



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

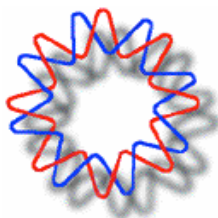
**Estudio del efecto de condiciones oscilantes
de oxígeno en una cepa de *Escherichia coli*
con mutaciones en las vías de fermentación
ácido-mixto.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
M A E S T R O E N C I E N C I A S
P R E S E N T A:

IBI. RAMSÉS ISMAEL GARCÍA CABRERA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ



CUERNAVACA, MORELOS

2010



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz.

Durante la realización de éste trabajo se contó con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), del proyecto DGAPA IN-223308, del proyecto Conacyt Fondo Salud 44126, del proyecto Ciencia Básica 104951-Z y del proyecto Conacyt F-Salud 126793.

AGRADECIMIENTOS

Miembros del comité tutorial

Dr. Guillermo Gosset Lagarda	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Leobardo Serrano Carreón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Norma Adriana Valdez Cruz	Instituto de Biotecnología, UNAM

Miembros del jurado

Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Angélica Meneses Acosta	Centro de Ciencias Farmacéuticas, UAEM
Dr. Mario Rodríguez Monroy	Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN
Dra. Norma Adriana Valdez Cruz	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se agradece el apoyo técnico de la Dra. Guadalupe Zavala Padilla de la Unidad de Microscopía Electrónica en la realización de las micrografías. Se agradece la asesoría de la Dra. Angélica Meneses Acosta para el análisis de viabilidad por citometría de flujo. Se agradece el apoyo del Dr. Alvaro R. Lara Rodríguez durante el montaje de las técnicas de cultivo. Se agradece todo el apoyo y consejos sobre el proyecto de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, Dr. Octavio T. Ramírez Reivich y Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. A todos los miembros de los grupos OTR y EG. A mis familiares y a los amigos de siempre. A los nuevos amigos del IBt, vlr.

ÍNDICE

Abreviaturas	8
Nomenclatura	9
Resumen	10
1. Introducción	12
2. Antecedentes	
2.1. Heterogeneidades en biorreactores	14
2.2. Consecuencias de la heterogeneidad de TOD	15
2.3. Respuesta al estrés ambiental	16
2.3.1. Regulación del metabolismo debido a la disponibilidad de oxígeno	16
2.4. Metabolismo facultativo de <i>E. coli</i>	17
2.5. Metabolismo aerobio	19
2.5.1. Síntesis aerobia de acetato	19
2.6. Metabolismo anaerobio	20
2.6.1. Fermentación de ácidos mixtos	21
2.6.2. Respiración anaerobia	22
2.7. Escalamiento descendente	23
2.8. Estrategias para contender con los gradientes de TOD	27
2.9. Viabilidad celular	29
2.10. La Proteína Verde Fluorescente (GFP) como modelo de estudio	30
3. Justificación	33
4. Hipótesis	33
5. Objetivo	
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos particulares	34
6. Materiales y Métodos	35
6.1. Cepas bacterianas y plásmido	35
6.2. Medio de cultivo	35
6.3. Banco celular e inóculo	36

6.4. Sistema de escalamiento descendente	36
6.5. Métodos analíticos	38
6.5.1. Cuantificación de la concentración celular	38
6.5.2. Cuantificación de metabolitos extracelulares	38
6.5.3. Análisis de la fluorescencia total de GFP	40
6.5.4. Cuantificación de GFP con geles SDS-PAGE	40
6.5.5. Evaluación de la viabilidad celular y distribución de la fluorescencia de GFP en la población	41
6.5.6. Intensidad de fluorescencia de NADH	43
6.6. Micrografías	44
6.7. Métodos de cálculo	44
6.7.1. Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos	44
6.7.2. Cálculo del carbono destinado para la formación de ácidos orgánicos	45
6.8. Estrategia experimental	46
7. Resultados y discusión	47
7.1. Evaluación del desempeño de las cepas en cultivos aerobios y oscilados	47
7.1.1 Crecimiento celular y consumo de glucosa	47
7.1.2. Acumulación de metabolitos extracelulares	50
7.1.2.1. Acumulación de metabolitos de las rutas de fermentación de ácidos mixtos	50
7.1.2.2. Acumulación extracelular de piruvato	54
7.1.2.3. Carbono utilizado para la formación de ácidos orgánicos	55
7.1.3. Producción de proteína recombinante	56
7.1.3.1. Micrografías de las cepas	56
7.1.3.2. Cuantificación de GFP mediante cromatografía en gel desnaturizante SDS-PAGE	57

7.1.3.3. Evaluación de la fluorescencia total de GFP	59
7.1.3.4. Distribución de la fluorescencia de GFP en la población	61
7.1.4. Evaluación de viabilidad celular	63
7.1.5. Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos	66
7.1.5.1. Comparación de la velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación	66
7.1.5.2. Comparación de los rendimientos globales de biomasa	68
7.1.5.3. Comparación de los consumos específicos de glucosa	68
7.1.5.4. Comparación de la productividad específica de acetato	70
7.1.5.5. Comparación de las productividades específicas, rendimientos y productividades volumétricas de GFP	70
7.1.6. Evaluación de la fluorescencia de NADH	72
7.2. Cultivos anaerobios de la cepa VAL24-pV21	73
7.3. Evaluación del desempeño de <i>E. coli</i> VAL24-pV21 con NaNO ₃	75
7.3.1. Crecimiento y consumo de glucosa	75
7.3.2. Acumulación de metabolitos extracelulares	76
7.3.2.1. Acumulación de metabolitos de la ruta de fermentación de ácidos mixtos en cultivos con nitrato	76
7.3.2.2. Carbono utilizado para la formación de ácidos orgánicos	77
7.3.3. Producción de proteína recombinante en cultivos con nitrato	79
7.3.3.1. Cuantificación de GFP por densitometría	79

7.3.3.2. Evaluación de la fluorescencia de GFP.	80
7.3.4. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con NO ₃	81
7.3.4.1 Velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación en cultivos con nitrato	81
7.3.4.2 Rendimiento global de biomasa en cultivos con nitrato	82
7.3.4.3 Consumos específicos de glucosa y producción específica de acetato en cultivos con nitrato	83
7.3.4.4 Productividad específica de GFP, rendimientos de GFP y productividades volumétricas de GFP en cultivos con nitrato	85
7.4. Cultivos anaerobios de VAL24-pV21 con NO ₃	87
8. Conclusiones	89
9. Perspectivas	91
Bibliografía	93
Apéndices	
A. Acumulación de metabolitos de las rutas de fermentación de los ácidos mixtos	98
B. Viabilidad celular de los cultivos determinada por citometría de flujo	100
C. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas	102

Índice de figuras

Figura 2.1.- Metabolismo facultativo de <i>E. coli</i> debido a la modularidad de las cadenas respiratorias.	18
Figura 2.2.- Metabolismo simplificado de <i>E. coli</i> .	20
Figura 2.3.- Reacciones de maduración de GFP.	31
Figura 6.1.- Sistema de escalamiento descendente para simular gradientes de oxígeno.	37
Figura 6.2.- Curvas estándar típicas para la cuantificación de metabolitos por HPLC.	39
Figura 6.3.- Perfil típico de la curva para la cuantificación de GFP por densitometría.	41
Figura 6.4.- Evaluación de la viabilidad y distribución de la fluorescencia por citometría de flujo.	42
Figura 6.5.- Barrido de excitación y emisión del NADH por fluorimetría.	43
Figura 6.6.- Diagrama de la estrategia experimental.	46
Figura 7.1.1.1.- Comparación del crecimiento.	48
Figura 7.1.1.2.- Cinéticas de consumo de glucosa.	49
Figura 7.1.2.1.- Acumulación extracelular máxima de ácidos orgánicos.	53
Figura 7.1.2.2.- Acumulación de piruvato por la cepa VAL24-pV21.	55
Figura 7.1.2.3.- Carbono acumulado en la formación ácidos orgánicos.	56
Figura 7.1.3.1.- Micrografías de las cepas de <i>E. coli</i> W3110 silvestre, W3110-pV21 y VAL24-pV21.	57
Figura 7.1.3.2.- Producción de GFP en el sistema de escalamiento descendente.	58
Figura 7.1.3.3.- Comportamiento de la fluorescencia total de GFP.	60
Figura 7.1.3.4.- Evaluación de la fluorescencia en la población caracterizada por citometría de flujo.	62
Figura 7.1.4.- Evaluación de la viabilidad celular por citometría	

de flujo.	65
Figura 7.1.5.1.- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas a distintos t_c .	67
Figura 7.1.5.2.- Comparación de las velocidades específicas de producción de GFP q_{GFP} , rendimientos de GFP $Y_{GFP/S}$ y productividades volumétricas.	71
Figura 7.1.6.- Acumulación de NADH para la cepa VAL24-pV21.	73
Figura 7.2.- Comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en anaerobiosis.	74
Figura 7.3.1.- Desempeño de la cepa VAL24-pV21 de cultivos con nitrato y t_c de 100 s y 150 s.	75
Figura 7.3.2.- Cinéticas de acumulación de acetato con y sin nitrato para la cepa VAL24 con t_c de 100 s y 150 s.	77
Figura 7.3.2.2.- Carbono de los metabolitos detectados en cultivos con y sin nitrato.	78
Figura 7.3.3.1.- Producción de proteína recombinante con y sin nitrato para los t_c de 100 s y 150 s.	79
Figura 7.3.3.2.- Cinéticas de fluorescencia total de GFP para las cinéticas con y sin nitrato para los t_c de 100 s y 150 s.	81
Figura 7.3.4.1.- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos con y sin nitrato.	84
Figura 7.3.4.2.- Comparación de las productividades específicas de GFP, rendimiento de GFP-sustrato y productividad volumétrica para las cepas con y sin nitrato para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21.	86
Figura 7.4. Comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en cultivos anaerobios con nitrato.	88
Figura A.1.- Acumulación de acetato.	98
Figura A.2.- Acumulación de lactato.	98
Figura A.3.- Acumulación de formato.	99
Figura A.4.- Acumulación de etanol.	99

Figura B.1.- Cuantificación de la viabilidad celular de la cepa W3110-pV21 mediante análisis de cuadrantes de gráficas de puntos.	100
Figura B.2.-Determinación de la viabilidad celular de la cepa VAL24-pV21 por citometría de flujo en gráficas de puntos.	101

Índice de tablas

Tabla 1- Estudios de escalamiento descendente.	24
Tabla 2- Tiempos de residencia promedio (t_{rp}) y flujo establecido (F) en la bomba peristáltica.	38
Tabla 3- Tiempos de retención (T_r) y pendientes calculadas por regresión lineal para la cuantificación de metabolitos extracelulares por HPLC.	39
Tabla 4- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 con distintas condiciones de operación.	102

Abreviaturas

<i>ace</i>	Dihidrolipoamida acetiltransferasa
<i>ack</i>	Acetato quinasa
<i>acn</i>	Aconitasa
<i>acs</i>	Acetil CoA sintetasa
<i>adhE</i>	Acetaldehído deshidrogenasa
<i>adhP</i>	Alcohol deshidrogenasa
AP50	Proteína modelo de mamífero
ArcAB	Sistema de control de la respiración aerobia
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
CI	Cuerpos de inclusión
CFD	Análisis computacional de la dinámica de fluidos
Cyt	Citocromo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
FHL	Complejo formato hidrógeno liasa
FNR	Proteína reguladora de la reducción de fumarato y nitrato
<i>frd</i>	Fumarato reductasa
<i>fum</i>	Fumarasa
GFP	Proteína verde fluorescente
<i>glt</i>	Citrato sintasa
<i>hyc</i>	Complejo formato hidrógeno liasa
IF-GFP	Intensidad de fluorescencia de GFP
<i>Ipd,ace</i>	Complejo piruvato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>ldhA</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>lpd</i>	Lipamida deshidrogenasa
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
MQ8	Menaquinona
NADH	Nicotin adenin dinucleótido, reducido
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleótido, oxidado
Nar	Nitrato reductasa
<i>pflA</i>	Piruvato formato liasa
PFR	Reactor de flujo pistón
PI	Yoduro de propidio
<i>poxB</i>	Piruvato oxidasa
<i>ppc</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
<i>pps</i>	Fosfoenol piruvato sintasa
<i>pta</i>	Fosfato acetiltransferasa
PTS	Sistema de transporte de glucosa fosfotransferasa

<i>pyk</i>	Piruvato quinasa
Q8	Ubiquinona
RNA	Ácido ribonucleico
<i>sdh</i>	Succinato deshidrogenasa
STR	Reactor de tanque agitado
TOD	Tensión de oxígeno disuelto.
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Nomenclatura

C_A	Carbono acumulado de acetato (g/L)
C_E	Carbono acumulado de etanol (g/L)
C_F	Carbono acumulado de formato (g/L)
C_L	Carbono acumulado de lactato (g/L)
C_M	Carbono total acumulado de los metabolitos (g/L)
D	Diámetro del impulsor (m)
D_T	Diámetro del tanque (m)
H_L	Altura del líquido (m)
F	Velocidad del flujo de líquido (L / min)
N	Velocidad del impulsor (rpm)
N_p	Número de potencia (adimensional)
P	Potencia (W)
P_g	Potencia gaseada (W)
P_v	Productividad volumétrica (g/L*h)
Q	Velocidad de flujo gaseoso (m ³ /min)
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato (g/g*h)
q_{ac}	Velocidad específica de producción de acetato (g/g*h)
q_{GFP}	Velocidad específica de producción de GFP (g/g*h)
t_c	Tiempo de circulación (s)
t_d	Tiempo de duplicación (s)
t_m	Tiempo de mezclado (s)
t_{O_2u}	Tiempo característico de consumo de oxígeno
V	volumen (L)
vvm	Flujo volumétrico de gas por volumen de líquido por min (min ⁻¹)
$Y_{X/S}$	Rendimiento global de biomasa (g/g)
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)

RESUMEN

La operación de biorreactores a gran escala suelen presentar problemas de mezclado que originan gradientes espaciales en los medios de cultivo. Los microorganismos modifican su fisiología para contender con las heterogeneidades, situación que puede afectar la productividad del proceso. En particular, los gradientes de oxígeno disuelto (TOD), promueven la activación de las rutas de fermentación de los ácidos mixtos en *Escherichia coli*, originando con ello el uso del carbono para la formación de ácidos orgánicos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el desempeño de la cepa de *E. coli* VAL24-pV21 que tiene eliminados los genes que producen los ácidos mixtos acetato, lactato y formato, con la intención de utilizar menor cantidad de carbono y mejorar la producción de GFP recombinante, cuando es sometida a diferentes tiempos de circulación (t_c). La caracterización de la cepa se realizó utilizando un sistema de escalamiento descendente de dos reactores de tanque agitado interconectados donde se simuló el gradiente de O_2 (0 y 10% de TOD en los distintos tanques) con t_c de 50, 100 y 150 s. El desempeño de la cepa mutante se comparó con el de la cepa sin mutaciones W3110-pV21. Se evaluó el crecimiento, consumo de glucosa, acumulación de metabolitos extracelulares (acetato, lactato, formato, etanol y piruvato), viabilidad celular, acumulación de NADH, producción de GFP y fluorescencia de la proteína recombinante. Se observó que con el aumento de los t_c , los valores de los diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos disminuyeron, indicando el efecto negativo de los gradientes de TOD sobre los microorganismos. Las velocidades específicas de crecimiento disminuyeron 80 y 28% del cultivo aerobio al del t_c de 150 s para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21, respectivamente. Los rendimientos globales de biomasa se redujeron 63% y 52% entre el control y el t_c de 150 s para la cepa VAL24-pV21 y W3110-pV21, respectivamente. Sin embargo, las mutaciones de la cepa VAL24-pV21 limitaron la formación de ácidos orgánicos que posiblemente contribuyó con la mayor expresión de GFP cuantificada para todos los t_c con respecto a la cepa W3110-pV21. La

fluorescencia total de GFP de la cepa VAL24-pV21 en general fue 10 veces más alta que la de la cepa W3110-pV21. La viabilidad celular de la cepa W3110-pV21 determinada por citometría de flujo no disminuyó y se mantuvo constante a lo largo de las cinéticas para los distintos t_c . Sin embargo, las recirculaciones afectaron la viabilidad de la cepa VAL24-pV21 principalmente para los t_c mayores de 100 y 150 s. Con la finalidad de optimizar el desempeño de la cepa VAL24-pV21 con largos periodos de anaerobiosis, se adicionó a los cultivos nitrato como aceptor final de electrones. Se observó que el nitrato en los cultivos oscilados tuvo efectos benéficos al aumentar la velocidad específica de crecimiento y rendimientos globales de biomasa, con respecto a los cultivos sin nitrato. Sin embargo, las productividades específicas de GFP fueron similares para las cinéticas de VAL24-pV21 con y sin nitrato, así como para la cepa W3110-pV21.

1. Introducción

En los últimos años, la industria biotecnológica con aplicaciones en medicina humana se ha centrado en la producción de proteínas terapéuticas mediante técnicas de DNA recombinante (Pavlou y Reichert, 2004). Los sistemas biológicos utilizados para la expresión de proteínas recombinantes son las bacterias, levaduras, células de mamífero, células de plantas, células de insecto, o bien animales y plantas transgénicos. Prácticamente todos los productos biofarmacéuticos comercializados actualmente se producen utilizando *Escherichia coli*, células de ovario de hámster chino (CHO por sus siglas en inglés) o *Saccharomyces cerevisiae*, como organismos hospederos. Aproximadamente el 40% de las proteínas terapéuticas no glicosiladas se producen en el modelo bacteriano (Langer, 2009; Ni y Chen, 2009). Algunos ejemplos de proteínas recombinantes producidas en *E. coli* y comercializadas son: factor activador del plasminógeno tisular, interferones, interleucinas, hormona del crecimiento y fragmentos de anticuerpos, entre otros (Graumann y Premstaller, 2006).

El uso generalizado de bacterias como sistemas de expresión y en particular de *E. coli* se debe a su rápido crecimiento, facilidad de cultivo y altos rendimientos de producto, así como a los profundos conocimientos que se han acumulado en las últimas décadas sobre la genética y la biología molecular del microorganismo. Una gran ventaja de utilizar *E. coli* a nivel industrial es el bajo costo de operación con respecto a otros modelos biológicos. Sin embargo, la obtención de proteínas recombinantes en *E. coli* tiene como desventajas: las limitaciones de liberación de proteínas recombinantes al medio de cultivo y las diferencias en la estructuración y la maduración de proteínas heterólogas (Jana y Deb, 2005; Zerbs et al., 2009), así como la formación de productos de fermentación, como el acetato, que afectan el crecimiento y la formación de proteínas recombinantes (Enfors et al., 2001).

Por otro lado, aunque existen algunos ejemplos de proteínas producidas en *E. coli* que son secretadas al medio de cultivo, lo cual ha sido logrado mediante el diseño de cepas por ingeniería genética (Ni y Chen, 2009), algunas proteínas expresadas son atrapadas en cuerpos de inclusión (CI) debido a que tienen baja solubilidad. Las proteínas atrapadas en CI normalmente son inactivas o presentan menor actividad y requieren pasos subsecuentes para ser estructuradas correctamente (Graumann y Premstaller, 2006). Sin embargo, debido a que los CI son resistentes a proteólisis y contienen grandes cantidades de material heterólogo, un alto porcentaje de las proteínas recombinantes que se producen a nivel comercial se obtienen a partir de CI, pues su recuperación es sencilla, aunque después la proteína tenga que ser solubilizada, estructurada y purificada (Baneyx y Mujacic, 2004; Sahdev et al., 2008). La producción de proteínas recombinantes a gran escala se ve afectada además por factores intracelulares y extracelulares que impactan la fisiología de los microorganismos. Algunos factores intracelulares que afectan la expresión de proteína recombinante son la sobrecarga metabólica, el estrés originado por el mantenimiento del plásmido y la posible toxicidad de la proteína expresada. Como factores extracelulares se pueden mencionar la acumulación de metabolitos tóxicos, las limitaciones de nutrientes y/o de oxígeno en el medio de cultivo (Graumann y Premstaller, 2006; Chou, 2007). Particularmente, se ha observado que en los cultivos industriales de alta densidad con *E. coli* se presentan problemas de mezclado que originan gradientes de sustrato, tensión de oxígeno disuelto (TOD) y CO₂, los cuales ocasionan el estrés celular. Con la finalidad de comprender el efecto de los factores extracelulares que modifican la fisiología de los microorganismos, se ha buscado estudiar y simular dichos fenómenos a nivel laboratorio mediante la metodología del escalamiento descendente. El objetivo de la simulación de los problemas ambientales sobre la célula, es optimizar el proceso para finalmente implementarlo en los biorreactores de gran escala.

2. ANTECEDENTES

2.1. Heterogeneidades en biorreactores

La presencia de gradientes en biorreactores de gran escala ha sido demostrada experimentalmente midiendo directamente las concentraciones de los sustratos en distintas zonas de tanques de gran escala. Por ejemplo, Schweder y col. (1999) midieron los niveles de RNA mensajero de *E. coli* W3110 en distintas regiones de un biorreactor de 30 m³. Ellos encontraron que los niveles de transcripción de dos genes sensibles a las concentraciones de oxígeno “*frd*” y “*pfl*” fueron mayores en la parte superior y la parte media del biorreactor en comparación con la parte inferior, y atribuyeron este comportamiento a las limitaciones de oxígeno. Además, encontraron que las diferencias en el nivel de transcripción se acentuaron con el aumento de la densidad celular, observando que los cambios suceden en tan solo 13 s. Por otro lado, Bylund y col. (1998) observaron gradientes de sustrato en un biorreactor de 12 m³ operado en lote alimentando en el que analizaron tres zonas del tanque. Las concentraciones de glucosa de la región más lejana, la intermedia y la más cercana a la alimentación fueron de 5, 35 y 2 000 mg/L, respectivamente. Al comparar el comportamiento de los microorganismos en el biorreactor industrial con un biorreactor de nivel laboratorio, observaron una disminución en el rendimiento global de biomasa y un incremento en la formación de acetato, que atribuyeron al sobreflujo metabólico en el biorreactor de gran escala. Sin embargo, un inconveniente de medir solamente algunas zonas del biorreactor es que la información de las heterogeneidades puede resultar incompleta o sesgada (Lidén, 2002). Con la intención de caracterizar mejor las heterogeneidades en el medio de cultivo, se han realizado análisis computacionales de dinámica de fluidos (CFD, por sus siglas en inglés) para caracterizar la presencia de gradientes en biorreactores de gran escala (Nienow, 2009).

En el escalamiento de un proceso del laboratorio a un biorreactor industrial, no es posible mantener constantes todas las variables de operación. Como consecuencia pueden propiciarse condiciones menos favorables de mezclado que originan la disminución en los rendimientos específicos y un aumento en la generación de subproductos no deseados (Schmidt, 2005). Lo anterior se produce porque normalmente la velocidad de agitación no es un criterio de escalamiento, situación que favorece la aparición de heterogeneidades de distintas variables (O'Beirne y Hamer, 2000). Algunos de los gradientes que se presentan a gran escala son de sustrato, pH y de TOD (Enfors et al., 2001). El problema se agrava cuando los biorreactores industriales son operados en forma de lote alimentado debido a que la solución de sustrato altamente concentrada favorece el sobreflujo metabólico y a limitaciones de O₂ debidas a su mayor consumo en estas zonas (Lidén, 2002). Además, la alimentación del sustrato que normalmente se realiza por la zona superior del tanque y el O₂, agregado por la parte inferior, deben recorrer mayores distancias que en un reactor de laboratorio, favoreciendo la aparición de gradientes (Amanullah et al., 2001). Particularmente, la heterogeneidad de TOD se acentúa debido a la baja solubilidad del O₂ en el medio de cultivo y al aumento del consumo de O₂ debido al crecimiento de los microorganismos.

2.2. Consecuencias de la heterogeneidad en la TOD

La presencia de gradientes de TOD en biorreactores de gran escala contribuye a la disminución en los rendimientos de biomasa y con ello a la reducción de la productividad (Schmidt, 2005). La formación de ácidos orgánicos se presenta cuando los microorganismos circulan a través de regiones con limitaciones de oxígeno durante las cuales activan las rutas de fermentación de ácidos mixtos (Xu et al., 1999).

Uno de los subproductos que es excretado al medio de cultivo y que tiene efectos negativos sobre los microorganismos es el acetato (Nakano et al., 1997). El acetato es una molécula con una naturaleza débilmente lipofílica que en la forma protonada puede atravesar la membrana lipídica hacia el interior de la célula en donde se disocia debido al pH intracelular (7.4 - 7.6). Para mantener la homeostasis, *E. coli* utiliza energía para regular el desajuste en el pH (Luli y Strohl, 1990). Como consecuencia, la acumulación de acetato en el medio de cultivo en concentraciones de aproximadamente 0.75 g/L, retarda el crecimiento celular y con ello la generación de biomasa (Contiero et al., 2000; Wong et al., 2009). Por otro lado, se ha reportado que la presencia de ácido fórmico en el medio de cultivo puede disminuir la velocidad de síntesis de RNA, DNA, proteínas, lípidos y pared celular (Cherrington et al., 1990).

2.3. Respuesta al estrés ambiental

En condiciones óptimas de O₂ disuelto, temperatura, nutrientes, solutos y pH, los microorganismos se desempeñan de tal forma que alcanzan las mayores velocidades de crecimiento, rendimientos y productividades. Sin embargo, en un ambiente donde existen heterogeneidades de nutrientes y factores ambientales, el crecimiento de un microorganismo dependerá de su capacidad para percibir y responder a los cambios en su entorno (Boor, 2006). La presencia de algún aceptor final de electrones (O₂, nitrato u otro) en el medio de cultivo induce la respuesta celular que se regula a nivel transcripcional (Unden y Bongaerts, 1997).

2.3.1. Regulación del metabolismo debido a la disponibilidad de O₂

Los cambios en la disponibilidad de O₂ en el medio son una señal importante que activa modificaciones en el metabolismo (Kiley y Beinert, 1999). En ausencia de O₂, *E. coli* realiza una regulación transcripcional mediante la proteína FNR (proteína

reguladora de la reducción del fumarato y nitrato, por sus siglas en inglés) y el sistema de dos componentes ArcAB (sistema de control de la respiración aerobia, por sus siglas en inglés), formado por las proteínas ArcA y ArcB (Konz et al., 1998; Shalel-Levanon et al., 2005). La proteína FNR es activa en condiciones anaerobias y su función es regular el metabolismo energético alterando la expresión de aproximadamente 125 genes involucrados en la fermentación y respiración anaerobia, y reprimiendo la transcripción de genes asociados al metabolismo aerobio (Kiley y Beinert, 1999; Alexeeva et al., 2000). La proteína ArcB está unida a la membrana y en condiciones limitadas de O₂, sufre dos autofosforilaciones. La proteína ArcA, que se encuentra en el citoplasma, es activada cuando uno de los grupos fosfato es transferido a esta proteína (Konz et al., 1998). La proteína ArcA actúa como represor transcripcional de al menos seis enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del ciclo del glioxilato, convirtiendo una ruta metabólica cíclica en una ramificada con la finalidad de reducir la producción de NADH/NADPH (Konz et al., 1998). En condiciones limitadas de O₂, el carbono fluye en una menor velocidad hacia la generación de precursores del TCA utilizados con fines biosintéticos (Guest, 1992).

2.4. Metabolismo facultativo de *E. coli*

El sistema respiratorio de *E. coli* es de carácter modular lo que significa que el microorganismo tiene la flexibilidad de intercambiar los distintos componentes de la cadena respiratoria para adaptarse a diferentes condiciones del medio de cultivo (Stewart, 1988). Las cadenas respiratorias de *E. coli* se componen básicamente de tres elementos: deshidrogenasas, quinonas y reductasas terminales (Figura 2.1.). La cadena respiratoria está ramificada en ambos lados de las quinonas por lo que la célula puede utilizar distintos donadores y aceptores de electrones según la disponibilidad en el medio de cultivo debido a la variedad de deshidrogenasas, quinonas y reductasas terminales (Unden y Bongaerts, 1997). La función de las

deshidrogenasas es oxidar sustratos orgánicos y transferir los electrones a las quinonas, quienes a su vez, proporcionan electrones a las reductasas terminales. La función de las reductasas terminales es reducir al aceptor final de electrones. Los sustratos que *E. coli* puede utilizar como donadores de electrones son formato, glucosa, glicerol, hidrógeno, d y l-lactato, NADH, prolina, piruvato y succinato. Como aceptores finales de electrones, *E. coli* puede utilizar O₂ (respiración aerobia) o bien puede realizar respiración anaerobia si dispone de algún aceptor final de electrones como nitrato, nitrito, fumarato, óxidos azufre y nitrógeno, tetracionato y tiosulfato (Unden y Bongaerts, 1997). Los aceptores finales de electrones son utilizados jerárquicamente de tal forma que cuando en el medio está presente el oxígeno, se reprimen la respiración anaerobia y las rutas de fermentación. En ausencia de oxígeno, el nitrato es el principal aceptor de electrones y reprime otros aceptores y rutas de fermentación. La regulación jerárquica es efectuada a nivel transcripcional sobre las correspondientes reductasas terminales (Unden y Bongaerts, 1997).

