$ ) mientras se mantuvo una alta concentración en el segundo compartimento ( $B_{\text{alto dCO}_2}$ ). De tal manera que cuando las bacterias circulan entre ambos compartimentos en forma cíclica y continua, experimentan fluctuaciones de dCO<sub>2</sub>. Con esta estrategia se simuló en forma simplificada los gradientes de dCO<sub>2</sub> que podrían experimentar las bacterias a lo largo de su recorrido dentro de un fermentador de gran escala. En el  $B_{\text{bajo dCO}_2}$  se requiere una alta velocidad de desorción de CO<sub>2</sub> para eliminar tan rápido como sea posible el CO<sub>2</sub> disuelto del caldo de cultivo entrante, proveniente del  $B_{\text{alto dCO}_2}$ . En forma opuesta, en el  $B_{\text{alto dCO}_2}$  se requiere una alta velocidad de absorción para incrementar tan rápido como sea posible la concentración de dCO<sub>2</sub> del caldo proveniente del compartimento de bajo dCO<sub>2</sub>. El microambiente experimentado por un célula dentro de un biorreactor está caracterizado por el tiempo de mezclado y por la distribución del tiempo de circulación. Con dichos parámetro es posible obtener

información acerca de la velocidad de mezclado y la segregación del fluido. Los tiempos de mezclado para cultivos microbianos en biorreactores tipo tanque agitado de  $30 \text{ m}^3$  pueden estar en el intervalo de los 125-250 s (Vrábel et al., 2000), mientras que los tiempos de circulación reportados para biorreactores de gran escala operados bajo condiciones típicas de *E. coli* están entre los 3 y 60 s (Amanullah et al., 2004; Lara et al., 2006a,b). Por lo tanto un  $t_c$  de 50 s fue seleccionado para iniciar nuestro estudio de gradientes de  $d\text{CO}_2$  debido a que tal valor de  $t_c$  es suficientemente grande como para manipular los flujos en las bombas de recirculación y aún se encuentra dentro de los valores reportados para biorreactores de gran escala. Desafortunadamente, el gradiente máximo (la máxima diferencia en  $d\text{CO}_2$  entre el  $B_{\text{alto } d\text{CO}_2}$  y el  $B_{\text{bajo } d\text{CO}_2}$ ) generado para el  $t_c$  de 50 s fue de tan solo 22 mbar (Figura 4.9), este gradiente fue muy pequeño como para producir algún cambio en el desempeño de los cultivos (Figura 4.11 y 4.12).

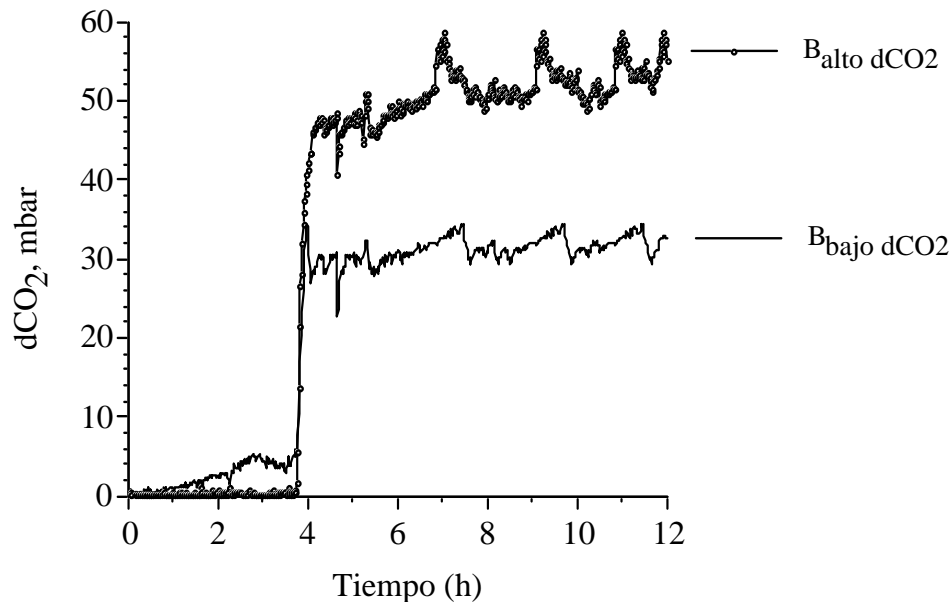


Figura 4.9. Perfil del gradiente de  $d\text{CO}_2$  generado en el SED a un  $t_c$  de 50 s.

Se intentó aumentar la magnitud del gradiente a dicho  $t_c$  (50 s) incrementando la velocidad de aireación de 1 a 3 vvm y manipulando la velocidad de agitación (600 a 1100 rpm) sin éxito, ya que los incrementos en la magnitud del gradiente de  $dCO_2$  resultaron despreciables. Después de esto, se decidió determinar en forma experimental los coeficientes de transferencia de masa volumétricos ( $kl_{aCO_2}$ ) para el proceso de absorción y desorción del  $dCO_2$ , los cuales fueron 16.3 y 17.3  $h^{-1}$ , respectivamente. Estos valores se determinaron en cada compartimento sin recircular el medio de cultivo a una temperatura de 37°C, 600 rpm, burbujeando a 1 vvm con una mezcla aire- $CO_2$  al 25% para el proceso de absorción y con 1 vvm de aire para el proceso de desorción. Los tiempos de respuesta del SED (estimados como el inverso del  $kl_{aCO_2}$ ) para los procesos de absorción y desorción fueron de 221 y 208 s, lo cual nos indicó que en comparación con tiempos de circulación tan pequeños como 50 s, la dinámica del sistema era muy lenta como para lograr incrementar el gradiente de  $dCO_2$ . Dado lo anterior, se decidió aumentar el  $t_c$  para incrementar el gradiente de  $dCO_2$  generado. Así que además del  $t_c$  de 50 s, se evaluaron otros dos  $t_c$  (170 y 375 s). En todos los  $t_c$  evaluados, los cultivos se inocularon mientras se hacía circular el medio de cultivo entre ambos compartimentos del SED mediante bombas peristálticas, pero sin generar gradiente de  $dCO_2$ . Como se muestra en la figura 4.10A, la generación del gradiente de  $dCO_2$  en el cultivo realizado a  $t_c$  de 375 s se inició 3.5 h después de inocular; para ello, se enriqueció con  $CO_2$  la mezcla aire- $N_2$  de entrada al  $B_{alto\ dCO_2}$  y se mantuvo el  $dCO_2$  alrededor de 213 mbar mientras que en el  $B_{bajo\ dCO_2}$  el  $dCO_2$  se desorbió mediante una mezcla aire- $N_2$  y se mantuvo cerca de los 33 mbar (Figura 4.10A). En ambos biorreactores del sistema de escalamiento descendente se controló la TOD y el pH a una valor constante de 20% y 7.0, respectivamente, utilizando las rutinas de control del módulo de fermentación BioFlo 110 (Figura 4.10B). En forma independiente el  $dCO_2$  fue controlado y adquirido en un módulo independiente descrito en la sección 3.4.1. Algo característico de los cultivos con gradientes de  $dCO_2$  fue que al iniciar los gradientes, el pH del compartimento con un alto  $dCO_2$  fue siempre ligeramente menor que en el compartimento con bajo  $dCO_2$  (Figura 4.10B). Sin embargo, la diferencia entre ambos compartimentos no superó 0.1 unidades de pH.

