



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESCALAMIENTO DESCENDENTE DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ADN PLASMIDÍCO POR UNA CEPA DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE: ESTUDIO DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A GRADIENTES ESPACIALES DE pH ALCALINO TÍPICOS DE BIORREACTORES DE ESCALA INDUSTRIAL.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JOSE TONATIUH CORTES ESQUIVEL

TUTOR PRINCIPAL
Dr. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. ALVARO RAÚL LARA RODRÍGUEZ
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Dr. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. Noviembre, 2014



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.

Los estudios que conforman esta tesis se realizaron en el laboratorio No. 10 del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Revich.

Durante la realización de este trabajo se contó con la beca para estudios de maestría de CONACyT. Además se contó con el apoyo del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-203212-2 e IT-201214.

A Cecilia Cortes y Eduardo Cortes por ser un gran ejemplo a seguir, darme su apoyo incondicional y por alentarme siempre a llegar más lejos. Gracias por ser mi familia y estar presentes en todos los momentos importantes de mi vida.

Agradecimientos

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por otorgarme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, por brindarme el tiempo y los recursos invertidos en mi formación.

Se agradece la asesoría técnica por parte del Dr. Álvaro Lara, el Dr. José Escalante, la Dra. Noemí Flores, la M. en C. Georgina Hernández, al Biol. Mario Caro y la Q.I. Luz Martínez.

A los miembros del equipo técnico del grupo Palomares-Ramírez: Dra. Laura Palomares, M. en C. Vanessa Hernández, M. en C. Ruth Pastor, Biól. Rosa Román y Karin Levy, por su apoyo en la adquisición y manejo de materiales y equipos empleados en el presente proyecto.

A cada uno de los miembros del grupo Palomares-Ramírez, por brindarme su amistad y conocimientos. En especial a la Ing. Elizabeth Carrasco, la M. en C. Oriana Niño, el M. en C. Gheoghe Borja, la QFB. Iozzin Ríos, el M. en C. Esteban Peguero, la Dra. Lili Gallo, la M. en C. Martha Contreras y el M. en C. Ramón Carrasco.

A los miembros del grupo EG por su amistad y apoyo a lo largo de los últimos dos años.

A los miembros de mi generación quienes me dieron su amistad y me brindaron su apoyo en las buenas y en las malas. En especial a Elizabeth Carrasco, Claudia Bravo y Carolina Perusquía

A mis amistades que en la distancia me brindaron su apoyo, buenos consejos y muchas aventuras. Muy en especial a Elizabeth Muñoz, David Martínez, Marco Ávila, Marisol Camarena, Diana González y Ricardo Padilla.

Nomenclatura.

Unidades

°C	Grado(s) Celsius
atm	Atmósfera
g	Gramos
h	Horas
L	Litro
m	Metro
M	Molar
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
ADP	Adenosina difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CSE	Contenido de plásmido superenrollado
C _t	Ciclo limite
D.O.	Densidad óptica 600 nm
Est	Estacionaria
Exp I	Exponencial temprana
Exp II	Exponencial media
Exp III	Exponencial tardía
FDA	Agencia de drogas y alimentos (E. U. A.)
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFR	Reactor de flujo pistón
PID	proporcional-integral-derivativo
PTS	Sistema de transporte de carbohidrato: fosfotransferasa
RT-PCR	PCR en tiempo real
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SED	Sistema de escalamiento descendente
STR	Reactor de tanque agitado
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
UV	Ultravioleta

Simbología

μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
AO	Concentración de ácido orgánico (g/L)
D	Diámetro del impulsor (m)
F	Frecuencia (s^{-1})
k_L	Coefficiente de transferencia de oxígeno en la interfaz gas-liquido ($m\ s^{-1}$)
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1})
N	Velocidad de agitación (rpm)
Na	Número de aireación
ND	Velocidad en la punta del impulsor (m/s)
P	Potencia (Watt)
P_T	Presión total (atm)
Q	Capacidad de bombeo (m^3/s)
q_{ADNp}	Velocidad específica de producción de ADNp (g/g*h)
q_{AO}	Velocidad específica de producción de ácido orgánico (g/g*h)
Q_R	Flujo de recirculación (mL/s)
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato (g/g*h)
Re	Número de Reynolds
S	Concentración de sustrato (g/L)
t	Tiempo de cultivo (h)
t_c	Tiempo de circulación (s)
T_{mix}	Tiempo de mezclado (s)
t_R	Tiempo de residencia (s)
V	Volumen (L)
X	Concentración de biomasa (g/L)
$Y_{AO/X}$	Rendimiento ácido orgánico en biomasa (g/g)
$Y_{P/X}$	Rendimiento específico producto en biomasa (mg/g)
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa en sustrato (g/g)
vvm	Flujo volumétrico de gas por volumen de medio (L/L*min)

RESUMEN

Para satisfacer la creciente demanda de productos biotecnológicos es necesario la implementación de procesos a gran escala, en donde la presencia de heterogeneidades ambientales es prácticamente inevitable. Debido a lo anterior, antes de escalar un proceso es necesario evaluar el impacto de dichas heterogeneidades en el rendimiento del cultivo. Anteriormente han sido ampliamente estudiadas las heterogeneidades causadas por gradientes en la concentración de sustrato y gradientes de gases disueltos; sin embargo, los gradientes de pH han sido poco estudiados, aún cuando la presencia de este tipo de gradientes está implícita en cualquier bioproceso a gran escala. Lo anterior se debe a que es necesaria la adición de soluciones concentradas de ácido o álcali para controlar el pH en un valor deseado. En el presente estudio se evaluó el efecto de condiciones constantes y oscilatorias de pH sobre parámetros cinéticos, estequiometricos, y niveles transcripcionales de genes relacionados al estrés por pH y a la síntesis de nucleótidos, en una cepa de *E. coli* productora de ADN plasmídico (ADNp). Con la finalidad de contar con controles experimentales en presencia y en ausencia de gradientes de pH, se realizaron cultivos a pH constante de 7.2 y 8.0 unidades, respectivamente. Durante los cultivos a pH 8.0 se observó un ligero incremento, tanto en el rendimiento específico como volumétrico de ADNp, en comparación a los cultivos a pH 7.2 (10 y 19 %, respectivamente); sin embargo, la exposición a pH 8.0 provocó una disminución en la velocidad específica de crecimiento, que pasó de ser de 0.39 h^{-1} a pH 7.2, a 0.25 h^{-1} a pH 8.0. De igual forma, la concentración celular se vio afectada, disminuyendo un 28 % con respecto a pH 7.2. Se observó además un incremento importante en la síntesis de ácidos orgánicos a pH 8.0. Por último, los niveles relativos de transcripción de genes relacionados al estrés por pH (*cyoA*, *tnaA*, *cysK*, *nhaA* y *rpoS*) se vieron incrementados con respecto al control a pH 7.2 (excepto *gadA*, *astD* y *torr*). También se evaluaron dos genes relacionados con la síntesis de nucleótidos, *nrdR* y *purR*, que son reguladores transcripcionales de carácter negativo de distintas enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos. Para estos últimos dos genes, los niveles transcripcionales también se vieron incrementados, en especial el aumento para *purR*, que fue 10.3 veces más en comparación con pH 7.2 (en la fase estacionaria del cultivo). La exposición oscilatoria a

gradientes de pH se logró utilizando un sistema de cultivo de dos compartimentos, uno de 5 L (STR 1) que representa la zona bien mezclada y uno de 0.25 L (STR 2) que simula la zona de adición de álcali. Con ayuda de una bomba peristáltica se recirculó el medio entre ambos compartimentos a diferentes flujos con la intención de mantener distintos tiempos de residencia en reactor que simula la zona de adición. A medida que se incrementó el tiempo de residencia, también lo hizo la magnitud de los gradientes de pH simulados. Dentro de los efectos observados a condiciones oscilatorias de pH destacaron tanto un decremento en el rendimiento específico como volumétrico de ADN_p, a medida que se incrementó el tiempo de residencia en la zona de adición (18 y 39 %, respectivamente a un tiempo de residencia en STR 2 de 240 s). La síntesis de ácidos orgánicos durante la exposición oscilatoria a gradientes de pH fue mayor que la observada durante cultivos a pH 8.0. Es importante destacar que el crecimiento celular se mantuvo sin cambios importantes en tiempos de residencia de 60, 120 y 180 s y sólo a 240 s la velocidad de crecimiento se vio disminuida en un 10% con respecto a cultivos control a pH 7.2. La fracción súper enrollada del plásmido se mantuvo entre el 80 y 88% para las distintas condiciones experimentales. Aunque los genes involucrados en el estrés por pH como en la síntesis de nucleótidos mostraron cambios con respecto a cultivos a pH 7.2, estos fueron menores que los observados a pH 8.0.

El presente trabajo representa el primer estudio en el que se evalúa el efecto de pH en *E. coli*. Asimismo, la información sobre la expresión relativa de los genes evaluados servirá para un mejor entendimiento a nivel molecular del efecto, tanto de la presencia constante como oscilatoria, del estrés por pH. Los resultados aquí reportados pueden ser de utilidad para establecer condiciones racionales de escalamiento y sistemas mejorados de control de pH en cultivos a escala comercial de *E. coli*.

Índice general

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Antecedentes	2
1.1.2	Retos del bioproceso	4
1.1.3	Heterogeneidades ambientales	5
1.1.4	Escalamiento descendente basado en el análisis de régimen	7
1.1.5	Análisis de régimen basado en tiempos característicos	8
1.1.6	Gradientes de pH	10
1.1.7	Respuesta de <i>E. coli</i> bajo estrés alcalino	14
1.1.8	Efecto del pH en la producción de ADN plasmídico	16
2.	HIPÓTESIS	17
3.1	Objetivo general	17
3.2	Objetivos específicos	17
4.	METODOLOGÍA	18
4.1	Características de la cepa y el plásmido modelo	18
4.1.1	Cepa	18
4.1.2	Plásmido	18
4.2	Medio de Cultivo	19
4.3.1	Cultivos a pH constante	20
4.3.2	Sistema de escalamiento descendente de pH	21
4.4	Metodos analíticos para el seguimiento del cultivo	24
4.4.1	Determinación de biomasa	24
4.4.2	Cuantificación de glucosa	26
4.4.3	Determinación de ácidos orgánicos	26
4.4.4	Extracción y cuantificación de ADN plasmídico	28
4.4.5	Análisis densitométrico en geles de agarosa	28
4.5	Análisis transcripcional	29
4.5.1	Extracción de ARN total en cultivos	29
4.5.2	RT-PCR cuantitativa	29
4.6.1	Cálculos cinéticos y estequiométricos	31
4.6.2	Cálculo de niveles de transcripción relativos	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

5.1	Cultivos a pH constante	36
5.1.2	Efecto del pH sobre la cinética del cultivo y la producción de ADNp	36
5.1.2	Efecto del pH sobre la producción de subproductos metabólicos.....	41
5.1.3	Efecto de cultivos a pH 8 sobre las respuestas transcripcionales de genes de interés	44
5.2	Simulación de gradientes utilizando la metodología de escalamiento descendente	47
5.2.2	Efecto de los gradientes de pH en la producción de subproductos metabólicos...	53
5.2.3	Efecto de los gradientes de pH en las respuestas transcripcionales de genes de interés.....	57
6	INTEGRACIÓN DE RESULTADOS	64
7	CONCLUSIONES	68
8	PERSPECTIVAS	70
9	APÉNDICES	72
	Apéndice A1. Cinéticas de cultivo utilizando el sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR2.	72
	Apéndice A2. Cinéticas de cultivo utilizando el sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR2.	73
	Apéndice A3. Niveles de transcripción de genes de interés de <i>E. coli</i> en diferentes condiciones experimentales.....	74
10	BIBLIOGRAFÍA	76