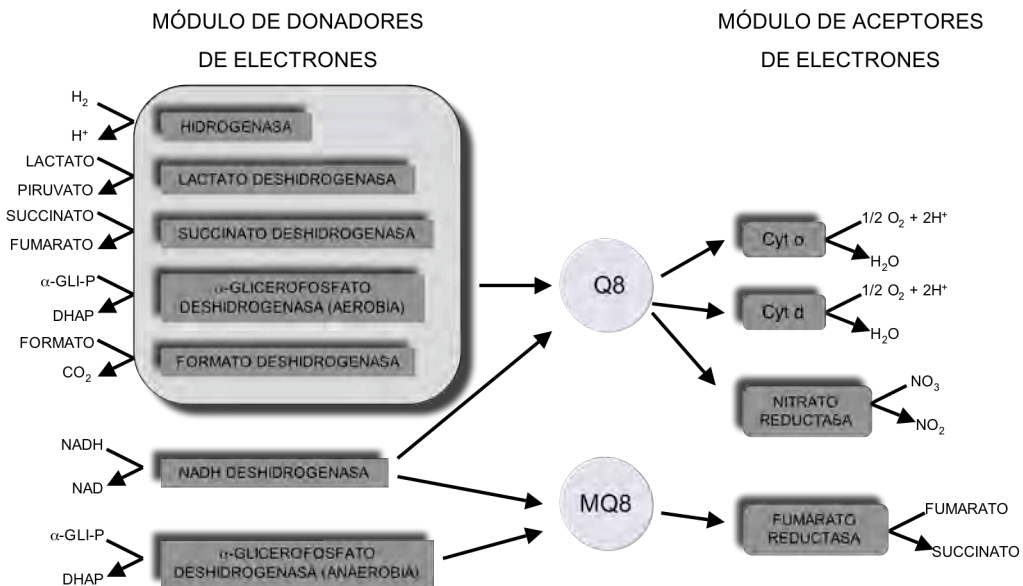


Figura 2.1.- Metabolismo facultativo de *E. coli* debido a la modularidad de las cadenas respiratorias. Q8, ubiquinona; MQ8, menaquinona. Adaptado de Moat y col. (2002).

2.5. Metabolismo aerobio

La respiración aerobia confiere mayores beneficios energéticos con respecto al metabolismo anaerobio en *E. coli*, porque le permite oxidar completamente el sustrato (Green et al., 2009). EL ATP es un nucleótido de alta energía utilizado como combustible en la mayoría de reacciones anabólicas de la célula. El ATP se puede generar por fosforilación a nivel de sustrato o por fosforilación oxidativa. El primer caso ocurre durante el catabolismo de carbohidratos, cuando una molécula de fosfato de alta energía se transfiere directamente de algún metabolito al ADP. En el segundo caso la energía es transferida por medio de un gradiente eléctrico y químico a través de la cadena respiratoria. En estas condiciones, las reductasas terminales pueden ser los complejos citocromo oxidasa “o” y “d” que se utilizan cuando en el medio hay altas y bajas concentraciones de O₂, respectivamente. Una de las funciones importantes de la cadena respiratoria es mantener el balance redox y la regeneración de NAD⁺ a partir de NADH (Shalel-Levanon et al., 2005).

2.5.1. Síntesis aerobia de acetato

En aerobiosis, el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (Lpd-Ace, lipoamida deshidrogenasa dihidrolipoamida acetiltransferasa) transforma el piruvato en Acetil-CoA (Figura 2.2.), que puede ser utilizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ser transformado en acetato mediante las enzimas fosfato acetiltransferasa (Pta) y acetato quinasa (AckA) (De Mey et al., 2007). *E. coli* puede reasimilar el acetato del medio de cultivo para generar Acetil-CoA mediante las mismas enzimas Pta-AckA o por la enzima acetil CoA sintetasa (Acs) (Chang et al., 1999). El mecanismo por el cual se genera el acetato en condiciones aerobias se conoce como sobreflujo metabólico y se origina por el desbalance entre el consumo de glucosa y su transformación en biomasa y productos (Xu et al., 1999). Este fenómeno normalmente ocurre cuando los microorganismos presentan altas

velocidades de consumo de glucosa y el Acetil CoA no es utilizado en el TCA, sino transformado en acetato por las enzimas Pta-AckA (Xu et al., 1999). Además, se ha observado que en cultivos operados en forma de lote alimentado, en los que normalmente se alcanzan altas concentraciones celulares, el mecanismo de sobreflujo es el principal responsable de la acumulación de acetato, al generarse gradientes de glucosa en biorreactores de gran escala (Xu et al., 1999; O'Beirne y Hamer, 2000).

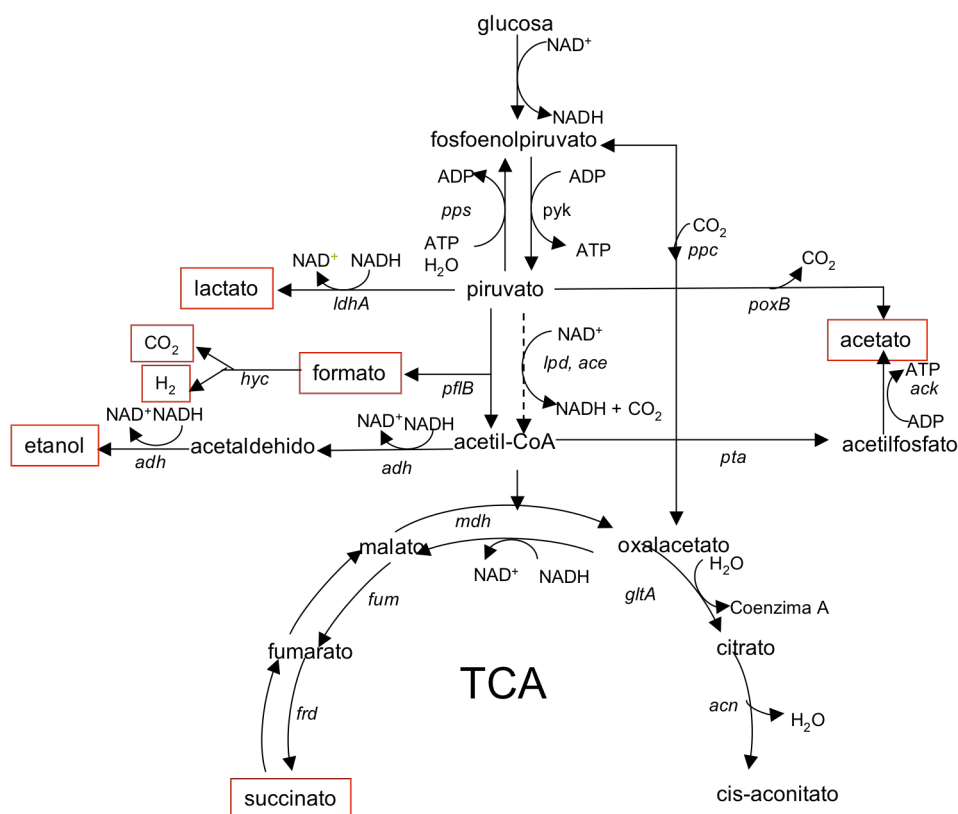


Figura 2.2.- Metabolismo simplificado de *E. coli*. Se presenta una versión reducida de las rutas metabólicas de la glucólisis, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés) y de fermentación de ácidos mixtos. En recuadros se muestran los productos del metabolismo de la fermentación de ácidos mixtos.

2.6. Metabolismo Anaerobio

En ausencia de O_2 , *E. coli* puede utilizar las rutas de fermentación de los ácidos mixtos para contender con las condiciones de cultivo o bien, si existe en el medio un aceptor final de electrones adecuado, realizar respiración anaerobia. Se ha observado

que la síntesis de algunas enzimas clave de las rutas metabólicas de las pentosas fosfato y de Embden-Meyerhof (fosfofructoquinasa, enolasa, gliceraldehído 3-P deshidrogenasa y piruvato quinasa) aumentan cuando la concentración de O₂ disminuye (Stewart, 1988).

2.6.1. Fermentación de ácidos mixtos

Los productos de la ruta fermentativa son: acetato, lactato, formato, succinato, etanol, H₂ y fumarato (Xu et al., 1999). Los productos se sintetizan a partir de piruvato; mientras el succinato se genera a partir de fosfoenolpiruvato (Figura 2.2.). La enzima piruvato formato liasa (PflB), que es susceptible a ser inhibida por O₂, cataliza la ruptura del piruvato en acetil-CoA y formato (Phue y Shiloach, 2005). Además, la expresión de *pfl* es dependiente de la actividad de las enzimas fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa. El formato puede ser excretado al medio de cultivo o puede ser transformado en H₂ y CO₂ por el complejo formato hidrógeno liasa (FHL). Sin embargo, para que se lleve a cabo la reacción se necesita selenio, níquel y molibdeno, que deben agregarse como elementos trazas al medio de cultivo (Soini et al., 2008).

La síntesis de acetato en condiciones anaerobias sucede a partir de acetil-CoA por las enzimas Pta-AckA. En esta reacción se genera un mol de ATP. La enzima piruvato oxidasa (PoxB) también es responsable de la generación de acetato a partir de piruvato, en condiciones anaerobias (Phue y Shiloach, 2005). Al respecto, se ha encontrado que el nivel de transcripción de *poxB* es dependiente de la concentración de O₂ disuelto, siendo mayor en condiciones limitadas de O₂, en tanto que los genes *pta-ack* se expresan menos cuando en el medio disminuye la concentración de O₂ disuelto (Phue y Shiloach, 2005). La enzima PoxB participa principalmente en el crecimiento aerobio de *E. coli* durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Abdel-Hamid et al., 2001; Phue y Shiloach, 2005). La enzima PoxB

también puede participar en la cadena respiratoria al transferir electrones del piruvato a la ubiquinona mediante la descarboxilación del piruvato (Causey et al., 2004). También se ha reportado que la enzima PoxB está involucrada en mecanismos de detección de estrés ambiental, como detección de limitaciones de carbono y la transición entre condiciones aerobias y anaerobias (Lara et al., 2006b).

La formación de piruvato a partir de glucosa genera dos moléculas de NADH y dos de ATP (figura 2.2.). Con la intención de mantener el flujo glucolítico en condiciones anaerobias, algunas de las rutas metabólicas de los ácidos mixtos tienen la finalidad de regenerar el NAD^+ . La enzima lactato deshidrogenasa (LdhA) es la encargada de producir lactato a partir de piruvato, reacción en la que es regenerado el NAD^+ . El etanol es generado por las enzimas acetaldehído deshidrogenada y etanol deshidrogenasa, que respectivamente transforman el acetil-CoA en acetaldehído y finalmente en alcohol. En las dos reacciones es regenerado el NAD^+ . El succinato se produce a partir de fosfoenolpiruvato después de una serie de reacciones durante las cuales también se regenera el poder reductor. El primer paso para la generación de succinato requiere de CO_2 que, de no ser suministrado al sistema por una fuente externa, principalmente se obtiene de la reacción catalizada por el complejo FHL (Xu et al., 1999).

2.6.2. Respiración anaerobia

La naturaleza modular de la cadena respiratoria de *E. coli*, le permite aprovechar cualquiera de los aceptores finales de electrones según se encuentren disponibles en el medio de cultivo. En particular, la cadena respiratoria anaerobia, donde se utiliza nitrato como aceptor final de electrones, se asemeja a la cadena respiratoria aerobia en que se regenera NAD^+ (Unden y Bongaerts, 1997). La reacción es catalizada por la enzima nitrato reductasa (NarA), quien es responsable de reducir el nitrato a nitrito, acoplando la oxidación de NADH (Stewart, 1988). La mayor parte de la

energía resultante es conservada como fuerza protón motriz, que es utilizada en la generación de ATP, transporte de solutos y otros procesos celulares (Stewart, 1988). La expresión del gen que codifica la proteínas NarA es regulada por FNR en anaerobiosis (Green et al., 2009). Las moléculas que pueden funcionar como donadores de electrones para NarA son el formato, NADH e hidrógeno (Unden y Bongaerts, 1997). Se ha observado que la presencia de nitrato hace superfluas la mayoría de las rutas de fermentación de ácidos mixtos.

2.7. Escalamiento descendente

La metodología de escalamiento descendente fue propuesta por Oosterhuis y consiste en simular en el laboratorio los problemas que ocurren a nivel industrial (Oosterhuis, 1984). Los pasos que forman a la metodología de escalamiento descendente son el análisis de régimen, simulación, optimización y finalmente implementación en biorreactores de gran escala. El análisis de régimen es una aproximación práctica para predecir la existencia de gradientes en biorreactores y consiste en determinar los tiempos característicos de un sistema, con la finalidad de establecer si existen condiciones limitantes en un proceso al comparar un fenómeno físico con un fenómeno biológico (Lara et al., 2006a). Los tiempos característicos se definen como la capacidad dividida por el flujo de un subproceso en particular. Para determinar los tiempos característicos es necesario conocer la configuración del biorreactor así como los modelos físicos y de las reacciones biológicas (Palomares y Ramírez, 2000). El tiempo característico de consumo de O_2 (t_{O_2u}) se define como el tiempo necesario para que un cultivo consuma el O_2 disuelto con la saturación en la fase gaseosa y representa el fenómeno biológico. Por otro lado, el fenómeno físico puede estar dado por el tiempo de circulación (t_c) que es el tiempo que transcurre para que un elemento de fluido ó célula circule a través del biorreactor desde un punto arbitrario hasta regresar a él. Cuando el t_{O_2u} es menor o de la misma magnitud que el t_c es posible suponer que en el medio de cultivo se presentarán gradientes de

O₂. Algunas de las correlaciones utilizadas para estimar el t_c promedio son las siguientes (Luyben, 1993):

$$t_c = t_m / 4 \qquad t_c = V/Q_i$$

En las ecuaciones t_m es el tiempo de mezclado (tiempo necesario para alcanzar la homogeneidad después de perturbar el sistema), V es el volumen del biorreactor y Q_i es la capacidad de bombeo de los impulsores. El rango de t_c en biorreactores de escala industrial con medios de cultivo de baja viscosidad y de fluidos Newtonianos, varía de 3 a 60 s (Vrábel et al., 2000; Amanullah et al., 2004; Palomares et al., 2009).

La simulación de gradientes dentro del escalamiento descendente se ha realizado utilizando distintas configuraciones. Algunos de ellos consisten en sistemas de un solo reactor de tanque agitado (STR, por sus siglas en inglés), aunque los mas frecuentes son los sistemas de dos STR interconectados y sistemas de STR conectado a un reactor de flujo pistón (PFR, por sus siglas en inglés) (Lara et al., 2006a; Neubauer y Junne, 2010). En los sistemas donde se controla la variable en un solo STR, todas las células experimentan condiciones de limitación y exceso de sustrato al mismo tiempo (Amanullah et al., 2004). Los sistemas de escalamiento descendente se basan en la idea de que los microorganismos oscilan o fluctúan al azar para reproducir los flujos a gran escala (Delvigne, 2009). En la tabla 1 se mencionan algunos ejemplos de estudios de escalamiento descendente.

Tabla 1.- Estudios de escalamiento descendente

Sistema / gradiente	Cepa	Observación	Referencia
STR-STR / TOD	<i>G. oxydans</i>	Propuso la metodología de escalamiento descendente. Diseñó un sistema de dos reactores de tanque agitado interconectados donde estudió el efecto de las limitaciones de oxígeno con t_c de 117-131s.	Oosterhuis et al., 1984.
STR-PFR / Sustrato	<i>S. cerevisiae</i>	Estudió el efecto de los gradientes de sustrato en un sistema STR-PFR. Encontró que la concentración de biomasa disminuyó 6% con	George et al., 1993.

STR-STR/ TOD	<i>B. subtilis</i>	respecto al control. Utilizó un sistema STR-STR para simular gradientes de TOD en un rango de t_c de 15 a 300s. Observó que la μ y la X_{max} disminuyeron 50 y 23% entre un cultivo aerobio y uno oscilado con t_c de 120 s.	Amanullah, 1994.
STR-PFR / Sustrato, TOD	<i>E. coli</i> W3110	Evaluaron los niveles de mRNA de distintos genes en un sistema STR-PFR de 20 m ³ . Observaron un aumento en el nivel de transcripción de genes relacionados con estrés ambiental y genes relacionados con limitaciones de O ₂ .	Schweder et al., 1999.
STR-PFR / Sustrato, TOD	<i>E. coli</i> W3110	Compararon cultivos en biorreactores de 30 m ³ con uno de escala laboratorio. Observaron que el rendimiento de biomasa fue 12% menor en el biorreactor de gran escala, así como la acumulación de ácidos orgánicos.	Xu et al., 1999.
STR-PFR / Sustrato, TOD	<i>E. coli</i> W3110	Evaluaron la viabilidad por citometría de flujo en distintas configuraciones del sistema de escalamiento descendente. El rendimiento de biomasa fue 35% menor en un biorreactor de 30 m ³ con respecto a uno de 5L, pero la viabilidad fue 15% mayor.	Hewitt et al., 2000.
STR-PFR / Sustrato, TOD	<i>E. coli</i> W3110 rhGH	Estudiaron cultivos de una cepa de <i>E. coli</i> que expresa rhGH en un sistema operado en lote alimentado. Observaron que disminuyó la concentración de biomasa, aumentó la lisis celular y se mejoró la calidad de la proteína recombinante.	Bylund et al., 2000.
STR-PFR / pH	<i>B. subtilis</i>	Utilizaron un sistema de dos compartimentos para simular gradientes de pH. Se determinó que tiempos de mezclado de 60 s o mayores, afecta la formación de producto, aunque no la concentración de biomasa.	Amanullah et al., 2001.
STR-PFR / Sustrato, TOD, pH	<i>E. coli</i> W3110	Evaluaron cultivos con distintas configuraciones de STR-PFR. Simularon gradientes de glucosa, TOD y pH en un STR de 5 L conectado a un PFR, y obtuvieron concentraciones similares de biomasa y viabilidad a los de un biorreactor de 20 m ³ .	Onyeaka et al., 2003.
STR-STR / TOD	<i>E. coli</i> W3110 PPI	Simularon gradientes de TOD en un sistema STR-STR operado con t_c de 20, 50, 90 y 180s. Observaron la disminución en los rendimientos de biomasa y proteína recombinante con el aumento del t_c .	Sandoval-Basurto et al., 2004.
STR-STR / TOD	<i>E. coli</i> W3110	Evaluaron los niveles transcripcionales de 21 genes de una cepa de <i>E. coli</i> que expresa GFP, en un sistema que simula gradientes de TOD con un t_c de 50s.	Lara et al., 2005.
STR-STR / TOD	<i>E. coli</i> W3110, VAL22, VAL23, VAL24-	Diseñaron y evaluaron cepas genéticamente modificadas con la intención de evitar la canalización de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos. La cepa VAL24-pV21 (<i>poxB</i> ⁻ , <i>ldhA</i> ⁻ , <i>pf1B</i> ⁻) tuvo un desempeño similar en cultivos	Lara et al., 2006b.

STR-PFR / Sustrato, TOD, pH	pV21 <i>E. coli</i> Proteína de mamífero	oscilados con t_c de 50 s y aerobios. Evaluaron viabilidad por citometría de flujo en cultivos de alta densidad operados en lote alimentado. Encontraron que la cepa inducida con IPTG en el sistema STR-PFR, alcanzó menor rendimiento de biomasa y se observó formación de cuerpos de inclusión.	Hewitt et al., 2007.
STR-PFR / Sustrato, TOD	<i>E. coli</i> prpoS::GFP	En un sistema STR-PFR se evaluó la respuesta al estrés de una cepa de <i>E. coli</i> . Determinaron por citometría de flujo que una fracción de la población pierde la capacidad de respuesta al estrés cuando se altera la eficiencia de mezclado	Delvigne et al., 2009.

En general, los principales efectos fisiológicos sobre los microorganismos que se han observado por la simulación de heterogeneidades durante el escalamiento descendente, son la disminución de las velocidades específicas de crecimiento y la reducción en los rendimientos y productividades del producto de interés (Amanullah, 1994; Xu et al., 1999; Bylund et al., 2000; Sandoval-Basurto et al., 2004). Otros parámetros que se han estudiado en las simulaciones de escalamiento descendente son la respuesta metabólica, la viabilidad celular y los niveles de transcritos de distintos genes los cuales se ven afectados por gradientes de TOD como por ejemplo *poxB*, *ldhA* y *pflB* (Enfors et al., 2001; Lara et al., 2005; Delvigne et al., 2009).

Los sistemas STR-PFR se han utilizado preferentemente para simular las condiciones que experimentan los microorganismos en cultivos de gran escala operados en forma de lote alimentado, donde se induce el sobreflujo metabólico. En estos sistemas además se observan limitaciones locales de TOD en la sección del PFR debido al mayor consumo de sustrato (que es alimentado en este punto) y de oxígeno (Xu et al., 1999; Hewitt et al., 2000; Bylund et al., 2000). Sin embargo, los gradientes de TOD se han estudiado satisfactoriamente en sistemas de dos STR, en los que es posible controlar las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis en cada compartimento mediante la inyección de mezclas de gases. Las células se hacen circular a través de las dos zonas simulando las condiciones que se experimentarían

en un reactor de gran escala (Oosterhuis et al., 1983; Amanullah, 1994; Sandoval-Basurto et al., 2005; Lara et al., 2006b). Por ejemplo, Amanullah (1994) estudió el efecto de gradientes de O₂ sobre una cepa de *Bacillus subtilis* en un sistema STR-STR en un rango de t_c de 15 a 300 s. Se observó que en los cultivos con t_c de 120 s, la concentración máxima de biomasa y la velocidad específica de crecimiento disminuyeron 23% y 50% respectivamente, comparado con cultivos aerobios control. Recientemente, se estudió el efecto de gradientes de O₂ mediante la variación en los t_c (20, 50, 90 y 180 s) en el cultivo de una cepa de *E. coli* W3110 que produce un precursor híbrido de la insulina humana, en un sistema de dos compartimientos, uno con condiciones de aerobiosis y otro en condiciones anaerobias (Sandoval-Basurto et al., 2005). Se determinó que la velocidad específica de crecimiento, biomasa y rendimiento de producto disminuyeron al aumentar el t_c. También, se encontró que la acumulación de ácidos orgánicos se presenta desde t_c de 20 s en los que el tiempo de exposición a condiciones anaerobias fue de 13.3 s (Sandoval-Basurto et al., 2005).

2.8. Estrategias para contender con los gradientes de TOD

Con la finalidad de evitar los efectos negativos provocados por las condiciones heterogéneas de cultivo sobre el desempeño de los microorganismos y la expresión de proteínas recombinantes, se han ideado diferentes estrategias para optimizar los procesos. Algunas estrategias propuestas inciden sobre las variables de operación del proceso como la remoción de algún metabolito del medio, el diseño de biorreactores con múltiples entradas de sustratos para evitar sobreflujo metabólico y el uso de fuentes de carbono diferentes a glucosa. Por ejemplo, Wong y col. (2009) utilizaron un sistema de electrodiálisis para remover el acetato del medio de cultivo de *E. coli* en biorreactores operados en lote y lote alimentado, mejorando con ello la producción de proteína recombinante y aumentando la velocidad específica de crecimiento. Por su parte, Aristidou y col. (1999) utilizaron fructosa como fuente de

carbono en cultivos de *E. coli* GJT001 en matraz y biorreactor, observando una menor acumulación de acetato y un incremento de 65% en el rendimiento de proteína recombinante. Para evitar los efectos tóxicos de la acumulación de formiato en el medio de cultivo sobre los microorganismos, Soini y col. (2008) agregaron selenio, níquel y molibdeno a la solución de elementos trazas para eliminar el metabolito, a través de su transformación en H₂ y CO₂ por el complejo FHL. Sin embargo, un inconveniente de esta última estrategia es que no se evita el uso de carbono en la formación de ácidos orgánicos.

Otra estrategia para evitar los efectos adversos de los gradientes, es la modificación genética de microorganismos para hacerlos menos sensibles a las condiciones adversas de cultivo, mediante la tecnología del DNA recombinante (Lidén, 2002). Algunas de las modificaciones genéticas que se han estudiado, incluyen la reducción del consumo de glucosa en la célula mediante la eliminación del sistema fosfotransferasa (PTS), eliminar las rutas metabólicas responsables de la síntesis de los ácidos orgánicos y desviar la fuente de carbono hacia la generación de otros productos o al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Eiteman y Altman, 2006; De Anda et al., 2006; Lara et al., 2006b; De Mey et al., 2007; Chou, 2007; Wong et al., 2008). Por ejemplo, Wong y col. (2008) eliminaron el operón *ptsHI* en una cepa de *E. coli* GJT001 para reducir la velocidad de consumo de glucosa y con ello evitar la acumulación de acetato por sobreflujo metabólico.

Recientemente, se estudió la respuesta transcripcional de 21 genes (algunos de los cuales pertenecen a las rutas de fermentación de ácidos mixtos) frente a gradientes de O₂ disuelto en un sistema de dos compartimientos operado con un t_c de 50 s y con mayor tiempo de exposición de las células a condiciones anaerobias (33 s) (Lara et al., 2005). Se observó que las células desvían su metabolismo a rutas anaerobias bajo estas condiciones. Lara y col. (2005), expresaron GFP (proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés) en la cepa *E. coli* W3110-pV21, encontrando

un decremento en la producción de proteína recombinante en comparación con cultivos aerobios con TOD constante a 10%. El plásmido pV21 contiene el gen que codifica para la proteína GFP. La velocidad específica de crecimiento se redujo 30% y la velocidad específica de consumo de glucosa se incrementó 3 veces con relación al control (Lara et al., 2006b). La disminución en la producción de biomasa y de la tasa específica de crecimiento, se relacionó con la producción de ácidos orgánicos. Considerando los resultados obtenidos de la evaluación de la cepa W3110-pV21, se construyeron tres cepas mutantes con la idea principal de mejorar su comportamiento en cultivos bajo condiciones oscilantes de O₂ (Lara et al., 2006b). Las cepas construidas fueron: VAL22 con una mutación en el gen *poxB*, VAL23 doble mutante (suprimidos los genes *ldhA*⁻ y *pflB*⁻) y VAL24-pV21 triple mutante (*poxB*⁻, *ldhA*⁻ y *pflB*⁻) (figura 2.2). Las cepas fueron evaluadas con un t_c de 50 s, encontrando que la cepa triple mutante utilizó menor cantidad de carbono para la formación de ácidos orgánicos comparado con la cepa W3110-pV21, al disminuir la formación de acetato y eliminándose la generación de lactato y formato (Lara et al., 2006b).

2.9. Viabilidad celular

El análisis del potencial de membrana en una célula bacteriana permite determinar el estado energético, metabólico y la integridad física de la membrana celular (Shapiro, 2000). El potencial de membrana se genera en las células por la diferencia de concentración de algunos iones como sodio, potasio, cloro e hidrógeno, en lados opuestos de la membrana celular que se mantiene por la acción de distintas bombas eléctricas y canales iónicos. Se ha establecido por convención que el interior de las bacterias tiene un potencial de membrana de entre -100 a -200 mV (Shapiro, 2000). Cuando el potencial de membrana se reduce a cero, se ha sugerido que la membrana se permeabiliza y presenta agujeros que permiten el libre flujo de materia, preferencialmente iones. Bajo estas condiciones se considera que la célula está

muerta, es decir que no es viable (Nebe-von Caron et al., 1998). El Yoduro de Propidio (PI) se utiliza para determinar la permeabilización de la membrana celular. El PI tiene una doble carga positiva en un grupo N-alcalino de isopropilo, que le permite intercalarse entre las cadenas de ADN (Nebe-von Caron et al., 1998).