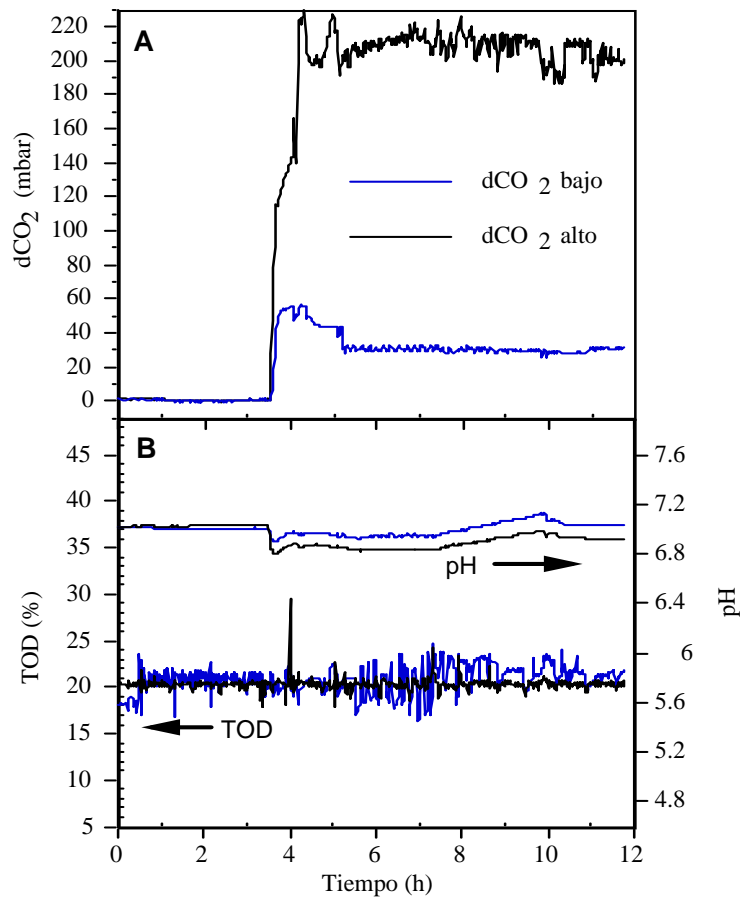


Figura 4.10 Perfiles típicos del control de  $d\text{CO}_2$ , pH y TOD obtenidos en el sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos a un tiempo de circulación de 375 s

Otro parámetro importante que se debe establecer cuando se realizan estudios de escalamiento descendente en sistemas de dos compartimentos es la relación de volumen de trabajo entre ambos compartimentos, la cual representa la relación de volumen de las zonas mal y bien mezclada de los biorreactores de gran escala (Oosterhuis et al., 1985). Por ejemplo, el punto de adición del sustrato y por tanto la región con la más alta



concentración del mismo en los cultivos alimentados de gran escala representa del 5 al 10% del volumen total del biorreactor. Así, los gradientes de sustrato imperantes en cultivos alimentados de gran escala han sido simulados en sistemas de laboratorio acoplando un reactor tipo tanque agitado (STR) y un reactor tipo flujo pistón (PFR), dando pulsos de sustrato en el PFR cuyo volumen oscila entre el 5 y 10% del volumen total de trabajo (Bylund et al., 1998,1999). En comparación, para los gradientes de oxígeno disuelto, la relación de volúmenes de las regiones bien y pobremente aireadas de un biorreactor de gran escala están en el intervalo de 0.25 - 0.5 (Oosterhuis et al., 1985; Amanullah et al., 2001; Sandoval-Basurto et al., 2005). En el caso de gradientes de  $dCO_2$ , esta relación de volúmenes es desconocida; por tanto, en este estudio una relación de volúmenes de 2:1 (volumen bajo  $dCO_2$ :volumen alto  $dCO_2$ ) fue seleccionada como una primera aproximación para simular los volúmenes de las zonas con baja-alta concentración de  $dCO_2$  que pueden existir en los biorreactores de gran escala.

#### **4.2.2 Respuesta metabólica de *E. coli* recombinante ante gradientes de $dCO_2$**

El comportamiento cinético típico del crecimiento, consumo de glucosa, producción de acetato y GFP bajo gradientes  $dCO_2$ , se muestran en la figura 4.7. Por claridad, solo se muestran cultivos únicos ya que las replicas resultaron muy similares. Al incrementar el  $t_c$ , de 50 a 170 a 375 s, aumentó el gradiente de  $dCO_2$  generado en el cultivo de (33 a 55 mbar) a (33 a 95 mbar) a (33 a 213 mbar), respectivamente. Esto implicó que las bacterias cultivadas al más alto  $t_c$  estuvieran expuestas a mayores concentraciones de  $dCO_2$  y por tanto a condiciones más tóxicas. El crecimiento fue inhibido al incrementar el  $t_c$ , mientras que el perfil de acumulación de proteína recombinante presentó un ligero retraso (Figura 4.11A y B). El agotamiento de la glucosa inicial demoró una hora más en el cultivo a  $t_c$  de 50s que en los cultivos a  $t_c$  de 170s y 375 s (Figura 4.11C). Esto fue debido a que en este cultivo en particular, la concentración celular con que se inoculó (0.16 densidades ópticas) fue menor en comparación con el resto de los cultivos mostrados (alrededor de 0.35 densidades ópticas). La acumulación de acetato aumentó al

incrementar el  $t_c$  y después que se agotó la glucosa inicial el acetato fue completamente consumido en todas las condiciones evaluadas (Figura 4.11D).

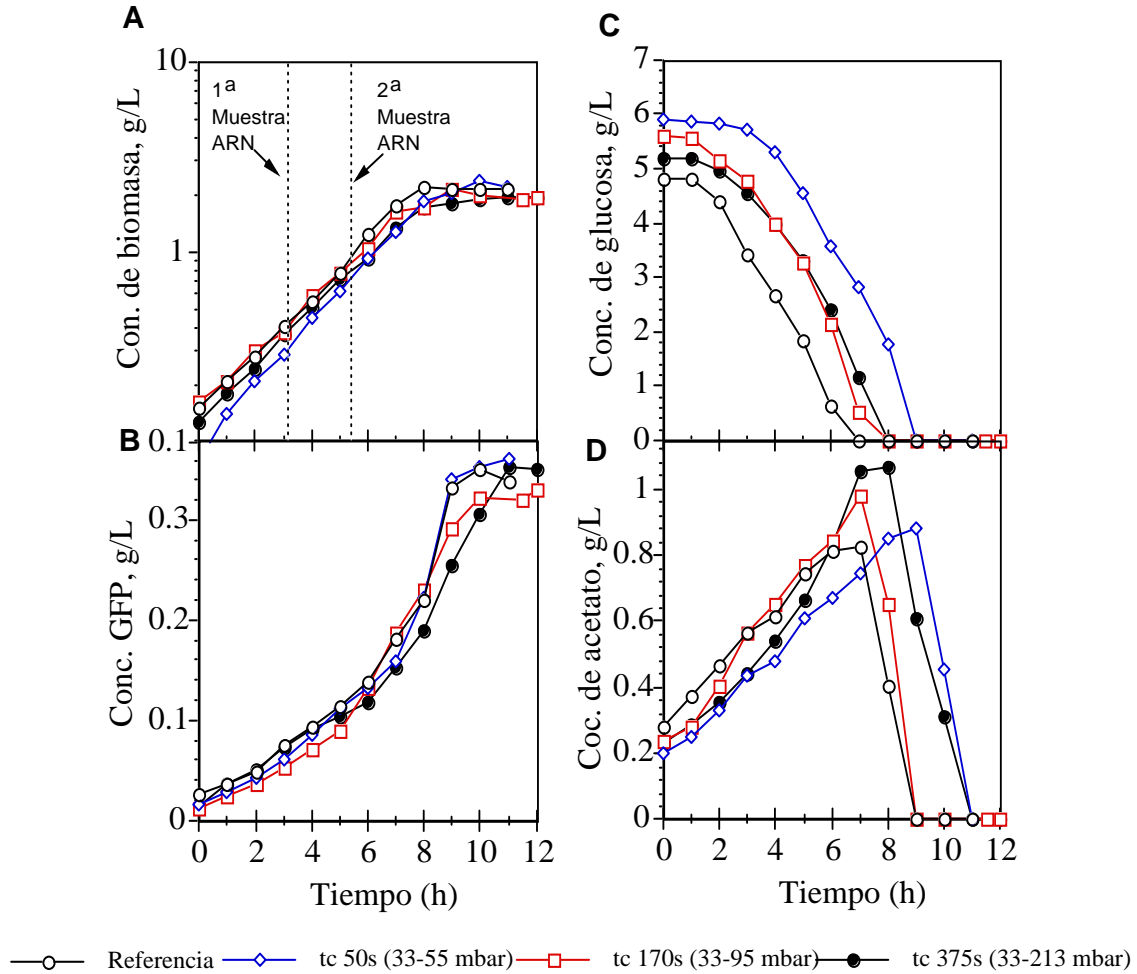


Figura 4.11. Cinéticas típicas de cultivos de *E. coli* recombinante expuestos a gradientes de  $dCO_2$  a diferentes  $t_c$ . Se graficó un solo grupo de datos para claridad de los perfiles.