Índice de figuras

Figura 1. Procedimiento de escalamiento descendente.	8
Figura 2. Tiempos característicos de procesos celulares y ambientales.	9
Figura 3. Sistemas de cultivo utilizados para realizar estudios de escalamiento descendente de pH.	11
Figura 4. Reacciones del catabolismo de aminoácidos estimuladas por pH alcalino.	15
Figura 5. Efecto del pH en la producción de ADNp. Adaptado de Ongkudon et al., 2011.	16
Figura 6. Mapa simplificado del plásmido pHN.	19
Figura 7. Sistema de cultivo en modo lote utilizado para cultivos a pH constante.	21
Figura 8. Sistema de cultivo utilizado en los experimentos de cambios oscilatorios de pH.....	24
Figura 9. Correlación entre la concentración de biomasa medida como peso seco y la D.O. a 600 nm.	25
Figura 10. Cromatograma típico de estándares de ácidos orgánicos.....	27
Figura 11. Curvas tipo para la cuantificación de ácidos orgánicos.....	27
Figura 12. Perfiles de amplificación de genes de referencia.....	30
Figura 13. Curvas de calibración de genes utilizados para qRT-PCR.	34
Figura 14. Cinética de cultivo a pH 7.2.....	38
Figura 15. Cinética de cultivo a pH 8.0.....	39
Figura 16. Cinéticas de producción de ácidos orgánicos.....	41
Figura 17. Producción de ácidos orgánicos.....	42
Figura 18: Niveles de transcripción de genes de interés de <i>E. coli</i> a pH 8 en diferentes fases del cultivo.	45
Figura 19. Diferencia de pH entre los dos compartimentos del sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR 2.....	49
Figura 20. Cinética con simulación de gradientes de pH con un tiempo de residencia en STR2 de 60 s ($Q_R=4.16\text{mL/s}$).....	50
Figura 21. Producción de ADNp a distintos tiempo de residencia en STR2.....	52
Figura 22. Concentración máxima de ácidos orgánicos en distintas condiciones experimentales...	54
Figura 23. Producción de ácidos orgánicos en distintas condiciones experimentales.....	55
Figura 24. Análisis transcripcional de transportadores en condiciones oscilatorias de pH.	58

Figura 25. Análisis transcripcional de genes del catabolismo de aminoácidos de <i>E. coli</i> expuesta a condiciones fluctuantes de pH.....	59
Figura 26. Análisis transcripcional de reguladores transcripcionales de <i>E. coli</i> expuesta a condiciones fluctuantes de pH.....	62
Figura 27. Efecto de la exposición a condiciones constantes y oscilatorias de pH..	67

Índice de tablas

Tabla 1. Interdependencia de los parámetros de escalamiento ascendente. Adaptado de Oldshue, 1966.....	5
Tabla 2. Tiempos de mezclado reportados en biorreactores. Adaptado de Lara et al., 2006.	7
Tabla 3. Medio PD modificado.....	20
Tabla 4. Elementos traza 250 X.....	20
Tabla 5. Correlaciones para la cuantificación de ácidos orgánicos.	28
Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por qRT-PCR.....	30
Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por qRT-PCR (continuación).	31
Tabla 8. Correlación de curvas de calibración de genes utilizados para qRT-PCR.	34
Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos a pH constante.	37
Tabla 10. Concentración máxima de ácidos orgánicos en cultivos a pH constante.	42
Tabla 11. Resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales	49

1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el uso de ADN plasmídico (ADNp) en tratamientos de terapia génica y vacunación ha cobrado un gran interés, tal y como se evidencia por el incremento de tratamientos basados en ADNp que se encuentran en ensayos clínicos. Los vectores de ADNp ofrecen una serie de ventajas con respecto a tratamientos basados en virus atenuados y proteínas recombinantes como son: ausencia de respuesta inmune específica al ADNp (Robinson, 2000), menor riesgo de infección secundaria (Kutzler y Weiner, 2008), fácil administración (Luo y Saltzman, 2000; Lian y Ho, 2001), formulaciones sencillas y ventajas productivas frente a otro tipo de vectores como los virales, tal y como lo detalla Lara y Ramirez en el 2012, y, Prather y colaboradores en el 2003. Actualmente existen 4 vacunas en el mercado para uso veterinario basadas en ADNp (Listner *et al.*, 2006), pero se espera que en las próximas décadas el número se incremente y, por consiguiente, se incremente también la demanda por este tipo de productos. Una de las desventajas de los tratamientos basados en ADNp es la necesidad de dosis relativamente elevadas (del orden de miligramos) (Leitner *et al.*, 1999), por lo que se requieren procesos a gran escala que permitan satisfacer la demanda por este tipo productos.

El principal problema que surge en un biorreactor con el cambio de escala es un mezclado cada vez más deficiente a medida que se incrementa el volumen del proceso, favoreciendo la presencia de heterogeneidades ambientales que se manifiestan como gradientes espaciales en variables fisicoquímicas (v.gr. gases disueltos, sustrato, temperatura, pH, biomasa, etc.). De tal forma, las células en el interior del biorreactor experimentarán cambios ambientales de forma oscilatoria, lo cual en ocasiones representa una situación de estrés para la célula y provocar cambios en su fisiología que favorezcan la presencia de metabolitos indeseados, pérdida de viabilidad, bajos rendimientos e incluso puede afectar la calidad del producto (Lara *et al.*, 2006).

La presencia y el efecto de las heterogeneidades ambientales han sido ampliamente estudiadas para distintos parámetros del cultivo como son: la concentración de sustrato (Neubauer *et al.*, 1995; Bylund *et al.*, 1999) y oxígeno disuelto (Sandoval-Basurto *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2006) y, en menor medida, la concentración de dióxido de carbono disuelto (Serrato *et al.*, 2009) y la temperatura (Caspeta *et al.*, 2009; Jaén *et al.*, 2013). Sin embargo, las heterogeneidades causadas

por gradientes de pH han sido poco estudiadas, aún cuando el control de ésta variable es crítico para lograr un cultivo exitoso (Ongkudon *et al.*, 2011).

En este estudio se evaluó el efecto de los gradientes de pH en la producción de ADNp por una cepa de *E. coli* recombinante VH33 $\Delta(recA, deoR)$, así como el efecto en su metabolismo y las respuestas transcripcionales de genes relacionados al estrés por pH alcalino.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Producción de ADN plasmídico y su importancia como agente terapéutico

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales cuya replicación es independiente del ADN cromosómico del huésped, además, tienen la capacidad de autoreplicarse de forma controlada con ayuda de factores codificados en el ADN cromosómico del huésped y de forma coordinada con la división celular (Lara *et al.*, 2012).

El uso de ADNp tiene una gran aplicación en sistemas de expresión de proteínas recombinantes, como vectores de clonación e incluso en tratamientos de terapia génica y vacunación. El ADNp utilizado para fines terapéuticos debe de contar con elementos para su replicación y selección en hospederos bacterianos, así como para la expresión del gen terapéutico en las células eucariotas blanco (Lara *et al.*, 2012).

Hoy en día la producción de vectores para terapia génica y vacunación basados en ADNp está tomando una gran importancia, debido a las ventajas que ofrecen este tipo de tratamientos, como son: : ausencia de respuesta inmune específica al ADNp (Robinson, 2000), menor riesgo de infección secundaria (Kutzler y Weiner, 2008), fácil administración (Luo y Saltzman, 2000; Lian y Ho, 2001), formulaciones sencillas y ventajas productivas frente a otro tipo de vectores como los virales, tal y como lo detalla Lara y Ramirez en el 2012, y, Prather y colaboradores en el. Por ejemplo, la producción de vectores virales requiere de cultivos de células eucariotas cuyos costos son elevados en comparación con los sistemas de producción de células procariotas utilizados en la producción de ADNp. La importancia del uso del ADNp como vector terapéutico se evidencia en el creciente número de tratamientos de terapia génica y vacunación basados en ADNp que se

encuentran en ensayos clínicos, el cual se ha incrementado en la última década de forma importante: de ser apenas 17 en 1995 a los actuales 468 productos que se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos, lo que representa un 24 % del total de los vectores utilizados en ensayos clínicos (Datos obtenidos de Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2014. www.abedia.com/wiley/).

Actualmente, en el mercado, existen 4 vacunas basadas en ADNp, cuyos blancos son: el virus del Nilo, el virus de necrosis infecciosa hematopoyética, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento y el melanoma, para el tratamiento de caballos, salmões, ganado en general y caninos, respectivamente (Listner *et al.*, 2006).

Dentro de los parámetros de calidad que deben cumplir este tipo de vectores para su uso en tratamientos de vacunación y terapia génica, destaca el aspecto topológico. El ADNp se puede encontrar en distintas isoformas como son: lineal, relajada, superenrollada, multímetros y agregados (Schleef y Blaesén, 2009). La FDA establece que la fracción de ADNp superenrollado debe ser mayor al 80% del total de las isoformas encontradas (U.S. Food and Drug Administration, 2014. www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm074770.htm). Lo anterior obedece a que la isoforma superenrollada difunde con mayor rapidez al interior de las células, lo que mejora considerablemente la capacidad de transfección. Al ser la única isoforma que se encuentra intacta, se asegura la correcta expresión del gen terapéutico (Schleef y Blaesén, 2009; Cherng *et al.*, 1999). Es También menos susceptible a la degradación por esfuerzos de corte y endonucleasas, lo que confiere mayor estabilidad. Además, el riesgo de integración cromosomal es menor, por lo que mejora su seguridad (Schleef y Blaesén, 2009; Gonin y Gaillard, 2004; Walther *et al.*, 2006).

Actualmente, se emplean cepas de *E. coli* para la producción de ADNp, debido a que este microorganismo requiere elementos simples para su cultivo, su desempeño usualmente es robusto, existen herramientas de ingeniería genética bien establecidas, así como una amplia experiencia en procesos a escala industrial. Distintas cepas de *E. coli* son utilizadas para este fin; sin embargo, una de las más comúnmente usada es la DH5 α (Mairhofer y Lara, 2014; Jaén, 2013; Lara *et al.*, 2012). Otras cepas de *E. coli* utilizadas para la producción de ADNp son las siguientes: la ABLE K, BL21 DE3, DH10 β , SURE, TURBO, XL1 Blue, XL10 Gold y W3110. En un estudio realizado por Yau y colaboradores en el 2008, éstas y otras cepas fueron analizadas para comparar la

producción de ADNp y el porcentaje de superenrollamiento. Los autores concluyeron que no es posible establecer una correlación directa entre el genotipo de las cepas estudiadas, el rendimiento y el superenrollamiento del ADNp producido.

1.1.2 Retos del bioproceso

La creciente demanda de productos biotecnológicos crea la necesidad de implementar procesos a gran escala que permitan altos rendimientos, para ello la etapa de desarrollo que se realiza a nivel laboratorio debe contemplar aspectos que permitan su posterior escalamiento con el fin de proporcionar las condiciones ambientales necesarias para lograr mantener un adecuado funcionamiento por parte de las células. Esto permitirá que la calidad y rendimiento del producto se mantengan constantes, tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial.

Para lograr un cambio de escala exitoso es necesario utilizar un criterio de escalamiento. Los criterios de escalamiento más usados son parámetros físicos relacionados con las variables de operación. En la revisión realizada por Belmar (1984) respecto a criterios de escalamiento de fermentaciones en la literatura científica, destacan cuatro criterios: el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La), la potencia volumétrica (P/V), la velocidad de la punta del impulsor (ND) y el tiempo de mezclado (T_m). Idealmente, todas las variables de operación deberían de mantenerse idénticas entre varias escalas, esto aseguraría el mismo comportamiento en las distintas escalas. Sin embargo, sólo es posible mantener un parámetro constante en el escalamiento ascendente, por lo que es de esperarse que los procesos a escala laboratorio se comporten diferente a los de escala industrial.

En la **Tabla 1** se muestra lo que sucede con las variables de operación al escalar un cultivo de 80 L a 10,000 L (factor de 5 en la geometría), fijando un determinado criterio de escalamiento (Oldshue, 1966). Puede observarse que al fijar una variable de operación, las otras se ven modificadas de forma importante. Esta alteración en las variables de operación puede afectar el grado de homogeneidad del sistema, favoreciendo la presencia de gradientes espaciales en variables fisicoquímicas. Por ejemplo, al tomar como criterio de escalamiento la potencia volumétrica (P/V), que es uno de los criterios más utilizados, el tiempo de circulación se incrementa 3 veces, lo mismo sucede al tomar como criterio de escalamiento la velocidad en la

punta del impulsor (ND) y el número de Reynolds (Re), donde el incremento en el tiempo de circulación (T_R) es de 5 y 25 veces, respectivamente. Si se quisiera mantener el tiempo de circulación constante en ambas escalas, es necesario incrementar la potencia volumétrica 25 veces, lo cual resulta impráctico.

Como vemos, el cambio de escala involucra un decremento en el grado de homogeneidad del sistema, lo cual se debe a las limitaciones prácticas y tecnológicas en la aplicación de potencia para mejorar el mezclado, es por esto, que es muy probable la presencia de heterogeneidades ambientales en los sistemas industriales.

Tabla 1. Interdependencia de los parámetros de escalamiento ascendente. Adaptado de Oldshue, 1966.