Con la intención de establecer si la dinámica de fluidos, asociados con los procesos de agitación y aireación podría tener algún efecto sobre la fisiología de *E. coli* W3110, Hewitt y col. (1998), evaluaron distintas condiciones en biorreactores de 5 L. Una vez alcanzado el estado estacionario, variaron la agitación (de 400 rpm hasta 1200 rpm) y la aireación (1 vvm hasta 3 vvm), en ambos casos por periodos de 7 h. El estado fisiológico de las células al principio, a la mitad y al final de los cultivos se determinó por citometría de flujo. Ellos encontraron que ninguna de las modificaciones de las condiciones de operación presentaron efectos negativos sobre la viabilidad celular. En otros estudios se ha evaluado la viabilidad celular en sistemas de escalamiento descendente STR-PFR y en biorreactores industriales de 30 m³, observando que la viabilidad no disminuye por debajo de 90% (Hewitt et al., 2000; Onyeaka et al., 2003). Sin embargo, recientemente se reportó que la viabilidad de una cepa de *E. coli* que expresa una proteína heteróloga inducida con IPTG, disminuyó hasta 82% en un sistema de escalamiento descendente STR-PFR (Hewitt et al., 2007).

2.10. La proteína verde fluorescente (GFP) como modelo de estudio

La GFP se ha utilizado ampliamente para investigación en distintos campos de la biotecnología, debido a que presenta características particularmente favorables. Algunas de ellas son la estabilidad, su tamaño que es de aproximadamente 27 kDa, su manejo relativamente sencillo, no representa una gran carga metabólica para el microorganismo hospedero y es posible cuantificarla por la intensidad de la fluorescencia (Kang et al., 2002; March et al., 2003). Además, se ha utilizado como

proteína reportera con diferentes objetivos como monitorear la expresión de un gen, evaluar la viabilidad y detectar bacterias en un medio (Feilmeier et al., 2000). Recientemente se utilizó la expresión de GFP bajo el promotor de la nitrato reductasa (*nar*) en una cepa de *E. coli*, con la intención de detectar limitaciones de oxígeno en biorreactores (García et al., 2009).

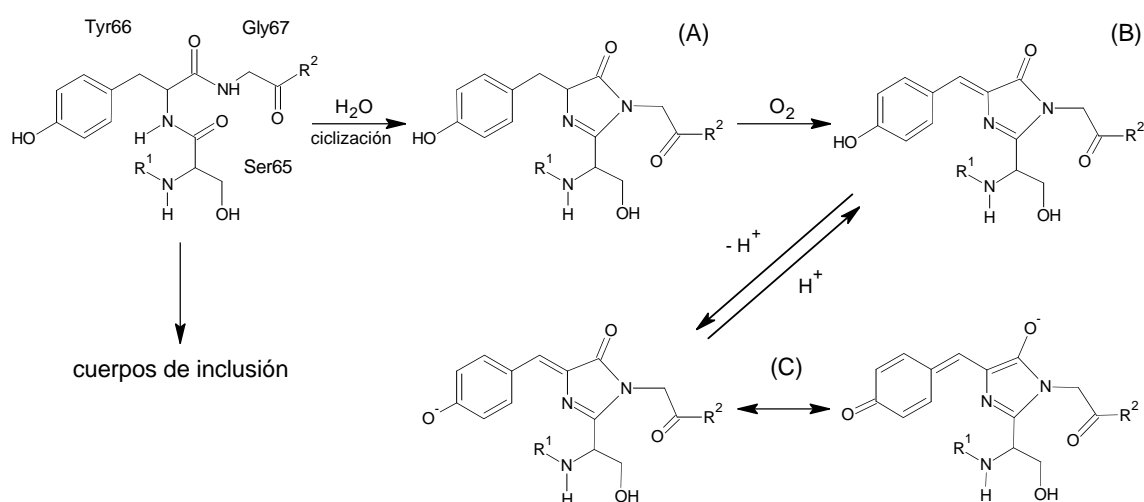


Figura 2.3.- Reacciones de maduración de GFP. La proteína sintetizada puede ser atrapada en cuerpos de inclusión o permanecer soluble en el citoplasma sin fluorescencia (A). Posteriormente el O_2 participa en la maduración del cromóforo (B). La GFP podrá excitarse a distinta longitud de onda dependiendo de si está o no protonada (C). Adaptado de Heim y col. (1994).

La GFP es una proteína de 238 aminoácidos aislada de la medusa *Aequorea victoria* (Yang et al., 1996). El cromóforo se genera por la ciclización y oxidación de los aminoácidos Ser-Tyr-Gly ubicados en las posiciones 65 a 67 (Figura 2.3.). La GFP inicialmente sintetizada puede ser atrapada en cuerpos de inclusión en donde se ha demostrado que puede presentar fluorescencia (García-Fruitós et al., 2005). Si no es atrapada en cuerpos de inclusión, puede permanecer como una proteína soluble sin fluorescencia, hasta que el O_2 actúe sobre la tirosina de la posición 66 y se ensamble el cromóforo, sin requerir de enzimas o cofactores adicionales. Si el cromóforo está protonado puede excitarse a 395 nm mientras que si se encuentra desprotonado puede excitarse a 475 nm (Figura 2.3.). En cultivos de microorganismos que expresan GFP y donde se establecen condiciones de anaerobiosis se ha observado la

presencia de proteína soluble pero no fluorescente (Heim et al., 1994). Con la finalidad de incrementar la fluorescencia de la proteína recombinante GFP en cultivos operados bajo condiciones microaerobias, Kang y col. (2002) co-expresaron la hemoglobina de *Vitreoscilla* sp. (VHb) en dos cepas de *E. coli* (BL21 y W3110) que se utilizan en la industria. Ellos encontraron que la fluorescencia específica de GFP fue mayor en las cepas que co-expresaban hemoglobina con respecto a las cepas nativas. Atribuyeron los resultados al incremento en el consumo de O₂ en las cepas con VHb que repercutió en una mejor transferencia de O₂ a la GFP necesario para la maduración del cromóforo.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismos genéticamente modificados con la finalidad de producir menores cantidades de ácidos orgánicos en cultivos donde se presentan heterogeneidades en la concentración oxígeno, permitirá operar los biorreactores bajo condiciones de menor agitación y por lo tanto menos costosas, sin que con ello se observe un detrimento de la productividad.

4. HIPÓTESIS

En condiciones oscilantes de oxígeno, la cepa de *E. coli* VAL24-pV21 (*poxB*⁻, *ldhA*⁻, *pflB*⁻) será capaz de producir mayor cantidad de proteína recombinante con respecto a la cepa W3110-pV21, debido a que las modificaciones genéticas evitarán la acumulación de acetato, lactato y formato, y el carbono podrá ser utilizado para la formación de GFP.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento de las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 cuando son sometidas a condiciones oscilantes de oxígeno utilizando un sistema de escalamiento descendente de dos reactores de tanque agitado.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento, consumo de sustrato, producción de metabolitos extracelulares y producción de GFP de las cepas de *E. coli* VAL24-pV21 y W3110-pV21, cultivadas con tiempos de circulación de 50, 100 y 150 s.
- Determinar el efecto de las oscilaciones de O₂ sobre la viabilidad celular y la expresión de GFP por citometría de flujo.
- Comparar los parámetros cinéticos y estequiométricos para las dos cepas en las distintas condiciones de cultivo.
- Utilizar nitrato como aceptor final de electrones en los cultivos oscilados con t_c de 100 s para la cepa VAL24-pV21.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas bacterianas y plásmido

En el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *E. coli* que pertenecen a la colección del laboratorio del Dr. Octavio T. Ramírez, IBt-UNAM, y cuya construcción se ha descrito previamente (Lara et al., 2006b). La cepa VAL24-pV21 es una triple mutante derivada de *E. coli* W3110 que tiene interrumpido el gen *poxB* y eliminados los genes *pflB* y *ldhA*, responsables de la generación de acetato, formato y lactato respectivamente. La cepa W3110-pV21 se utilizó para realizar los cultivos de referencia que se compararon con los resultados de la cepa VAL24-pV21. Las dos cepas contienen el plásmido pV21. El plásmido tiene una copia del gen que expresa la proteína SuperGlo GFP, que está bajo el control del promotor *lacZ*, cuenta con un gen de resistencia a espectinomicina y es inducible con IPTG (Lara et al., 2006b). En algunos experimentos se utilizó como control una cepa nativa de *E. coli* W3110 sin transformar con el plásmido pV21. Dicha cepa pertenece a la colección del Dr. Francisco Bolivar Zapata, IBt-UNAM.

6.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo experimental en este trabajo fue un medio mineral con glucosa. El medio se preparó con agua destilada y tuvo la siguiente composición (g/L): glucosa 5.0; Na₂SO₄, 2.0; (NH₄)₂SO₄, 2.7; NH₄Cl, 0.5; K₂HPO₄, 14.6; NaH₂PO₄*H₂O, 4.0; citrato de sodio, 1.0; tiamina 0.01. El pH se ajustó a 7.0 +/- 0.1 con HCl 2N. Además, se agregó MgSO₄ en una concentración de 0.4 g/mL. La composición de la solución de minerales traza fue (g/L): CaCl₂*H₂O, 0.74; ZnSO₄*7H₂O, 0.18; MnSO₄*H₂O, 0.1; Na₂EDTA, 20.1; FeCl₃*6H₂O, 16.7; CuSO₄*5H₂O, 0.1; CoSO₄*7H₂O, 0.21. Se agregó 1.2 mL de solución de sales traza. Las soluciones de glucosa, MgSO₄ y solución de sales traza se esterilizaron por

separado, en tanto que el medio mineral se esterilizó en el biorreactor a 121°C por 20 minutos. Se prepararon soluciones de espectinomicina, tiamina y del inductor isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), de las que se tomaron alícuotas para obtener una concentración final de 100 mg/L, 10mg/L y 0.5mM, respectivamente. Estas soluciones se esterilizaron por filtración con membrana de 0.22 μ m. Los cultivos con nitrato se realizaron utilizando el medio de cultivo con la misma composición pero se agregó NaNO₃ para obtener una concentración final de 50 mM. El NaNO₃ se agregó al medio mineral y se esterilizó en el biorreactor.

6.3. Banco celular e inóculo

Los bancos celulares se construyeron cultivando las cepas en medio LB. En condiciones de esterilidad, se agregaron a los crioviales 0.4 mL de una solución de glicerol al 50% y 0.6 mL de medio de cultivo. Los crioviales se conservaron en congelación a -70 °C. Los cultivos con los que se inocularon los biorreactores para los distintos experimentos, se realizaron en matraces de 500 mL con mamparas y 100 mL del medio antes descrito. Los matraces se incubaron a una temperatura de 37 °C y con agitación de 175 rpm. Con la intención de eliminar los metabolitos extracelulares, la biomasa usada como inóculo fue lavada centrifugando a 10,400 g a 4 °C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la biomasa en 20 - 30 mL de medio mineral fresco.

6.4. Sistema de escalamiento descendente

El sistema de escalamiento descendente que se utilizó para simular gradientes de TOD, se construyó según lo descrito por Sandoval-Basurto y col. (2005). Se utilizaron dos biorreactores de tanque agitado (sistema STR-STR) con jarras de 1L (New Brunswick Scientific Co., Inc, BioFlo 110) equipados con dos turbinas de seis paletas tipo Rushton y baffles (Figura 4.1). La recirculación del medio de cultivo se realizó en jarras interconectadas con mangueras de baja permeabilidad al O₂ tipo

Tygon (Masterflex, 06419-35), fijadas a puertos en las tapas de los biorreactores (Figura 6.1.). Se utilizó una bomba peristáltica con doble cabezal (MasterFlex, Easy-Load I/P modelo 77601-10) para manipular el flujo de recirculación requerido para simular los distintos t_c evaluados en este trabajo (Tabla 2). En un tanque se controló la TOD a 0% alimentando nitrógeno únicamente para mantener las condiciones de anaerobiosis mientras que en el otro tanque se controló la TOD en 10% por mezcla de gases (aire y nitrógeno).

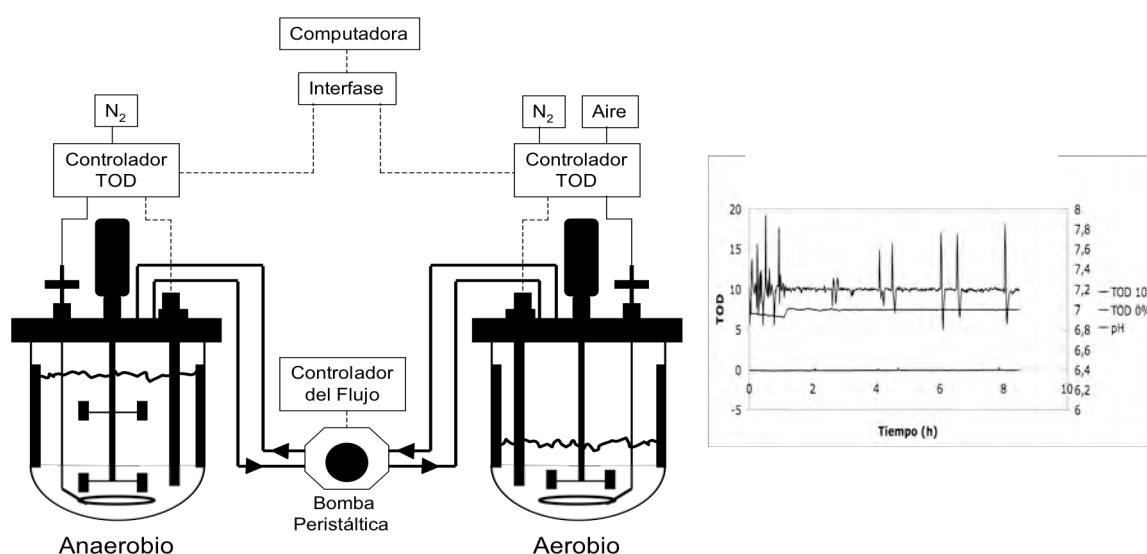


Figura 6.1.- Sistema de escalamiento descendente para simular gradiente de O₂. El medio de cultivo se recircula a través de los dos compartimentos donde se controlan condiciones aerobias y anaerobias mediante mezcla de gases. Además, se presenta el perfil típico de control de TOD y pH de los cultivos.

En ambos reactores los gases se alimentaron a 0.5 VVM y con agitación de 500 rpm. El volumen del biorreactor anaerobio se mantuvo en 800 mL mientras que en el aerobio fue de 400 mL. Se adaptaron electrodos para determinar la TOD (Mettler Toledo, InPro6820/12/120) y pH (Mettler Toledo, 405-DPAS-SC-K8S/120). El pH fue controlado automáticamente a 7.0 +/- 0.1 con NaOH 2 M. Las condiciones de operación se monitorearon a través de una interfase conectada a la computadora con el programa BioCommand, lo que permitió medir en línea el comportamiento de los cultivos. Las variables monitoreadas en línea fueron velocidad de agitación, temperatura (37°C), pH y TOD. En el transcurso del cultivo y por intervalos de

tiempo se tomaron muestras directamente del biorreactor que fueron conservadas por congelamiento.

Tabla 2- Tiempos de residencia promedio (t_{rp}) y flujo establecido (F) en la bomba peristáltica.

t_c (s)	t_{rp} aerobio (s)	t_{rp} anaerobio (s)	F (L/min)
50	17	33	1.44
100	33	66	0.72
150	50	100	0.48

6.5. Métodos analíticos

6.5.1. Cuantificación de la concentración celular

El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica (DO) de 1 mL de muestra mediante un espectrofotómetro (Beckman DU 610) con luz visible a 600 nm. Se consideró un rango de confiabilidad hasta 0.6 DO y cuando las lecturas resultaron mayores a este valor se hicieron diluciones con agua destilada. Los valores de DO se transformaron a concentraciones de biomasa con base en una curva estándar. La curva se construyó con cultivos aerobios en biorreactor de los que se tomaron muestras periódicamente. En tubos de 1.5 mL puestos a peso constante previamente, se concentraron 6 mL de medio y se centrifugaron a 11,300 g por 10 minutos. Las células se lavaron con solución isotónica (NaCl 0.9%). Los sobrenadantes se desecharon y la biomasa se secó en estufa a 70°C. Se pesaron los tubos y se calculó la concentración de biomasa restando el peso inicial de los tubos. Se construyeron curvas estándar para cada cepa.

6.5.2. Cuantificación de metabolitos extracelulares

La cuantificación de acetato, lactato, formato, piruvato y etanol que se acumularon a lo largo de las cinéticas, así como la de glucosa, se realizó por cromatografía de

líquidos de alta resolución (HPLC Waters Milford, MA). En la tabla 3 se muestran los tiempos de retención típicos para los distintos metabolitos y en la figura 6.2. las curvas patrón de los metabolitos.

Tabla 3.- Tiempos de retención (Tr) y pendientes calculadas por regresión lineal para la cuantificación de metabolitos extracelulares por HPLC

Metabolito	Tr (min)	Pendiente
Piruvato	10.9	6.0 E-6
Glucosa	11.5	4.0 E-6
Lactato	15.2	9.0 E-6
Formato	16.4	4.0 E-6
Acetato	17.8	7.0 E-6
Etanol	24.9	2.0 E-6

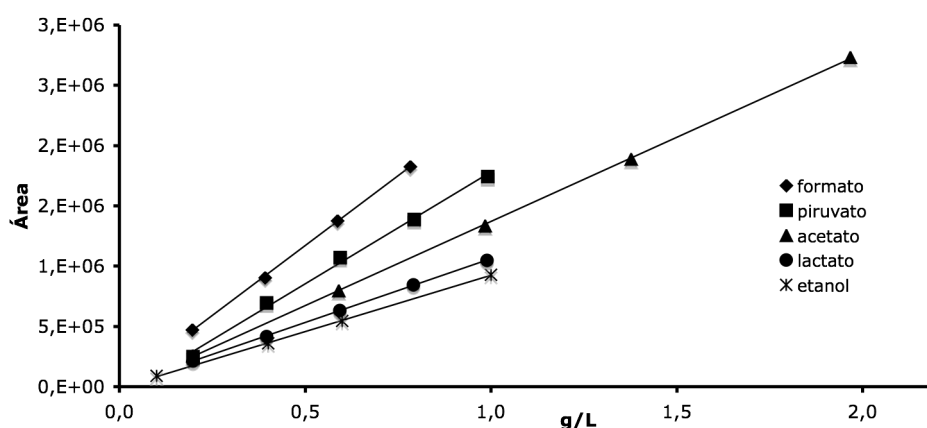


Figura 6.2.- Curvas estándar típicas para la cuantificación de metabolitos por HPLC. Para simplificar la gráfica los valores de área de piruvato se dividieron entre 10 y los valores de etanol se multiplicaron por 10.

Para la cuantificación de la glucosa y el etanol se utilizó un detector de índice de refracción (Waters, 2414) y para los ácidos orgánicos el detector fue de arreglo de fotodiodos (Waters, 2996). Las muestras fueron centrifugadas a 9,600 g por 7 minutos, se recuperó el sobrenadante y se filtró con membrana de 0.45 μm (GHP Acrodisc 13). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (BioRad Hércules, CA). La fase móvil fue H_2SO_4 5 mM, con un flujo de 0.5 mL/min con una temperatura de 50°C. Se construyeron curvas estándar para cuantificar cada uno de los metabolitos, relacionando el área bajo la curva con la concentración a partir de los

cromatogramas obtenidos y con ayuda del programa Empower (Waters Milford, MA).

6.5.3. Análisis de la fluorescencia total de GFP

El análisis de fluorescencia total de GFP se realizó con un fluorímetro (PerkinElmer LS55 Luminescence Spectrometer), midiendo a una longitud de onda de excitación de 480 nm y la de emisión de 507 nm, como ha sido reportado (Lara et al., 2005). Los resultados reportados por el equipo se obtuvieron como unidades de intensidad de fluorescencia (IF-GFP). Se consideraron valores de IF-GFP hasta 300 unidades y cuando fueron mayores se hicieron diluciones con agua destilada.

6.5.4. Cuantificación de GFP con geles SDS-PAGE

Para cuantificar la proteína recombinante producida en las distintas cinéticas, se analizaron las muestras en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El análisis densitométrico de las diferentes bandas se realizó con el programa Imagen 1.40g (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Se hicieron diluciones para uniformar la concentración de las muestras a 1 DO. La concentración se verificó con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Las muestras se sonicaron (Sonios & Materials Inc, Vibra cell) con 3 pulsos de 7 segundos a una amplitud de 28% y se centrifugaron. El volumen total con el que se cargaron los geles fue de 10 μ L, conformado por la muestra y la solución amortiguadora de carga 4x. Además, en cada gel se cargaron 5 μ L de estándar de albúmina a concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL y 3 μ L del marcador de peso molecular BenchMark (Invitrogen). La cuantificación de GFP se realizó construyendo curvas donde se relacionó el área por la intensidad de la banda contra la concentración de proteína (Figura 6.3.).

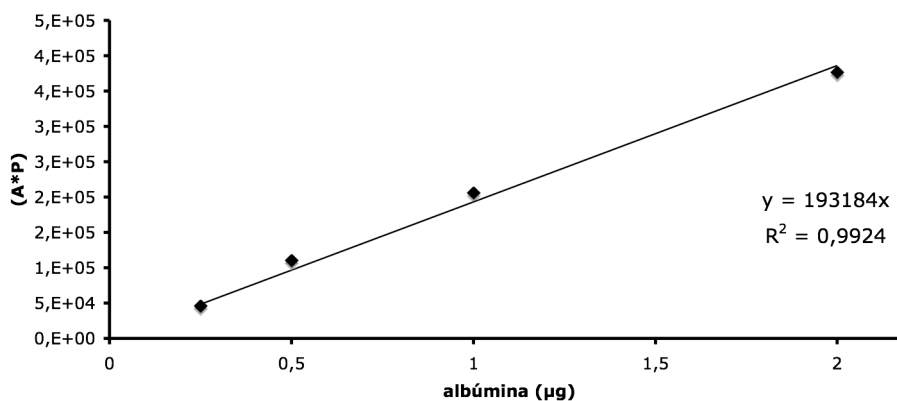


Figura 6.3.- Perfil típico de la curva para la cuantificación de GFP por densitometría.

6.5.5. Evaluación de la viabilidad celular y distribución de la fluorescencia de GFP en la población

La viabilidad de la población y fluorescencia de GFP en la población se estimó por citometría de flujo (Beckton Dickinson). Se considera a una célula sana cuando la membrana citoplasmática se encuentra polarizada y el sistema de transporte está activo. El yoduro de propidio (PI) es un marcador que puede unirse al ADN pero que no puede atravesar una membrana intacta, por esta razón se ha utilizado como un indicativo de la viabilidad bacteriana. El equipo cuenta con un láser que excita el PI a una longitud de onda de 488 nm y emite a 630 nm. Como fase móvil se utilizó FACS Flow (BD). La IF-GFP también puede ser determinada por citometría de flujo e indica la distribución de la fluorescencia en las muestras a lo largo de las cinéticas.

La solución de PI se filtró con membrana de 0.22 µm y se almacenó a 4°C en oscuridad. Las muestras fueron diluidas 1:1 con amortiguador de fosfatos PBS (pH 7.2) y se agregó PI para obtener una concentración final de trabajo de 5 µg/mL. Una vez agregado el PI a la muestra se homogenizó por 10 s y se incubó por 10 – 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. El programa de adquisición de datos del equipo (CellQuest) permite analizar los datos mediante diagramas de puntos (Dot plot). La fluorescencia en el canal 1 (emisión de fluorescencia a 510 nm, FL1)

detecta la IF-GFP y el canal 3 (emisión de fluorescencia a 610 nm, FL3) la emisión de IP. Usualmente la fluorescencia de IP se detecta en el canal 2. Sin embargo, la fluorescencia de GFP interfería con el canal 2, por lo que se analizaron las muestras en el canal 3. Como primer paso, se estableció la región en la que una cepa de *E. coli* W3110 silvestre (sin pV21), presentaba fluorescencia. Para esta cepa se observó que la intensidad de fluorescencia es baja por lo que la población se localizó cercana al origen de la gráfica (Figura 6.4. a, cuadrante 3). Además se determinaron las regiones de la población viable con señal en canal 1 por expresión de GFP (Figura 6.4. b, cuadrante 4), y la población no viable con señal en canal 3 por tinción con IP (Figura 6.4. c, cuadrante 2). El cuadrante 1 (figura 6.4. c) indica las células no viables con fluorescencia en el canal 3 por el IP pero que no presentan fluorescencia de GFP.

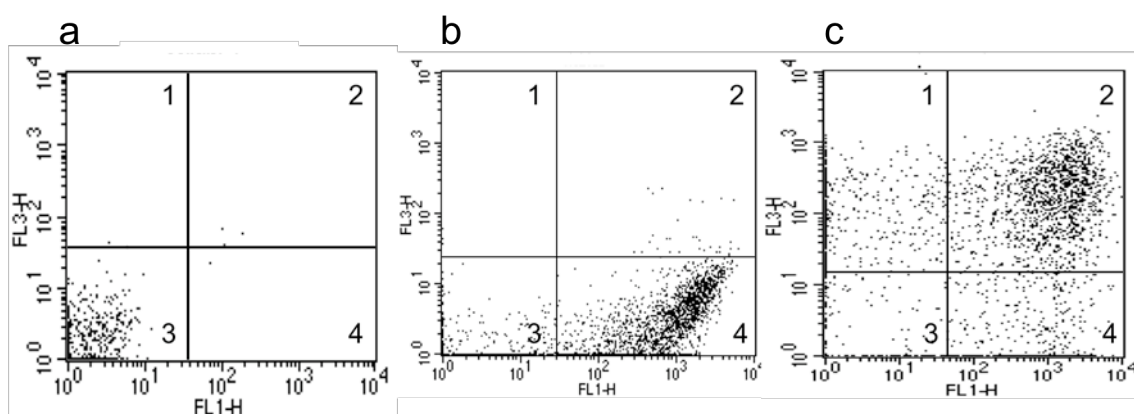


Figura 6.4.- Evaluación de la viabilidad y distribución de la fluorescencia por citometría de flujo. Se establecieron los cuadrantes de células viables no fluorescentes (a, cuadrante 3), células viables fluorescentes de GFP en el canal 1 (b, cuadrante 4), células no viables con fluorescencia de IP en el canal 3 y de GFP en el canal 1 (c, cuadrante 2) y células no viables con fluorescencia en IP pero no de GFP (c, cuadrante 1).

La población viable se obtuvo de un cultivo de VAL24-pV21 en matraz con mamparas del que se tomó una muestra a la mitad de la fase exponencial para ser analizada. La población no viable corresponde a una muestra de un cultivo crecido por más de 48 h y que además fue congelado. Una vez establecidas las regiones de las diferentes poblaciones, se realizó un análisis estadístico de los cuadrantes en los diagramas de puntos para determinar el porcentaje de la población viable y la

distribución de la fluorescencia. El análisis de los datos fue realizado usando el programa de adquisición en función del número de eventos establecido (50,000) para cada cuadrante en el diagrama de puntos (%).

6.5.6. Intensidad de fluorescencia de NADH

La determinación de la acumulación de NADH a lo largo de las cinéticas se realizó mediante el método de análisis fluorimétrico (Bergmeyer HU, 1974). Una de las ventajas del método es que la fluorescencia del NADH se puede medir sin necesidad de hacer extracciones celulares. Para determinar las longitudes máximas de emisión y excitación, se realizaron barridos utilizando como estándar NADH (Sigma-Aldrich). Se preparó una solución estándar de NADH a 1 mg/mL en solución amortiguadora de KH_2PO_4 0.1 M (pH.-7). Posteriormente se hicieron diluciones de la solución estándar en medio mineral para descartar alguna interferencia. En la figura 6.5. se observa el barrido de emisión y excitación para una solución con una concentración 5 μM de NADH.

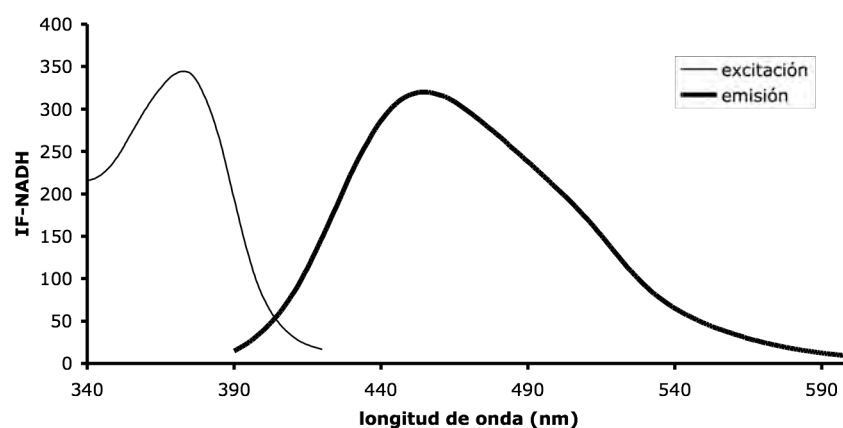


Figura 6.5.- Barrido de excitación y emisión del NADH por fluorimetría.