A partir de los perfiles de los cultivos, se calcularon algunos parámetros cinéticos y estequiométricos relevantes mostrados en la figura 4.12. Las barras en dicha figura representan el valor promedio de las réplicas de los cultivos. La concentración celular máxima alcanzada en todos los  $t_c$  evaluados fueron muy cercanas al del cultivo de

referencia ( $2.185 \pm 0.025$  g/L en peso seco) (Figura 4.12A), a pesar de que la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu$ ) fue ligeramente afectada por los gradientes de  $dCO_2$  (Figura 4.12B). Comparado con el cultivo de referencia, la  $\mu$  disminuyó en un 8.5% y un 11% en los cultivos mantenidos a un  $t_c$  de 170 y 375 s, respectivamente. La concentración máxima de GFP de los cultivos mantenidos a un  $t_c$  de 170 y 375 s disminuyó ligeramente comparado con el cultivo de referencia, en un 5 y 4% respectivamente (Figura 4.12C). Sin embargo, el rendimiento máximo de proteína recombinante por gramo de biomasa fue muy similar en todas las condiciones (aprox. 0.165 g/g) (Figura 4.12D). El rendimiento máximo de biomasa sobre glucosa ( $Y_{X/S}$ ) promedio para el cultivo de referencia fue de  $0.38 \pm 0.014$  g/g, y disminuyó en un 5% para los cultivos a  $t_c$  de 170 y 375 s y un 9% para el cultivo a  $t_c$  de 50s. Sin embargo tales decrementos deben ser considerados con precaución ya que las barras de error se traslapan con la del cultivo de referencia (Figura 4.12E).

El principal metabolito de fermentación ácido mixta encontrado fue el acetato, cuya acumulación incrementó al aumentar el tiempo de circulación hasta en un 15% y un 24%, para los cultivos mantenidos a un  $t_c$  de 170 y 375 s, respectivamente (Figura 4.12F). Otro subproducto detectado en el medio de cultivo fue el formato, aunque su acumulación fue despreciable (por debajo de 0.09 g/L) para todas las condiciones evaluadas (Apéndice A4). El rendimiento máximo de acetato acumulado por gramo de glucosa consumida ( $Y_{ace/glu}$ ) aumentó al incrementar el tiempo de circulación (Apéndice A4). Este resultado indicó que una mayor cantidad de carbono proveniente de la glucosa fue desechada, sin embargo, esto no afectó significativamente el rendimiento de biomasa sobre glucosa consumida (Figura 4.12E), ya que todo el carbono excretado en forma de acetato fue completamente asimilado por *E. coli* después de agotarse la glucosa.

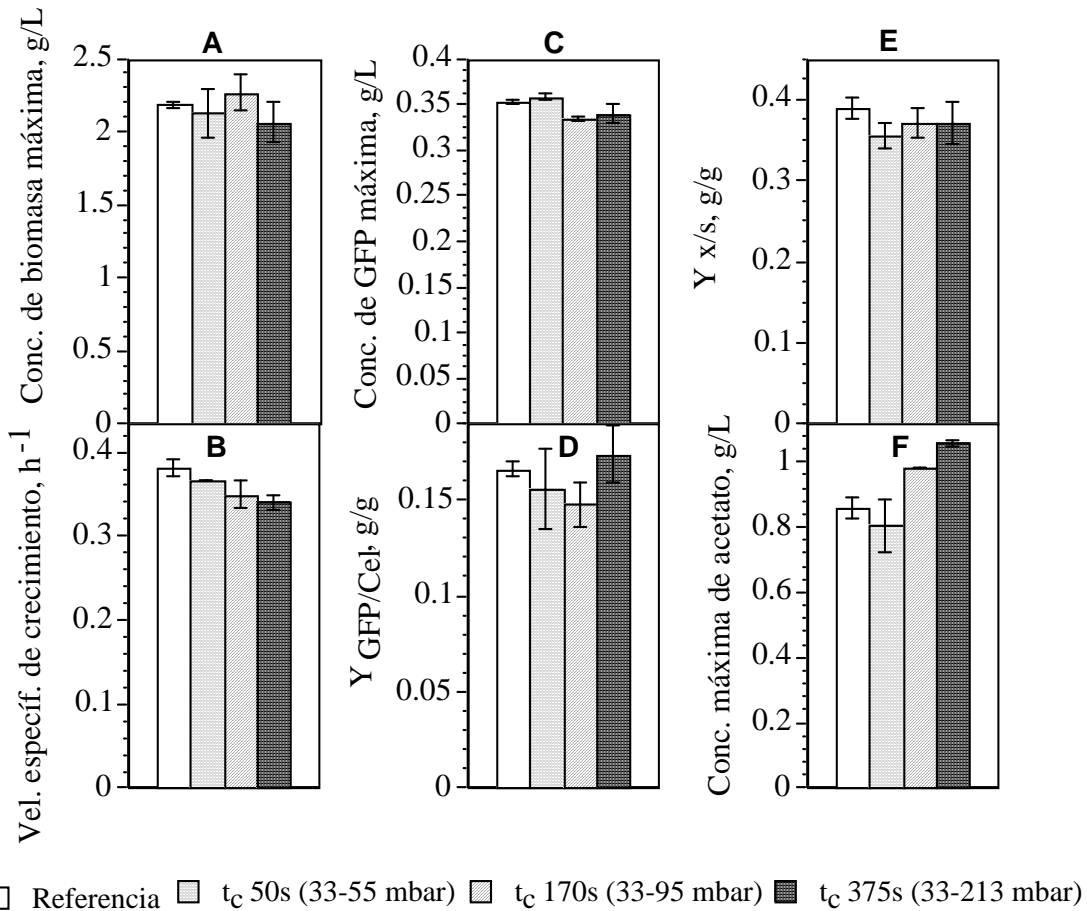


Figura 4.12. Efectos de los gradientes del  $dCO_2$  en los parámetros cinéticos y estequiométricos. A) Concentración de biomasa máxima. B) Velocidad específica de crecimiento máxima. C) Concentración de GFP máxima. D) Rendimiento máximo de GFP sobre biomasa ( $Y_{GFP/X}$ ). E) Rendimiento máximo de biomasa sobre glucosa ( $Y_{X/S}$ ). F) Concentración máxima de acetato. Los valores entre paréntesis corresponden al intervalo del gradiente.

El estudio del desempeño de los cultivos de *E. coli* bajo condiciones fluctuantes de  $dCO_2$  es relevante dado que las fermentaciones a nivel industrial raramente se llevan a cabo bajo condiciones homogéneas y constantes. Hasta donde conocemos, éste es el primer trabajo

que ha evaluado el desempeño de los cultivos de *E. coli* expresando una proteína heteróloga bajo condiciones oscilantes de  $d\text{CO}_2$ , tales como las que pueden prevalecer en biorreactores de gran escala. Durante el cultivo mantenido a  $t_c$  de 375 s, las bacterias debieron permanecer en promedio 150 s a 33 mbar y 225 s a 213 mbar (estimado a partir de la relación de volúmenes utilizada). Bajo tales condiciones, la  $\mu$  disminuyó en tan solo un 11%, mientras que cuando los cultivos se expusieron en forma constante a una concentración de  $d\text{CO}_2$  menor (150 mbar), la  $\mu$  disminuyó en un 33% (Figura 4.4B, ver sección 4.1.1). Se ha reportado que cuando se dan pulsos de  $\text{CO}_2$  la fase lag de crecimiento, éstos, resultan más perjudiciales que cuando se dan en la fase exponencial y estacionaria (Shang et al., 2003). Por lo tanto, inicialmente consideramos que la diferencia en la  $\mu$  entre los cultivos a  $d\text{CO}_2$  constante y oscilante se debía a las diferencias en la etapa de crecimiento en las que fueron expuestos a las altas concentraciones de  $d\text{CO}_2$ . En el caso del cultivo mantenido a 150 mbar de  $d\text{CO}_2$ , las bacterias estuvieron expuestas a una alta concentración de  $d\text{CO}_2$  desde el inicio del cultivo (fase lag), mientras que en el cultivo con gradientes de  $d\text{CO}_2$ , la exposición altas concentraciones de  $d\text{CO}_2$  (213 mbar en forma intermitente) ocurrió 3 h después de haber iniciado el cultivo (fase exponencial temprana de crecimiento). Sin embargo, para aceptar o rechazar tal argumento, se realizó por duplicado un cultivo a un  $t_c$  de 375 s fluctuando el  $d\text{CO}_2$  entre 33 y 213 mbar, pero esta vez desde el inicio del cultivo y se comparó con los cultivos expuesto a gradientes de  $d\text{CO}_2$  3 h después de inoculados (Figura 4.13). No se observaron diferencias en cuanto a la máxima concentración de GFP acumulada, mientras que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu = 0.364 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ ) de los cultivos expuestos a gradientes de  $d\text{CO}_2$  desde el inicio resultó tan solo un 7% mayor.