Parámetro	Nomenclatura	Fermentador pequeño (80L)	Fermentador de producción (10000 L)			
			P/V	N	ND	Re
Potencia	P	1.0	125	3125	25	0.2
Potencia volumétrica	P/V	1.0	1.0	25	0.2	0.0016
Velocidad del impulsor	N	1.0	0.34	1.0	0.2	0.04
Diámetro del impulsor	D	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Capacidad de bombeo	Q	1.0	42.5	125	25	5.0
Tiempo de circulación	$V/Q, tc$	1.0	2.94	1.0	5.0	25
Velocidad en la punta del impulsor	ND	1.0	1.7	5.0	1.0	0.2
Número de Reynolds	Re	1.0	8.5	25.0	5.0	1.0

1.1.3 Heterogeneidades ambientales

Las heterogeneidades ambientales se manifiestan en forma de gradientes espaciales en los principales parámetros del cultivo como son: la concentración de sustrato, la concentración celular, temperatura, gases disueltos, la velocidad de cizallamiento y el pH. Los principales factores que favorecen la presencia de heterogeneidades son: grandes volúmenes de operación, altas concentraciones celulares, la velocidad de agitación y la configuración y modo de operación

del sistema de cultivo. Una forma en que se puede predecir la presencia de heterogeneidades es mediante el tiempo de mezclado (tiempo requerido para alcanzar la homogeneidad luego de la inyección de un pulso de trazador). Si éste se encuentra en el mismo orden de magnitud que el tiempo de reacción (tiempo característico de una reacción limitante del microorganismo cultivado), es probable que encontremos la presencia de gradientes en uno o más parámetros del cultivo (Oosterhuis *et al.*, 1985; Sweere *et al.*, 1987; Shuler y Kargi, 1992; Lara *et al.*, 2006).

En la **Tabla 2** se puede apreciar que aquellos cultivos con una configuración *airlift* o de columna de burbujas, presentan un tiempo de mezclado considerablemente mayor que los cultivos con una configuración de tanque agitado (STR por sus siglas en inglés). También se puede apreciar que los tiempos de mezclado se incrementan en reactores con una misma configuración en función del volumen del cultivo. Un incremento en el tiempo de mezclado, puede afectar negativamente el rendimiento del cultivo, al favorecer la presencia de gradientes en distintas variables del proceso (Lara *et al.*, 2006). Es por ello que se han realizado diversos estudios para investigar el efecto que puede tener la presencia de gradientes. La mayoría de estos estudios se enfocan en la presencia de gradientes de sustrato y oxígeno disuelto, y en menor medida en dióxido de carbono y temperatura (Lara *et al.*, 2006; Amanullah y Buckland, 2004). Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica, se encontraron solo 4 trabajos, dedicados específicamente al estudio de gradientes de pH (Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2002; Amanullah *et al.* 2001; Wallenius *et al.*, 2011). De forma general, como consecuencia de la presencia de gradientes de pH, se ha observado disminución en la viabilidad celular (Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2002), acumulación de metabolitos de fermentación (Amanullah *et al.*, 2001) y en algunos casos disminución en la concentración del producto de interés (Amanullah *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 1988) y respuestas a nivel transcripcional (Wallenius *et al.*, 2011). En el presente trabajo se tomó como objeto de estudio las heterogeneidades causadas por gradientes de pH alcalinos en el proceso de producción de ADNp.

Tabla 2. Tiempos de mezclado reportados en biorreactores. Adaptado de Lara et al., 2006.

Tipo de reactor	Línea celular	Tiempo de mezclado (s)
Cultivo celular		
5-L STR	CHO	2-5
8.5-L STR	Células vegetales	3.6
11-L STR cinta helicoidal	Células vegetales	18-25
20-L STR	CHO	20-80
8 m ³ STR	Células Namalwa	40-200
10 m ³ STR ^a	Células vegetales	20-200
12 m ³ STR	Células de mamífero	120-360
10-L STR con filtro rotatorio de hoja angulada, 20 rpm	CHO	120
250-L STR con filtro rotatorio e impulsor de hoja angulada, 20 rpm	CHO	120
250-L Con filtro rotatorio e impulsor de hoja angulada, 80 rpm	CHO	1620
1 m ³ Con filtro rotatorio de hoja angulada/ mezclado a través del filtro rotatorio.	CHO	3120
15-L Columna de burbujas	Raíces vegetales	2400
10 m ³ Tipo "airlift"	Células vegetales	200-1000
Cultivo microbiano		
12 m ³ STR equipado con 3 impulsores tipo <i>Rushton</i>	Microorganismos	10-50
12 m ³ STR equipado con 3 impulsores tipo <i>Scaba</i>	Microorganismos	10-30
30 m ³ STR equipado con 3 impulsores tipo <i>Rushton</i>	Microorganismos	125-250
30 m ³ STR equipado con 3 impulsores tipo <i>Scaba</i>	Microorganismos	70-110
2 m ³ Columna de burbujas	Microorganismos	18
2 m ³ Tipo <i>airlift</i>	Microorganismos	80
4 m ³ Tipo <i>airlift tower loop</i>	Levadura de pan	100-175
40 m ³ Columna de burbujas	Microorganismos	80
40 m ³ <i>Airlift</i>	Microorganismos	101
150 m ³ Columna de burbujas	Levadura de pan	10-1000

1.1.4 Escalamiento descendente basado en el análisis de régimen

Una estrategia para llevar un proceso a escala industrial, es establecer las condiciones que las células pueden experimentar en cultivos a gran escala y entonces tratar de reproducir a escala

laboratorio esas condiciones de cultivo (Larsson *et al.*, 1993; Palomares *et al.*, 2000). Este proceso es conocido como escalamiento descendente. El escalamiento descendente basado en el análisis de régimen se compone de 4 pasos principales esquematizados en la **Figura 1** (Sweere *et al.*, 1987):

- i) **Análisis de régimen:** este es un análisis del proceso a escala productiva, con el que se identifican mecanismos limitantes que después serán investigados a nivel laboratorio. El análisis de régimen puede hacerse mediante una comparación de tiempos característicos.
- ii) **Simulación:** se deben diseñar sistemas de cultivo a nivel laboratorio que sean capaces de reproducir las condiciones esperadas a escala industrial.
- iii) **Optimización del modelo:** en esta etapa se proponen los cambios necesarios para mejorar el sistema cultivo, como pueden ser cambios en la línea celular, composición del medio de cultivo, condiciones de operación o ajustes del biorreactor.
- iv) **Aplicación:** el conocimiento generado en los pasos anteriores es trasladado a escala industrial.

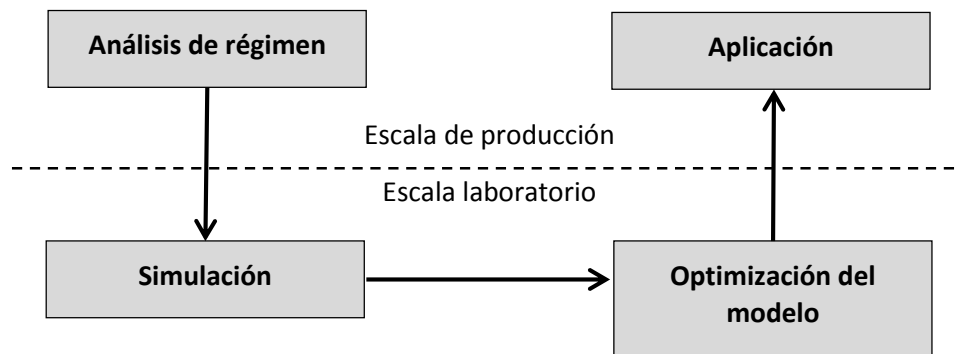


Figura 1. Procedimiento de escalamiento descendente. Adaptado de Sweere *et al.*, 1987.

1.1.5 Análisis de régimen basado en tiempos característicos

El análisis de régimen experimental se debe apoyar en el análisis de régimen teórico. Este último se subdivide en dos: análisis de régimen basado en parámetros característicos y en parámetros de sensibilidad (Sweere *et al.*, 1987). Para efectos del presente estudio sólo se abordará el análisis de régimen basado en parámetros característicos, específicamente, el tiempo.

El tiempo característico, es una medición de la rapidez de un mecanismo y se puede considerar como el tiempo necesario para que un mecanismo genere un cambio detectable en el sistema (Sweere *et al.*, 1987; Frandsen *et al.*, 1993). Un tiempo característico corto significa un mecanismo rápido; un valor alto significa un mecanismo lento. Para poder determinar el tiempo característico es necesario contar con la siguiente información: la configuración del biorreactor, los modelos tecnológicos (modelos que describan el mezclado, calentamiento y la transferencia de materia), y el modelo microbiológico (un modelo que describa la relación entre la velocidad de producción y la velocidad de crecimiento y concentración de sustrato) (Feijen y Homeester, 1991).

El análisis de régimen basado en tiempos característicos se realiza comparando los tiempos característicos de diferentes subprocesos, de tal forma que si los tiempos característicos de mecanismos intracelulares se encuentran en el mismo orden de magnitud que aquellos de cambios en el microambiente extracelular (tal como el mezclado y la transferencia de materia), entonces es posible que ambos subprocesos interactúen modificando el comportamiento celular al ocasionar cambios en la fisiología del microorganismo (Johnstone y Thring, 1957; Sweere *et al.*, 1987; Luyben, 1993; Palomares *et al.*, 2000). En la **figura 2** se muestran las magnitudes relativas de algunos procesos celulares y ambientales.

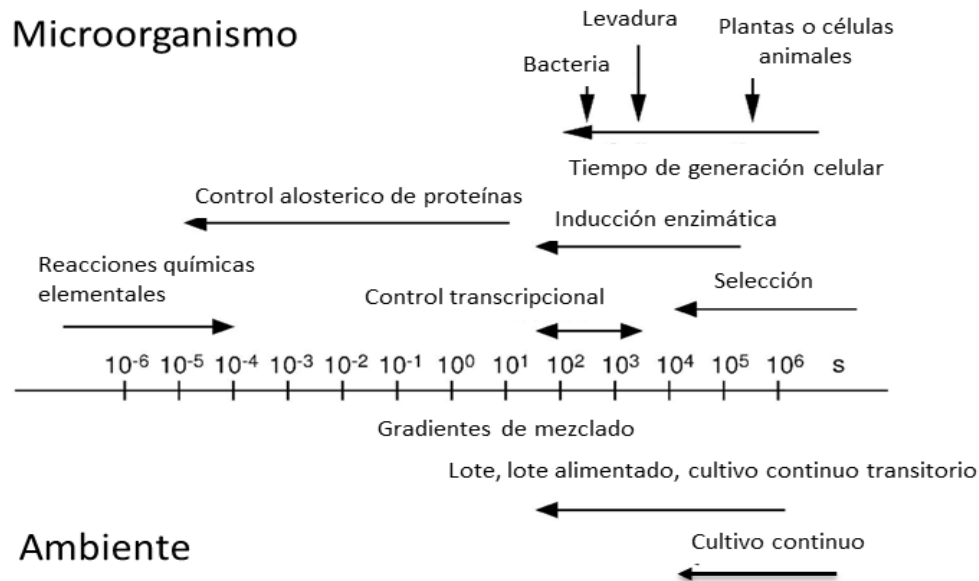


Figura 2. Tiempos característicos de procesos celulares y ambientales. Adaptado de Palomares *et al.*, 2000.

1.1.6 Gradientes de pH

Los gradientes de pH en un biorreactor ocurren comúnmente por la necesidad de adicionar soluciones concentradas de ácido o álcali en una zona de la superficie líquida del biorreactor con el fin de controlar el pH en un valor deseado (Amanullah *et al.*, 2001). Esto da como resultado una diferencia de pH entre la zona de alimentación y el resto del líquido, la cual puede ser tal que en la zona de alimentación se alcancen valores extremos de pH, que pueden modificar el pH intracelular y afectar funciones celulares como el transporte de glucosa, la proporción ATP/ADP y la actividad de ciertas enzimas (Borys *et al.*, 1993). Se ha demostrado mediante modelos estructurados (Reuss *et al.*, 1994) y evidencias experimentales (Langheinrich *et al.*, 1999; Ozturk 1996) la presencia de gradientes de pH en biorreactores de escala industrial, donde se observan diferencias de pH entre la zona de adición de álcali y el resto del líquido, que van de 0.2 hasta 5 unidades. A pesar de estas evidencias y el efecto que podría tener la presencia de valores extremos de pH en el rendimiento del cultivo y la fisiología celular, existen solo 4 trabajos, dedicados específicamente al estudio de gradientes de pH (Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2002; Amanullah *et al.* 2001; Wallenius *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante resaltar que ninguno de estos trabajos toma como modelo de estudio a *E. coli*. A continuación se hace una breve revisión de trabajos que se han enfocado en estudiar el efecto que puede tener la presencia de gradientes de pH en un sistema de cultivo.