Las muestras se analizaron con una longitud de onda de excitación 360 nm y de emisión 450 nm. Se colocaron 200 μL de muestra inmediatamente después de ser

tomada del biorreactor en 800 μL de una solución de metanol al 60% previamente enfriado y conservado en hielo seco (Zhu y Shimizu, 2004). Este procedimiento permite detener el metabolismo de los microorganismos sin dañar las células al evitar que la muestra se congele (Zhu y Shimizu, 2004). Posteriormente se tomaron 200 μL de la solución con la muestra y se midieron en el fluorímetro PerkinElmer LS55 Luminescence Spectrometer.

6.6. Micrografías

El análisis microscópico de las cepas se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica del IBt-UNAM. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (Zeiss EM900 80kV) con una cámara CCD Dual Vision 300W (Gatan, Inc). El corte de los bloques con las muestras se realizó con un ultramicrotomo (Leica Ultracut R). Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

6.7. Métodos de cálculo

6.7.1. Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos

La ecuación utilizada para calcular las velocidades específicas de crecimiento, fue la siguiente:

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

El tiempo de duplicación de los microorganismos se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$t_d = \ln(2) / \mu$$

Los rendimientos $Y_{a/b}$: biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$), biomasa/producto ($Y_{X/P}$) y producto sustrato ($Y_{P/S}$) se calcularon en la fase exponencial de crecimiento con las siguientes ecuaciones:

$$Y_{X/S} = \Delta X / -\Delta S \quad Y_{X/P} = \Delta X / \Delta P \quad Y_{P/S} = \Delta P / -\Delta S$$

Las velocidades específicas q_i de consumo de glucosa (q_S), producción de proteína recombinante (q_{GFP}) y de producción de acetato (q_{Ac}) se calcularon con la ecuación:

$$q_i = \mu / Y_{X/S}$$

6.7.2. Cálculo del carbono destinado para la formación de ácidos orgánicos

El carbono proveniente de la glucosa que los microorganismos utilizaron para la generación de ácidos orgánicos a lo largo de las cinéticas, se calculó sumando las cantidades de carbono acumulado en cada tiempo de la cinética (C_M). Para los cálculos se multiplicó el peso molecular del carbono (12 g C/mol) por el número de carbonos presentes en la estructura molecular de cada metabolito y el valor se dividió por el peso molecular del respectivo metabolito. Los factores de conversión que se obtuvieron fueron: acetato ((24.0 g de C/mol) / (59.0 g de acetato/mol)), lactato ((36.0 g de C/mol) / (89.1 g de acetato/mol)), formato ((12.0 g de C/mol) / (45.0 g de acetato/mol)) y etanol ((24.0 g de C/mol) / (46.1 g de acetato/mol)). Los gramos de carbono para los metabolitos se estimaron multiplicando los factores de conversión por las concentraciones de metabolitos en cada punto de la cinética y se sumaron como se muestra en la siguiente ecuación:

$$C_M = C_A + C_L + C_F + C_E$$

Donde (las concentraciones en g/L)

C_M = carbono acumulado de los metabolitos

C_A = carbono proveniente del acetato

C_L = carbono proveniente del lactato

C_F = carbono proveniente del formato

C_E = carbono proveniente del etanol

6.8. Estrategia experimental

En la figura 6.6. se presenta el diagrama de bloques sobre la estrategia que se siguió en el desarrollo experimental de éste trabajo.

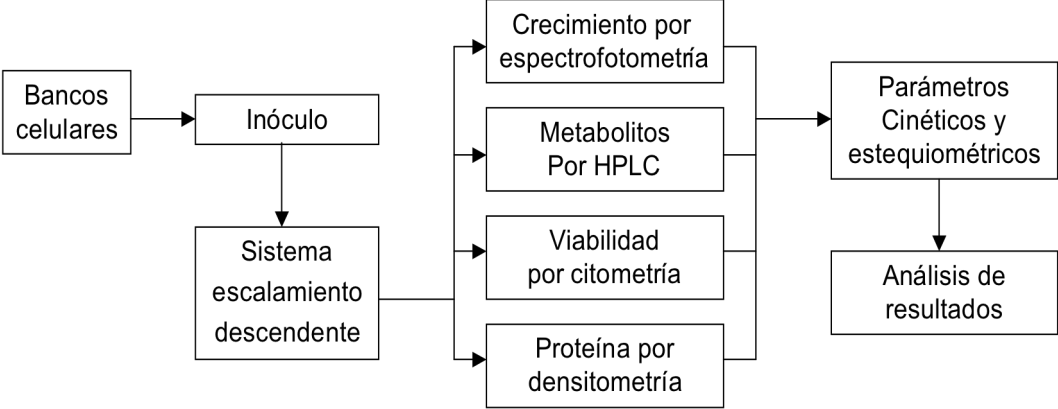


Figura 6.6.- Diagrama de la estrategia experimental.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados de la evaluación de la cepa *E. coli* VAL24-pV21 utilizando distintos t_c (50, 100 y 150 s), en un sistema de escalamiento descendente donde se simularon gradientes de TOD. Los resultados se compararon con la cepa control W3110-pV21. En la sección 7.1. se muestra el efecto del aumento de los t_c en los cultivos oscilados sobre el crecimiento, consumo de glucosa, acumulación de metabolitos extracelulares, producción de proteína recombinante, viabilidad celular, acumulación de NADH, y los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados a partir de los datos obtenidos. La sección 7.2. corresponde a la evaluación de VAL24-pV21 en condiciones anaerobias. En la sección 7.3. se presenta el comportamiento de los microorganismos en cultivos oscilados a los que se agregó nitrato como aceptor final de electrones con la finalidad de optimizar el proceso. La evaluación bajo estas condiciones se hizo operando el sistema de escalamiento descendente con los t_c de 100 y 150s. Finalmente, en la sección 7.4. se presenta el cultivo de VAL24-pV21 en anaerobiosis agregando nitrato al medio de cultivo para determinar si la cepa podría crecer bajo dichas condiciones.

7.1. Evaluación del desempeño de las cepas en cultivos aerobios y oscilados

7.1.1 Crecimiento celular y consumo de glucosa

El crecimiento celular para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 se muestra en la figura 7.1.1.1. (A y B respectivamente). Los cultivos control aerobios (0 s) se realizaron recirculando el medio de cultivo con un flujo de 1.44 L/min que corresponde al t_c de 50 s pero controlando en ambas jarras la TOD a 10%. Los cultivos control se utilizaron como referencia para comparar el efecto de las oscilaciones de O_2 de los cultivos recirculados con los distintos t_c evaluados en este

trabajo de 50 s, 100 s y 150 s (tabla 2). La cepa VAL24-pV21 alcanzó una concentración máxima de biomasa de 2.8 g/L en los cultivos control y disminuyó 20, 55 y 60% con los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. El crecimiento de la cepa mutante en los t_c de 100 y 150 s se observó que fue de tipo lineal (figura 7.1.1.1. A), situación a la que se le ha denominado “crecimiento microaerobio” (Konz et al., 1998). En los cultivos control de la cepa W3110-pV21 (figura 7.1.1.1. B), se cuantificó una concentración máxima de biomasa de 2.3 g/L y este parámetro fue similar para el t_c de 50 s, mientras que para los t_c de 100 y 150 s se observó un decremento en ambos casos de aproximadamente 40%.

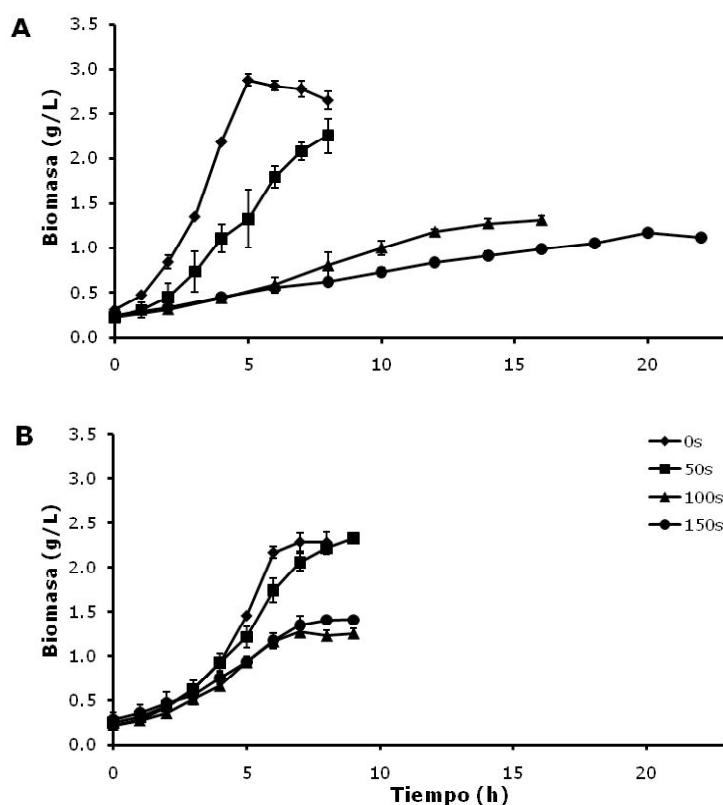


Figura 7.1.1.1.- Comparación del crecimiento. Se presentan las cinéticas de las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) para los cultivos control (◆) y con t_c 50 s (■), 100 s (▲) y 150 s (●).

En términos generales se ha observado que la acumulación de biomasa es dependiente de la TOD, la cual disminuye conforme aumentan las limitaciones de O_2 (Phue y Shiloach, 2005). En condiciones limitadas de O_2 la capacidad

biosintética de *E. coli* se ve afectada debido a la regulación metabólica sobre el ciclo de los ácidos tricarbóxicos por los sistemas ArcAB y FNR (Konz et al. 1998), originando la disminución de la concentración máxima de biomasa alcanzada en los cultivos oscilados. Al respecto, Amanullah (1994), observó una disminución del 23% en la concentración máxima de biomasa en cultivos donde se simulaban gradientes de TOD en un sistema STR-STR operados con un t_c de 120 s con respecto al cultivo aerobio control para *B. subtilis*.

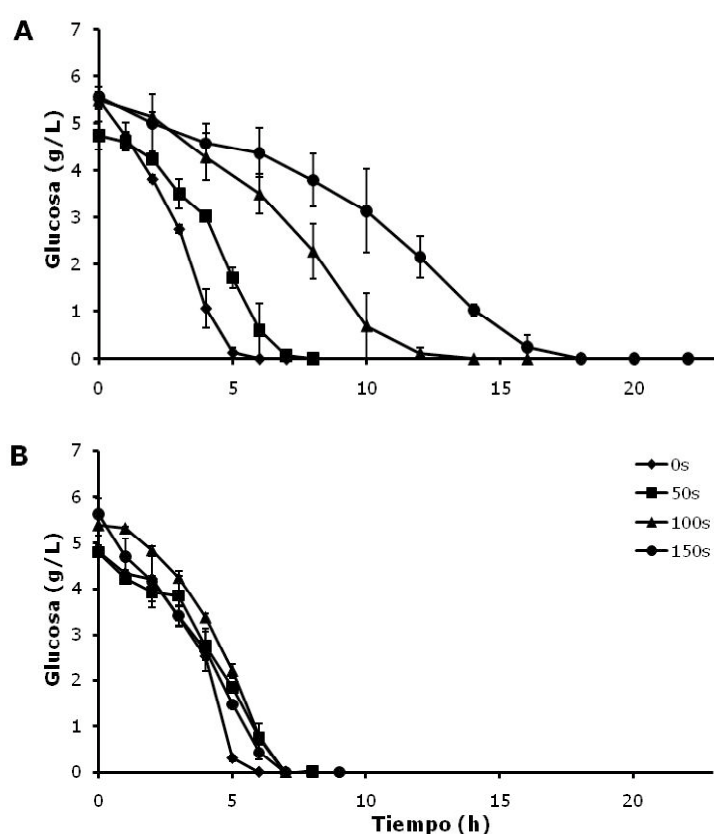


Figura 7.1.1.2.- Cinéticas de consumo de glucosa. Se presentan los cultivos de las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) evaluados en los cultivos control (\blacklozenge) y con t_c 50 s (\blacksquare), 100 s (\blacktriangle) y 150 s (\bullet).

Se ha propuesto que un factor que puede contribuir con la disminución de biomasa es la continua producción y reasimilación de productos de la fermentación de ácidos mixtos, lo cual podría explicar el efecto observado sobre la biomasa debido a la acumulación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo, como se verá más adelante

(Xu et al., 1999). Además ha sido observado que el escalamiento de un proceso de nivel laboratorio a biorreactores de gran escala, frecuentemente origina la disminución en la concentración final de biomasa debido a la presencia de heterogeneidades en los medios de cultivo, lo que se ha reportado en múltiples trabajos (Xu et al., 1999; Hewitt et al., 2000; Bylund et al., 2000; Sandoval-Basurto et al., 2004). Por ejemplo, Hewitt y col. (2000) reportaron que en un reactor de gran escala de 30 m³ se obtuvo 35% menos concentración de biomasa con respecto a un biorreactor de 5 L bien mezclado.

Las cinéticas de consumo de glucosa se muestran en la figura 7.1.1.2. Se observó que la cepa VAL24-pV21 agotó la glucosa del medio de cultivo en 6 h en el cultivo control y en 7 h en el cultivo con t_c de 50 s (figura 7.1.1.2. A). Sin embargo, para los t_c de 100 y 150 s y en concordancia con el aumento en los tiempos de cultivo, el tiempo en que el sustrato fue consumido aumentó hasta 14 y 18 h, respectivamente. Por otro lado, la glucosa fue consumida en 6 h para los cultivos control de la cepa W3110-pV21 mientras que en los t_c evaluados lo hizo en 7 h (figura 7.1.1.2. B). En términos generales, el agotamiento de la glucosa en el medio de cultivo, produjo el inicio de la fase estacionaria en todos los cultivos.

7.1.2. Acumulación de metabolitos extracelulares

7.1.2.1. Acumulación de metabolitos de las rutas de fermentación de ácidos mixtos

Las cinéticas de acumulación de acetato, lactato, formato y etanol se presentan en el apéndice A (figuras A.1. – A.4.). En la figura 7.1.2.1. se comparan las concentraciones máximas de metabolitos alcanzadas para los distintos t_c evaluados para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21. En condiciones aerobias y con limitaciones de O₂, se observó la síntesis de acetato en los cultivos control para las

dos cepas. La cepa VAL24-pV21 alcanzó el doble de concentración máxima de acetato (0.4 g/L) con respecto a W3110-pV21 (0.2 g/L) (figura A.1.). Al no existir limitaciones en la TOD en los cultivos control, la síntesis del acetato se ha atribuido al mecanismo de sobreflujo metabólico que se origina por el desbalance entre el consumo de glucosa y su transformación en biomasa y productos, como ha sido reportado por otros grupos (Becker et al., 1997; Xu et al., 1999). En condiciones aerobias se ha observado que los genes *pta-ack*, que codifican para las enzimas responsables de generar acetato, se expresan mayoritariamente en la fase exponencial de crecimiento, mientras que el gen *poxB* principalmente se expresa en la fase exponencial tardía y la fase estacionaria (Chang et al., 1999; Abdel-Hamid et al., 2001; Phue y Shiloach, 2005). Los resultados obtenidos sugieren que la producción de acetato puede deberse a la expresión de los genes *pta-ack*, en tanto que la mutación del gen *poxB* en la cepa VAL24-pV21 no disminuyó la producción de acetato en condiciones aerobias con respecto a la cepa nativa. Otros autores también han observado que la eliminación del gen *poxB* no reduce la acumulación de acetato en los cultivos (Causey et al., 2004; Lara et al., 2006b). En los cultivos control y para las dos cepas, se observó la reasimilación total de acetato, una vez consumida la glucosa (figura A.1.). Se ha reportado que la producción y reasimilación de ácidos orgánicos, puede afectar el crecimiento de los microorganismos (Xu et al., 1999), situación que podría explicar las menores concentraciones de biomasa alcanzadas conforme aumentó el t_c para las dos cepas (figura 7.1.1.1.).

Los gradientes de TOD en el medio de cultivo inducen la activación de las rutas metabólicas de fermentación de ácidos-mixtos, donde el acetato es uno de los principales productos. En concordancia con esta situación, se observó que en los cultivos recirculados, las concentraciones máximas de acetato fueron mayores a las obtenidas en los cultivos control. La cepa VAL24-pV21 cultivada con t_c de 50, 100 y 150 s, acumuló concentraciones máximas de acetato de 1.4, 1.6 y 1.7 g/L,

respectivamente (figura 7.1.2.1.). Por otro lado, la cepa W3110-pV21 alcanzó concentraciones máximas de acetato de 1.1, 1.7 y 1.4 g/L para los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. La producción de acetato bajo estas condiciones de cultivo puede deberse a la suma del acetato producido por sobre flujo metabólico a través de la actividad de los genes *pta-ack* y de la ruta de fermentación de ácidos mixtos por la actividad del gen *poxB* (únicamente en W3110-pV21). Es importante notar que la reasimilación de acetato en los cultivos recirculados sucedió una vez que se agota la glucosa en ambas cepas salvo para W3110-pV21 con t_c de 100 s (Apéndices, figura A.1.). Sin embargo, en los cultivos recirculados, la reasimilación fue limitada y no contribuyó con la formación de biomasa. El comportamiento de las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 coincide con lo reportado por Phue y Shiloach (2005) quienes observaron que existe una relación entre el incremento de la acumulación de acetato y la disminución de la disponibilidad de O₂ debido al aumento de la actividad de las rutas metabólicas en las que participan los genes *pta-ack* y *poxB* (ver figura 2.2.).

La presencia de formato, lactato y etanol (figura 7.1.2.1.), es evidencia de la actividad de las rutas de fermentación de ácidos mixtos debido a las condiciones de anaerobiosis (Xu et al., 1999). En particular, la expresión del gen *pflB* sucede cuando se reduce la expresión de los genes que codifican para la enzima piruvato deshidrogenasa debido a limitaciones de TOD. En concordancia con lo anterior, en los cultivos control para ambas cepas no se observó la acumulación de formato, lactato y etanol. En los cultivos recirculados de la cepa VAL24-pV21 no se detectó lactato ni formato como era de esperarse debido a la eliminación de los genes *ldhA* y *pflB* (figuras 7.1.2.1. y 2.2.). Por el contrario, en la cepa W3110-pV21 se observó la acumulación de lactato para los t_c de 100 y 150 s donde se alcanzaron 0.8 y 0.7 g/L, respectivamente. El formato se acumuló en concentraciones de 0.2, 0.9 y 0.7 g/L para los mismos t_c . Se ha observado que el lactato y acetato son metabolitos mas fácilmente reasimilables que el formato (Enfors et al., 2001), situación que puede observarse en las gráficas del apéndice A. En relación con estos resultados, se

observó que una vez consumida toda la glucosa, el lactato se reconsumió lentamente, mientras que la concentración de formato permaneció constante. En las cinéticas control no se detectó la acumulación de etanol para ninguna de las dos cepas, sin embargo, las oscilaciones de O_2 promovieron la síntesis del metabolito. La cepa W3110-pV21 no acumuló etanol con t_c de 50s pero se detectaron 0.2 y 0.3 g/L para los t_c de 100 y 150 s, respectivamente. Los cultivos recirculados para la cepa VAL24-pV21 acumularon 0.1 g/L para el t_c de 50 s y 0.2 g/L para los t_c de 100 y 150 s (figura 7.1.2.1.). La activación de la ruta metabólica que conduce a la síntesis de etanol ayuda a *E. coli* a contender con las heterogeneidades del medio debido a que permite regenerar el NAD^+ necesario para la glucólisis.

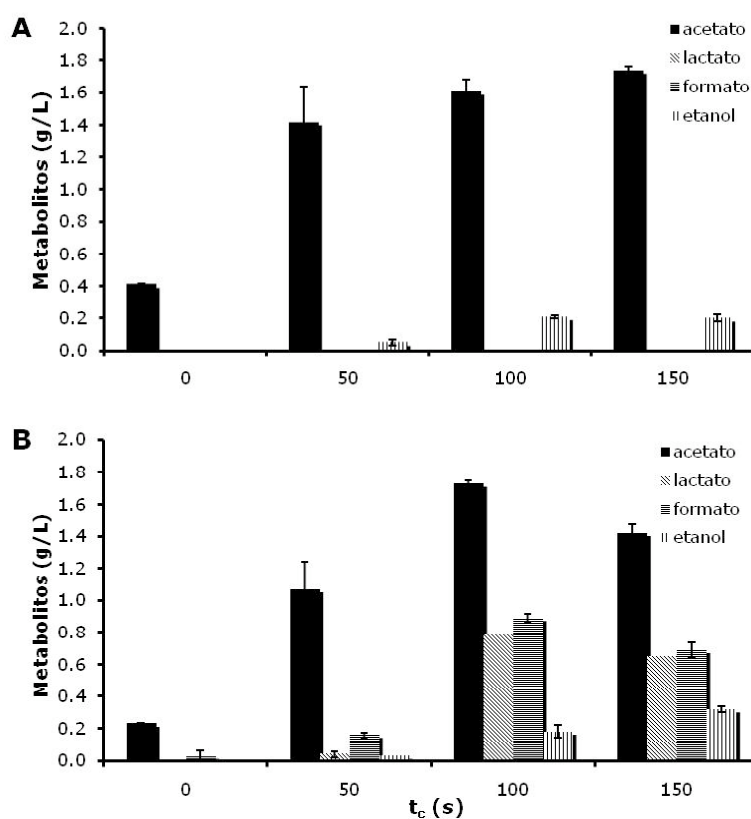


Figura 7.1.2.1.- Acumulación extracelular máxima de ácidos orgánicos. Los metabolitos corresponden a los cultivos de referencia y oscilados para las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B). En la figura se presentan las concentraciones máximas de acetato, lactato, formato y etanol.

7.1.2.2. Acumulación extracelular de piruvato

El piruvato juega un papel central en el metabolismo del carbono de *E. coli* debido a que es un intermediario entre las reacciones de anabolismo y catabolismo. Dicho metabolito es utilizado como sustrato por las enzimas *ldhA*, *poxB* y *pflB* en cultivos limitados de O₂, para dar lugar a la formación de lactato, acetato, formato y acetyl-CoA, respectivamente o bien es transformado en acetyl-CoA y/o CO₂ en condiciones aerobias por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. La acumulación de piruvato se ha observado en cepas a las que se les han mutado genes (*atpFH*, *sucA*, *focA*, *pflB*, *frdBC*, *ldhA*, *adhE*, *poxB*, *ackA*, *aceEF*) que utilizan al metabolito como precursor en diferentes reacciones (Causey et al., 2004; Zhu et al., 2007, Zhu et al., 2008). En los medios de cultivo de las cinéticas control y recirculadas de la cepa W3110-pV21 no se detectó la presencia de dicho metabolito, indicando que fue utilizado en subsecuentes rutas metabólicas. En la figura 7.1.2.2 se presenta el perfil de la acumulación del piruvato en el medio de cultivo para la cepa VAL24-pV21. En las cinéticas control y con t_c de 50 s no se detectó acumulación de piruvato, pero en los sistemas recirculados con t_c de 100 y 150 s el metabolito se acumuló en forma progresiva desde el inicio de los cultivos hasta que se terminó la glucosa en el medio.

En concordancia con los resultados de Lara y col. (2006b), nosotros tampoco detectamos acumulación de piruvato en los cultivos aerobios y con t_c de 50 s para la cepa VAL24-pV21. Sin embargo, el aumento de los periodos de anaerobiosis para los t_c de 100 y 150 s, posiblemente evitó que el complejo piruvato deshidrogenasa, que solo es activo en condiciones aerobias, transformara mayores cantidades de piruvato en acetyl-CoA, causando su acumulación. Además, la acumulación de piruvato se vio favorecida debido a la incapacidad de la cepa para generar lactato y formato, así como la limitación para sintetizar acetato por la ausencia del gen *poxB*. La acumulación de piruvato en la cepa VAL24-pV21 podría considerarse como

desfavorable debido a que dicha situación posiblemente limitó la generación de energía para los microorganismos (Causey et al., 2004).

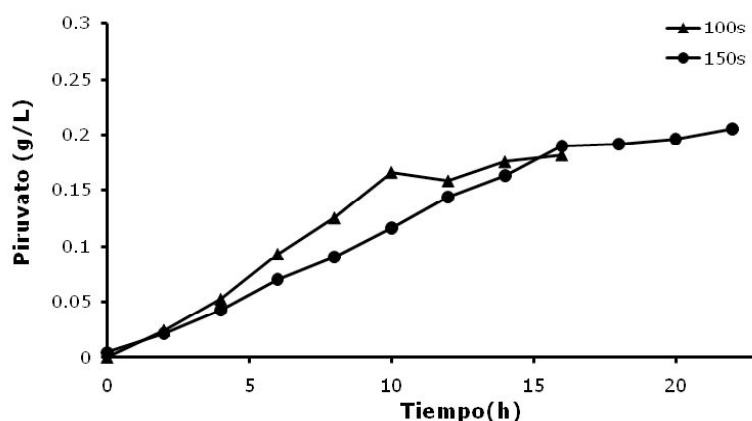


Figura 7.1.2.2.- Acumulación de piruvato por la cepa VAL24-pV21. Las cinéticas corresponden a los cultivos recirculados con t_c de 100 s (▲) y 150 s (●).

7.1.2.3. Carbono utilizado para la formación de ácidos orgánicos

El carbono del sustrato consumido por los microorganismos se distribuyó en la generación de biomasa y productos. Con la finalidad de comparar la cantidad de carbono que las cepas emplearon para la acumulación de ácidos orgánicos (acetato, lactato, formato y etanol) en los distintos t_c , se sumó el carbono de los metabolitos (C_M) para cada tiempo de la cinética (figura 7.1.2.3). En las cinéticas control, la cantidad máxima de C_M fue de 0.17 y 0.12 g de C/L para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21, respectivamente. Sin embargo, estas cantidades aumentaron significativamente en los cultivos oscilados principalmente para los t_c de 100 y 150 s. Los porcentajes de carbono destinados a la generación de ácidos orgánicos calculados a partir del sustrato inicial proporcionado en el medio de cultivo para la cepa VAL24-pV21 fueron 8% en el control y aproximadamente 35% para los tres cultivos recirculados. La cepa W3110-pV21 destinó 6% en el cultivo de referencia y aproximadamente 30, 65 y 50% en los cultivos recirculados con t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. Los resultados permiten observar que las mutaciones tuvieron un efecto positivo en la cepa VAL24-pV21 debido a que la cepa utilizó menor cantidad

de carbono en la generación de metabolitos con respecto a la cepa W3110-pV21 principalmente para los t_c de 100 y 150 s, condiciones en las que los microorganismos experimentaron periodos más prolongados de anaerobiosis.

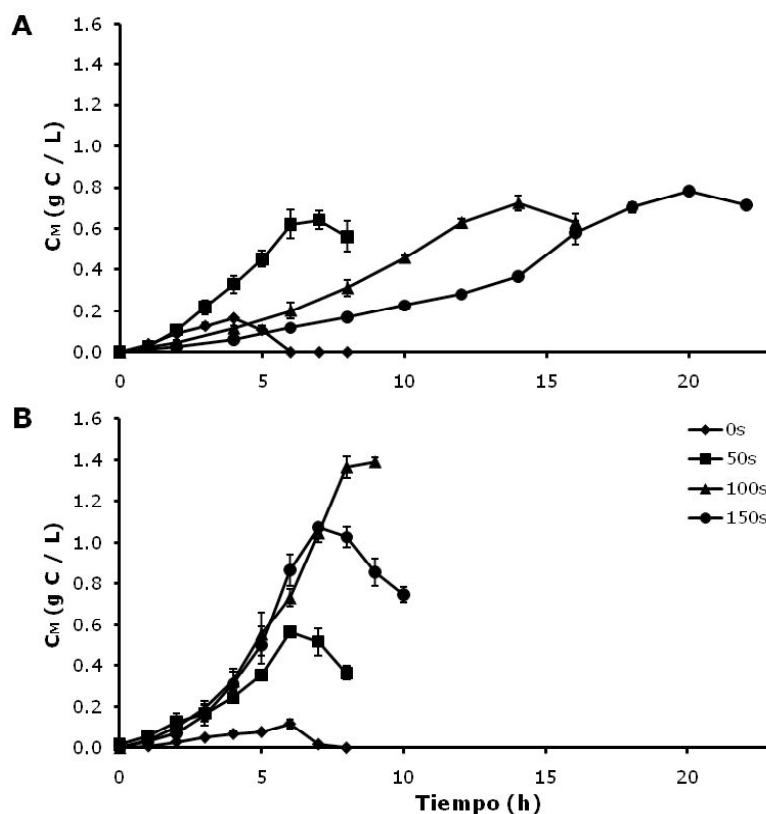


Figura 7.1.2.3.- Carbono acumulado en la formación de ácidos orgánicos. La acumulación en cada punto de la cinética representa la suma del carbono del acetato, lactato, formato y etanol. Las cinéticas de las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) corresponden a los cultivos control (◆) y con t_c 50 s (■), 100 s (▲) y 150 s (●).