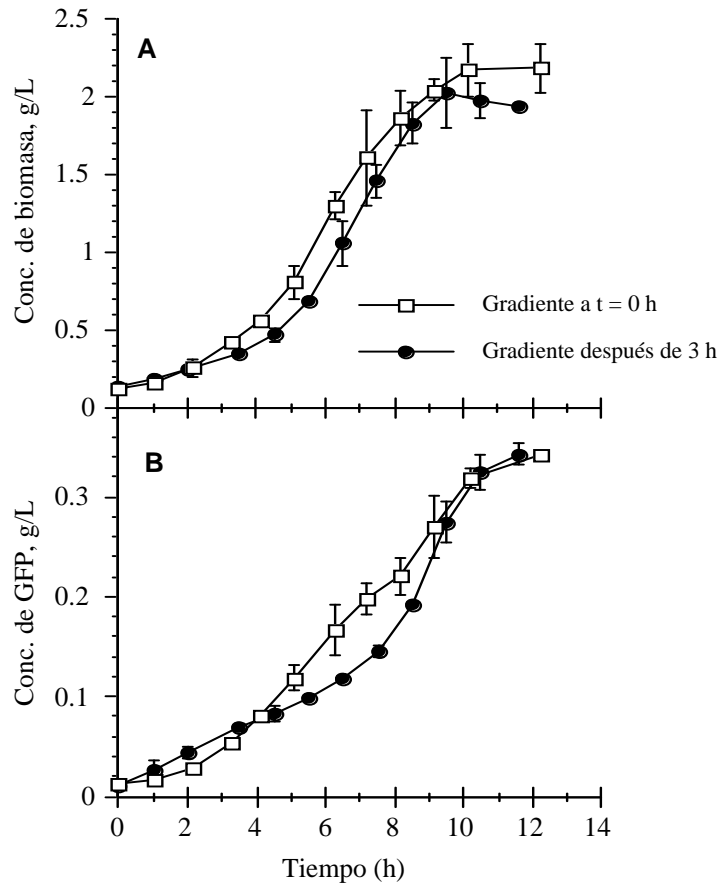


Figura 4.13 Perfil de concentración de biomasa y GFP de dos cultivos expuestos a gradientes de  $d\text{CO}_2$  a  $t_c$  de 375 s. Los cuadros vacíos (---□---) identifican los cultivos expuestos a gradientes de  $d\text{CO}_2$  desde el momento de la inoculación y los círculos rellenos (---●---) a los cultivos expuestos a gradientes de  $d\text{CO}_2$  3 h después de inocular.

Estos resultados mostraron que los cultivos expuestos en forma intermitente a concentraciones de  $d\text{CO}_2$  tan altas como 213 mbar, resultan menos afectadas que aquellos expuestos en forma constante, aún y cuando los niveles de  $d\text{CO}_2$  sean menores (150 mbar) en los últimos. Posiblemente, el tiempo que las bacterias permanecen en el compartimento de bajo  $d\text{CO}_2$  es suficiente para restaurar el metabolismo y homeóstasis

celular debido a que el CO<sub>2</sub> intracelular puede difundir rápidamente al exterior de la célula.

#### **4.2.3 Respuesta transcripcional de *Escherichia coli* recombinante ante gradientes de dCO<sub>2</sub>**

Como se mencionó en secciones anteriores (4.1.2 y 4.1.3), las altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> propiciaron cambios en los niveles de transcripción de algunos genes involucrados en la respuesta de ácido resistencia (*adiA*, *gadA* y *gadC*), así como en algunos genes involucrados en los ciclos de TCA (*icdA*, *sucA* y *sucB*) y glioxilato (*aceA*) (Baez et al, 2009). Dado que los efectos de los gradientes de dCO<sub>2</sub> a nivel macroscópico (sección 4.2.2) resultaron mucho menos tóxicos en comparación con los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante y con base en los resultados de transcripción obtenidos en los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante, se decidió modificar la lista de los genes estudiados anteriormente. Por lo tanto, genes cuyos niveles de transcripción no cambiaron o que presentaron ligeros cambios en los cultivos a dCO<sub>2</sub> constantes (Figura 4.5) no fueron incluidos en esta nueva sección. De los genes que presentaron los mayores cambios en sus niveles de expresión a dCO<sub>2</sub> constante, se seleccionaron cuatro genes para el estudio transcripcional de los cultivos con gradientes de dCO<sub>2</sub>: *gadA* y *gadC* del grupo de los genes de ácido resistencia, *sucA* y *sucB* del grupo de las reacciones de descarboxilación (ver Figura 4.5). Como ya se mencionó anteriormente, los niveles de transcripción de *sucA* y *sucB*, que codifican para la 2- $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, resultaron más sensibles al dCO<sub>2</sub> que los niveles de *icdA*, que codifica para la otra enzima de descarboxilación del TCA. Por otro lado, los genes *gadA* y *gadC* que codifican para la glutamato descarboxilasa y el antitransportador del glutamato:ácido gama amino butírico, respectivamente; también se inducen a elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub> (Baez et al., 2009). Los resultados de los niveles de transcripción de los genes estudiados se muestran en la figura 4.14.