Se han utilizado diferentes sistemas de escalamiento descendente (SED) para estudiar el efecto de los gradientes de pH, como son sistemas de un solo compartimento utilizando un biorreactor de tanque agitado (Miller *et al.*, 1988) y sistemas de doble compartimento utilizando una combinación de bioreactores STR-PFR (Amanullah *et al.* 2001; Wallenius *et al.*, 2011) y STR-STR (Osman *et al.*, 2002) en donde se juega con las proporciones de volúmenes y los flujos de recirculación de un compartimento a otro, con el fin de simular la hidrodinámica y tiempos de circulación de bioreactores de distintas escalas. También se han implementado dos diferentes modos de operación que son cultivos continuos (Miler *et al.*, 1988; Wallenius *et al.*, 2011) y en lote (Amanullah *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2002).

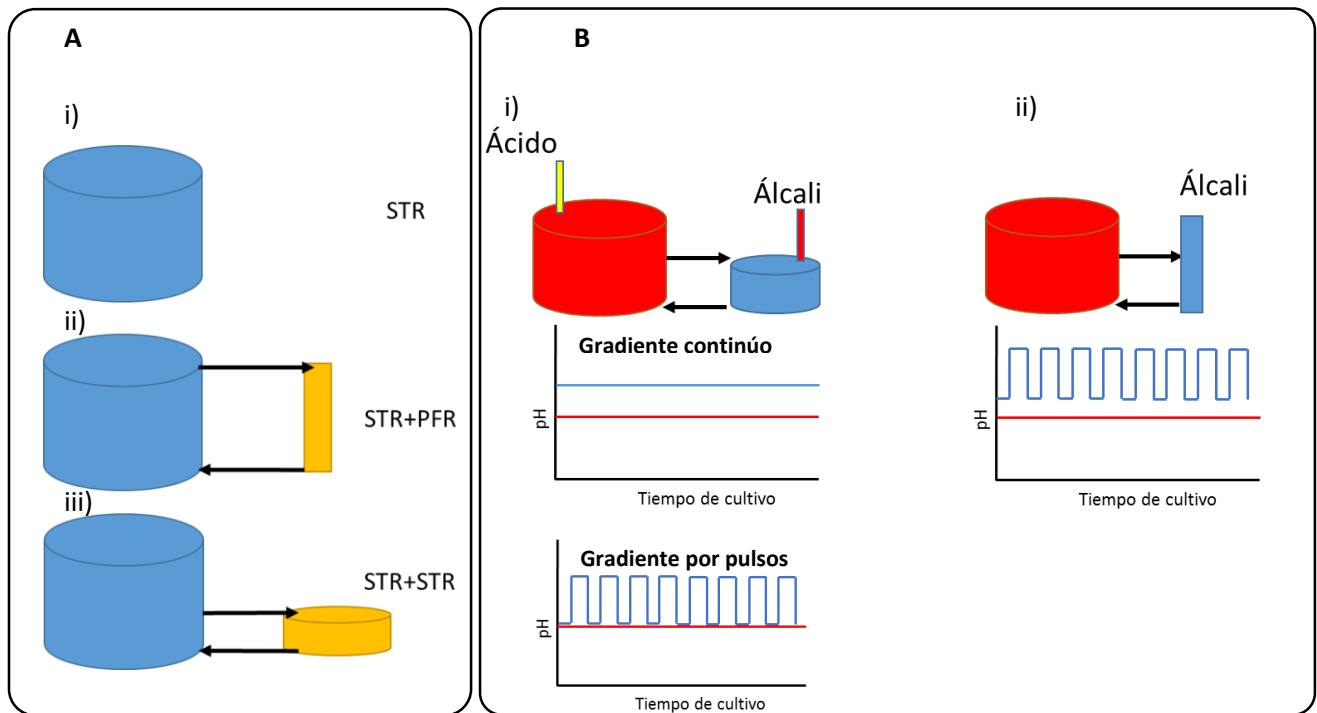


Figura 3. Sistemas de cultivo utilizados para realizar estudios de escalamiento descendente de pH. Panel A: configuración de los sistemas de cultivo utilizados. Panel B: estrategias utilizadas para simular los gradientes de pH

Dentro de los sistemas de escalamiento descendente de dos compartimentos se han utilizado dos estrategias para simular los gradientes de pH. La primera consiste en mantener una diferencia de pH entre los dos compartimentos. Esto se logra adicionando álcali y posteriormente una cantidad equimolar de ácido para lograr la neutralización (**Figura 3 B-i y B-ii**). Lo anterior se puede hacer de forma continua (Wallenius *et al.*, 2011) o por pulsos (Osman *et al.*, 2001). Es necesario destacar que esta estrategia, debido a las reacciones de neutralización, genera una acumulación de sales que puede afectar la viabilidad celular debido a un incremento en la osmolaridad. Consecuentemente, los gradientes que se simulan con esta estrategia suelen ser pequeños (una fracción de unidad de pH) o sólo se realizan durante una fracción del tiempo total del cultivo. La segunda estrategia, utilizada por Amanullah y colaboradores (2001), consistió en separar la zona bien mezclada (zona de los impulsores) y la zona adición; esta última, se confina en un compartimento pequeño, en donde se adiciona la solución concentrada de álcali en función a un punto de monitoreo de pH que se encuentra en la zona bien mezclada (**Figura 3 A-ii**). De esta forma se logra generar gradientes de pH sin un incremento lineal en la osmolaridad como sucede

con las otras estrategias utilizadas por Wallenius y colaboradores en el 2011 y por Osman y colaboradores en el 2001.

Miller y colaboradores en 1988 estudiaron el efecto de cambios de pH en células de hibridomas productoras de anticuerpos en suspensión. El efecto del pH se evaluó en el estado estacionario de cultivos continuos (**Figura 3 A-i**), a una tasa de dilución de $0.02 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Los cambios de pH realizados fueron los siguientes: 7.4 a 7.7, 7.7 a 7.2, 7.2 a 6.8 y 6.8 a 7.2. La viabilidad para valores de pH de 7.4 y 7.2 fue muy similar (alrededor del 80 %), mientras que a valores de pH de 6.8 y 7.7 la viabilidad disminuyó de forma importante (60 y 70 %, respectivamente) con respecto a pH 7.4. Es importante destacar que a valores de 7.7, la viabilidad se recuperó (en aproximadamente 7 días) a valores observados a un pH de 7.4. Además de los efectos en la viabilidad, se observó que el rendimiento específico de producción de anticuerpo monoclonal se ve impactado de forma positiva para valores de pH de 6.8 (hasta tres veces más), esto último atribuido a una caída en la velocidad específica de crecimiento durante el cambio de pH de 7.2 a 6.8, donde observaron un incremento en la acumulación de glucosa.

Osman y colaboradores (2002) estudiaron el efecto de los gradientes de pH en cultivos de células de mieloma GS-NS0, utilizando un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos STR-STR (**Figura 3 A-iii**), donde uno de ellos correspondía al 17 % (v/v) del otro. En este sistema se simulaban los gradientes de pH al añadir NaOH 2 M y, simultáneamente en el compartimento grande, HCl 2 M. En sus resultados observaron una disminución en la viabilidad celular de hasta el 27.5 % para 100 perturbaciones (cambio de pH de 7.3 a 8.0) con una duración de 200 s.

Amanullah y colaboradores en el 2001 estudiaron el efecto de las oscilaciones de pH en la producción de acetoína y 2,3 butanodiol en una cepa de *Bacillus subtilis*, empleando un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos (**Figura 3 A-ii**). Uno de los compartimentos era un reactor de tanque agitado y el otro un reactor tubular, donde se simulaban los gradientes de pH mediante la adición de una solución concentrada de NaOH 5M. En sus resultados encontraron que, si bien la biomasa no se vio afectada, la producción de acetoína y 2,3 butanodiol se vio disminuida, en función del tiempo de residencia (T_r) en el reactor tubular, observándose una reducción en el rendimiento volumétrico y específico de un 26 % a un T_r de 240 s. Por otra parte notaron que la presencia de estos gradientes favorecía la producción de acetato, el cual era

indetectable en los cultivos control a pH constante (7.2), alcanzando hasta 0.75 g/L para un T_r de 240 s.

Serrato en el 2009, estudió el efecto de gradientes de pH y CO_2 sobre la producción de anticuerpos monoclonales en cultivos de células de hibridomas murinos. Utilizando un bioreactor de tanque agitado y mediante variaciones en el flujo de CO_2 , logró generar la presencia de condiciones oscilatorias de CO_2 y de pH. Los gradientes simulados para pH fueron de 7.1 ± 0.2 (1800 s), 7.1 ± 0.3 (3600 s) y 7.3 ± 0.5 (7200 s), los cuales corresponden a gradientes de CO_2 de 50 ± 20 mbar, 45 ± 30 mbar y 90 ± 90 mbar, respectivamente. En sus resultados observó que las condiciones oscilantes de pH y CO_2 (1800 s y 3600 s) favorecieron la producción de anticuerpos monoclonales y redujeron la producción de lactato, en comparación con cultivos a pH y CO_2 constantes (condiciones fisiológicas óptimas: 50 mbar CO_2 y pH de 7.2). Sin embargo, la presencia de gradientes de pH y CO_2 , afectó el crecimiento celular, observándose una menor concentración celular (3.77×10^6 , 3.05×10^6 y 2.06×10^6 células/mL, para 1800, 3600 y 7200 s, respectivamente) y una caída en la velocidad específica de crecimiento (0.032 , 0.031 y 0.025 h^{-1} para 1800, 3600 y 7200 s, respectivamente) a medida que se incrementó la magnitud del gradiente de pH, en comparación con cultivos a pH y CO_2 constantes (condiciones fisiológicas óptimas). En los que la velocidad de crecimiento y la concentración celular fueron de 0.04 h^{-1} y 3.52×10^6 células/mL.

Recientemente, en el 2011, Wallenius y colaboradores diseñaron un sistema para estudiar el efecto de gradientes de pH y temperatura en *Lactobacillus rhamnosus*. El sistema consistía de dos reactores (STR-PFR), conectados a través de una bomba peristáltica ($T_r=60$ s en PFR) con una operación en continuo (**Figura 3** A-ii). Una vez que se alcanzó el estado estacionario se realizaron las perturbaciones de pH y temperatura. Las perturbaciones de pH (5.3-6.2) se efectuaron manteniendo el PFR a un pH diferente con NaOH 3M y neutralizando en la entrada al STR mediante la adición de HCl 3M. Las perturbaciones de temperatura (32.0-37.0 °C) se realizaron con ayuda de un baño de agua conectado a una chaqueta de enfriamiento. En sus resultados encontraron que la concentración del producto de interés (acetoína) no se vio afectada; sin embargo, se observó un aumento en la expresión de genes relacionados a estrés, por los cambios de pH y de temperatura. Cabe destacar que los gradientes simulados corresponden a las condiciones hidrodinámicas de un biorreactor de 2 m³.

1.1.7 Respuesta de *E. coli* bajo estrés alcalino

Debido a su metabolismo fermentativo, *E. coli* genera metabolitos que acidifican el medio de cultivo, por lo que en el control de pH se contempla la adición de álcali y no de ácido. Por lo tanto, en este estudio sólo se aborda los gradientes de pH provocados por la adición de álcali y el estrés que provoca en la célula.

E. coli es una enterobacteria capaz de soportar valores extremos de pH que se presentan en el tracto digestivo, como en el estómago (pH de 1-3) y el intestino delgado, donde se pueden alcanzar valores de pH de 8, debido a la secreción de sales biliares (Begley *et al.*, 2005). Para poder soportar estos valores de pH es necesario que *E. coli* cuente con mecanismos de respuesta que le permita mantener sus funciones fisiológicas. Debido a que en el presente trabajo sólo se aborda el estudio de gradientes alcalinos, se describirá la respuesta de *E. coli* durante el estrés causado, por pH alcalino.

De forma general, las respuestas a estrés por pH alcalino en *E. coli* están dirigidas a mantener el pH intracelular dentro de valores fisiológicos, ya sea mediante el ingreso de iones hidronio al interior de la célula o mediante la generación de especies ácidas (Padan *et al.*, 2005; Krulwich *et al.*, 2011; Saito y Kobayashi, 2003).