7.1.3. Producción de proteína recombinante

7.1.3.1. Micrografías de las cepas

Las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* normalmente se expresan en el citoplasma o el periplasma. Sin embargo, se considera que es preferible que la expresión sea en el citoplasma porque de esta forma los rendimientos de producción generalmente son más altos (Baneyx y Mujacic, 2004; Graumann y Premstaller,

2006). Los cuerpos de inclusión (CI) se generan cuando se sobreexpresa el gen de interés y se favorece la acumulación de proteína, que en muchos casos conduce a una estructuración desfavorable. La expresión de GFP en *E. coli* generalmente se da en el citoplasma en forma soluble, sin embargo, se ha reportado que puede ser atrapada en CI (García-Fruitós et al., 2005). Con la intención de conocer la naturaleza de la expresión de la proteína recombinante en las cepas W3110-pV21 y VAL24-pV21 se realizaron micrografías que se compararon con imágenes de la cepa W3110 nativa. En la figura 7.1.3.1. se puede apreciar que en ninguna de las tres cepas es evidente la presencia de CI, que generalmente son cuerpos electrodensos que se observan bien definidos, sugiriendo que en las dos cepas la proteína se expresa en forma soluble en el citoplasma. Las imágenes mostradas son representativas de la población presente en la muestra analizada por microscopía.

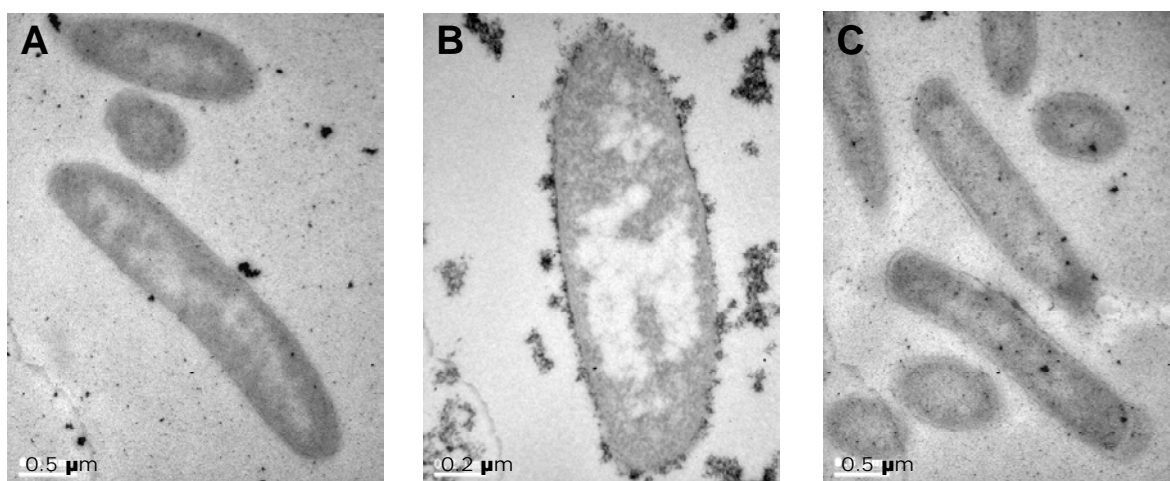


Figura 7.1.3.1.- Micrografías de las cepas de *E. coli* W3110 silvestre (A), W3110-pV21 (B) y VAL24-pV21 (C). Las imágenes mostradas son representativas de la población analizada. En ninguna de las dos cepas recombinantes son evidentes la presencia de cuerpos de inclusión.

7.1.3.2. Cuantificación de GFP mediante cromatografía en gel desnaturizante SDS-PAGE

La producción de GFP en los cultivos de referencia y oscilados, se cuantificó por densitometría de geles de SDS-PAGE (figura 7.1.3.2.). La síntesis de proteínas recombinantes normalmente sucede durante la fase exponencial de crecimiento

debido a que la expresión de la proteína requiere un alto nivel de actividad celular y energía metabólica (Yuan et al., 2004; Carneiro et al., 2009; Wong et al., 2009). Cuando los cultivos entran en fase estacionaria y el crecimiento cesa, normalmente la síntesis de proteína recombinante también lo hace (Chou, 2007). Al respecto, Wong y col. (2009) observaron que cultivos de *E. coli* que expresan GFP inducidos desde el principio del cultivo alcanzaron concentraciones máximas de proteína recombinante mayores a un orden de magnitud con respecto a cultivos inducidos en la etapa final de la fase de crecimiento.

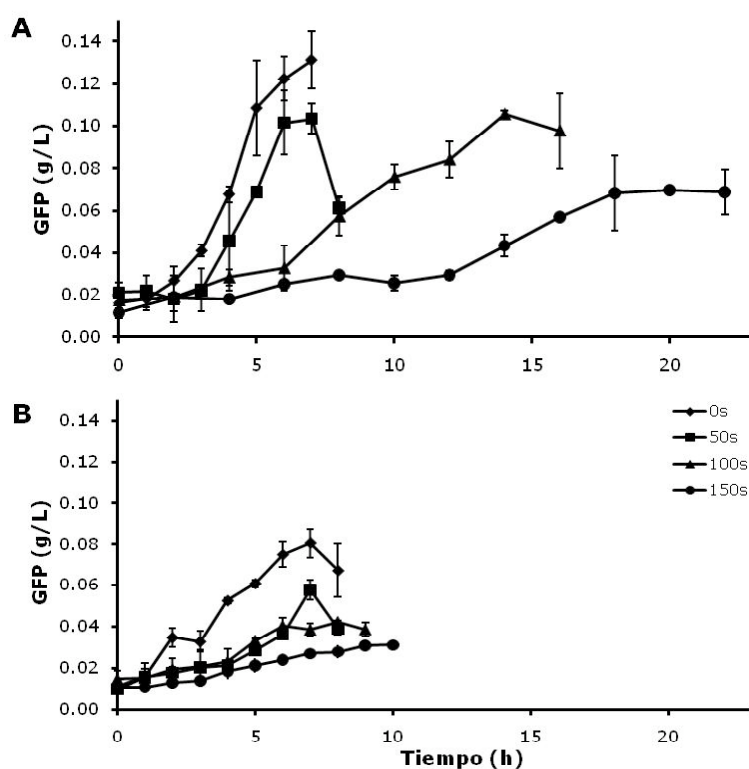


Figura 7.1.3.2.- Producción de GFP en el sistema de escalamiento descendente. Las cinéticas corresponden a las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) para los cultivos control (♦) y con t_c 50 s (■), 100 s (▲) y 150 s (●). La cuantificación se realizó por densitometría de geles SDS-PAGE.

En la figura 7.1.3.2. se observa que la producción de GFP está asociada al crecimiento. La concentración máxima de GFP alcanzada por la cepa VAL24-pV21 en el cultivo control fue de 0.13 g/L; para los t_c de 50 y 100 s disminuyó 20% y para el t_c 150 s disminuyó 47%, con respecto a la concentración alcanzada en el control.

La cepa W3110-pV21 alcanzó una menor concentración de proteína recombinante en el control (0.08 g/L) con respecto a la cepa VAL24-pV21 bajo las mismas condiciones (0.13 g/L). Las oscilaciones de TOD tuvieron un mayor impacto sobre la síntesis de proteína recombinante en la cepa W3110-pV21 al disminuir la concentración máxima de GFP en aproximadamente 30, 50 y 60% con respecto al control para los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. Una explicación que se ha propuesto para la disminución en la producción de proteína recombinante en cultivos con limitaciones de O_2 , es que al encontrarse el ciclo de los ácidos tricarboxílicos ramificado, la síntesis de varios aminoácidos es afectada (Konz et al., 1998). La disminución en la concentración máxima de proteína recombinante también fue observada por Sandoval-Basurto y col. (2004) quienes reportaron que un cultivo con oscilaciones en la TOD y un t_c de 180 s disminuyó 94% la concentración máxima de pre-proinsulina con respecto a un control aerobio.

La explicación de la mayor expresión de GFP por la cepa VAL24-pV21 con respecto a W3110-pV21 podría encontrarse en que la cepa mutante desperdició menor cantidad de carbono en la generación de ácidos orgánicos pero también debido a la fisiología particular de la cepa mutante por las modificaciones genéticas. Por ejemplo, se ha reportado que el gen *poxB* es responsable de detectar condiciones de estrés (King y Ferenci, 2005; Lara et al., 2006b) y por lo tanto su eliminación en el sistema con oscilaciones de TOD posiblemente favoreció una mayor expresión de GFP.

7.1.3.3. Evaluación de la fluorescencia total de GFP

La expresión de GFP se determinó también midiendo la fluorescencia total de la proteína recombinante (figura 7.1.3.3). En general, se observó que la cepa VAL24-pV21 mostró una fluorescencia aproximadamente 10 veces mayor a la de la cepa W3110-pV21.

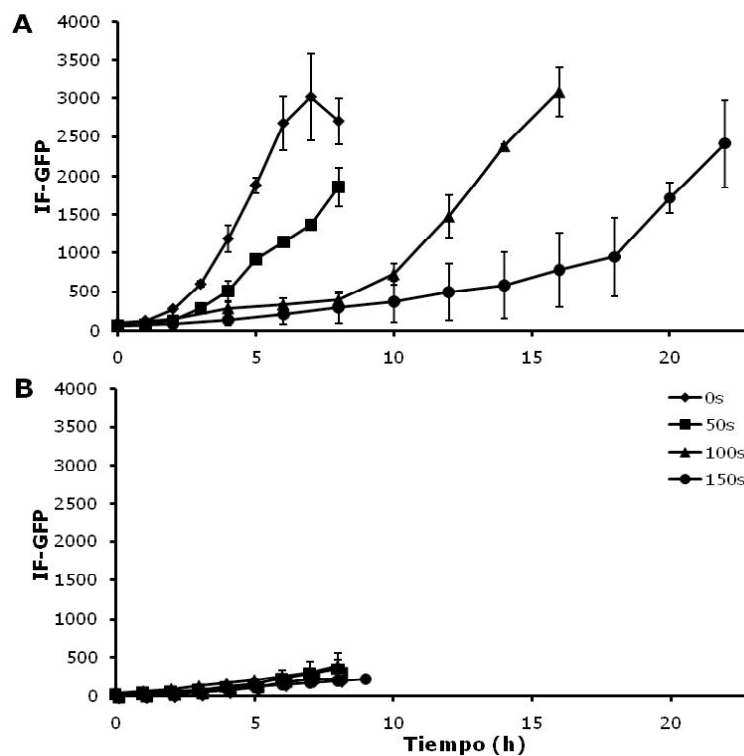


Figura 7.1.3.3.- Comportamiento de la fluorescencia total de GFP. Los cultivos evaluados con las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) corresponden a las cinéticas control (♦) y con t_c 50 s (■), 100 s (▲) y 150 s (●). La intensidad de fluorescencia de la proteína recombinante (IF-GFP) se cuantificó por fluorimetría.

La cepa W3110-pV21 para todas las condiciones evaluadas, mostró un perfil en el que la fluorescencia fue incrementándose gradualmente desde el principio de los cultivos. Por otro lado, el perfil de fluorescencia de la cepa VAL24-pV21 en el control (donde no hubo limitaciones de O_2) aumentó en forma exponencial, y para el t_c de 50 s fue de manera lineal. Sin embargo, en los cultivos recirculados con t_c de 100 y 150 s se observó un incremento de la fluorescencia después de haberse agotado la glucosa del medio. El comportamiento de la fluorescencia (figura 7.1.3.3.) es parecido a lo reportado por Kang y col. (2002). Ellos evaluaron la fluorescencia de GFP en dos cepas de *E. coli* y observaron un incremento constante de la fluorescencia una vez inducido el cultivo para una cepa de *E. coli* W3110 que expresa GFP, en tanto que para la cepa de *E. coli* BL21, observaron un incremento repentino en la fluorescencia al aproximarse a la fase estacionaria. El incremento de

la fluorescencia al final del cultivo fue atribuido a que la cepa BL21 requiere mayor cantidad de O₂ para realizar las funciones metabólicas durante la fase exponencial. El O₂ disponible intracelularmente posiblemente sea utilizado para crecimiento y mantenimiento, y es solo hasta que se agota el sustrato y los cultivos se aproximan al estado estacionario cuando el O₂ podría ser utilizado para madurar el cromóforo (figura 2.3.).

La cuantificación de la producción de proteína recombinante por fluorescencia es rápida y sencilla debido a que puede ser medida desde afuera de la célula, sin necesidad de alterar al microorganismo (Kang et al., 2002; March et al., 2003), pero tiene el inconveniente de que no siempre refleja la formación del producto recombinante. Al respecto, en nuestro sistema de trabajo (oscilaciones de TOD) no representa la metodología más adecuada para la cuantificación debido a las limitaciones O₂, ya que éste es necesario para la maduración del cromóforo (Heim et al., 1994), y que se limita conforme aumenta el t_c. Por ello, la evaluación de fluorescencia en nuestro sistema puede ser considerada como un indicativo de la maduración de la proteína recombinante y no de la cantidad de proteína. Las gráficas de fluorescencia (figura 7.1.3.3) permiten observar que la cepa VAL24-pV21 tuvo una mayor capacidad para madurar la proteína recombinante con respecto a la cepa W3110-pV21.

7.1.3.4. Distribución de la fluorescencia de GFP en la población

Con la finalidad de determinar el efecto de las oscilaciones de TOD sobre la expresión de GFP en la población celular, se evaluó la fluorescencia por citometría de flujo. Se observó que para la cepa VAL24-pV21 (figura 7.1.3.4. A) y para todas las condiciones de cultivos evaluadas en este trabajo, mas del 85% de las células de la población mostraron fluorescencia desde el principio de las cinéticas y la proporción de células fluorescentes se mantuvo constante hasta el final de las

cinéticas. En el caso de la cepa W3110-pV21 (figura 7.1.3.4. B), se observa que al inicio de los cultivos, para todas las condiciones evaluadas, aproximadamente la mitad de la población no mostró fluorescencia. Sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo y el IPTG fue induciendo la expresión de GFP, el porcentaje de células fluorescentes fue aumentando hasta llegar a más de 80%, después de 4 h de cultivo.

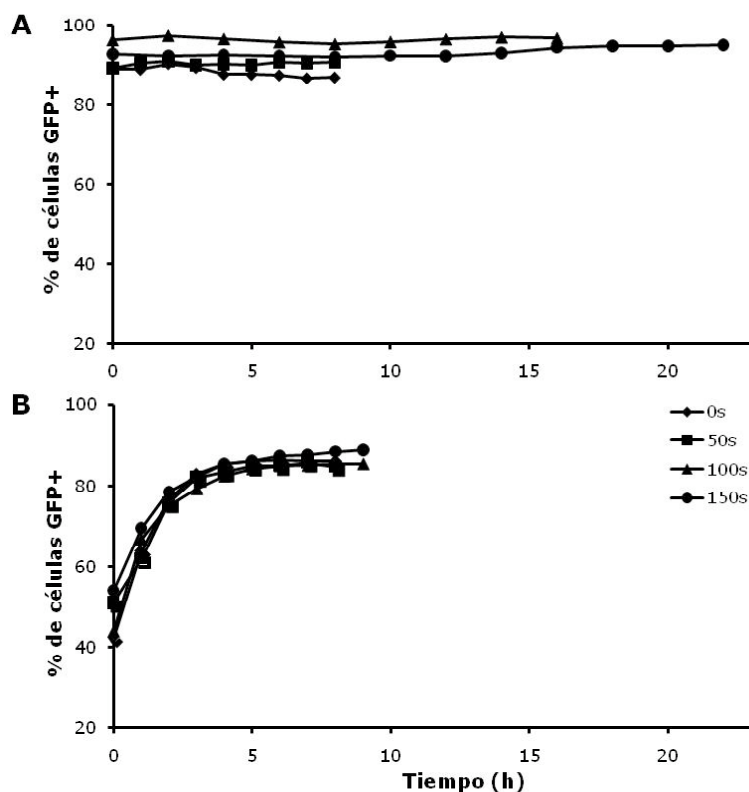


Figura 7.1.3.4.- Evaluación de la fluorescencia en la población caracterizada por citometría de flujo. Los cultivos de las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) corresponden a las cinéticas control (◆) y con t_c 50s (■), 100s (▲) y 150s (●).

Es importante notar que la expresión de GFP detectada por citometría de flujo se refiere a la distribución de la fluorescencia en los microorganismos dentro de la población analizada a diferencia de la fluorescencia analizada por fluorimetría, donde se reporta la intensidad de fluorescencia como valores promedio. La presencia de células fluorescentes desde el inicio de los cultivos para las dos cepas podría deberse a que los plásmidos que tienen al promotor *lac* y son inducidos con IPTG,

suelen presentar como problema fuga en la expresión (Jana y Deb, 2005). La distribución de la fluorescencia en los cultivos y en concordancia con la fluorescencia detectada por fluorimetría, nuevamente puede considerarse como un indicativo de la maduración del cromóforo y no de la cantidad de proteína producida por los microorganismos.

7.1.4. Evaluación de viabilidad celular

La viabilidad de la población celular se determinó por citometría de flujo utilizando PI como marcador. Se considera que una célula no es viable cuando la membrana está permeabilizada; en estas condiciones el PI es capaz de introducirse a la célula e intercalarse en el DNA (Nebe-von Caron et al., 1998). En la metodología se mostraron los diferentes cuadrantes que se establecieron para analizar las muestras (figura 6.4.) y en el apéndice B se presentan las gráficas de las poblaciones para las dos cepas de las cinéticas control (t_c 0 s) y recirculadas (t_c 50, 100 y 150 s) que indican la presencia de fluorescencia de GFP y del marcador PI. Se presentan únicamente tres puntos representativos de las cinéticas, al inicio, intermedio y al final. Los cultivos control (t_c 0 s) de W3110-pV21 y VAL24-pV21 se realizaron recirculando el medio de cultivo con el objetivo de poder comparar los resultados con los cultivos operados con los distintos t_c y observar un posible efecto mecánico de la recirculación sobre la viabilidad celular. En la figura 7.1.4 se presenta el porcentaje de células viables en cada punto de las distintas cinética para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21. La población celular en el control presentó una ligera disminución de la viabilidad durante la fase exponencial de crecimiento de 15% para la cepa VAL24-pV21 (figura 7.1.4. A) y de 10% para la cepa W3110-pV21 (figura 7.1.4. B). Este comportamiento permite suponer que no existe un efecto significativo del estrés mecánico (por agitación, aireación o recirculación) sobre la fisiología de las cepas y que por lo tanto la disminución de la viabilidad se puede atribuir a las condiciones de cultivo y a la fisiología particular de cada cepa. Anteriormente,

Hewitt y col. (1998) analizaron la viabilidad de *E. coli* W3110 por citometría de flujo y demostraron que bajo distintas velocidades de agitación (400 y 1200 rpm) y aireación (de 1 y 3 vvm), la viabilidad celular de *E. coli* no es alterada. La viabilidad de las cepas W3110-pV21 y VAL24-pV21 en los cultivos control no disminuyó en la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, una caída en la viabilidad celular de los cultivos control fue observada una vez agotada la glucosa para las cepas W3110-pV21 y VAL24-pV21, sugiriendo un rápido comienzo de la fase de muerte (figura 7.1.4.). Este resultado coincide con lo reportado por Onyeaka y col. (2003), quienes observaron una disminución en la viabilidad de *E. coli* solamente hasta el final de las cinéticas para cultivos aerobios (TOD 20%) en biorreactores bien mezclados. Los cultivos con recirculación de la cepa W3110-pV21 para los tres t_c evaluados, no mostraron una disminución significativa en la viabilidad durante la fase exponencial de crecimiento ni tampoco después de agotarse la glucosa, estimándose una reducción de aproximadamente 5% en los tres casos. Por otro lado, la viabilidad de la cepa VAL24-pV21 al final de la cinética para el t_c de 50 s se redujo en 10%, mientras que se observó una disminución progresiva a lo largo de las cinéticas con t_c de 100 y 150 s hasta 70% y 65% de población viable al final de los cultivos, respectivamente.

La evaluación de la viabilidad en los cultivos control y antes de agotarse la glucosa en el medio de cultivo mostró que no existe un efecto mecánico importante del sistema de escalamiento descendente (STR-STR) sobre las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21. En concordancia con nuestros resultados, se ha reportado que la aireación y agitación propia de los biorreactores no tienen efecto sobre la viabilidad celular de *E. coli* (Hewitt et al., 1998), mientras la viabilidad de la cepa W3110-pV21 en los cultivos recirculados no disminuyó. Sin embargo, los cultivos recirculados de la cepa VAL24-pV21 mostraron una disminución progresiva de la viabilidad principalmente con los t_c de 100 y 150s.

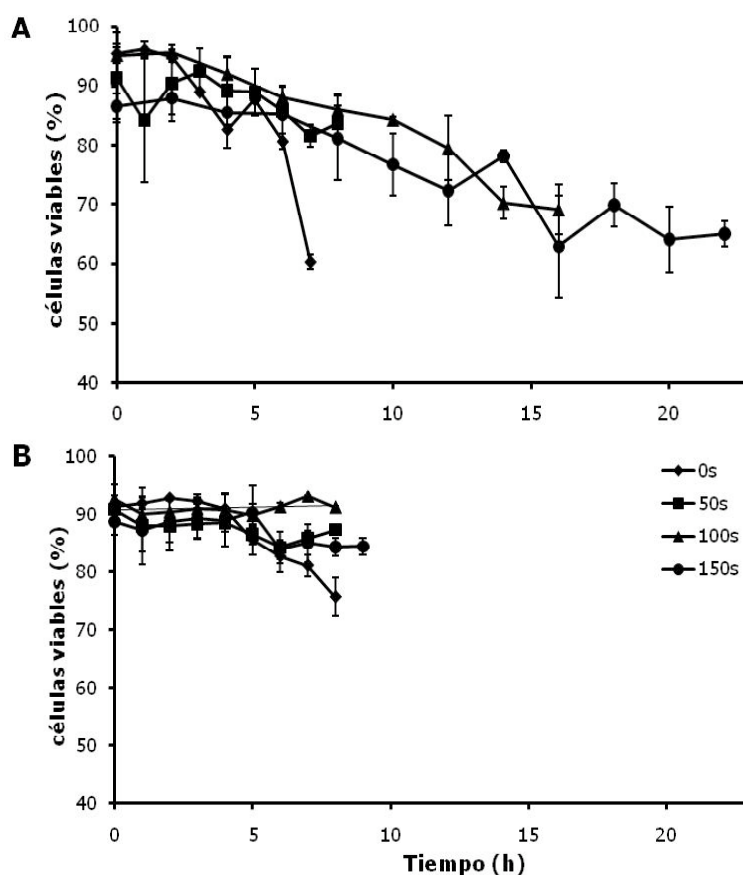


Figura 7.1.4.- Evaluación de la viabilidad celular por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células viables de las cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B) para las cinéticas control (◆) y con t_c 50 s (■), 100 s (▲) y 150 s (●).

Se ha reportado la disminución de la viabilidad en cultivos de *E. coli* evaluados en sistemas de escalamiento descendente STR-PFR y se ha atribuido al efecto de la inducción con IPTG (Hewitt et al., 2007). Sin embargo, en nuestro sistema no es posible afirmar que la disminución de la viabilidad para la cepa VAL24-pV21 en los cultivos recirculados se deba al efecto del inductor debido a que no se observó una disminución de la viabilidad en el cultivo control antes de agotarse la glucosa, ni tampoco se observó una disminución considerable para la cepa W3110-pV21 en todas las condiciones evaluadas. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad puede atribuirse al aumento de las oscilaciones de TOD que alteran el metabolismo y la respuesta ante el insulto según la fisiología de la cepa mutante.

7.1.5. Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos

Los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 en las distintas condiciones evaluadas en este trabajo se muestran en la figura 7.1.5.1. En el apéndice C (tabla 4), se comparan los datos cinéticos y estequiométricos calculados en este trabajo.

7.1.5.1. Comparación de la velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación

La velocidad específica de crecimiento (μ) en el cultivo aerobio para la cepa VAL24-pV21 fue de 0.45 h^{-1} y en los cultivos recirculados de 0.41 , 0.15 y 0.09 h^{-1} para los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente (figura 7.1.5.1. A). Las oscilaciones de TOD afectaron el desempeño de la cepa mutante, disminuyendo la μ con respecto al cultivo control en 9, 67 y 80% para los t_c de 50, 100 y 150 s. Por otro lado, la cepa W3110-pV21 en el control tuvo una μ de 0.4 h^{-1} . Las μ de la cepa W3110-pV21 para los cultivos recirculados fueron 0.34 , 0.30 y 0.29 h^{-1} que significaron una disminución con respecto al cultivo aerobio de 15, 25 y 27% para los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. El efecto de las recirculaciones sobre la μ en la cepa W3110-pV21 fue menos drástico que en la cepa mutante, situación que se puede comparar en los mayores t_c de 100 y 150 s. Dicha situación sugiere la necesidad de las rutas metabólicas suprimidas en VAL24-pV21 para contender con las oscilaciones de O_2 . En concordancia con los resultados, se ha reportado una disminución del 30% en la μ en un cultivo oscilado con un t_c de 180 s con respecto al cultivo aerobio de referencia (Sandoval-Basurto et al., 2004), para una cepa de *E. coli* W3110 recombinante que expresaba pre-proinsulina.

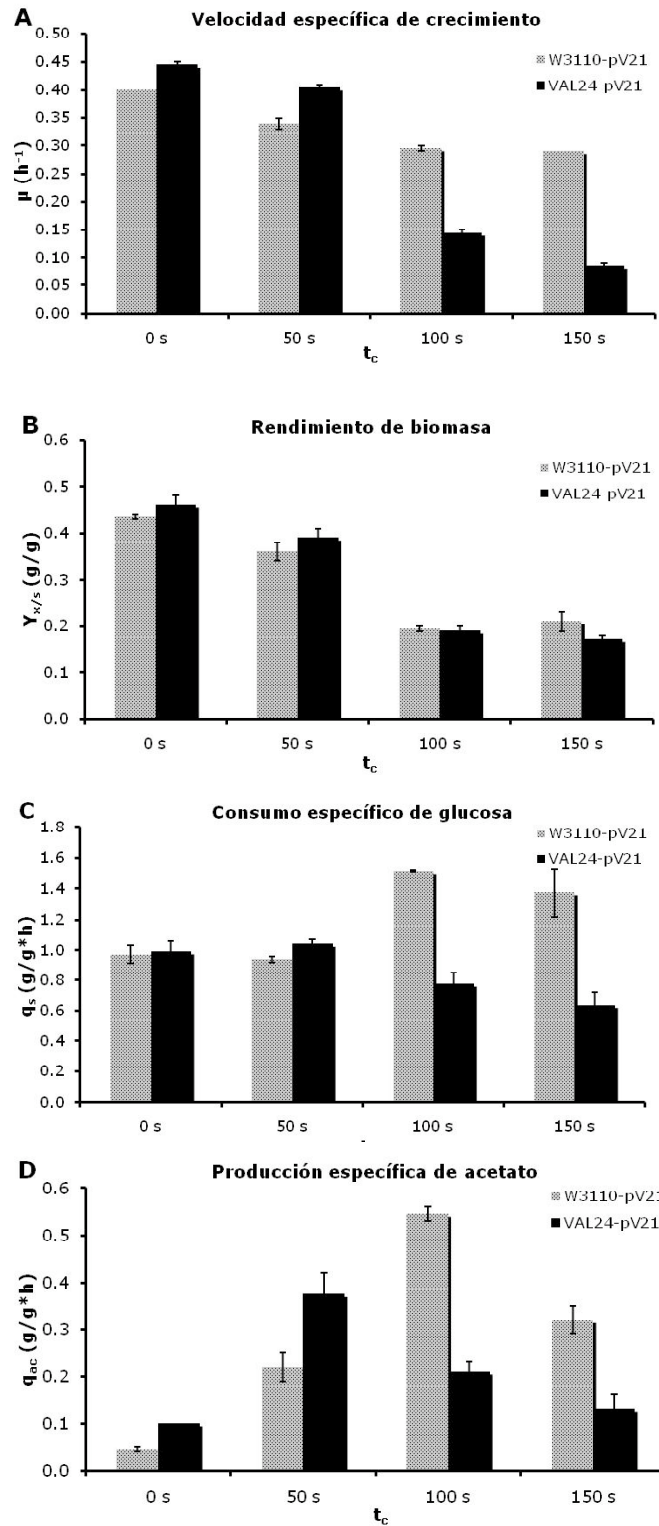


Figura 7.1.5.1.- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas a distintos t_c . Velocidad específica de crecimiento (A), rendimiento biomasa-sustrato (B), consumo específico de glucosa (C) y producción específica de acetato (D) en los cultivos control y oscilados para las cepas W3110-pV21 y VAL24-pV21.