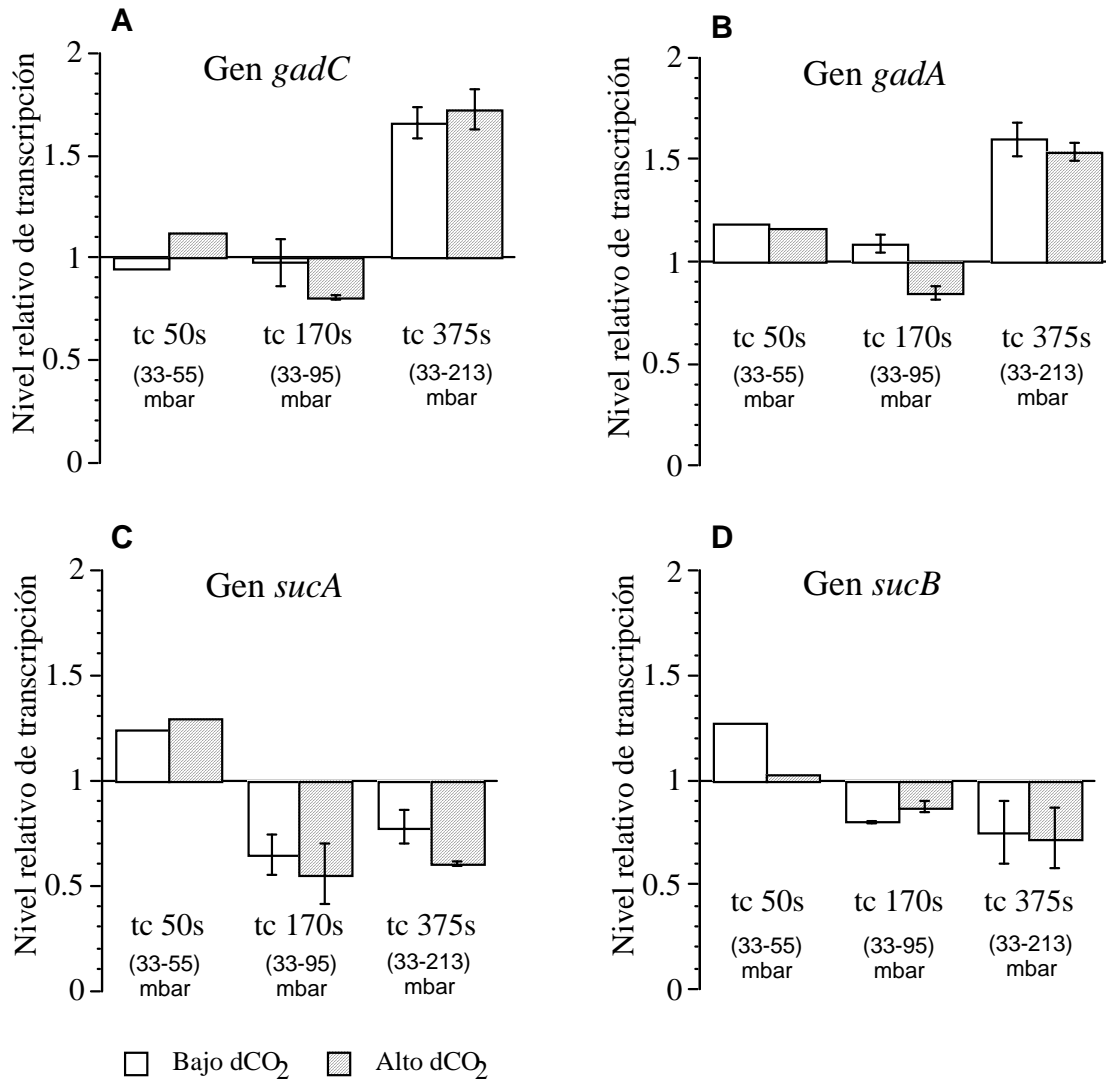


Figura 4.14. Niveles de transcripción en cultivos bajo gradientes de  $dCO_2$ . Se tomaron muestras para cuantificar la expresión del ARNm en ambos compartimentos del SED, los valores de expresión son relativos al propio cultivo justo antes de iniciar los gradientes de  $dCO_2$  (condición de referencia cuyo valor de transcripción en el gráfico es 1). Las barras de error indican el error de las replicas, excepto para  $t_c$  de 50 s cuyos datos provienen del análisis de un solo cultivo.



En la figura 4.14A y B, se muestran los niveles de transcripción de *gadC* y *gadA* en los compartimentos de bajo y alto dCO<sub>2</sub>. No se observaron cambios respecto a la condición de circulación de 50 y 170 s. Sin embargo, para t<sub>c</sub> de 375 s el nivel de expresión de *gadC* aumentó en un 66% y 72%, y el de *gadA* en un 60% y 54%, en los compartimentos de bajo y alto dCO<sub>2</sub>, respectivamente. Para el cultivo a t<sub>c</sub> de 50s no esperábamos observar ningún incremento en los niveles de expresión ya que prácticamente no se observaron cambios en el desempeño del cultivo en comparación con el cultivo de referencia (Figura 4.12). Sin embargo, para el cultivo a t<sub>c</sub> de 375 s donde la concentración máxima de acetato acumulado incrementó un 24% y la velocidad específica de crecimiento disminuyó en un 11%, sí se observaron cambios, principalmente en la expresión de *gadC* y *gadA*. Es interesante que concentraciones de 70 mbar de dCO<sub>2</sub> en cultivos mantenidos a dCO<sub>2</sub> constante propiciaron un aumento en la transcripción de *gadC* de 3 veces (Figura 4.5D) y que para el cultivo a t<sub>c</sub> de 375 s donde las bacterias se exponen a concentraciones de dCO<sub>2</sub> de 213 mbar éste fue de tan solo un 72%. Lo anterior podría sugerir que cuando las bacterias transitan por el compartimento de bajo dCO<sub>2</sub>, éste difunde al exterior (medio de cultivo) y la célula recupera su homeóstasis intracelular propiciando una menor acidificación del citoplasma en comparación con los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante y por tanto una menor expresión de los genes de ácido resistencia. En cuanto a la acumulación de subproductos, se ha reportado que altas concentraciones de CO<sub>2</sub> estimulan la acumulación de acetato (Pan et al., 1987; Castan et al., 2002; Baez et al., 2009). Debido a la desregulación de los genes *icdA*, *sucA* y *sucB* bajo elevadas concentraciones de dCO<sub>2</sub>, Baez et al. (2009) han sugerido una posible disminución de la actividad de TCA y la consecuente acumulación de acetyl-CoA como principales causas de la acumulación de acetato bajo tales condiciones. En concordancia, una disminución del 45% y 39% en la expresión de *sucA* fue observada en el compartimento de alto dCO<sub>2</sub> para los cultivos a t<sub>c</sub> de 170 s y 375 s, respectivamente (Figura 4.14C). En el caso de *sucB*, la disminución de la expresión observada fue modesta, hasta un 20% y 28% en los cultivos a t<sub>c</sub> de 170 y 375 s, respectivamente (Figura 4.14D). Sin embargo, los cambios se encontraron dentro del intervalo del error experimental (cambios por debajo del 30%) de la técnica de qRT-PCR (Flores et al., 2005) utilizada. Si bien la disminución de la transcripción de *sucA* fue modesta (38% respecto a la condición de referencia) en el cultivo a t<sub>c</sub> de 375 s, el

aumento (24%) en la acumulación de acetato también lo fue (Figura 4.12F). Los resultados son consistentes con la idea de que la actividad del TCA haya disminuido ya que *sucA* codifica para el componente E1 de la 2- $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual es la enzima determinante del ciclo (Li et al., 2006).

#### 4.2.4 Conclusiones parciales

Los efectos de los esfuerzos de corte presentes en el sistema de escalamiento descendente utilizado, no resultaron perjudiciales, aun cuando *E. coli* fue expuesta a elevadas concentraciones de  $d\text{CO}_2$ . Cuando se simularon tiempos de circulación de 375 s en el SED, el  $d\text{CO}_2$  fue oscilado entre 33 y 213 mbar. Bajo estas condiciones se observó una disminución en la velocidad específica de crecimiento de 11%, mientras que el acetato acumulado incrementó en un 24% respecto al cultivo de referencia. La exposición a altas concentraciones de  $d\text{CO}_2$  en forma intermitente, resultan menos tóxicas para los cultivos que cuando se exponen en forma continua, probablemente debido a que el tiempo en que las bacterias permanecen en el compartimento de baja concentración de  $d\text{CO}_2$  es suficiente para restablecer el metabolismo y homeóstasis celular. Con base en los resultados obtenidos, podemos proponer que es seguro operar un biorreactor en presencia de gradientes de  $d\text{CO}_2$  cuyas concentraciones estén por debajo de los 100 mbar, y éstas no afectarán en más de un 8% el crecimiento y producción de proteína recombinante en cultivos de *E. coli* W3110, inclusive en biorreactores mal mezclados con  $t_c$  tan altos como 170 s. Por último, podemos proponer la velocidad superficial del gas que se suministra al biorreactor como el parámetro de escalamiento más importante para evitar la acumulación del  $d\text{CO}_2$ . Debido a que la velocidad de desorción del  $\text{CO}_2$  es fuertemente dependiente de la velocidad superficial, más que la presión de operación, velocidad de agitación o pH.

## 5. CONCLUSIONES

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que reporta los efectos de las concentraciones de  $dCO_2$  que pueden alcanzarse en biorreactores de gran escala sobre el crecimiento, metabolismo y producción de proteína heteróloga por una cepa recombinante de *E. coli*. En la primera parte de este trabajo se evaluaron los efectos del  $dCO_2$  sobre la fisiología de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de  $dCO_2$ , la respuesta celular se estudió desde una perspectiva macroscópica (parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivo) y una molecular (análisis transcripcional de genes seleccionados). De ambos resultados se derivaron conclusiones directas y se pudieron inferir probables mecanismos de toxicidad del  $dCO_2$ , descritos a continuación.

Los niveles de toxicidad del  $dCO_2$  sobre *Escherichia coli* resultaron dependientes de la cepa empleada, en este caso el crecimiento de la cepa BL21 resultó menos sensible que el de cepa W3110.