El transporte de iones hidronios se da por la participación de dos sistemas, los antiportadores Na^+/H^+ y la ATP sintasa, ambos aumentan sus niveles transcripcionales cuando la célula se enfrenta a un pH alcalino. Con la sobreexpresión del complejo ATP sintasa, se incrementa el flujo de hidronios al interior de la célula y se favorece la producción de ATP, debido al aumento de la fuerza protón motriz y al aumento en el potencial eléctrico transmembranal (Slonczewski *et al.*, 2009; Maurer *et al.*, 2005; Krulwich *et al.*, 2011). *E. coli* cuenta con dos antiportadores Na^+/H^+ , que son NhaA y NhaB. NhaB participa en el intercambio de Na^+/H^+ en condiciones ácidas, mientras que NhaA es requerido para el crecimiento en pH alcalino externo en presencia de sodio, se ha reportado que su actividad se ve incrementada en tres órdenes de magnitud al realizar un cambio de pH de 6.5 a 8.5 (Taglicht *et al.*, 1991). Cuando se tienen condiciones pobres en sodio o cuando hay una gran entrada de sodio, debido al gradiente del mismo, los antiportadores K^+/H^+ asumen la dominancia (Krulwich *et al.*, 2011).

NhaA, además de transportar iones Na^+/H , también tiene un papel crucial como sensor de pH, ya que cuenta con un grupo de residuos ionizables que se encuentran en el asa VIII-IX de la proteína. Esta región sufre un cambio conformacional dependiente de pH, lo cual resulta en un incremento en la actividad del antiportador de hasta 2000 veces debido al cambio de pH de 6.5 a 8.5 (Tzuber *et al.*, 2004; Kozachkov *et al.*, 2007; Olkhova *et al.*, 2007).

La expresión de algunos transportadores de electrones de la cadena respiratoria se ve modificada por el pH alcalino, como el citocromo *bo* oxidasa (CyoABCD), la cual se ve inducida 7 veces más cuando el pH extracelular se incrementa de 6.0 a 7.5 (Cotter *et al.*, 1990). La citocromo *bo* oxidasa es predominante en condiciones ricas en oxígeno y favorece la acidificación al mantener la relación H^+/e^- cercana a 2 (Puustinen *et al.*, 1991; Verkhovskaya *et al.*, 1992).

La presencia de pH alcalino externo induce la expresión de enzimas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos, lo que permite la generación de metabolitos ácidos como succinato y piruvato. Este último puede transformarse, mediante la vía de fermentación ácido-mixta, en acetato, formato y lactato. Las enzimas reportadas que incrementan su expresión a pH alcalino son TnaA (triptofanasa) (Bingham *et al.*, 1999; Stancik *et al.*, 2002; Yohannes *et al.*, 2004) y CysK (cisteína sintasa A) (Flint *et al.*, 1996; Stancik *et al.*, 2002), que consumen triptófano, serina y cisteína, y AstD (Schneider *et al.*, 1998; Stancik *et al.*, 2002), un miembro del operón AST que degrada la arginina. EL operón AST produce glutamato, el cual puede ser convertido por GadA y GadB (isoformas de la glutamato descarboxilasa) (Yohannes *et al.*, 2004) a GABA (ácido gamma-aminobutírico) y éste último puede transformarse en succinato por GabT (Metzer *et al.*, 1979; Stancik *et al.*, 2002). Estas reacciones se resumen en la **figura 4**.

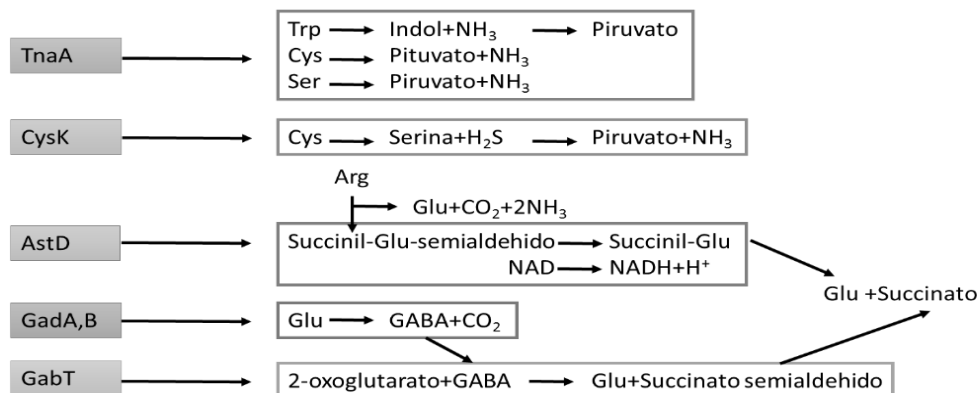


Figura 4. Reacciones del catabolismo de aminoácidos estimuladas por pH alcalino. Adaptado de Stancik *et al.*, 2002.

1.1.8 Efecto del pH en la producción de ADN plasmídico

En *E. coli*, se sabe que el pH puede modificar la producción de ADNp y dependiendo del intervalo de pH en el que se encuentre el cultivo, ácido o alcalino, se verá afectada negativa o positivamente. A pH ácido (pH=6), tanto la productividad volumétrica como específica, se ve disminuida (40 % y 27 %, respectivamente), con respecto a cultivos realizados a un pH óptimo de crecimiento de 7 (Ongkudon *et al.*, 2011). Algo similar observa Reinikainen y colaboradores (1989), donde el número final de copias de plásmido fue el mas bajo (10-25 copías de ADNp/Copias de ADN cromosómico) para valores de pH entre 6.5-7.0 y altas temperaturas de 40-42 °C (Reinikainen *et al.*, 1989). Lo contrario sucede al cultivar las células a pH alcalino, en donde se observa un aumento del rendimiento tanto volumétrico como específico (40% y 50 %, respectivamente), con respecto a cultivos a un pH óptimo ode crecimiento 7 (Ongkudon *et al.*, 2011). Reinikainen y colaboradores (1989), observan que el número final de copias de plásmido se incrementa (100-125 copías de ADNp/Copias de ADN cromosómico) a valores de pH de 7.5-8.0 y altas temperaturas de 40-42 °C. Ambos autores concluyen que las condiciones optimas de pH para la producción de ADNp difieren de las condiciones optimas para el crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, mantener un cultivo a un pH diferente del óptimo trae como consecuencia la presencia de estrés en las células, el cual se manifiesta con un decremento en la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, como se observa en la **figura 5**.

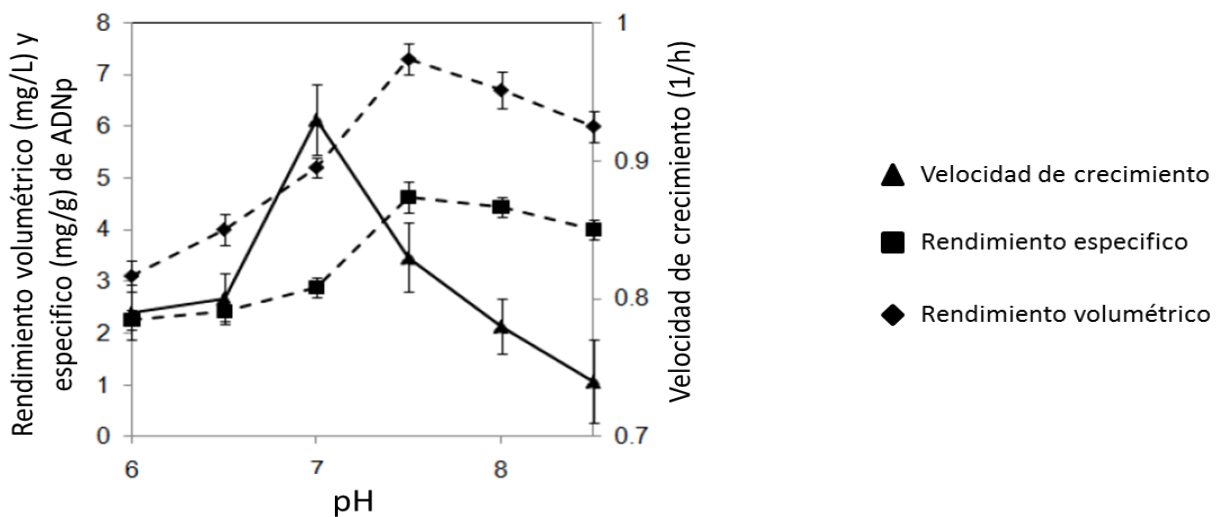


Figura 5. Efecto del pH en la producción de ADNp. Adaptado de Ongkudon *et al.*, 2011.

2. HIPÓTESIS

La presencia de gradientes espaciales de pH en cultivos de *Escherichia coli*, disminuirá la producción de ADNp y modificará las respuestas metabólica y transcripcional de la célula.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los gradientes espaciales de pH en la producción de ADN plasmídico y la respuesta metabólica y transcripcional de una cepa de *E. coli* recombinante productora de ADNp utilizando la metodología de escalamiento descendente.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de condiciones constantes de pH que representen una condición sin estrés (pH 7.2) y otra condición con estrés (pH 8.0), sobre el rendimiento del cultivo de *E. coli* productora de ADNp.
2. Evaluar el efecto de condiciones oscilatorias de pH sobre el rendimiento del cultivo de *E. coli* productora de ADNp con ayuda de un sistema de escalamiento descendente.
3. Evaluar los niveles relativos de transcripción de genes relacionados al estrés por pH y la síntesis de nucleótidos en las diferentes condiciones experimentales.

4. METODOLOGÍA

4.1 Características de la cepa y el plásmido modelo

4.1.1 Cepa

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó la cepa de *Escherichia coli* VH33 $\Delta(recA, deoR)$, que es una derivada de W3110 ($\Delta ptsH, \Delta ptsI, \Delta lacI, lacZ::loxP$), productora del plásmido pHN (Borja *et al.*, 2012). En esta cepa se sustituyó el sistema natural de consumo de glucosa (sistema fosfotransferasa, PTS) de *E. coli* por una permeasa de galactosa (De Anda *et al.*, 2006). Con esta modificación se minimiza el sobreflujo metabólico y por lo tanto la producción de ácidos orgánicos (Lara *et al.*, 2008). La cepa fue proporcionada por el Dr. Alvaro Raúl Lara Rodríguez (UAM-C), a partir de la cual se preparó un banco celular en matraces bafleados de 500 mL de volumen nominal y 150 mL de medio LB líquido suplementado con 0.2 g/L de ampicilina. Los matraces se incubaron a una temperatura de 37°C y 200 rpm. Una vez alcanzada una concentración celular de 2 unidades de densidad óptica (D.O._{600 nm}), el cultivo se mantuvo en hielo y se prepararon 50 crioviales de 2 mL, cada uno con 750 μ L de caldo de cultivo y 750 μ L de glicerol al 80% (v/v) y se almacenaron en ultracongelación a -70 °C.

4.1.2 Plásmido

El plásmido utilizado fue el pcDNA HN176-MuV de 6.1 Kb (Herrera *et al.*, 2010) el cual está basado en el plásmido pcDNA3.1" de Invitrogen y tiene insertado un gen que codifica para un antígeno que genera respuesta inmune contra la parotiditis (Hemaglutinin Neuraminidasa-HN-).

La construcción cuenta con los siguientes elementos: un sitio de origen de replicación pUC que permite tener un alto número de copias en *E. coli*; un gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa), para mantener la presión de selección en células de *E. coli* transformadas; un promotor basado en la secuencia de citomegalovirus humano (P_{CMV}), bajo el cual se encuentra el gen heterólogo (HN); una señal de terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento bovino (BGH pA) que permite la poliadenilación del transcrito; y por último, cuenta con un gen de resistencia a neomicina bajo el promotor temprano del virus SV40, con una señal de

terminación de la transcripción de SV40. Con la resistencia a neomicina es posible seleccionar células de mamífero transformadas (Herrera *et al.*, 2010). En la **figura 6** se muestra un esquema simplificado del plásmido denominado pHN.

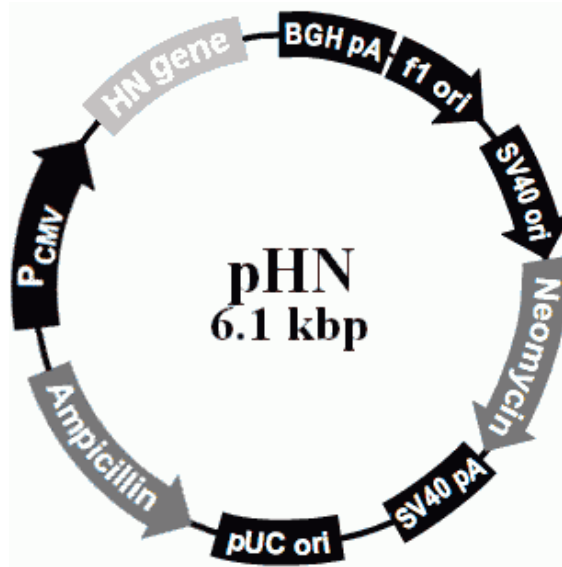


Figura 6. Mapa simplificado del plásmido pHN (tomado de Wunderlich *et al.*, 2014).