7.1.5.2. Comparación de los rendimientos globales de biomasa

El rendimiento global de biomasa ($Y_{X/S}$) calculado para el cultivo control de la cepa VAL24-pV21 fue de 0.46 g/g, y para los cultivos recirculados fueron 0.39, 0.19 y 0.17 g/g para los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente (figura 7.1.5.1. B). Las oscilaciones de TOD disminuyeron los rendimientos con respecto al cultivo aerobio en 15, 59 y 63% para los respectivos t_c (50, 100 y 150 s). Los resultados indican que el mayor impacto de las oscilaciones es para los t_c de 100 y 150 s, mientras que con un t_c de 50 s solo se observa una ligera disminución de 15% en el $Y_{X/S}$. Dichos resultados coinciden con los datos reportados por Lara y col. (2006b), quienes observaron una disminución de aproximadamente 10% entre un cultivo aerobio y uno oscilado con t_c de 50 s para la cepa VAL24-pV21. Por otro lado, la cepa W3110-pV21 en el cultivo aerobio tuvo un $Y_{X/S}$ de 0.44 g/g similar al calculado para la cepa VAL24-pV21 en las mismas condiciones y para los recirculados fueron de 0.36, 0.20 y 0.21 g/g, que representan una disminución de 18, 55 y 52 % en los respectivos t_c de 50, 100 y 150s, con respecto al control. El aumento en el t_c tiene un importante impacto sobre el $Y_{X/S}$ debido al redireccionamiento del metabolismo hacia las rutas de fermentación de ácidos mixtos. Las disminuciones en los $Y_{X/S}$ con el aumento del t_c fue similar en ambas cepas lo cual podría indicar que las modificaciones genéticas de la cepa VAL24-pV21 no influyen en la forma en la que las cepas distribuyen el carbono para la formación de biomasa.

7.1.5.3. Comparación de los consumos específicos de glucosa

En la figura 7.1.5.1. C, se observa el comportamiento de los consumos específicos de glucosa (q_s) para las dos cepas, las cuales siguieron patrones contrarios conforme se aumentó el t_c . La q_s del cultivo aerobio de la cepa VAL24-pV21 fue 0.99 g/g*h y para el t_c de 50 s fue muy similar (1.04 g/g*h). Un comportamiento parecido fue reportado previamente para la cepa VAL24-pV21 bajo las mismas condiciones (Lara

et al., 2006). Sin embargo, para los t_c de 100 y 150 s se observó una disminución de 21 y 35% con respecto al control. La cepa W3110 alcanzó una q_s de 0.97 g/g*h en el control y con el t_c de 50 s la q_s fue similar (0.94 g/g*h). Las q_s de los t_c de 100 y 150 s para la cepa W3110-pV21 aumentaron 57 y 42 %, respectivamente con relación al control. Una explicación del aumento de q_s en W3110-pV21 para los t_c de 100 y 150 s (figura 7.1.5.1. c) posiblemente se encuentre en la necesidad del microorganismo de utilizar mayores cantidades de sustrato para la síntesis de ácidos orgánicos a través de las rutas de ácidos mixtos y así generar energía a través de fosforilación a nivel de sustrato, así como también mantener el equilibrio de $NAD^+/NADH$ (Zhu y Shimizu, 2004). Shalel-Levanon y col. (2005), reportaron el aumento en el flujo de síntesis de metabolitos de la fermentación de ácidos mixtos en cultivos anaerobios con respecto a cultivos aerobios. También se ha observado que cuando la concentración de O_2 disminuye, la síntesis de algunas enzimas de las rutas metabólicas de las pentosas fosfato y de Embden-Meyerhof aumenta. La necesidad de regenerar el NAD^+ para mantener el flujo metabólico de la glucólisis, promueve un aumento de la expresión de las enzimas del metabolismo del piruvato, como LdhA (Stewart, 1988). Por el contrario, la cepa VAL24-pV21 disminuyó la q_s posiblemente porque las mutaciones limitaron el uso del carbono para la generación de ácidos orgánicos para los t_c de 100 y 150 s. Sin embargo, las mutaciones de la cepa VAL24-pV21, debieron originar una incapacidad para regenerar el NAD^+ a través de la enzima LdhA lo que finalmente limitó el flujo glucolítico. La acumulación de $NADH$ regula alostéricamente a las enzimas citrato sintasa (responsable de transformar oxalacetato en citrato en el TCA) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (responsable de transformar oxalacetato en fosfoenolpiruvato, en una reacción de gluconeogénesis) (Eiteman y Altman, 2006). La inhibición alostérica de dichas enzimas en medio mínimo limita el flujo glucolítico y con ello la distribución del carbono para la biosíntesis (Causey et al., 2004). Dichas consideraciones podrían explicar la disminución en la q_s para la cepa VAL24-pV21.

7.1.5.4. Comparación de la productividad específica de acetato

En concordancia con el aumento de la acumulación de acetato (figura 7.1.5.1. D) en los cultivos recirculados, la productividad específica de acetato (q_{ac}) se incrementó con el t_c . Los valores calculados de q_{ac} para la cepa VAL24-pV21 fueron 0.10, 0.38, 0.21 y 0.13 g/g*h para los t_c de 0, 50, 100 y 150 s, respectivamente. Se puede notar que la disminución en las q_{ac} de los t_c de 100 y 150 s, se debió a la reducción de las μ más que a una disminución en la acumulación del metabolito. Por otro lado, la q_{ac} de la cepa W3110-pV21 en el control fue de 0.05 g/g*h y en los cultivos recirculados se incrementó a 0.22, 0.55 y 0.32 g/g*h para los distintos t_c evaluados. Se ha observado que existe una correlación entre el aumento de q_s y q_{ac} (Vemuri et al., 2006), similar a lo observado para los cultivos de la cepa W3110-pV21.

7.1.5.5. Comparación de las productividades específicas, rendimientos y productividades volumétricas de GFP.

La productividad específica de GFP (q_{GFP}) se observa en la figura 7.1.5.2. A. Los parámetros se calcularon a partir de las concentraciones de GFP obtenidas por análisis densitométrico (sección 7.1.3.2.). La cepa VAL24-pV21 en el t_c de 0 s alcanzó una q_{GFP} (0.024 g/g*h) del doble a la calculada para la cepa W3110-pV21 en las mismas condiciones (0.013 g/g*h), asociado con las mayores concentraciones máximas de GFP (figura 7.1.3.2). Al igual que el resto de los parámetros ya mencionados, el aumento del t_c disminuyó las q_{GFP} . La reducción en dicho parámetro en la cepa VAL24-pV21 con respecto al control fue de 8, 54 y 75% en tanto que la cepa W3110-pV21 lo hizo en 38, 31 y 54% para los t_c de 50 100 y 150 s, respectivamente. Se puede notar que a pesar de que la cepa VAL24-pV21 alcanzó concentraciones máximas de GFP mayores a las de la cepa W3110, el impacto de las oscilaciones sobre las velocidades específicas de crecimiento fue mayor para la cepa

mutante principalmente para los t_c de 100 y 150 s, originando una mayor disminución en la q_{GFP} para la cepa VAL24-pV21.

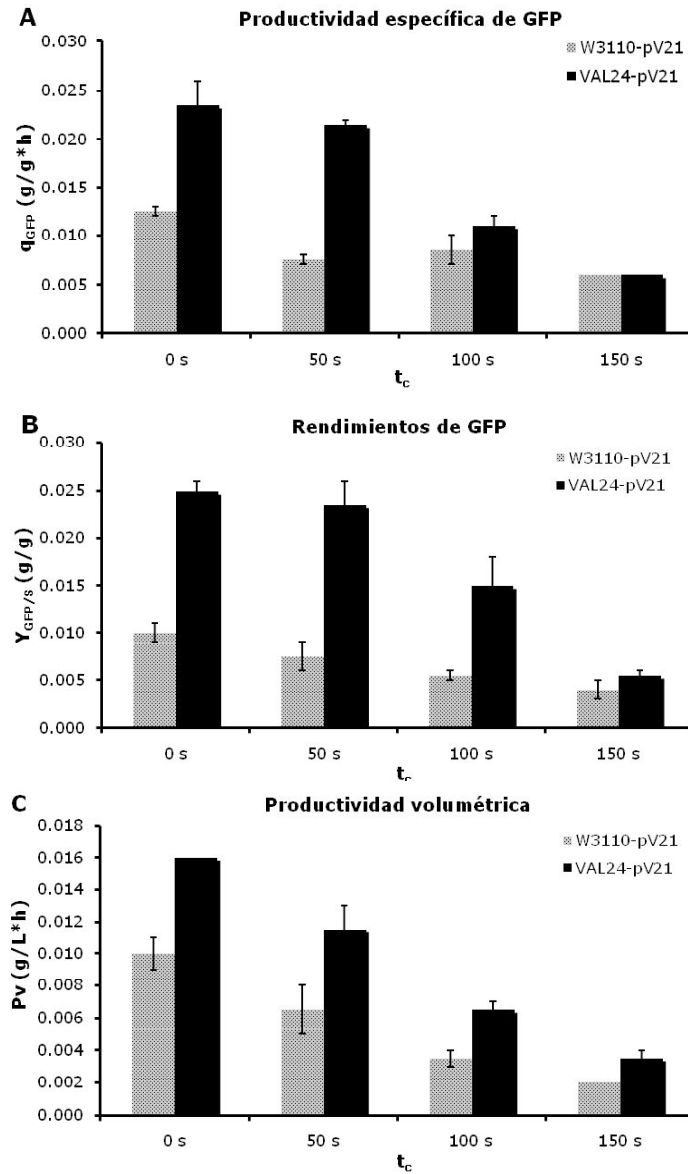


Figura 7.1.5.2.- Comparación de las velocidades específicas de producción de GFP q_{GFP} (A), rendimientos de GFP $Y_{GFP/S}$ (B) y productividades volumétricas P_v (C). Los resultados corresponden a los distintos t_c evaluados para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21.

Los rendimientos de GFP ($Y_{GFP/S}$) también disminuyeron con el aumento de los t_c . Para la cepa VAL24-pV21 se calculó un rendimiento de 0.025 g/g y un valor muy similar para el t_c de 50 s (0.024 g/g). Los cultivos con t_c de 100 y 150 s disminuyeron el $Y_{GFP/S}$ en 40 y 76% con respecto al cultivo control. La cepa W3110-

pV21 en el t_c de 0 s presentó un valor de $Y_{GFP/S}$ igual a 0.01 g/g el cual disminuyó 20, 40 y 60% con respecto al cultivo aerobio para los t_c de 50, 100 y 150 s. Lara y col. (2006b) también observaron que las oscilaciones con un t_c de 50 s no afectaron significativamente la q_{GFP} y el $Y_{GFP/S}$. Sin embargo, el aumento de las oscilaciones de TOD impacta ambos parámetros en los cultivos con largos periodos de oscilación (100 y 150 s). En correspondencia con nuestros resultados, Sandoval-Basurto y col. (2004) observaron una disminución del 87% en el $Y_{P/S}$ en un cultivo con un t_c de 180 s, para la producción de pre-proinsulina, comparado con un cultivo control aerobio.

Las oscilaciones afectaron las productividades volumétricas disminuyendo los valores conforme aumentó el t_c (figura 7.1.5.2. C). En el control, la cepa VAL24-pV21 tuvo una productividad volumétrica de 0.016 g/L y disminuyó 25, 56 y 75% con los t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. Por su parte, la cepa W3110-pV21 alcanzó una productividad volumétrica de 0.010 g/L*h y disminuyó en 30, 60 y 80% para los cultivos con t_c de 50, 100 y 150 s, respectivamente. El porcentaje de disminución de las productividades volumétricas en los respectivos t_c fue similar para ambas cepas, pero cada decremento tiene diferente explicación. La disminución de la productividad volumétrica en la cepa VAL24-pV21 se debió al aumento de los tiempos de las cinéticas, mientras que para la cepa W3110-pV21 se debió a la menor concentración de GFP alcanzadas en cada condición evaluada.

7.1.6. Evaluación de la fluorescencia de NADH

El NADH es producido en diferentes puntos del metabolismo celular (figura 2.2.). Por ejemplo, la producción de 1,3-difosfoglicerato a partir de gliceraldehido 3-fosfato por la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, genera NADH, durante la glucólisis (Moat et al., 2002). En condiciones limitadas de O_2 , *E. coli* regenera NAD^+ mediante algunas de las rutas de fermentación de ácidos mixtos (Xu

et al., 1999). La enzima LdhA produce lactato y además regenera NAD^+ , mientras que la enzima PflB produce formato y Acetil-CoA, que posteriormente puede ser utilizado para generar etanol y con ello NAD^+ . El funcionamiento coordinado de las rutas metabólicas para la oxidación y reducción de la coenzima permite mantener el balance NAD^+/NADH en la célula y con ello el flujo glicolítico (Zhu y Shimizu, 2004). Las mutaciones de la cepa VAL24-pV21 podrían por lo tanto, originar una acumulación de NADH al tener interrumpidos los genes *ldhA* y *pflB*. Con la intención de verificar esta hipótesis, se determinó la acumulación de NADH por fluorescencia para la cepa VAL24-pV21. En la figura 7.1.6. se muestran los perfiles de acumulación de NADH. En los cultivos control y con t_c de 50 s, no se observó aumento en la intensidad de fluorescencia del NADH. Sin embargo, como era de esperarse, la cepa VAL24-pV21 mostró un incremento progresivo de la fluorescencia para los cultivos con t_c de 100 y 150 s, de aproximadamente 3 veces con respecto al control.

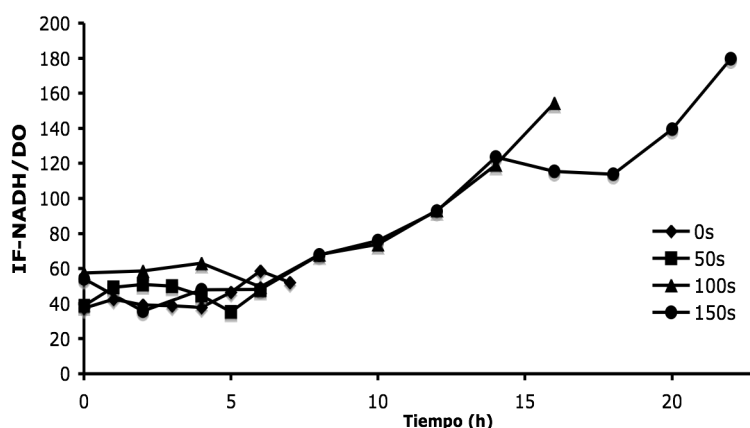


Figura 7.1.6.- Acumulación de NADH para la cepa VAL24-pV21. La cuantificación se realizó por fluorescencia en las distintas condiciones evaluadas.

7.2. Cultivos anaerobios de la cepa de *E. coli* VAL24-pV21

Con la intención de evaluar el comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en ausencia de O_2 , se realizaron cultivos en biorreactor con 750 mL de medio de cultivo alimentando únicamente nitrógeno a 0.5 vvm y con una agitación de 500 rpm. Las

cinéticas fueron hechas para verificar si la naturaleza facultativa de *E. coli* le permitiría crecer bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Las cinéticas se monitorearon por 48h y durante este tiempo no se observó crecimiento de biomasa, consumo de glucosa ni aumento en la IF-GFP (figura 7.2.). Mat-Jan y col. (1989) estudiaron el comportamiento de una cepa doble mutante (*pfl*⁻, *ldh*⁻) cultivada en condiciones de anaerobiosis con glucosa como fuente de carbono, encontrando que fue incapaz de crecer, lo que se atribuyó a la incapacidad de la cepa para generar acetil CoA que posteriormente es utilizado en el TCA para la biosíntesis de aminoácidos. Sandoval-Basurto y col. (2005) tampoco observaron crecimiento de una cepa de *E. coli* W3110 en cultivos anaerobios y explicaron la situación por la ausencia de elementos trazas (Se, Mo y Ni) necesarios para la actividad del complejo FHL. Otra explicación de la ausencia de crecimiento de la cepa en anaerobiosis podría ser la ausencia de donadores de electrones y la necesidad de agregar al medio de cultivo aceptores finales de electrones para favorecer la respiración anaerobia (Unden y Bongaerts, 1997). Considerando la idea de favorecer la respiración anaerobia adicionando aceptores finales de electrones, se decidió agregar NaNO₃ a los cultivos oscilados.

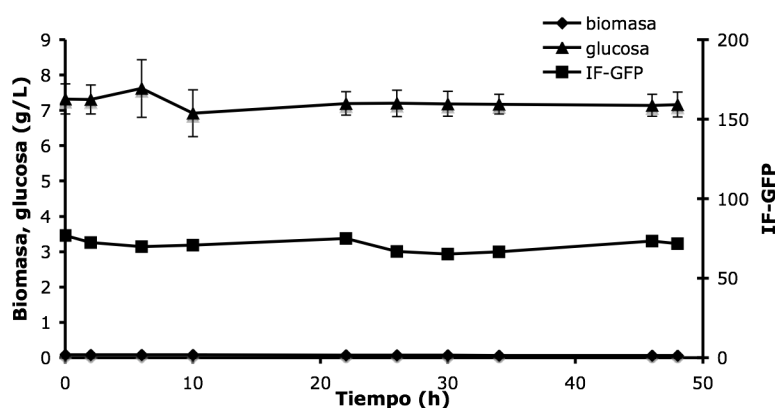


Figura 7.2.- Comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en anaerobiosis. Evaluación del crecimiento de biomasa, consumo de glucosa en intensidad de fluorescencia de GFP.

7.3. Evaluación del desempeño de VAL24-pV21 con NaNO_3

7.3.1. Crecimiento y consumo de glucosa

Para mejorar el desempeño de VAL24-pV21 en cinéticas con largos t_c , se realizaron cultivos recirculados a los que se agregó nitrato como aceptor final de electrones. De igual forma se consideró el hecho de que en los cultivos oscilados de 100 y 150 s de la cepa VAL24-pV21 se había observado el aumento de la IF-NADH (figura 7.1.6.), sugiriendo la acumulación de NADH, que puede funcionar como donador de electrones en la cadena respiratoria anaerobia con nitrato (Unden y Bongaerts, 1997). El fundamento de dichos experimentos se encuentra en la idea de proporcionar al microorganismo dos aceptores finales de electrones para utilizar según las condiciones de cultivo por las que transitara en los sistemas oscilados.

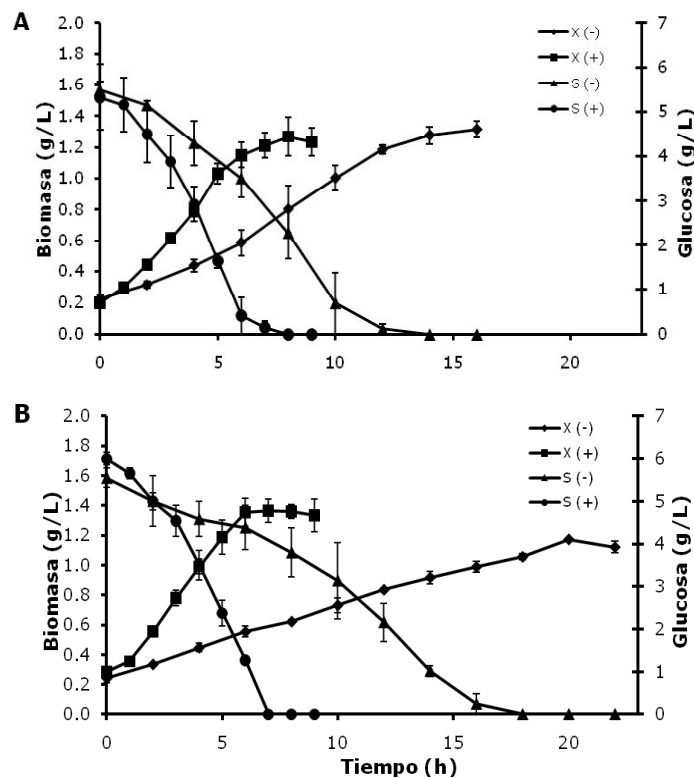


Figura 7.3.1.- Desempeño de la cepa VAL24-pV21 de cultivos con nitrato y t_c de 100 s (A) y 150 s (B). Comparación del crecimiento de biomasa (X) y consumo de glucosa (S) en cultivos con (+) y sin nitrato (-).

En la figura 7.3.1 se muestra la comparación del crecimiento de biomasa y consumo de glucosa para los t_c de 100 y 150 s para la cepa VAL24-pV21 en cultivos con y sin nitrato. Se observó que con la adición de nitrato al medio de cultivo, disminuyeron los tiempos de cultivo aunque las concentraciones máximas de biomasa fueron similares para el t_c de 100 s, alcanzando 1.27 g/L de biomasa con nitrato y 1.31 g/L sin el aceptor final de electrones. En los cultivos con t_c de 150 s con nitrato la concentración máxima de biomasa fue mayor (1.36 g/L) a los cultivos sin nitrato (1.17 g/L). La cepa VAL24-pV21 en presencia de nitrato consumió más rápidamente glucosa comparado con los cultivos sin nitrato. Las cinéticas con t_c de 100 y 150 s con nitrato agotaron el sustrato en aproximadamente en 7 h. Estos resultados son congruentes con el aumento de la velocidad de crecimiento (Tabla 4).

7.3.2. Acumulación de metabolitos extracelulares

7.3.2.1. Acumulación de metabolitos de la ruta de fermentación de ácidos mixtos en cultivos con nitrato

En los dos cultivos evaluados con nitrato el único metabolito de la ruta de fermentación de ácidos mixtos detectado fue acetato (figura 7.3.2.). Las concentraciones máximas de acetato alcanzadas fueron de 1.6 g/L y 1.7 g/L para los t_c de 100 y 150 s, respectivamente, las cuales fueron muy similares a las observadas en los cultivos sin nitrato para la cepa VAL24-pV21 con t_c de 100 y 150 s (1.6 y 1.7 g/L, respectivamente). Como ya se había observado, las mutaciones impidieron la formación de lactato y formato en la cepa mutante. Por otro lado, tampoco se detectó piruvato en el medio de cultivo el cual se había detectado en los cultivos sin nitrato para los t_c de 100 y 150 s en concentraciones de 0.18 y 0.21 g/L. Dicha situación sugiere que el nitrato permitió aprovechar de mejor forma el sustrato. En condiciones limitadas de O_2 cuando se utiliza nitrato como aceptor final de electrones, la glucosa no es oxidada por TCA y los principales metabolitos

generados son acetato y formiato (Prohl et al., 1998). En congruencia con nuestros resultados, la cepa VAL24-pV21 no produjo formiato por la mutación en *pfl*, pero el acetato si se acumuló en el medio de cultivo, posiblemente por un mecanismo de sobreflujo metabólico (Xu et al., 1999).

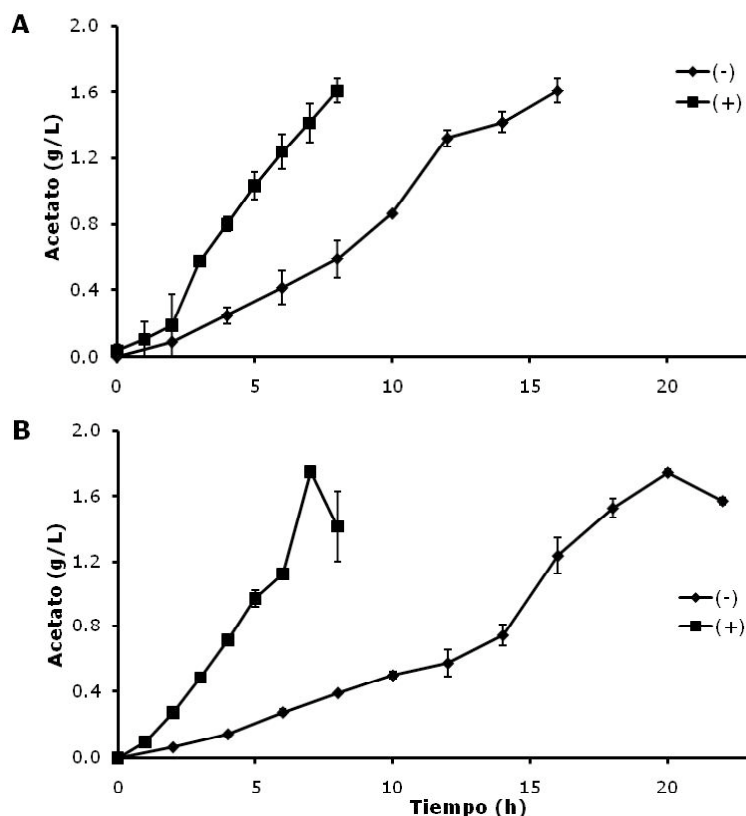


Figura 7.3.2.- Cinéticas de acumulación de acetato con (+) y sin (-) nitrato para la cepa VAL24-pV21 con t_c de 100 s (A) y 150 s (B).

7.3.2.2. Carbono utilizado para la formación de ácidos orgánicos

En la figura 7.3.2.2. se presentan los perfiles de la acumulación de carbono utilizado para la generación de ácidos orgánicos comparando la acumulación de carbono para la cepa VAL24-pV21 con y sin nitrato, así como para la cepa W3110-pV21 con t_c de 100 y 150 s. La cantidad de carbono con respecto al sustrato inicial agregado al medio de cultivo que la cepa VAL24-pV21 acumuló en forma de acetato (único

metabolito detectado en el medio de cultivo) en el t_c de 100 s, fue del 35% y para el t_c de 150 s del 30%.

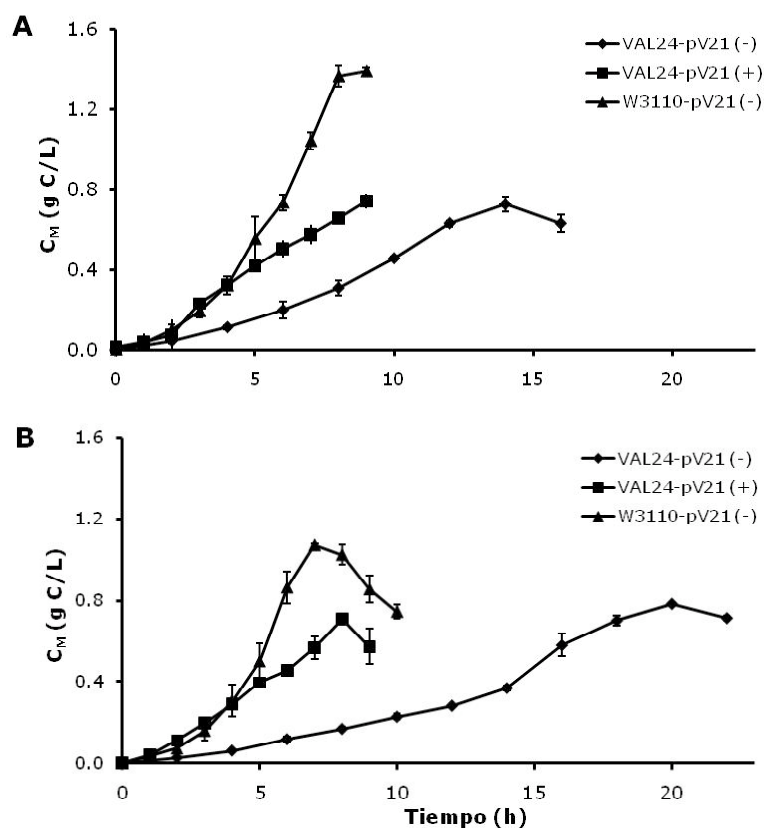


Figura 7.3.2.2.- Carbono de los metabolitos detectados en cultivos con y sin nitrato. La cuantificación del carbono (C_M) corresponde a los ácidos orgánicos detectados en el medio de cultivo. Se comparan los cultivos con t_c de 100 s (A) y 150 s (B) para la cepa VAL24-pV21 y W3110-pV21 sin (-) y con nitrato (+).