Al incrementar la concentración del  $dCO_2$  en el medio de cultivo, una mayor cantidad de  $CO_2$  puede difundir hacia el interior de las células y acumularse propiciando la acidificación del citoplasma. Se concluyó que tal fenómeno ocurría ya que la expresión de los genes de los sistemas de ácido resistencia de la glutamato y arginina descarboxilasa aumentaron al aumentar el  $dCO_2$ . Al disminuir el pH intracelular, posiblemente la actividad de algunas enzimas de TCA (por ejemplo las de descarboxilación) fueron afectadas, dicho evento podría limitar la disponibilidad de intermediarios necesarios para la síntesis de aminoácidos. Tal concuerda con los niveles de transcripción determinados para las enzimas de TCA.

El  $dCO_2$  promovió una mayor acumulación de acetato en el medio de cultivo, lo cual se

pudo explicar, con base en los niveles de transcripción respectivos, como el efecto negativo de éste sobre las dos reacciones de descarboxilación de TCA. En consecuencia, es posible concluir que una mayor cantidad de carbono proveniente de glicólisis fue dirigida hacia la producción de acetato mediante PoxB. Si el flujo de carbono hacia TCA disminuye, la bacteria dispondría de una menor cantidad de precursores para biosíntesis de aminoácidos, proteínas y otras macromoléculas. Lo anterior pudo explicar el retraso observado en la acumulación de proteína recombinante y la disminución de la velocidad específica de crecimiento.

El gasto energético para mantener la homeóstasis del pH intracelular (inferido del análisis transcripcional) podría limitar la energía requerida para el crecimiento y producción de proteína recombinante.

El presente trabajo mostró por primera vez que *Escherichia coli* puede responder a nivel transcripcional después de ser expuesta a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto y reveló posibles mecanismo responsables de los efectos tóxicos del dCO<sub>2</sub>.

En la segunda parte de este trabajo se realizaron cultivos con fluctuaciones de dCO<sub>2</sub>, simulando en forma simplificada los gradientes de concentración de dCO<sub>2</sub> que pueden ocurrir en biorreactores de gran escala. Dada la alta solubilidad del CO<sub>2</sub> y la limitada dinámica de desorción del SED diseñado, la magnitud de las fluctuaciones de dCO<sub>2</sub> generadas a t<sub>c</sub> de 50 s resultaron modestas, por lo que para simular oscilaciones de dCO<sub>2</sub> de mayor magnitud se tuvo que trabajar a mayores t<sub>c</sub>. La respuesta de *E. coli* ante tales condiciones fue estudiada desde dos perspectivas: macroscópica y molecular.

La exposición de los cultivos de *E. coli* a altas concentraciones de dCO<sub>2</sub> en forma intermitente resultaron menos tóxicas en comparación a los cultivos a dCO<sub>2</sub> constante.

Esto indica que las bacterias probablemente poseen la capacidad de restaurar rápidamente su metabolismo y homeóstasis cuando transitan en el compartimento de baja concentración de  $d\text{CO}_2$ .

Se demostró que es posible operar biorreactores con gradientes de  $d\text{CO}_2$  menores a 100 mbar y con tiempos de circulación promedio menores a los 170 s, sin tener pérdidas mayores al 8% en el crecimiento y producción de proteína recombinante.

La información generada en este trabajo es importante para desarrollar mejores estrategias de escalamiento durante la producción de proteína recombinante, sobre todo cuando las condiciones de operación puedan promover la acumulación del  $d\text{CO}_2$ .

## 6. PERSPECTIVAS

Una de las perspectivas inmediatas del presente trabajo es la determinación de la variación del pH intracelular de *E. coli* para cada concentración de  $d\text{CO}_2$  evaluada. De esta forma, se sustentará en forma contundente que los efectos tóxicos del  $d\text{CO}_2$  son debidos a cambios en el pH intracelular. En este sentido, la medición extracelular de GABA y agmatina complementarán la información obtenida.

En el caso que las reacciones de descarboxilación sean las principales afectadas por el  $\text{CO}_2$ , la disponibilidad de intermediarios del TCA que sirven como precursores bioquímicos sería limitado. Una estrategia para mitigar los efectos del  $\text{CO}_2$  desde una

perspectiva molecular, sería sobre-expresar las vías anapleróticas de *E. coli* o incluso clonar otra existente en procariotes como la de piruvato carboxilasa. De esta forma habría un mayor suministro de carbono al TCA y por tanto una mayor cantidad de precursores para la síntesis de aminoácidos. Desde una perspectiva de proceso, la adición de medios complejos que provean de precursores de aminoácidos sería una alternativa práctica.

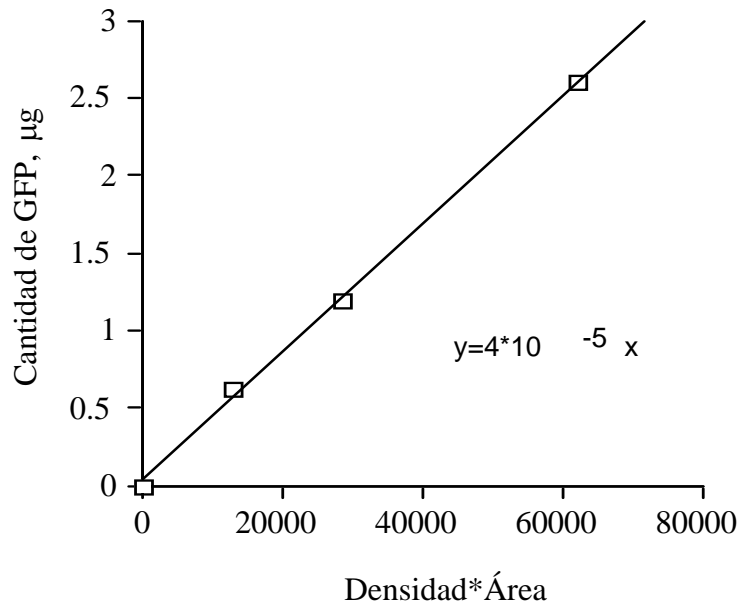
Otras estrategia para contender con los efectos negativos del  $d\text{CO}_2$  en los cultivos (específicamente con la acidificación intracelular) serían la adición de glutamato y arginina, lo cual podría revertir parcialmente los efectos negativos del  $d\text{CO}_2$  ya que estos aminoácidos activan los sistema de ácido resistencia dependientes de glutamato y arginina.

La acumulación de acetato y su consecuente efecto tóxico observado aquí bajo elevadas concentraciones de  $d\text{CO}_2$  pueden ser mitigadas por la delección de *poxB*, ya que esta vía de producción de acetato se sobre-expresa a elevadas concentraciones de  $d\text{CO}_2$ .

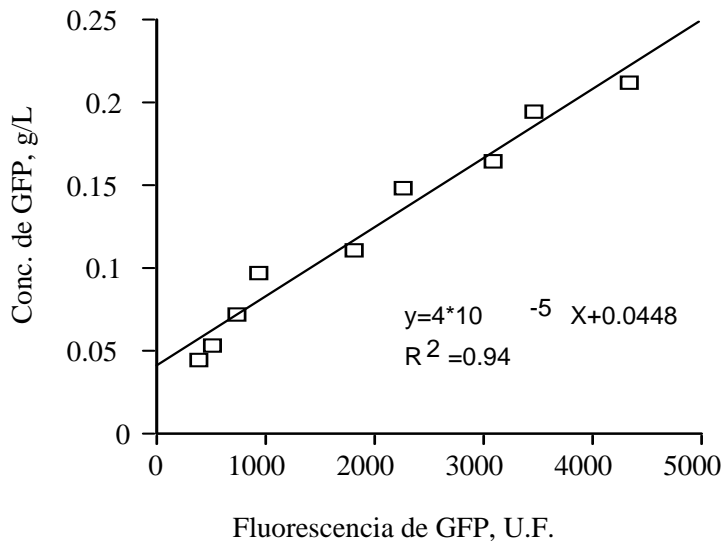
Dado que una alta concentración de  $d\text{CO}_2$  en el medio de cultivo promueve una disminución en el pH, podrían simularse en forma simultánea gradientes de pH y  $d\text{CO}_2$ , manipulando la concentración del  $d\text{CO}_2$  en un medio de cultivo. Para ello se requeriría un medio de cultivo con una limitada capacidad amortiguadora, o incluso se podría diseñar un medio para *E. coli* cuyo sistema buffer fuera de carbonatos. Este sistema tendría la ventaja de que no se requeriría la adición de ningún agente (ácido o base) que pudiera alterar la osmolaridad del sistema a lo largo todo el cultivo.