4.2 Medio de Cultivo.

El medio de cultivo empleado para la realización en este trabajo, fue el medio químicamente definido PD formulado para cultivos de alta densidad celular de *E. coli* (Soto *et al.*, 2011). Este medio se modificó enriqueciendo la fuente de nitrógeno con fosfato dibásico de amonio, como se muestra en la **tabla 3**.

Para la preparación del medio PD modificado, las sales de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl y citrato de sodio se disolvieron en un volumen adecuado de agua destilada y se ajustó el pH a 7.2 con NH_4OH al 15%. La solución se esterilizó a $121^\circ C$ y 15 psi por 30 minutos. Una vez estéril, se incorporaron los elementos trazas provenientes de una solución 250 X (**tabla 4**), la glucosa procedente de una solución de 650 g/L y el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ proveniente de una solución a 500 g/L. Estas últimas tres soluciones fueron esterilizadas por separado a $121^\circ C$ y 15 psi por 30 minutos. También se adicionó ampicilina, la cual se toma de una solución *stock* a 100 g/L y tiamina proveniente de una solución *stock* a 10 g/L. Ambas soluciones fueron previamente esterilizadas por filtración.

Tabla 3. Medio PD modificado.

Componente	g/L
K_2HPO_4	9
$(NH_4)_2HPO_4$	8
KH_2PO_4	5.3
$(NH_4)_2SO_4$	2.5
NH_4Cl	1.0
Ácido cítrico (citrato de sodio)	1.0
Tiamina-HCL	0.01
Ampicilina	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
Solución de elementos traza 250x.	4 mL/L
Glucosa	20 g/L

Tabla 4. Elementos traza 250 X.

Componente	g/L
EDTA-sodio	3.525
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.625
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3.750
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.375
H_3BO_3	0.750
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.525
$Zn (CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	8.450
Fe(III) Citrato	25.200

4.3 Condiciones de cultivo

4.3.1 Cultivos a pH constante

Para cada condición de pH (7.2 y 8), los cultivos se llevaron a cabo en un sistema de fermentación BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) en biorreactores con capacidad nominal de 1.2 L, con un volumen de operación de 0.7 L. Para la adquisición de datos y control de los parámetros de operación, se utilizó el *software* AFS-BioCommmand Bioprocessing (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Cada condición evaluada se realizó al menos por duplicado y se operaron las variables de control de igual forma para cada cultivo (temperatura de 37 °C, flujo de gases a 1 vvm y una tensión de oxígeno disuelto (TOD) a 30% respecto a la saturación con aire). La TOD y el pH se monitorearon mediante un electrodo polarográfico (Mettler Toledo) y un electrodo de vidrio (Mettler Toledo), respectivamente. Para el control de la TOD se utilizó una cascada de agitación-oxígeno (agitación: 200 rpm-1200 rpm y composición de oxígeno: 0%-100%). Para controlar el pH se utilizó una solución concentrada de sosa (5 M). Las muestras de ARN para evaluar los niveles de transcripción de genes de interés se tomaron en distintas fases del cultivo: exponencial temprana (2 h), exponencial media (5 h), exponencial tardía (8 h) y fase estacionaria (11 h). El diagrama del sistema de cultivo utilizado se muestra en la **figura 7**.

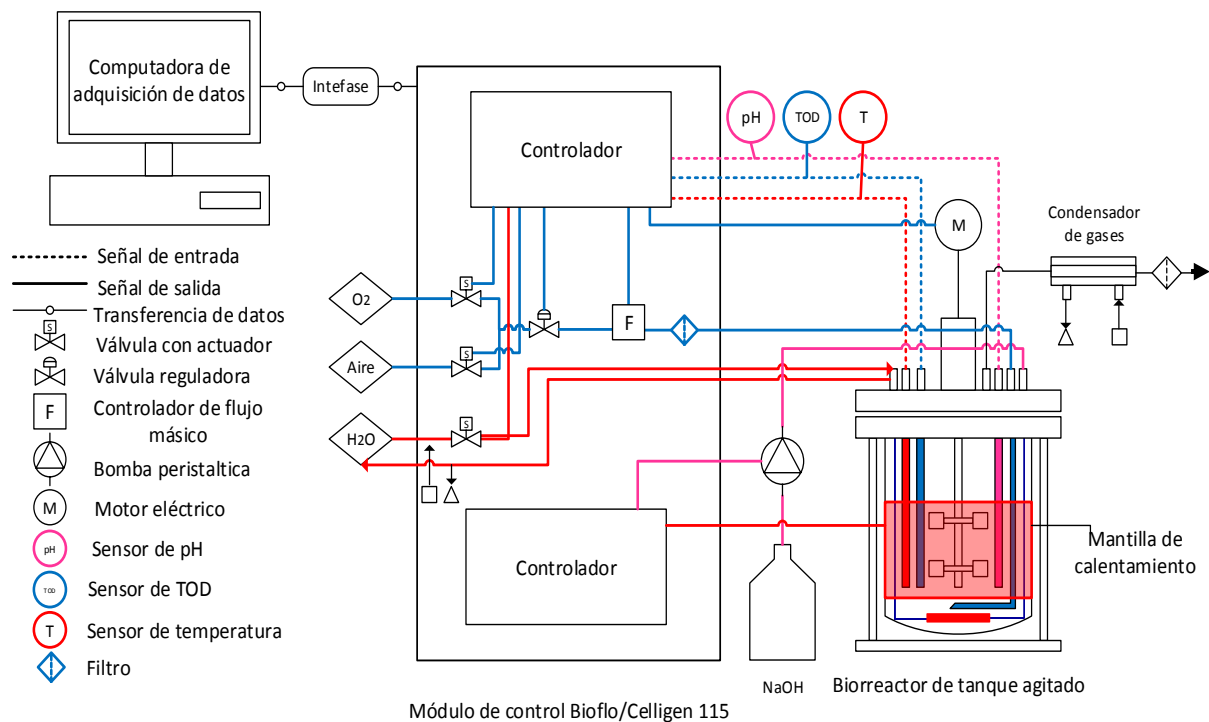


Figura 7. Sistema de cultivo en modo lote utilizado para cultivos a pH constante.

4.3.2 Sistema de escalamiento descendente de pH

El diseño del sistema de escalamiento descendente se basó en los conceptos propuestos por Namdev y colaboradores (1992) para evaluar los efectos de la zona de alimentación de glucosa en fermentaciones modo lote alimentado de *Sacharomyces cerevisiae*. En ese trabajo se representó el proceso de mezclado en un fermentador de escala industrial mediante un modelo de tres zonas de mezclado, que consisten en la zona de adición, el líquido afectado por la zona de adición y la zona de los impulsores. Siguiendo la distribución logarítmica normal de los tiempos de circulación (log-normal CTD) sugerida por Bajpai y Reuss (1982), para un fermentador de 100 m³, Namdev y colaboradores (1992), usaron una distribución basada en el modelo de “zona de redes” de Mann y colaboradores (1981), con una media de 20 s y una desviación estándar de 8.9 s, para simular la alimentación de glucosa. El modelo de recirculación de flujo (sistema de escalamiento descendente) consistía en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de flujo pistón (PFR) con un flujo de recirculación. La CTD del modelo de recirculación está dado por (Levenspiel, 1999):

$$F(t) = F \exp[-F(t - t_R)] \quad (1)$$

Donde:

$$F = \frac{Q_R}{V_{STR}} \quad (2)$$

$$t_c = \frac{V_{PFR}}{Q_R} \quad (3)$$

Siendo:

V_{PFR} : Volumen de reactor de flujo pistón (L)

V_{STR} : Volumen de reactor de tanque agitado (L)

t_c : Tiempo de circulación (s)

Q_R : Flujo de recirculación (mL/s)

F : Frecuencia (1/s)

El flujo de recirculación (Q_R), determina la frecuencia con que las células entran al PFR de un STR de un sistema de escalamiento descendente. El PFR se considera como la zona heterogénea correspondiente a la zona de alimentación, mientras que el STR se considera como la zona bien mezclada, correspondiente a la zona de los impulsores.

En el presente trabajo se utilizó una configuración de dos reactores, uno de ellos con un volumen nominal de 7.0 L (STR1) y otro de 0.5 L (STR2). En este último se simuló la zona de adición de álcali. El flujo de recirculación entre los dos compartimentos determinó la frecuencia de exposición a la zona de adición de ácido o álcali. Los parámetros de diseño experimental, Q_R , $V_{STR 1}$ y $V_{STR 2}$ dependen de $F(t)$, de acuerdo a las ecuaciones (1),(2) y (3). El mejor ajuste de la ecuación (1) para el CTD, usando el modelo de la "red de zonas", resultó en un valor máximo de $F= 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y un tiempo de circulación (t_c) de 9.6 s (Namdev *et al.*, 1992). El valor del tiempo de circulación representa el tiempo mínimo para que un elemento fluido deje la zona de adición, circule por el seno de la solución por medio de los impulsores y regrese a la zona de adición. Por lo tanto, el tiempo de residencia (t_R), que un elemento fluido tiene en la zona de adición, puede aproximarse a la mitad del tiempo de circulación, que en este caso serían 4.8 s. Esto se basa en la suposición

de que la zona de adición está completamente homogénea, una vez que entra a la zona de los impulsores.

Por lo tanto, $F_{max}=1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $t_R=4.8 \text{ s}$. Utilizando un volumen de operación de STR 1 de 5L y usando el valor de F_{max} , el valor máximo de Q_R (Q_{Rmax}), se puede calcular de la ecuación (2), dando como resultado un Q_{Rmax} de 8.5 mL/s y un volumen mínimo de STR 2 ($V_{STR2min}$), $V_{STR2min}$ de 40.8 mL. Los valores de $V_{STR2min}$ y Q_{Rmax} representan los límites de los parámetros de diseño y pueden ser usados para seleccionar valores mínimos de Q_R y valores máximos de V_{STR2} . Debido a que no existe un estimado del volumen de la zona de adición, el volumen de STR 2 se estimó como un 5 % del volumen de STR 1 (similar a la fracción de volumen utilizada por Namdev *et al.*, 1992, George *et al.*, 1993 y Amanullah *et al.*, 2000), lo que corresponde a 0.25 L. Usando este volumen en el STR 2, el flujo de recirculación puede modificarse para obtener diferentes tiempos de residencia en el STR 2.

El sistema de escalamiento descendente se configuró utilizando dos compartimentos (STR 1 y STR 2) con una operación en lote, en donde STR 1 consistió en un fermentador de 7 L con un volumen de operación de 5 L y STR 2 un fermentador de 0.5 L con un volumen de operación de 0.25 L. Ambos compartimentos se mantuvieron recirculados entre sí con ayuda de una bomba peristáltica Master Flex 77601-10 (Cole-Parmer instrument Co.). Tanto STR1 como STR2 se equiparon con un electrodo de oxígeno disuelto (Mettler Toledo) y un electrodo de pH (Mettler Toledo). La temperatura en ambos compartimentos se mantuvo a 37°C y un flujo de gases de 1 vvm. La TOD se mantuvo a 30 % mediante una cascada de agitación-composición de oxígeno (en STR 2, sólo composición de oxígeno), la respuesta de ambos componentes de la cascada se controló mediante un algoritmo de control proporcional-integral-derivativo (PID). El control de pH se realizó mediante la adición de una solución concentrada de sosa (5 M) en STR 2 para controlar el pH a un valor de 7.2 en STR1. La adición de sosa se controló mediante un algoritmo PID, que automáticamente permite la adición de sosa a través de una bomba peristáltica. Esta configuración en el control de pH permite la simulación de gradientes de pH al adicionar la sosa en STR 2 en función de lo requerido por STR 1 y la magnitud de los gradientes se puede modificar con ayuda del flujo de recirculación que afecta directamente al tiempo de residencia en ambos compartimentos. El flujo de recirculación se configuró para asegurar tiempos de residencia de 60s, 120s, 180s y 240s en STR 2, esto con la finalidad de simular distintos tiempos de mezclado

típicos de fermentadores a gran escala. En la **figura 8** se muestra un diagrama del sistema de cultivo. Con el fin de evaluar los perfiles de expresión de los genes involucrados en el estrés por pH se tomarón muestras cada 3 h.