En la figura 7.3.2.2 se observa que la cepa mutante, utilizó cantidades de carbono similares en los cultivos con y sin nitrato para la síntesis de ácidos orgánicos considerando las concentraciones máximas alcanzadas, pero destinó aproximadamente 50% menos carbono inicial en comparación con la cepa W3110-pV21 con un t_c de 100 s. Los cultivos operados a un t_c de 150 s en la cepa VAL24-pV21 también utilizaron cantidades de carbono similares con y sin el aceptor de electrones, pero canalizaron aproximadamente 35% menos carbono que la cepa W3110-pV21 bajo las mismas condiciones.

7.3.3. Producción de proteína recombinante en cultivos con nitrato

7.3.3.1. Cuantificación de GFP por densitometría

En la figura 7.3.3.1 se muestra la producción de GFP en los cultivos en los que se agregó nitrato y se compara con la producción de proteína recombinante de las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 cultivadas con los mismos t_c sin nitrato.

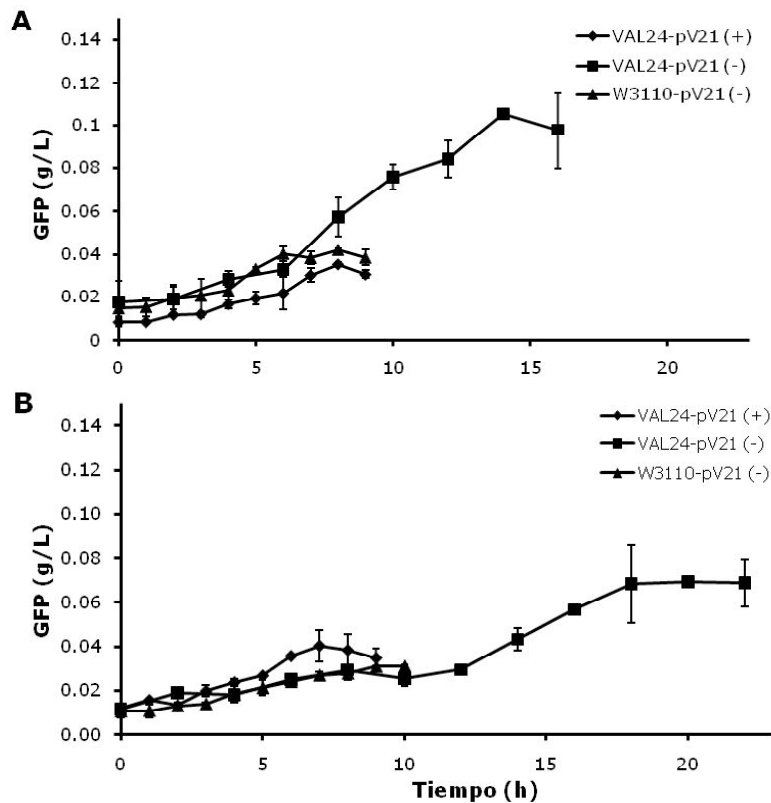


Figura 7.3.31.- Producción de proteína recombinante con (+) y sin (-) nitrato para los t_c de 100 s (A) y 150 s (B). La cuantificación se realizó por análisis densitométrico de geles SDS-PAGE.

La concentración máxima de GFP alcanzada en los cultivos con nitrato con t_c de 100 y 150 s fue de 0.04 g/L. Los cultivos de VAL24-pV21 y de W3110-pV21 con t_c de 100 s y nitrato alcanzaron concentraciones máximas de GFP similares (0.04 g/L) aunque menores a las alcanzadas por la cepa VAL24-pV21 sin nitrato (0.11 g/L). En las cinéticas con t_c de 150 s la concentración máxima de GFP fue ligeramente mayor

(0.04 g/L) para la cepa VAL24-pV21 con nitrato con respecto a la cepa W3110-pV21 (0.03 g/L), pero menor a alcanzada por la cepa mutante sin el aceptor final de electrones (0.07 g/L). Es importante notar que la presencia de nitrato en el medio de cultivo redujo los tiempos en que se alcanzaron las concentraciones máximas de proteína recombinante. Se ha observado que en anaerobiosis y cuando se utiliza nitrato como aceptor de electrones, el TCA está reprimido debido a la regulación transcripcional del sistema ArcAB sobre las enzimas del ciclo (Shalel-Levanon et al., 2005a), pero también debido al uso de glucosa como fuente de carbono (Prohl et al., 1998). La represión del TCA bajo dichas condiciones podría explicar la disminución en la producción de GFP con largos periodos de anaerobiosis debido a que algunos metabolitos del TCA se utilizan para sintetizar aminoácidos (Konz et al., 1998).

7.3.3.2. Evaluación de la fluorescencia de GFP

Mediante fluorimetría se evaluó la IF-GFP en los cultivos a los que se adicionó nitrato. Los resultados obtenidos fueron comparados con las cinéticas de las cepas W3110-pV21 y VAL24-pV21 sin nitrato para los dos t_c evaluados (figura 7.3.3.2.). La IF-GFP de los cultivos de VAL24-pV21 con nitrato para el t_c de 100 s fue tres veces mayor a lo medido para la cepa W3110-pV21, aun cuando la concentración de GFP cuantificada con geles de SDS-PAGE fue la misma (figura 7.3.3.1.). Los cultivos de la cepa VAL24-pV21 con nitrato y a un t_c de 150 s presentaron cinco veces más IF-GFP que los de la cepa W3110-pV21. Sin embargo, como puede observarse en la figura 7.3.3.2, la IF-GFP de la cepa VAL24-pV21 con nitrato fue menor a la alcanzada en los cultivos de la misma cepa sin nitrato para los t_c evaluados. El perfil de la fluorescencia en la cepa VAL24-pV21 con nitrato para los t_c de 100 y 150 s, se incrementó en forma constante desde el inicio del cultivo, posiblemente, debido a la mayor disponibilidad de O_2 intracelular como consecuencia de la presencia de nitrato como un segundo aceptor final de electrones.

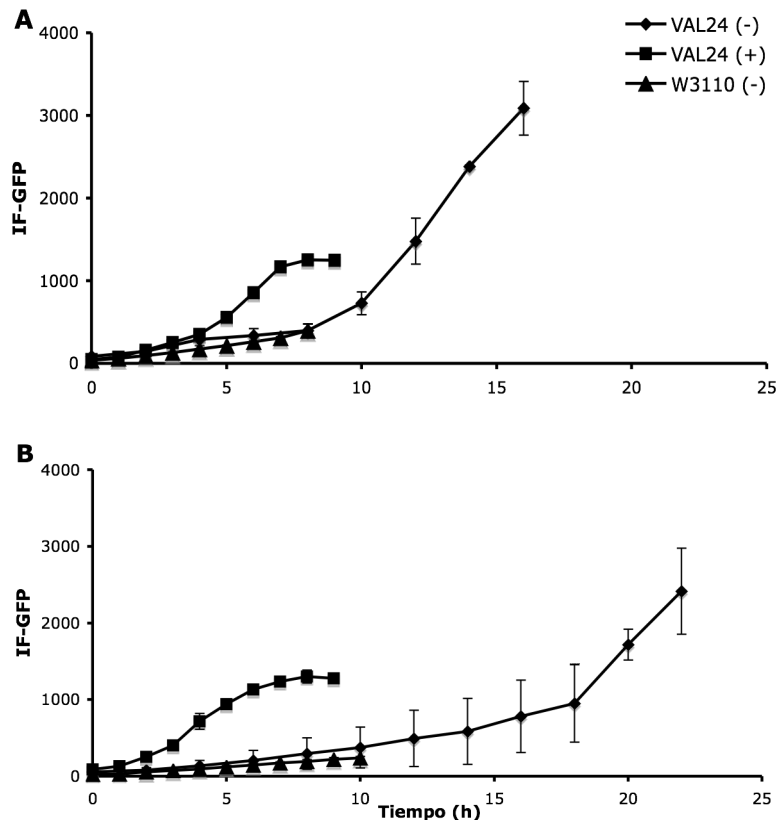


Figura 7.3.3.2.- Cinéticas de fluorescencia total de GFP para las cinéticas con (+) y sin (-) nitrato para los t_c de 100 s (A) y 150 s (B).

7.3.4. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos con NO_3

7.3.4.1 Velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación en cultivos con nitrato

Los cultivos de la cepa VAL24-pV21 a los que se agregó nitrato, mostraron un incremento en la velocidad específica de crecimiento con respecto a aquellos sin el aceptor final de electrones (figura 7.3.4.1. A). La μ aumentó de 0.15 a 0.32 h^{-1} con la presencia del aceptor final de electrones para la cepa VAL24-pV21 con un t_c de 100 s. La velocidad específica fue similar a la alcanzada por la cepa W3110-pV21 operada con el mismo t_c (0.30 h^{-1}). Para el t_c de 150 s la μ de la cepa VAL24-pV21 se incrementó más de tres veces con la adición de nitrato (de 0.09 h^{-1} a 0.32 h^{-1}) e incluso fue ligeramente mayor a la alcanzada por la cepa W3110-pV21 (0.29 h^{-1}). Se ha observado que cuando bacterias entéricas realizan respiración anaerobia en

presencia de nitrato como aceptor final de electrones, la μ de los cultivos tienen un valor intermedio entre aquellas que se alcanzarían en condiciones aerobias y anaerobias (Stewart, 1988).

Los tiempos de duplicación también disminuyeron con la presencia del nitrato (Apéndice C). Los cultivos de VAL24-pV21 para el t_c de 100 s con nitrato tuvieron un t_d de 2.2 h que representa el 50% del calculado para los cultivos sin el aceptor final de electrones (4.8 h), y muy similar al alcanzado por la cepa W3110-pV21 (2.4 h), bajo las mismas condiciones. El efecto benéfico del nitrato puede observarse mejor en los cultivos con t_c de 150 s al reducir dicho parámetro de 7.8 h (cultivos sin nitrato) a 2.2 h (cultivos con nitrato). El t_d de la cepa W2110-pV21 con un t_c de 150 s fue de 2.4 h, similar al de VAL24-pV21 con nitrato para el mismo t_c .

7.3.4.2 Rendimiento global de biomasa en cultivos con nitrato

La presencia de nitrato también mejoró los rendimientos globales de biomasa en la cepa VAL24-pV21 (figura 7.3.4.1. B). El cálculo de $Y_{X/S}$ mostró que los cultivos de la cepa VAL24-pV21 con nitrato para el t_c de 100 s tuvieron un rendimiento de 0.25 g/g. Este valor fue aproximadamente 32% mayor al alcanzado en las cinéticas de la misma cepa sin nitrato (0.19 g/g) y 25% mayor al de la cepa W3110-pV21 (0.20 g/g) bajo las mismas condiciones. El $Y_{X/S}$ de la cepa VAL24-pV21 para el t_c de 150 s con nitrato fue de 0.24 g/g que representa un aumento del 41% al logrado sin nitrato (0.17 g/g). Por otro lado, el incremento del $Y_{X/S}$ en los cultivos con nitrato pudo deberse a que existió la reoxidación del NADH cuando fue utilizado como donador de electrones, aunado a la producción de energía por fosforilación a nivel de sustrato durante la generación de acetato. En nuestro sistema además debe considerarse que los microorganismos pudieron sumar la energía generada tanto en condiciones aerobias como anaerobias (debido a la naturaleza modular de la cadena

respiratoria), para mejorar el desempeño en un medio heterogéneo (Moat et al., 2002).

7.3.4.3 Consumos específicos de glucosa y producción específica de acetato en cultivos con nitrato

El nitrato incrementó la q_s de 0.78 a 1.26 g/g*h en los cultivos de VAL24-pV21 con t_c de 100 s (figura 7.3.4.1. C). Sin embargo, la q_s fue menor al valor alcanzado por W3110-pV21 (1.52 g/g*h) bajo las mismas condiciones. De la misma forma, el nitrato incrementó la q_s en las cinéticas de la cepa VAL24-pV21 con t_c de 150 s de 0.64 a 1.32 g/g*h, mientras que bajo estas condiciones la q_s de la cepa W3110-pV21 se comportó de forma similar a la cepa VAL24-pV21 tratada con nitrato (1.38 g/g*h). El aumento de las q_s en los cultivos con nitrato es consistente con los mayores valores de las μ y $Y_{X/S}$. Una posible explicación podría encontrarse en el uso de NADH como donador de electrones en la cadena respiratoria anaerobia y con ello la regeneración de NAD^+ . La presencia del cofactor oxidado permitiría un mayor flujo a través de la glucólisis que explicaría el aumento en q_s . La q_{ac} de los cultivos con nitrato para la cepa VAL24-pV21 con t_c de 100 s fue dos veces mayor (0.44 g/g*h) al de las cinéticas sin el aceptor de electrones (0.21 g/g*h). Es importante notar que el aumento en la q_{ac} se debió al incremento en la μ y no a una mayor producción del metabolito. La q_{ac} de la cepa W3110-pV21 (0.55 g/g*h) fue mayor a la alcanzada por la cepa VAL24-pV21 con t_c de 100 s con y sin nitrato (figura 7.3.4.1. D). En los cultivos recirculados con t_c de 150 s se alcanzaron velocidades similares en las cinéticas de VAL24-pV21 con nitrato y W3110-pV21 (0.33 y 0.32 g/g*h, respectivamente), mayores a las calculadas para la cepa mutante sin nitrato (0.13 g/g*h).

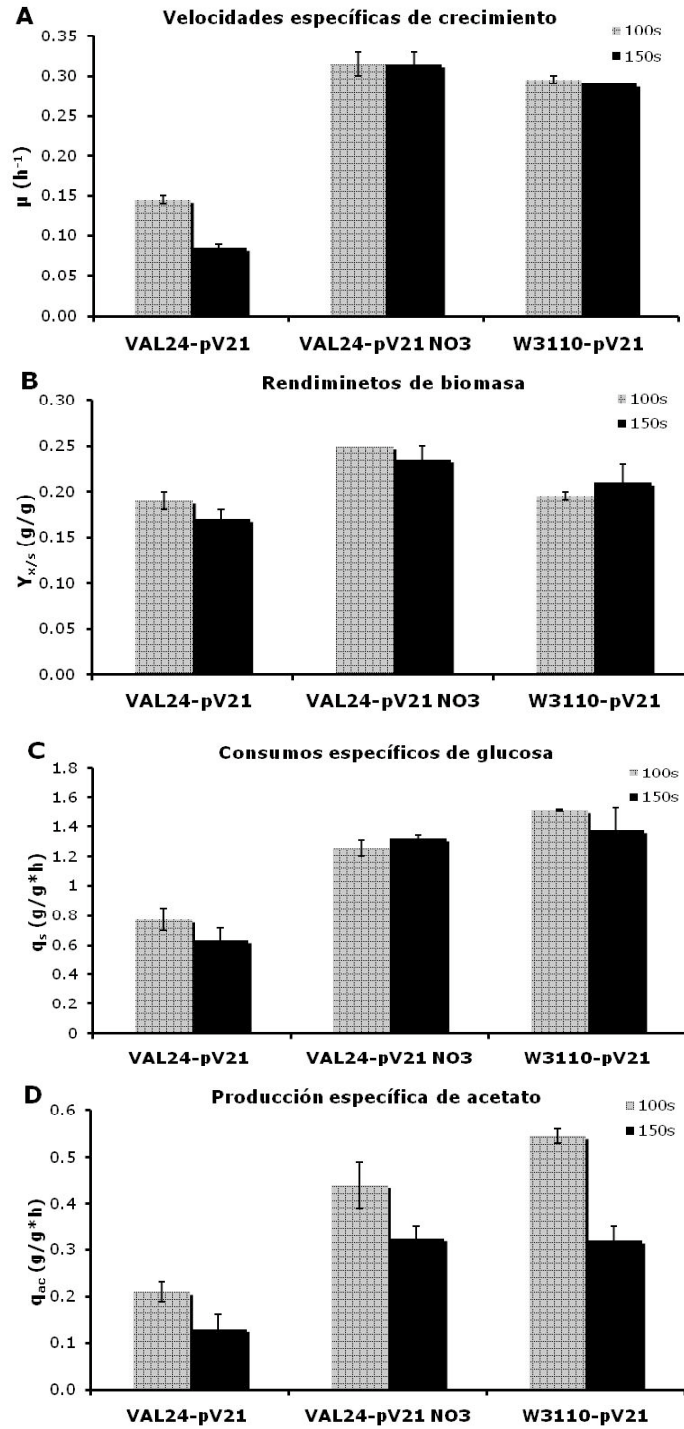


Figura 7.3.4.1.- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas VAL24-pV21 con y sin nitrato y W3110-pV21 sin nitrato. Velocidad específica de crecimiento (A), rendimiento de biomasa (B), consumo específico de glucosa (C) y producción específica de acetato (D), de cultivos con t_c de 100 y 150 s.

7.3.4.4 Productividades específicas, rendimientos y productividades volumétricas de GFP en cultivos con nitrato

Las productividades específicas de GFP (figura 7.3.4.2. A) para los cultivos de VAL24-pV21 con t_c de 100 y 150 s con nitrato tuvieron una q_{GFP} de 0.008 g/g*h en ambos casos, en tanto que las q_{GFP} sin el aceptor de electrones fueron de 0.011 y 0.006 g/g*h para los t_c de 100 y 150 s, respectivamente. La cepa W3110-pV21 obtuvo una q_{GFP} de 0.009 y 0.006 g/g*h para los t_c de 100 y 150 s respectivamente. La q_{GFP} alcanzada por la cepa VAL24-pV21 en el cultivo donde se utilizó nitrato con un t_c de 150 s, fue ligeramente mayor a la obtenida en los cultivos de VAL24-pV21 sin nitrato y W3110-pV21, bajo las mismas condiciones (figura 7.3.4.2. A).

Los $Y_{GFP/S}$ se comparan en la figura 7.3.4.2. B. Se observó que con nitrato el $Y_{GFP/S}$ para la cepa VAL24-pV21 fue tres veces menor (0.005 g/g) al del cultivo sin nitrato para el t_c de 100 s (0.015 g/g) y ligeramente menor al de los cultivos con t_c de 150 s (0.006 g/g*h). Los q_{GFP} de la cepa W3110-pV21 fueron similares a los de la cepa VAL24-pV21 con nitrato. Se ha reportado que cultivos anaerobios donde se utiliza nitrato como aceptor final de electrones y glucosa como fuente de carbono, presentan represión del TCA (Prohl et al., 1998). Dicha represión del TCA, limitaría la producción de proteína recombinante y con ello se produciría la disminución de $Y_{GFP/S}$. Esta situación podría explicar el mayor $Y_{GFP/S}$ alcanzado en los cultivos de VAL24-pV21 sin nitrato con t_c de 100 s, debido a una mayor actividad del TCA.

La productividad volumétrica (figura 7.3.4.2 C) del cultivo de VAL24-pV21 con nitrato y un t_c de 100s fue de 0.004 g/L*h, menor a la obtenida en las cinéticas sin nitrato para la cepa mutante (0.007 g/L*h), pero igual a la obtenida para la cepa W3110-pV21 (0.004 g/L*h). Las cinéticas con un t_c de 150 s con y sin nitrato para la cepa VAL24-pV21 tuvieron una productividad volumétrica igual (0.004 g/L*h)

pero del doble a la que se alcanzó con la cepa W3110-pV21 (0.002 g/L*h) con las mismas condiciones de operación.

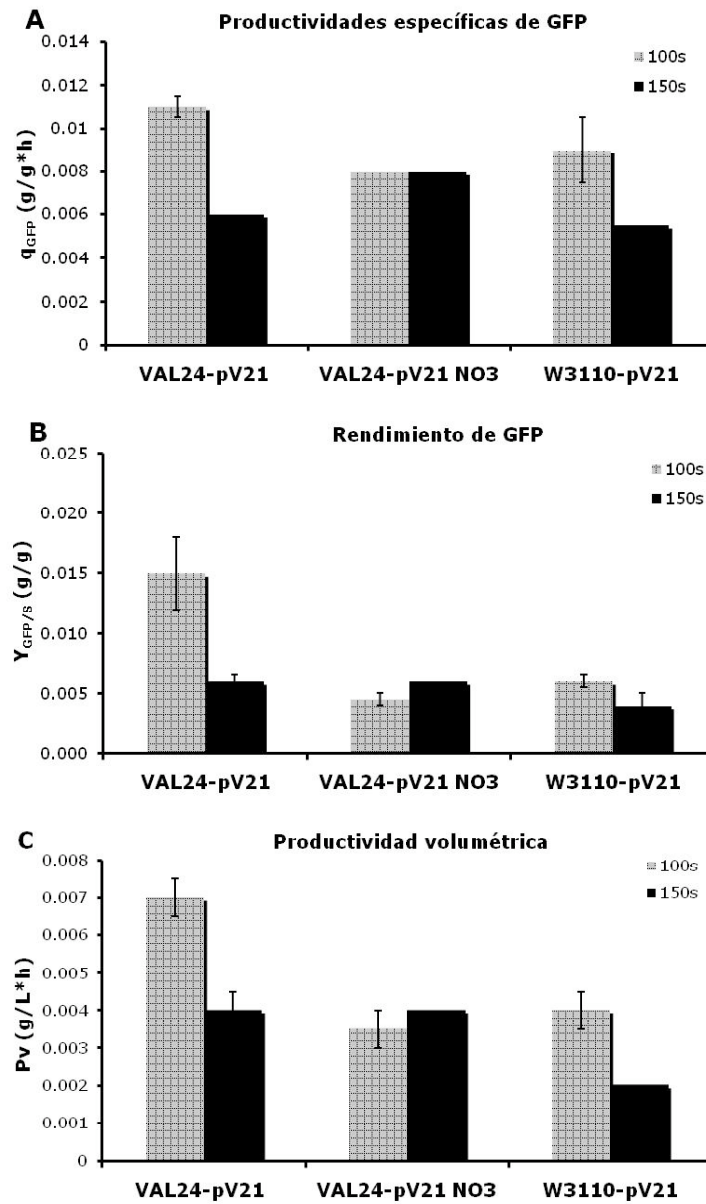


Figura 7.3.4.2.- Comparación de las productividades específicas de GFP (A), rendimiento de GFP-sustrato (B) y productividad volumétrica P_v (C) para las cepas con y sin nitrato para las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21.

7.4. Cultivos anaerobios de VAL24-pV21 con NO₃

El comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en cultivos anaerobios en los que se agregó nitrato se presenta en la figura 7.4. Se observó que la presencia del aceptor final de electrones en el medio de cultivo no favoreció el crecimiento celular, el aumento de IF-GFP y el consumo de sustrato, en la cinéticas que se monitorearon durante 48h. Los resultados pueden explicarse por el hecho de que nuevamente la mutación en *pflB* impidió a la cepa sintetizar acetil CoA en condiciones de anaerobiosis (Mat-Jan et al., 1989). La síntesis de acetil CoA es importante porque posteriormente es utilizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, no solamente para generar mayores cantidades de NADH sino también para la síntesis de precursores de aminoácidos. El crecimiento de *E. coli* mediante la cadena respiratoria anaerobia requiere la presencia no solo del aceptor final de electrones, sino también de algún donador de electrones. El NADH acumulado en los cultivos oscilados con los t_c de 100 y 150 s (figura 7.1.6) pudo funcionar como donador de electrones (Unden y Bongaerts, 1997) para modificar el desempeño de la cepa VAL24-pV21 con nitrato (sección 7.3). Sin embargo, al no observarse consumo de glucosa en los cultivos anaerobios, sería de esperarse que no estuviera presente el NADH para funcionar como donador de electrones. Otro elemento que puede funcionar como donador de electrones es el formato, pero la cepa VAL24-pV21 no puede sintetizar dicho metabolito por la mutación en *pfl*. Por otro lado, el hidrógeno también es utilizado como donador de electrones por la enzima nitrato reductasa, que usualmente se genera a partir del formato mediante la enzima formato-hidrógeno liasa que produce H₂ y CO₂, reacción que no puede realizarse al no estar presente el formato.

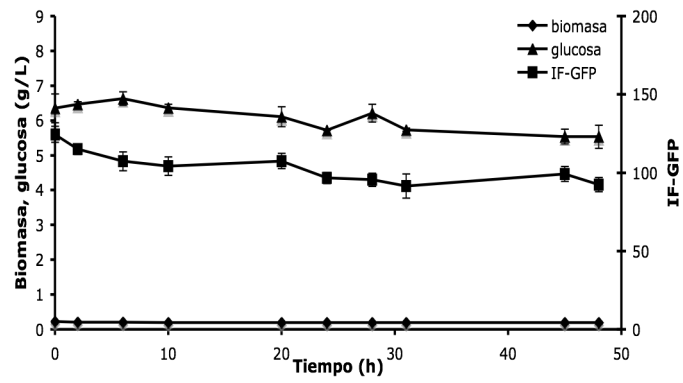


Figura 7.4.- Comportamiento de la cepa VAL24-pV21 en cultivos anaerobios con nitrato.
Evaluación del crecimiento de biomasa, intensidad de fluorescencia de GFP (IF-GFP) y consumo de glucosa.

8. CONCLUSIONES

- El aumento del t_c originó la disminución de las concentraciones máximas de biomasa, observándose un mayor impacto en la cepa VAL24-pV21.
- En la cepa VAL24-pV21 la μ disminuyó 80% con el t_c de 150 s con respecto al control, mientras la cepa W3110-pV21 solo disminuyó 28%. Dicho resultado sugiere que las rutas metabólicas de fermentación de ácidos mixtos (*ldhA*, *pflB* y *poxB*) son necesarias en cultivos con t_c de 100 y 150 s.
- La adición de nitrato al medio de cultivo, mejoró dos y tres veces las μ de los cultivos de VAL-24-pV21 con t_c de 100 y 150 s, respectivamente.
- Los rendimientos de biomasa con respecto al control disminuyeron 63% para la cepa VAL24-pV21 y 52% para W3110-pV21 con el t_c de 150 s, sugiriendo que las modificaciones genéticas no afectan considerablemente la distribución de carbono hacia la formación de biomasa.
- La presencia de nitrato en el medio de cultivo aumentó los $Y_{x/s}$, siendo 31 y 41% mayores en los cultivos con los t_c de 100 y 150 s, respectivamente.
- Las concentraciones máximas de GFP sintetizadas por la cepa VAL24-pV21 fueron mayores en todas las condiciones evaluadas con respecto a la cepa W3110-pV21, pudiéndose atribuir a la distribución de carbono debido al fondo genético de la cepa VAL24-pV21.
- La presencia de nitrato en el medio de cultivo no mejoró la producción de GFP para la cepa VAL24-pV21.

- Las modificaciones genéticas de la cepa VAL24-pV21 redujeron la acumulación de ácidos orgánicos con respecto a la cepa W3110-pV21.
- La cepa VAL24-pV21 en cultivos con o sin nitrato, acumuló concentraciones similares de ácidos orgánicos, pero menores a las producidas por W3110-pV21.
- Las oscilaciones de TOD afectaron la viabilidad de la cepa VAL24-pV21 principalmente para los t_c de 100 y 150 s donde se observó un porcentaje final de células viables de 70 y 65%, respectivamente. Por otro lado, la viabilidad de la cepa W3110-pV21 no disminuyó considerablemente en los distintos cultivos evaluados. Por lo tanto, la disminución de la viabilidad puede atribuirse a las oscilaciones de TOD y a la fisiología particular del microorganismo y no al estrés mecánico del sistema.

PERSPECTIVAS

A continuación se describen algunas propuestas que podrían mejorar el crecimiento y productividad de la cepa VAL24-pV21 en cultivos con oscilaciones de TOD:

- Las tres mutaciones de la cepa VAL24-pV21 permiten el adecuado desempeño de los microorganismos con t_c de 50 s. Sin embargo, con mayores tiempos de circulación la cepa disminuye considerablemente su desempeño con respecto al cultivo aerobio. La cepa VAL24-pV21 acumuló NADH en los cultivos con t_c de 100 y 150 s indicando la incapacidad de la cepa para reoxidar al cofactor. Tomando como experiencia la evaluación de VAL24-pV21 con largos periodos de anaerobiosis, podría construirse y evaluarse una cepa doble mutante (*pflB*⁻, *poxB*⁻) que posiblemente permitiría mejorar el desempeño en comparación con la triple mutante, debido a que podría regenerar NAD⁺ a través de *ldhA*.
- Con la finalidad de aprovechar la naturaleza modular de la cadena respiratoria, se podrían utilizar distintos donadores y aceptores de electrones en los cultivos oscilados. El fumarato puede funcionar como aceptor de electrones y tiene como ventaja adicional que forma parte del ciclo de los ácidos tricarbónicos y podría favorecer la capacidad biosintética del microorganismo y con ello la producción de proteína recombinante. Podrían utilizarse otros donadores de electrones como el succinato con la intención de activar la cadena respiratoria anaerobia. Nuevamente, la ventaja que podría proporcionar dicho donador de electrones sería que es un metabolito del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Tanto el fumarato como donador y el succinato como aceptor, podría evaluarse conjuntamente en el medio de cultivo.