## Apéndices

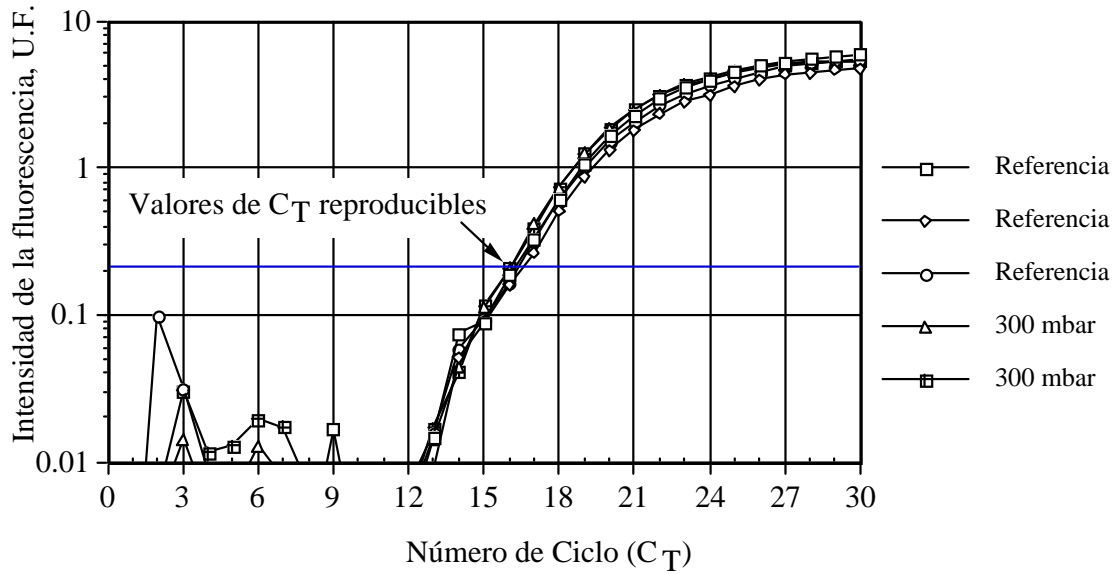
**Apéndice A1.** Curva de calibración interna típica, utilizada en los geles de acrilamida para cuantificar GFP de las muestras de fermentación.



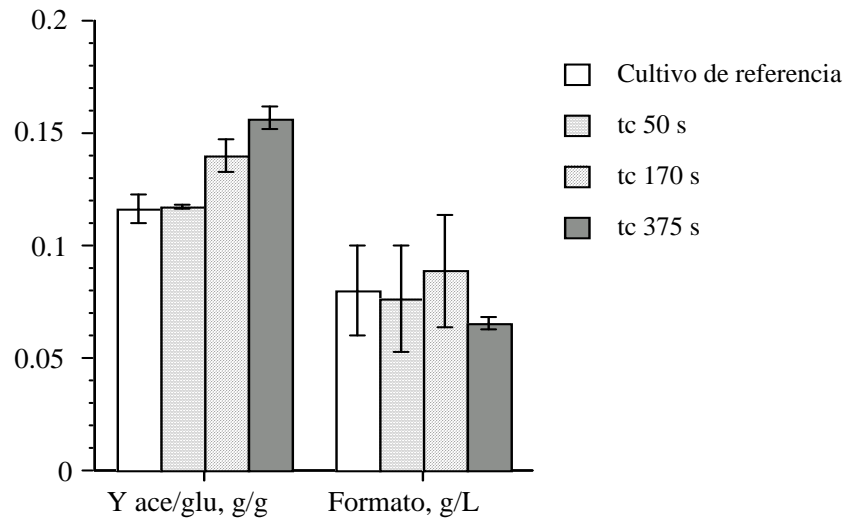
**Apéndice A2.** Correlación entre los valores de fluorescencia obtenidos de las muestras del caldo de cultivo y la concentración de GFP determinada por densitometría.



**Apéndice A3.** Perfil de la amplificación del gen *ihfB* (housekeeping) bajo diferentes condiciones de cultivo por RT-PCR.



**Apéndice A4.** Rendimiento máximo de acetato acumulado por gramo de glucosa consumidos ( $Y_{ace/glu}$ ) y concentración máxima de formato acumulado en cultivos a diferentes tiempos de circulación.





## Nomenclatura y abreviaturas

		Unidades:
Acetil-CoA	Acetil coenzima A	
ADN	Ácido desoxirribonucleico	
ARN	Ácido ribonucleico	
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	
ATP	Trifosfato de adenosina	
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	
dCO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> disuelto	mbar
GFP	Proteína verde fluorescente	
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución	
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosido	
kDa	Kilo dalton	
kla <sub>CO2</sub>	Coefficiente volumetrico de transferencia de masa	h <sup>-1</sup>
LB	Luria Bertani	
pCO <sub>2</sub>	Presión parcial del CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa	mmHg, mbar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	
q <sub>ac</sub>	Velocidad específica de producción de acetato	g / g h
-q <sub>ac</sub>	Velocidad específica de consumo de acetato	g / g h
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real	
SED	Sistema de escalamiento descendente	
t <sub>c</sub>	Tiempo de circulación	s
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	%
t <sub>m</sub>	Tiempo de mezclado	s
vvm	Flujo volumetrico de gas por volumen de medio	L/L min
Y <sub>GFP/cel</sub>	Rendimiento de GFP con base en biomasa	g/g

$Y_{GFP/S}$	Rendimiento de GFP con base en sustrato	g/g
$Y_{XS}$	Rendimiento biomasa con base en sustrato	g/g
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	$h^{-1}$

## Producción científica

### PUBLICACIONES

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. 2008. Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnol Bioeng*. Aceptado 14 Abril 2009

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. Simulation of dissolved CO<sub>2</sub> gradients in recombinant *Escherichia coli* cultures: Metabolic and transcriptional response. *Manuscrito en preparación*

### PONENCIAS

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. Simulation of dissolved CO<sub>2</sub> gradients in recombinant *Escherichia coli* cultures: metabolic and transcriptional response. **Metabolic Engineering VII, Puerto Vallarta, Mexico.** September 14-19, 2008. (Poster).

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. Transcriptional and Metabolic Response of Recombinant *Escherichia coli* to Elevated Dissolved Carbon Dioxide Concentrations.

**AICHE Annual Meeting**, Salt Lake City, Utah. EUA. Noviembre 4-9, 2007 (Poster).

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. Respuesta metabólica y transcripcional de *Escherichia coli* recombinante en cultivos con altas concentraciones de CO<sub>2</sub> disuelto. **XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**. Morelia, México. Junio 25-29 de 2007 (Poster).

Baez A, Ramírez OT. Efectos del CO<sub>2</sub> en el crecimiento, metabolismo y producción de GFP en *Escherichia coli* recombinante: Un estudio de escalamiento descendente. **XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**. Mérida, México. Septiembre 18-23 de 2005 (Presentación Oral).

**REFERENCIAS**

Aguilera J, Petit T, de Winde JH, Pronk JT. 2005. Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res* 5:579-593.

Amanullah A, Buckland BC, Nienow A. 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries. In: Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM, Editors. Handbook of industrial mixing: Science and practice. New Jersey; John Wiley & Sons. pp. 1071-1170.

Amanullah A, McFarlane C, Emery AN, Nienow A. 2001. Scale down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 73:389-399.

Arnold CN, McElhanon J, Lee A, Leonhart R, Siegele DA. 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* 183:2178-2186.

Artsimovich 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.

Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. 2009. Metabolic and Transcriptional Response of Recombinant *Escherichia coli* to Elevated Dissolved Carbon Dioxide Concentrations. *Biotechnol Bioeng*. Aceptado 14 Abril 2009.

Ballestra P, Abreu Da Silva A, Cuq JL. 1996. Inactivation of *Escherichia coli* by carbon dioxide under pressure. *J Food Sci* 61:829-831.

Bäumchen C, Knoll A, Husemann B, Seletzky J, Maier B, Dietrich C, Amoabediny G, Büchs J. 2007. Effect of dissolved carbon dioxide concentrations on growth of *Corynebacterium glutamicum* on D-glucose and L-lactate. *J Biotechnol* 128:868-874.