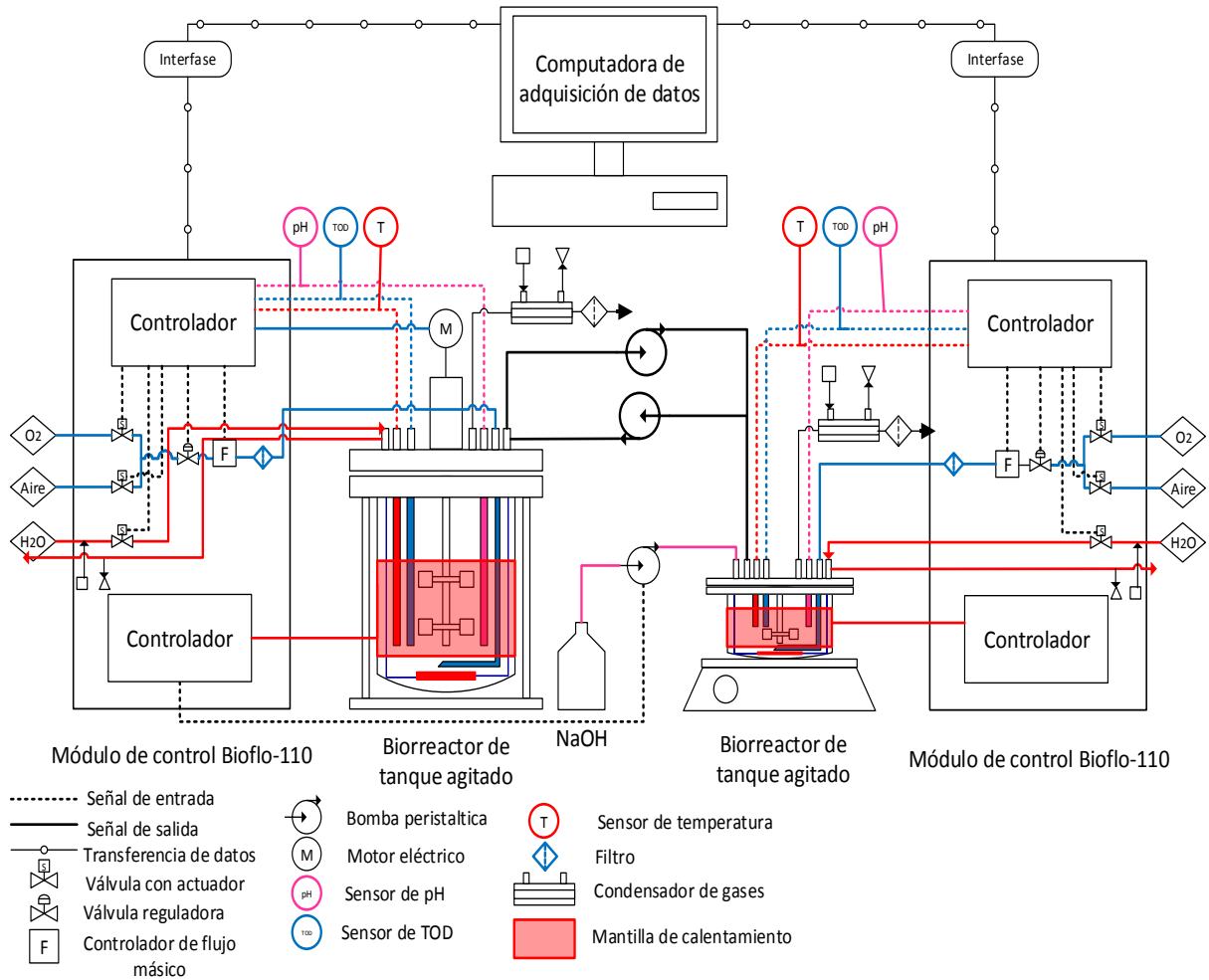


Figura 8. Sistema de cultivo utilizado en los experimentos de cambios oscilatorios de pH.

4.4 Métodos analíticos para el seguimiento del cultivo

4.4.1 Determinación de biomasa.

a) Absorbancia a 600 nm (D.O. 600 nm)

La concentración de biomasa se determinó por medio de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. Para esto se realizaron diluciones de las muestras para ajustar a una D.O. entre 0.1 y 0.6 unidades de absorbancia.

b) *Determinación del peso celular seco*

Para la determinación de peso celular seco, se llevaron a peso constante tubos *Eppendorf* de 2 mL en un horno a 80 °C, posteriormente se pesaron usando una balanza analítica. Después se colectaron de 1.5 - 6 mL de caldo de cultivo, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con solución salina fisiológica y se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos. La biomasa obtenida se secó a la temperatura indicada hasta peso constante. La concentración de biomasa como peso seco se calculó con los pesos de los tubos vacíos y con la biomasa seca, tomando en cuenta el volumen de caldo de cultivo empleado.

c) *Correlación peso seco celular-D.O. 600 nm*

Se realizó una correlación entre peso seco y D.O. a 600 nm para poder calcular el peso seco (PS) correspondiente a la biomasa obtenida en cada una de las condiciones experimentales. En la **figura 9** se muestra la correlación obtenida de D.O. 600 nm vs la concentración de biomasa en peso seco en medio PD. Los datos obtenidos se ajustaron a una recta con pendiente de 0.439 g_{PS}/D.O. 600nm con una $R^2 = 0.9905$.

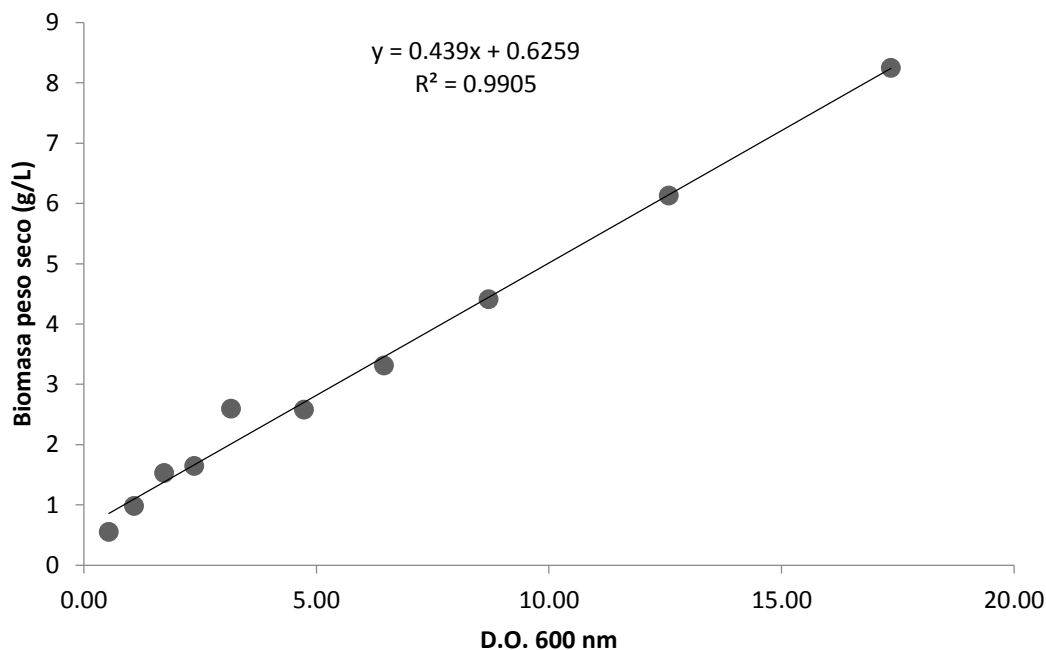
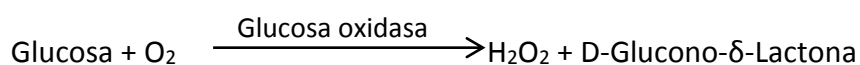


Figura 9. Correlación entre la concentración de biomasa medida como peso seco y la D.O. a 600 nm.

4.4.2 Cuantificación de glucosa

Para cuantificar la glucosa, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante, el cual se inyectó en un analizador bioquímico YSI 2700 (Yellow Spring Instruments), cuyo principio de medición se basa en la reacción catalizada por la enzima D-glucosa oxidasa, la cual se encuentra inmovilizada en una membrana (Manual de usuario: YSI 2700 *Select Biochemistry analyzer*, 2014. www.ysilifesciences.com). A continuación se muestra la reacción catalizada:



La cuantificación se realiza de forma indirecta al oxidarse electroquímicamente el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en el electrodo de platino del equipo. Esto genera un cambio de corriente y permite su cuantificación al comparar la lectura con la de un estándar de concentración conocida.

4.4.3 Determinación de ácidos orgánicos

Las muestras tomadas para la cuantificación de ácidos orgánicos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se filtró por membranas de poro de 0.45 μm. Las muestras ya filtradas se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Waters), empleando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), manteniendo la temperatura de la columna a 60 °C, utilizando como fase móvil H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.5 mL/min. El equipo fue equipado con un detector de arreglo de fotodiodos UV (Waters 2478, Dual λ absorbance detector). A partir de los cromatogramas de los estándares se obtuvo que los tiempos de retención para acetato, formiato, lactato y succinato fueron 17.9, 16.5, 14.9 y 13.9 min, respectivamente (**figura 10**).

Se construyeron curvas tipo de cada ácido orgánico, partiendo de concentraciones conocidas e integrando el área bajo la curva de cada uno de los picos obtenidos. En la **figura 11** se muestran las curvas tipo de cada ácido orgánico y en la **tabla 5**, las regresiones obtenidas, con las que posteriormente fue posible cuantificar la concentración de los ácidos orgánicos de interés, mediante interpolación.

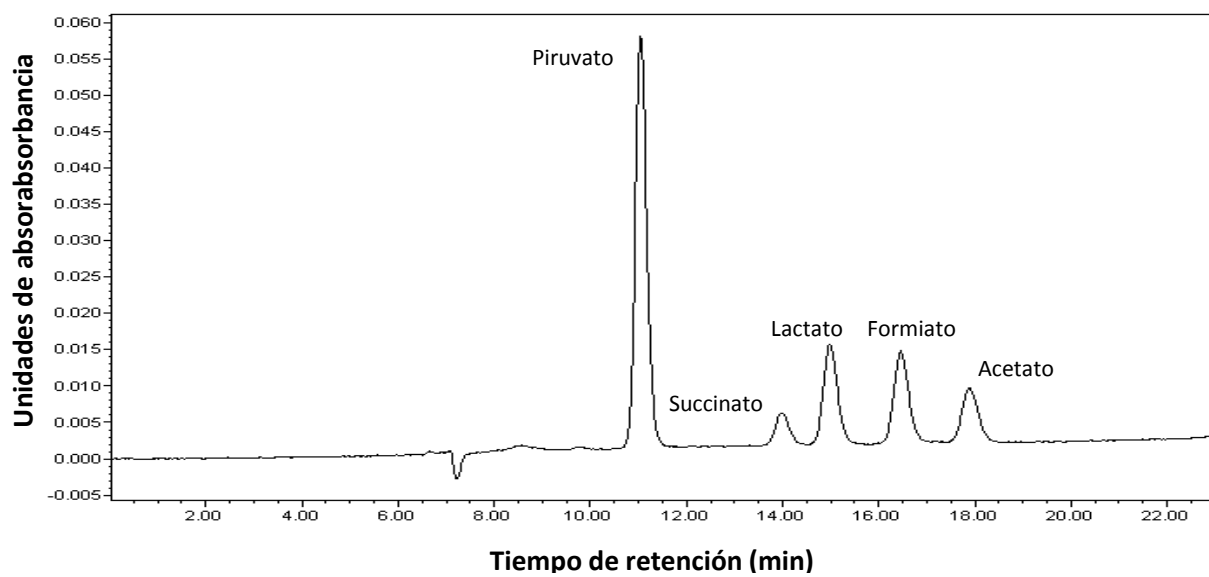


Figura 10. Cromatograma típico de estándares de ácidos orgánicos.

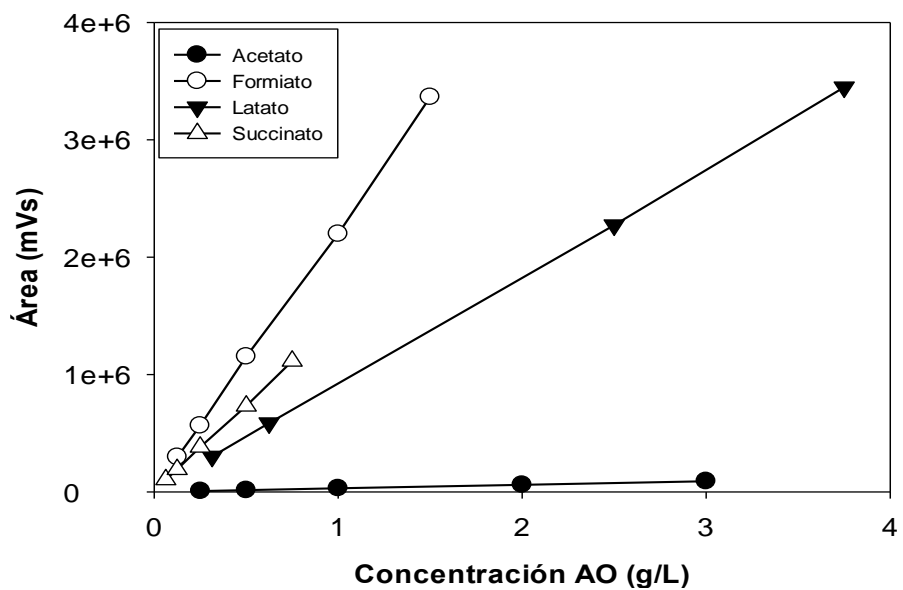


Figura 11. Curvas tipo para la cuantificación de ácidos orgánicos.