- La adición de nitrato al medio en los cultivos oscilados mejora la μ , $Y_{X/S}$ y q_s con respecto a cultivos sin el aceptor final electrones. Sin embargo, las concentraciones máximas de proteína recombinante son menores en los cultivos con nitrato. La disminución en la producción de proteína recombinante en cultivos oscilados con largos periodos de anaerobiosis se han relacionado con la ramificación de ciclo de los ácidos tricarbóxicos y con ello la limitación de la capacidad biosintética del microorganismo. En cultivos anaerobios con nitrato y utilizando glucosa, se ha observado además, que el TCA no es activo. Sin embargo, se ha observado que el uso de glicerol en cultivos donde el nitrato es el aceptor final de electrones, el TCA se activa. Considerando dicha situación, posiblemente la producción de proteína recombinante se incrementaría si se sustituye la glucosa como fuente de carbono por glicerol.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hamid AM, Attwood MM, Guest JR. 2001. Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 147: 1483-1498.
- Alexeeva S, de Kort B, Sawers G, Hellingwerf Klaas, de Mattos M.J.T. 2000. Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 182: 4934-4940.
- Amanullah A. 1994. Scale down models of mixing performance in large scale bioreactors, Ph.D. dissertation, University of Birmingham, England.
- Amanullah A, McFarlane CM, Emery AN, Nienow AW. 2001. Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 73: 390-399.
- Amanullah A, Buckland BC, Nienow AW. 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 York: John Wiley & Sons, 2004. pp 1071-1170.
- Aristidou A, San K, Bennett G. 1999. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using Fructosa as the primary carbon source. *Biotechnology Progress*. 15: 140-145.
- Baneyx F, Mujacic M. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 22: 1399-1408.
- Becker S, Vlad D, Schuster S, Pfeiffer P, Uden G. 1997. Regulatory O₂ tensions for the synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. *Archives of Microbiology*. 168: 290-296.
- Boor KJ. 2006. Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *Plos Biology*. 4: 18-20.
- 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 Engineering*. 18: 171-180.
- Bylund F, Guillard F, Enfors SO, Trägårdh C, Larsson G. (1999). Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance. *Bioprocess Engineering*. 20: 377-389.
- Bylund F, Castan A, Mikkola R, Veide A, Larsson G. (2000). Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. *Biotechnology and Bioengineering*. 69: 119-128.
- Carneiro S, Amaral AL, Veloso ACA, Dias T, Peres AM, Ferreira EC, Rocha I. 2009. Assessment of Physiological Conditions in *E. coli* Fermentations by Epifluorescent Microscopy and Image Analysis. *Biotechnology Progress*. 25: 882-891.
- Causey TB, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO. 2004. Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2235-2240.
- Chang DE, Shin S, Rhee JS, Pan JG. 1999. Acetate Metabolism in a *pta* Mutant of *Escherichia coli* W3110: Importance of Maintaining Acetyl Coenzyme A Flux for Growth and Survival. *Journal of Bacteriology*. 181: 6656-6663.
- Cherrington CA, Hinton M, Chopra I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 68: 69-74.
- Chou CP. 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76: 521-532.
- Contiero J, Beatty c, Kumari S, DeSanti CL, Strohl WR, Wolfe A. 2000. Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 24: 421-430.

- Delvigne F, Destain J, Thonart P. 2005. Bioreactor hydrodynamic effect on *Escherichia coli* physiology: experimental results and stochastic simulations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 28: 131-137.
- Delvigne F, Boxus M, Ingels S, Thonart P. 2009. Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a prpoS::GFP reporter gene in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*. 8: 15.
- De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2006. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering*. 8: 281-290.
- De Mey M, Maeseneire S, Soetaert W, Bañadme E. 2007. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 34: 689-700.
- Eiteman MA, Altman E. 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology*. 24: 530-536.
- Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D et al. 2001. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 85:175-185.
- Feilmeier B, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips G. 2000. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 182: 4068-4076.
- García-Fruitós E, González-Montalbán N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Arís A, Ventura S, Villaverde A. 2005. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial Cell Factories*. 4: 27.
- García JR, Cha HJ, Rao G, Marten MR, Bentley W. 2009. Microbial *nar*-GFP cell sensors reveal oxygen limitations in highly agitated and aerated laboratory-scale fermentors. *Microbial Cell Factories*. 8:6.
- George S, Larsson G, Enfors SO. 1993. A scale-down two-compartment reactor with controlled substrate oscillations: Metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*. 9: 249-257.
- Graumann K, Premstaller A. 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*. 1:164-186.
- Green J, Crack JC, Thomson AJ, LeBrun NE. 2009. Bacterial sensors of oxygen. *Current Opinion in Microbiology*. 12: 145-151.
- Guest, JR. Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli* the 1992 Marjory Stephenson Prize Lectura. *Journal of General Microbiology*. 138: 2253-2263.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RW. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12501-12504.
- Hewitt CJ, Boon L, McFarlane C. 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 59: 612-620.
- Hewitt CJ, Nebe-von-Caron G, Axelsson B, McFarlane CM, Nienow AW. 2000 Studies related to the scale-up og high cell density *E. coli* fed-batch fermentations using multi-parameter flow cytometry : effect of a changing micro-environment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. 70: 381-390.
- Hewitt CJ, Onyeaka H, Lewis G, Taylor I, Nienow A. 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 96: 495-505.
- Jana S, Deb JK. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 289-298.

- Kang DG, Kim YK, Cha HJ. 2002. Comparison of green fluorescent protein expression in two industrial *Escherichia coli* strains, BL21 and W3110, under co-expression of bacterial hemoglobin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 523-528.
- Kiley P, Beinert H. (1999). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 341-352.
- Konz JO, King J, Cooney CL. (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress*. 14: 393-409.
- Langer ES. 2009. Capitalizing on novel expression systems. *Genet Eng Biotechnol News*. 15:12.
- Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2005. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradient simulated in a scale down system. *Biotechnology and Bioengineering*. 93: 372-385.
- Lara AR, Galindo E, Ramírez OT, Palomares LA. 2006a. Living with Heterogeneities in Bioreactors. *Molecular Biotechnology*. 34: 355-382.
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 94: 1164-1175.
- Lidén G. 2002. Understanding the bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 24: 273-279.
- Luli G, Strohl W. 1990. Comparison of Growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 1004-1011.
- Luyben K Ch AM. 1993. Regime analysis for the scale-down of biotechnological processes. 159-169.
- March JC, Rao G, Bentley WE. 2003. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 303-315.
- Mat-Jan F, Alam KY, Clark D. 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*. 171: 342-348.
- Moat AG, Foster JW, Spector MP. Microbial Physiology. New York: Wiley-Liss, Inc., 2002. Chapter 8, 9, 11.
- Nakano K, Sato RS, Marka H. 1997. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 597-601.
- Nebe-von Caron G, Stephens P, Badley RA. 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 988-998.
- Neubauer P, Junne S. 2010. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*. 21: 1-8.
- Ni Y, Chen R. 2009. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 31: 1661-1670.
- Nienow AW. 2009. Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. 42: 789-796.
- O'Beirne D, Hamer G. 2000. Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: a problem exacerbated by scale-up. *Bioprocess Engineering*. 23: 487-494.
- Onyeaka H, Nienow AW, 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 85: 1-11.
- Oosterhuis NMG. 1984. Scale-up of bioreactors, a scale-down approach. PhD thesis Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- Palomares LA, Ramírez OT. 2000. Bioreactor Scale-down. In: Spier RD, editors.

- Encyclopedia of Cell Technology, New York: John Wiley & Sons. pp 174–183.
- Palomares LA, Lara AR, Ramírez OT. 2009. Bioreactor scale-down. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, edited by Michael C. Flickinger.
 - Pavlou AK, Reichert JM. 2004. Recombinant protein therapeutics – success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*. 22: 1513-1519.
 - Phue J, Shiloach J. 2005. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*. 7: 353-363.
 - Prohl C, Wackwitz B, Vlad D, Uden G. 1998. Functional citric acid cycle in an arcA mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Archives of Microbiology*. 170: 1-7.
 - Sahdev S, Khattar S, Saini K. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 307: 249-264.
 - Sandoval-Basurto E, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. 2005. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering*. 89: 453-463.
 - Schmidt FR. 2005. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 425-435.
 - Schweder T, Krüger E, Xu B, Jürgen B, Blomdten G, Enfors SO, Hecker M. 1999. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology and Bioengineering*. 65: 151-159.
 - Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. 2005. Effect of Oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR Regulation Systems and Metabolic Responses. *Biotechnology and Bioengineering*. 89: 556-564.
 - Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. 2005. Effect of ArcA and FNR on the Expression of Genes Related to the Oxygen Regulation and the Glycolysis Pathway in *Escherichia coli* Under Microaerobic Growth Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 92: 147-159.
 - Shalel-Levanon S, San KY, Bennett GN. 2005. Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expresión of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*. 7: 364-374.
 - Shapiro HM. 2000. Membrana Potencial Estimation by Flow Cytometry. *Methods*. 21: 271-279.
 - Soini J, Ukkonen K, Neubauer P. 2008. High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations – consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microbial Cell Factories*. 7: 26.
 - Stewart V. 1988. Nitrate Respiration in Relation to Facultative Metabolism in Enterobacteria. *Microbiological Reviews*. 52: 190-232.
 - Uden G, Bongaerts J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1320: 217-234.
 - Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 3653-3661.
 - Vrabel 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. *Chemical Engineering Science*. 55: 5881-5896.
 - Wong MS, Wu Steven, Causey T, Bennett G, San K. 2008. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production.

Metabolic Engineering. 10: 97-108.

- Wong M, Wright M, Woodley JM, Lye GJ. 2009. Enhanced recombinant protein synthesis in batch and fed-batch *Escherichia coli* fermentation based on removal of inhibitory acetate by electro dialysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84: 1284-1291.
- Xu B, Jahic M, Enfors S. 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 564-571.
- Yang F, Moss LG, Phillips Jr GN. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 14: 1246-1251.
- Yuan H, Yang X, Hua Z. 2004. Optimization of expression of an Annexin V-Hirudin chimeric protein in *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 159: 147-156.
- Zerbs S, Frank A, Collart F. 2009. Bacterial systems for production of heterologous proteins. *Methods in Enzymology*. 463: 149-168.
- Zhu J, Shimizu K. 2004. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 367-375.
- Zhu Y, Eiteman MA, De Witt K, Altman E. 2007. Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 456-464.
- Zhu Y, Eiteman MA, Altman R, Altman E. 2008. High Glycolytic Flux Improves Pyruvate Production by a Metabolically Engineered *Escherichia coli* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 6649-6655.

APÉNDICES

Apéndice A.

Acumulación de metabolitos de las rutas de fermentación de los ácidos mixtos

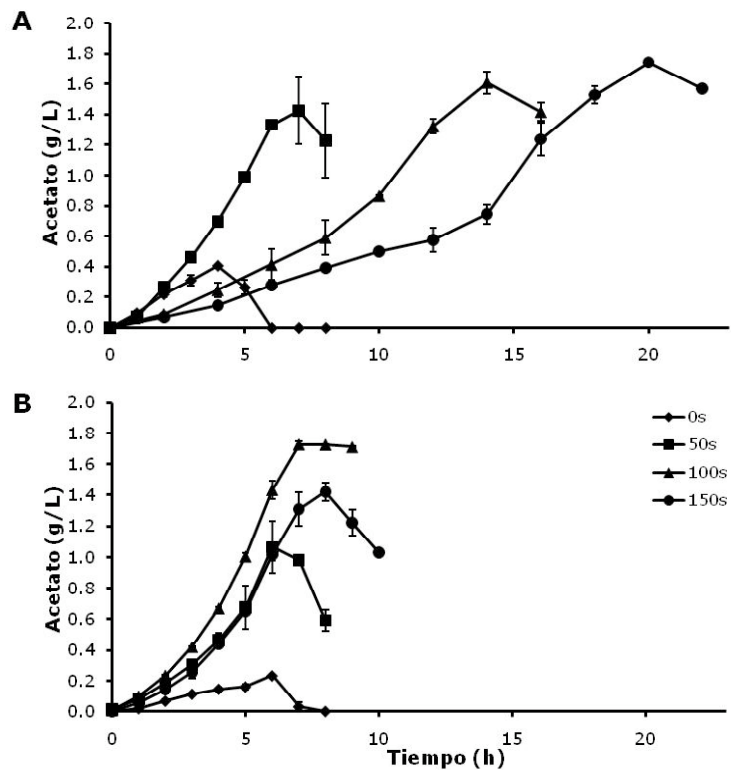


Figura A.1.- Acumulación de acetato. Cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B).

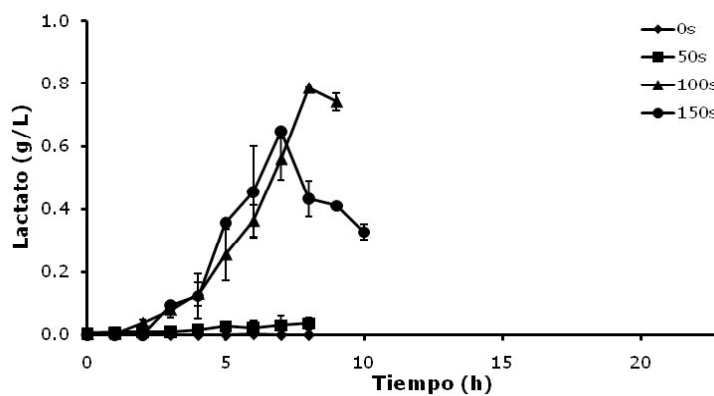


Figura A.2.- Acumulación de lactato. Cepa W3110-pV21 para el cultivo control y recirculados.

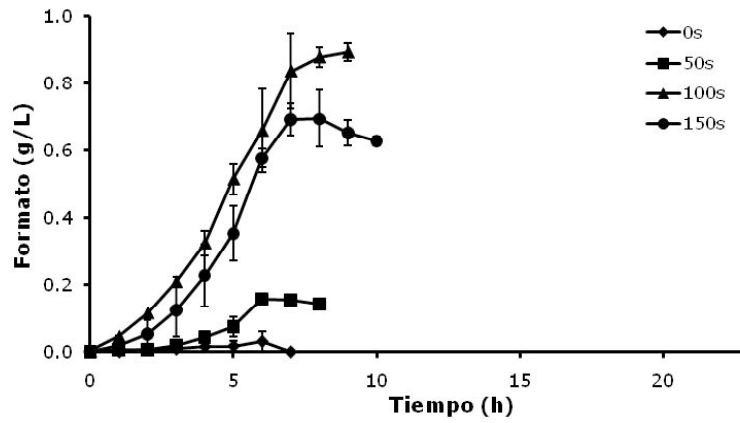


Figura A.3.- Acumulación de formato. Ceba W3110-pV21 para el cultivo control y recirculados.

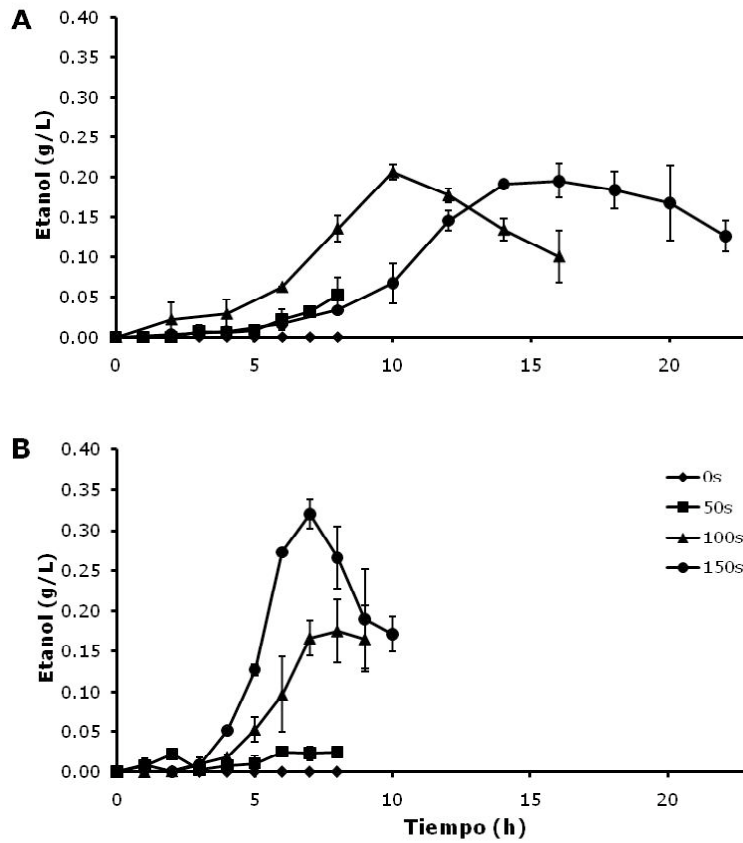


Figura A.4.- Acumulación de etanol. Cepas VAL24-pV21 (A) y W3110-pV21 (B).

Apéndice B.

Viabilidad celular determinada por citometría de flujo.

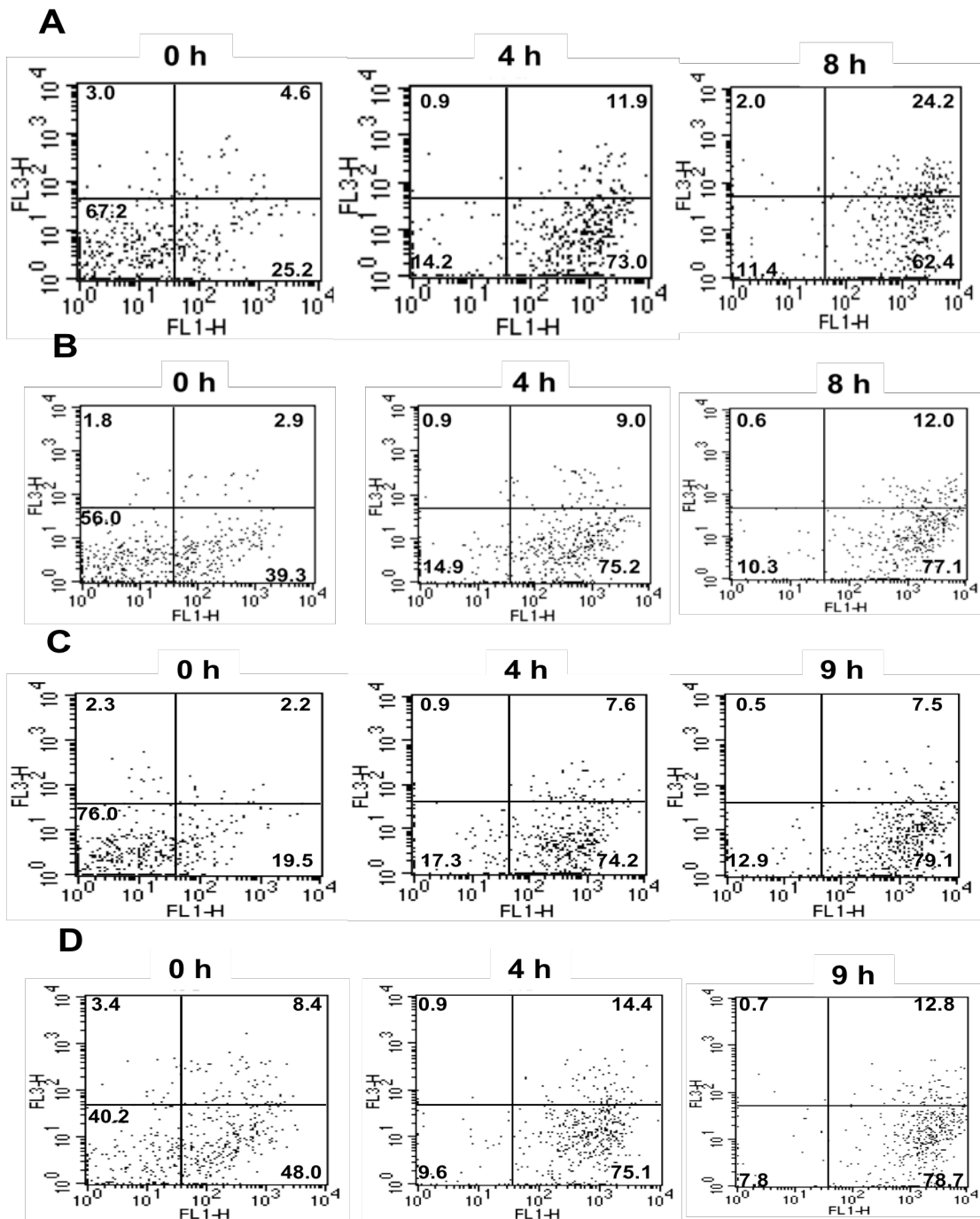


Figura B.1.- Cuantificación de la viabilidad celular de la cepa W3110-pV21 mediante análisis de cuadrantes de gráficas de puntos. Las gráficas corresponden a los cultivos control (A) y recirculados con t_c de 50 s (B), 100 s (C) y 150 s (D). Se muestran tres momentos de las cinéticas: al inicio, un punto intermedio y al final de la fase exponencial. El canal 1 (FL1-H) y 3 (FL3-H) indican la intensidad de fluorescencia verde y rojo, respectivamente.

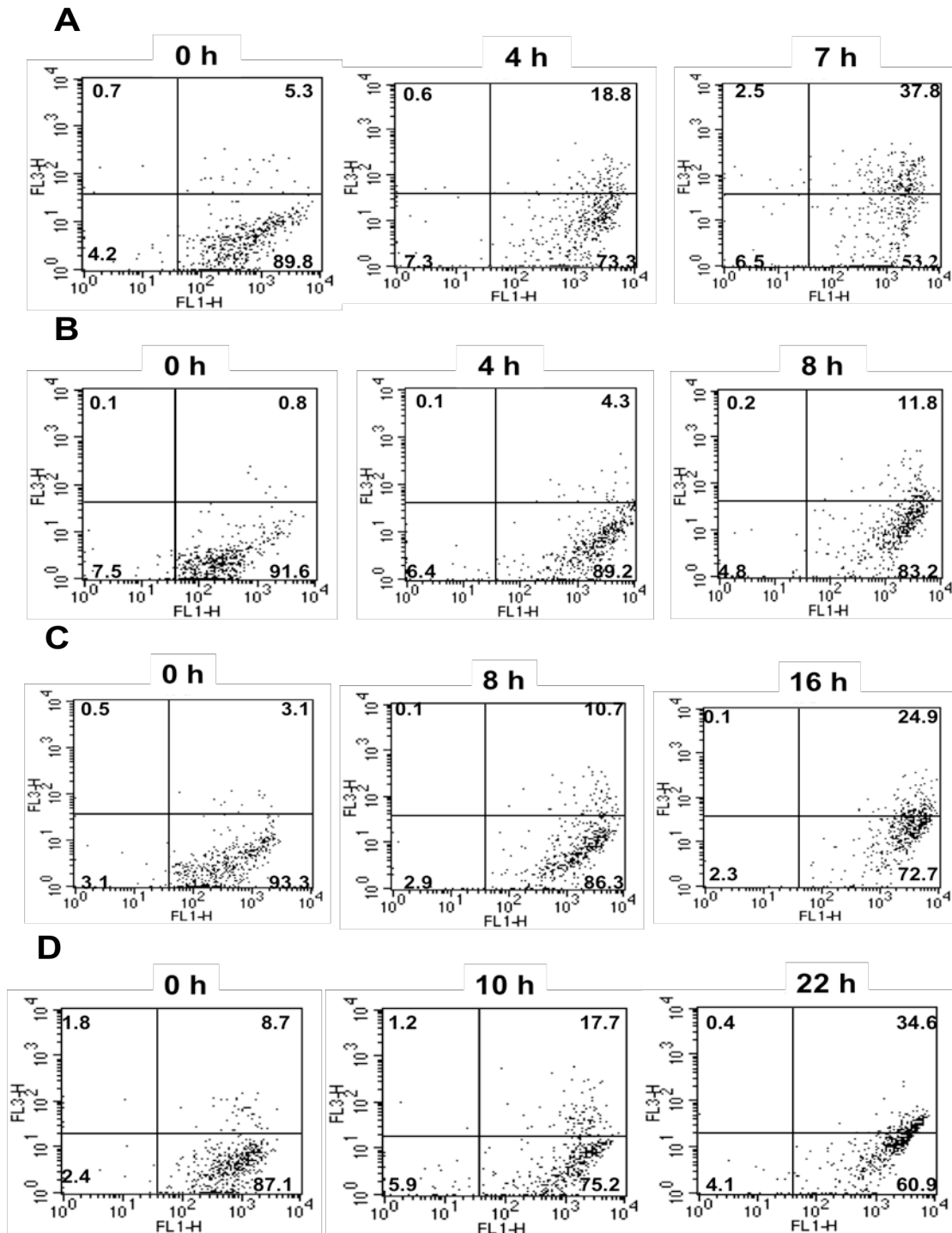


Figura B.2.-Determinación de la viabilidad celular de la cepa VAL24-pV21 por citometría de flujo en gráficas de puntos. Las gráficas corresponden a cinéticas control (A), y cultivos recirculados con t_c de 50 s (B), 100 s (C) y 150 s (D). Se muestran tres momentos de las cinéticas: al inicio, un punto intermedio y al final de la fase exponencial de crecimiento. El canal 1 (FL1-H) y 3 (FL3-H) indican la intensidad de fluorescencia verde y rojo, respectivamente.

Apéndice C.

Tabla 4- Comparación de parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas VAL24-pV21 y W3110-pV21 con distintas condiciones de operación. Los valores reportados corresponden a la velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento global de biomasa ($Y_{x/s}$), velocidad específica de consumo de glucosa (q_s), productividad específica de acetato (q_{ac}), tiempo de duplicación (t_d), productividad específica de GFP (q_{GFP}), rendimiento de GFP (Y_{GFP}) y productividad volumétrica de GFP.

Cepa	t_c (s)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g/g)	q_s (g/g \cdot h)	q_{ac} (g/g \cdot h)	t_d (h)	q_{GFP} (g/g \cdot h)	$Y_{GFP/S}$ (g/g)	P vol. (g/L \cdot h)
VAL24-pV21	0	0.45 +/- 0.01	0.46 +/- 0.02	0.99 +/- 0.07	0.10 +/- 0	1.5 +/- 0.05	0.024 +/- 0.003	0.025 +/- 0.001	0.016 +/-
	50	0.41 +/- 0.01	0.39 +/- 0.02	1.04 +/- 0.03	0.38 +/- 0.05	1.7 +/- 0.02	0.022 +/- 0	0.024 +/- 0.003	0.012 +/- 0.001
	100	0.15 +/- 0	0.19 +/- 0.01	0.78 +/- 0.08	0.21 +/- 0.02	4.8 +/- 0.17	0.011 +/- 0.001	0.015 +/- 0.003	0.007 +/- 0.0005
	150	0.09 +/- 0	0.17 +/- 0.01	0.64 +/- 0.09	0.13 +/- 0.03	7.8 +/- 0.15	0.006 +/- 0	0.006 +/- 0.001	0.004 +/- 0.0005
W3110-pV21	0	0.40 +/- 0	0.44 +/- 0.01	0.97 +/- 0.06	0.05 +/- 0.01	1.7 +/- 0	0.013 +/- 0	0.010 +/- 0	0.01 +/- 0.001
	50	0.34 +/- 0.01	0.36 +/- 0.02	0.94 +/- 0.02	0.22 +/- 0.03	2.0 +/- 0.06	0.008 +/- 0.001	0.008 +/- 0.002	0.007 +/- 0.001
	100	0.30 +/- 0.01	0.20 +/- 0.01	1.52 +/- 0.01	0.55 +/- 0.02	2.4 +/- 0.04	0.009 +/- 0.002	0.006 +/- 0.001	0.004 +/- 0.0005
	150	0.29 +/- 0	0.21 +/- 0.02	1.38 +/- 0.16	0.32 +/- 0.03	2.4 +/- 0	0.006 +/- 0	0.004 +/- 0.001	0.002 +/- 0
VAL24-pV21/NO ₃	100	0.32 +/- 0.02	0.25 +/- 0	1.26 +/- 0.06	0.44 +/- 0.05	2.21 +/- 0.11	0.008 +/- 0	0.005 +/- 0.001	0.004 +/- 0.0005
	150	0.32 +/- 0.02	0.24 +/- 0.02	1.32 +/- 0.02	0.33 +/- 0.03	2.21 +/- 0.11	0.008 +/- 0	0.006 +/- 0	0.004 +/- 0