Bertoloni G, Bertucco A, De Cian B, Parton T. 2006. A study on the inactivation of micro-organisms and enzymes by high pressure CO<sub>2</sub>. *Biotechnol Bioeng* 95:155-160.

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.

Bylund F, Collet E, Enfors SO, Larsson G. 1998. Substrate gradient formation in the large scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess Eng* 18:171-178.

Bylund F, Guillard F, Enfors S, Tragardh C, Larsson G. 1999. Scale-down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. *Bioproc Eng* 20:377-389.

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.

Castan A, Näsman A, Enfors S. 2002. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme Microb Technol* 30:847-854.

- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:3525-3535.
- Chang YY, Wang AY, Cronan JE Jr. 1994. Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the rpoS (katF) gene. *Mol Microbiol* 11:1019-1028.
- Dahod SK. 1993. Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameters in fermentation processes. *Biotechnol Prog* 9:655-660.
- Dittrich CR, Bennett GN, San KY. 2005. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 21:1062-1067.
- Dixon NM, Kell DB. 1989. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 67:109-136.
- Doran PM. Bioprocess engineering principles. 1998. Academic Press. San Diego, CA.
- El-Sabbagh N, McNeil B, Harvey LM. 2006. Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Enzyme Microb Technol* 39:185-190.
- Enfors S, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noissomit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, 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.

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, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F. 2004. The role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8:209-221.

Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohidrate phosphotransferase system. *Metab Eng* 7:70-87.

Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Ginneken LV, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in food: the past, the present and the future. *Int J Food Microbiol* 117:1-28.

Gray D R, Chen S, Howarth W, Inlow D, Maiorella B L. 1996. CO<sub>2</sub> in large-scale and high density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnol* 22:65-78.

Hewitt CJ, Boon LT, McFarlane CM, Nienow AW. 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 59:612-620.

Hewitt C, Caron G, Axelsson B, McFarlane C, Nienow AW. 2000. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol Bioeng* 70:381-390.

Hewitt CJ, Onyeaka H, Lewis G, Taylor IW, Nienow AW. 2007. A comparison of high cell density fed-batch fermentations involving both induced and non-induced recombinant *Escherichia coli* under well-mixed small-scale and simulated poorly mixed large-scale conditions. *Biotechnol Bioeng* 96:495-505.

Humphrey A. 1998. Shake flask to fermentor: What have we learned? *Biotechnol Prog* 14:3-7.

Huang J, Craggs TD, Christodoulou J, Jackson SE. 2007. Stable intermediate state and high energy barriers in the unfolding of GFP. *J Mol Biotechnol* 370:356-371.

Jones RP, Greenfield PF. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb Technol* 4:210-223.

Khosla C, Bailey JE. 1988. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* 331:633-635.

Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J, Büchs J. 2007. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J Biotechnol* 132:167-179.



Kvint K, Farewell A, Nyström T. 2000. RpoS-dependent promoters required guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma S. *J Biol Chem* 275:14795-14798.

Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006a. 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.

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

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

Larsson G, Törnkvist M, Stahl Wernesson E, Trágardh C, Noorman H, Enfors SO. 1996. Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. *Bioproc Eng* 14:281-289.

Li M, Ho PY, Yao S, Shimizu K. 2006. Effect of *lpdA* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by <sup>13</sup>C-labeling experiments. *J Biotechnol* 122:254-266.

Lidén G. 2002. Understanding the bioreactor. *Bioproc Biosys Eng* 24:273-279.

- Lin H, Castro NM, Bennett GN, San KY. 2006. Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:870-874.
- 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.
- Luyben KChAM. Regime analysis for the scale-down of biotechnological processes. In: Proceedings of the international symposium on bioreactor performance. Mortensen U y Norman HJ (eds). Denmark, 1993. Pp. 159-169.
- Ma Z, Gong S, Richard H, Tucker DL, Conway T, Foster JW. 2003. GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 49:1309-1320.
- Maalej S, Benadda B, Otterbein M. 2003. Interfacial area and volumetric mass transfer coefficient in a bubble reactor at elevated pressures. *Chem Eng Sci* 58:2365-2376.
- March JC, Eiteman MA, Altman E. 2002. Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68:5620-5624.
- Mayr B, Nagy E, Horvat P, Moser A. 1994. Scale up on basis of structured mixing models: a new concept. *Biotechnol Bioeng* 43:195-206.

McIntyre M, McNeil B. 1997. Effects of elevated dissolved CO<sub>2</sub> levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. *Appl Environ Microbiol* 63:4171-4177.

Moreau PL. 2004. Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J Bacteriol* 186:7364-7368.

Mori H, Kobayashi T, Shimizu S. 1983. Effect of carbon dioxide on growth of microorganisms in fed-batch cultures. *J Ferment Technol* 61:211-213.

Mostafa SS, Gu X. 2003. Strategies for improved dCO<sub>2</sub> removal in large-scale fed-batch cultures. *Biotechnol Prog* 19:45-51.

O'Beirne D y Hamer G. 2000. The utilisation of glucose/acetate mixtures by *Escherichia coli* W3110 under aerobic growth conditions. *Bioprocess Eng* 23:375-380.

Onyeaka H, Nienow AN, Hewitt CJ. 2003. Further studies related to the scale-up of high cell density *Escherichia coli* fed-batch fermentations: the additional effect of a changing microenvironment when using aqueous ammonia to control pH. *Biotechnol Bioeng* 84:474-484.

Oosterhuis NMG. 1984. Scale-up of bioreactors, a scale down approach. PhD thesis, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.

Oosterhuis N, Kossen N. 1984. Dissolved oxygen concentration profiles in a production scale bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 26:546-550.

Oosterhuis NMG, Kossen NWF, Olivier APC, Schenk ES. 1985. Scale-down and optimization studies of the gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxidans*. *Biotechnol Bioeng* 27:711-720.

Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. 2004. Production of recombinant proteins: Challenges and solutions. in *Methods Mol Biol* 267:15-51.

Palomares LA, Ramírez OT 2000. Bioreactor scale-down en: The Encyclopedia of Cell Technology; Spier, R. E. (ed), John Wiley and Sons, Inc., Pp. 174-183.

Pan G, Rhee J, Lebeault J. 1987. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed bath culture. *Biotechnol Lett* 9:89-94.

Pederson AG, Bundgaard-Nielsen M, Nielsen J, Villadsen J. 1994. Characterization of mixing in stirred tank bioreactors equipped with Rushton turbines. *Biotechnol Bioeng* 44:1013-1017.

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. *Biotechnol Bioeng* 90:805-820.

Phue JN, Shiloach J. 2004. Transcription level of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J Biotechnol* 109:21-30.

Quail MA, Haydon DJ, Guest JR. 1994. The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol* 12:95-104.

Reuss M, Schmalzriedt S y Jenne M. 1994. Structured modelling of bioreactors in: Advances in bioprocess engineering. Galindo E, Ramírez OT. (eds). Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Pp. 207-215.

Richard H, Foster JW. 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potencial. *J Bacteriol* 186:6032-6041.

Sandoval-Basurto EA, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2005. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic responses and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* 89:453-463.

Seáñez G, Peña C, Galindo E. 2001. High CO<sub>2</sub> affects alginate production and prevents polymer degradation in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol* 29:535-540.

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.

Shang L, Jiang M, Ryu CH, Chang HN, Cho SH, Lee JW. 2003. Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO<sub>2</sub> pulse injection and autogenous CO<sub>2</sub> methods. *Biotechnol Bioeng* 83:312-320.

Slonczewski JL, Foster JW. 1996. pH-regulated genes and survival at extreme pH. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Washington, DC: ASM Press. Pp 1539-1549.

Spilimbergo S, Bertucco A. 2003. Non-thermal bacteria inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnol Bioeng* 84:627-638.

Spilimbergo S, Bertucco A, Basso G, Bertoloni G. 2005. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO<sub>2</sub> treatment. *Biotechnol Bioeng* 92:447-451.

Sweere A.P.J., Luyben K.Ch.A.M. and Kossen N.W.F. 1987. Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme and Microb Technol* 9:386-398.

Vrábel P, van der Lans RGJM, Luyben K, Boon L, Nienow AW. 2000. Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements. *Chem Eng Sci* 55:5881-5896.

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.

Yang C, Hua Q, Baba T, Mori H, Shimizu K. 2003. Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol Bioeng* 84:129-144.