Tabla 5. Correlaciones para la cuantificación de ácidos orgánicos.

Ácido orgánico	Correlación	R ²
Acetato	Conc.=Área/30290.86	0.999
Formiato	Conc.=Área/2220385.33	0.999
Lactato	Conc.=Área/913230.86	0.999
Succinato	Conc.=Área/1466038.75	0.999

4.4.4 Extracción y cuantificación de ADN plasmídico

La extracción de plásmido fue a partir de 2 mg de biomasa húmeda, utilizando el kit comercial QIAquick de QIAGEN, el cual se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas, seguido de la adsorción de ADN plasmídico a una columna de sílica en presencia de una alta concentración de sales. Posteriormente, se llevó a cabo la elución con 70 µL de una solución baja en sales.

La cuantificación de ADN plasmídico se realizó mediante espectrofotometría ultravioleta a 260 nm, haciendo uso del el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

4.4.5 Análisis densitométrico en geles de agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE (40 mM tris-HCl, 20mM ácido acético y 1 mM EDTA, pH 8.0), en los cuales se cargó un volumen constante de 10 µL por carril a una concentración normalizada de 50 ng/µL de ADNp. La separación se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 30 min, empleando bromuro de etidio como agente colorante a una concentración de 0.02 µg/mL (Moore, 2001). Los geles fueron revelados exponiéndolos a 260 nm en un fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad, USA). La concentración de superenrollamiento (CSE) se determinó mediante densitometría de las poblaciones, utilizando el software ImageLab (Bio-Rad, USA). Aquella población que tuvo una mayor migración con respecto al total de las poblaciones, se relacionó con la isoforma superenrollada del ADNp y se calculó el porcentaje correspondiente a esta isoforma. Para calcular el CSE al final del cultivo se promediaron los últimos tres puntos del cultivo.

4.5 Análisis transcripcional

4.5.1 Extracción de ARN total en cultivos

Las muestras destinadas para la extracción de ARN se estabilizaron utilizando el reactivo RNA protect bacteria (Qiagen). Para ello se tomaron 1.2 mL de caldo de cultivo y 3.6 mL de reactivo estabilizador de ARN; se homogenizó con ayuda de un vortex por 5 s, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar durante 10 min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se almacenaron los *pellets* en ultracongelación a -70°C. La extracción de ARN total, se realizó con el kit comercial RNeasy Protect Bacteria Mini Kit, de Qiagen. El ARN obtenido se sometió a un tratamiento enzimático para la eliminación de ADN usando el kit TURBO DNase (Ambiom). El ARN total se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) y se analizó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.5.2 RT-PCR cuantitativa

Para el análisis de expresión y síntesis de ARNm se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la cual ha demostrado su utilidad y precisión para el monitoreo de niveles de expresión de genes en cultivos bacterianos (Flores et al. 2005; Lara *et al.*, 2006; Baez *et al.*, 2011). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Mx3005P (Agilent Technologies), utilizando el kit comercial Brilliant III Ultra-fast SYBR Green qRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies). Las condiciones de reacción se mantuvieron de acuerdo al protocolo de la casa comercial (1 ciclo: 10 minutos a 50°C. 1 ciclo: 3 minutos a 95°C. 40 ciclos: 10 segundos a 95°C, seguido de 15 segundos a 61 °C), utilizando 10 ng totales de ARN y una concentración de oligonucleótidos de 250 nM (**tablas 6 y 7**). Siempre se incluyó para cada gen un control sin templado (NTC) y un control sin retrotranscriptasa (No-RT). Cada reacción se realizó por triplicado para cada uno de los genes de cada condición evaluada.

Para determinar si como gen calibrador se utilizaría *idnT* o *ihfB* (Zhou *et al.*, 2011), se evaluó si los niveles de expresión de los candidatos se modificaba en las distintas condiciones experimentales. Como puede observarse en la **figura 12**, *idnT* mostró mayor reproducibilidad en el ciclo limite (C_T), razón por lo cual se utilizó como gen de referencia (calibrador).

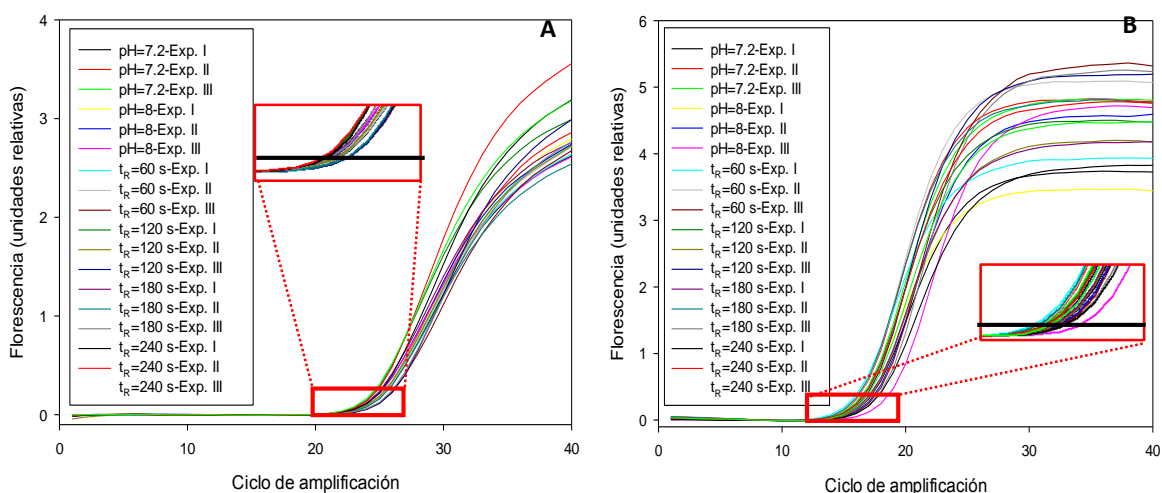


Figura 12. Perfiles de amplificación de genes de referencia. **A:** *idnT* en diferentes condiciones de cultivo. **B:** *ihfB* en diferentes condiciones de cultivo. Las fases de cultivo se representan de la siguiente forma: Exp. I (exponencial temprana, 2 h), Exp. II (exponencial media, 5 h), Exp. III (exponencial tardía, 8 h). En el recuadro rojo se representa el ciclo límite (C_T) con una línea negra.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por qRT-PCR.

Gen	Producto del gen	Oligonucleótido sentido Oligonucleótido anti sentido	Producto de amplificación (pares de bases)
<i>astD</i>	Succinilglutamato semialdehido deshidrogenasa	5'-TTCCCTGGTCATTTGCCGAAC-3' 5'-GCATTACCGCTTCGCCACT-3'	109
<i>cyoA</i>	Subunidad A del citocromo <i>bo</i> oxidasa	5'-GGCATTGCTACCGTGAAT-3' 5'-AGACGCGGAATGAAGAAGGA-3'	101
<i>cysK</i>	O-acetilserina sulfidrilasa A	5'-GCGGTTACAAACTCACCT-3' 5'-CTTTAGCACCTTCGTCAGCA-3'	105
<i>gadA</i>	Glutamato descarboxilasa	5'-ATCGCGGAGTCAAACGATT-3' 5'-TTCTGACGAGCGTTGCCAT-3'	101
<i>idnT</i>	Transportador idonato/ 5-cetoglutarato/ Gluconato	5'-CTTTGAGGCTAATCTCGGAAC-3' 5'-TTTCTCAAAGCGAGTTAGCAGT-3'	109

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los estudios de nivel relativo de transcripción por qRT-PCR (**continuación**).

Gen	Producto del gen	Oligonucleótido sentido Oligonucleótido anti sentido	Producto de amplificación (pares de bases)
<i>ihfB</i>	Subunidad β del factor de integración del hospedero	5'-GCCAAGACGGTTGAAGATGC-3' 5'-GAGAAACTGCCGAAACCGC-3'	101
<i>nhaA</i>	Antiportador Na/H+	5'-GGCCATCATTATCATCGCATT-3' 5'-CACAGATTCAATAC6CGCGAGT-3'	102
<i>nrdR</i>	Represor transcripcional de unión a ADN	5'-CCCATTCTGTTTCGCCGTGGA-3' 5'-TACACACCAGACACTGCCGAC-3'	95
<i>purR</i>	Represor transcripcional de unión a ADN	5'-CTACTCCCCTAGCGCGGTG-3' 5'-TGATCTCGGCAAAATAGGCC-3'	101
<i>rpoS</i>	Subunidad de la ARN polimerasa	5'-GGACGCGACTCAGCTTTACC-3' 5'-CGACATCTCCACGCAGTGC-3'	101
<i>tnaA</i>	Triptofanasa	5'-ATACACCATTCCGACTCACC-3' 5'-ACCATTTTGCTGCGATCCA-3'	105
<i>torR</i>	Regulador transcripcional de unión a ADN	5'-TGATGTTAACCCGCGCCCTG-3' 5'-ATTTCCAGCCCAACAATACGG-3'	97

4.6 Métodos de cálculo

4.6.1 Cálculos cinéticos y estequiométricos

Las velocidades específicas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos y ADNp fueron calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$q_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (5)$$

$$q_{ADNp} = \frac{1}{X} \frac{d_{ADNp}}{dt} \quad (6)$$

$$q_{AO} = \frac{1}{X} \frac{d_{AO}}{dt} \quad (7)$$

Rendimientos específicos:

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (8)$$

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} \quad (9)$$

Donde:

μ :	Velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)
q_s :	Velocidad específica de consumo de sustrato	(g/g*h)
q_{ADNp} :	Velocidad específica de producción de ADNp	(g/g*h)
q_{AO} :	Velocidad específica de producción de ácido orgánico	(g/g*h)
X :	Concentración de biomasa	(g/L)
$ADNp$:	Concentración de ADN plasmídico	(g/L)
S :	Concentración de sustrato	(g/L)
AO :	Concentración de ácido orgánico	(g/L)
t :	Tiempo	(h)

La presentación de resultados, es mediante la media calculada de dos cultivos independientes, en todos los casos, las barras de error representan el error estándar entre las réplicas experimentales. En el **Apéndice A 1**, se presentan los datos de forma independiente de cada una de las réplicas de dos condiciones evaluadas en el SED (60 s y 180 s de t_R), con la finalidad de mostrar la reproducibilidad de los experimentos.

4.6.2 Cálculo de niveles de transcripción relativos

Se empleó el método doble delta C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) descrito por Livak y Schmittgen (2001). Para poder utilizar este método es necesario que las eficiencias de amplificación para cada gen sean similares.

Para ello fue necesario realizar una curva estándar utilizando diferentes cantidades de ARN inicial. Posteriormente se graficó el ciclo límite (C_t) contra los nanogramos iniciales de ARN. La pendiente de la curva está directamente relacionada con la eficiencia de reacción, tal y como lo muestra la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de reacción} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \quad (10)$$

Donde la eficiencia de reacción corresponde a la proporción de moléculas de templado que se están duplicando cada ciclo. En la **figura 13** se muestran las curvas de calibración para cada gen y en la **tabla 8** se muestran las regresiones obtenidas, así como la eficiencia de la reacción.

El primer paso para calcular los cambios transcripcionales, es la diferencia de los C_t del gen de interés (denominado GDI) y el gen calibrador (*idnT*, denotado como GC), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta C_t = C_{t(GDI)} - C_{t(GC)} \quad (11)$$

Posteriormente se procede a comparar el ΔC_t de la condición experimental, contra una condición control, de la siguiente forma:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t(\text{experimental})} - \Delta C_{t(\text{control})} \quad (12)$$

Por último, se incorpora el $\Delta \Delta C_t$ como nivel de transcripción, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de transcripción} = 2^{-\Delta \Delta C_t} \quad (13)$$

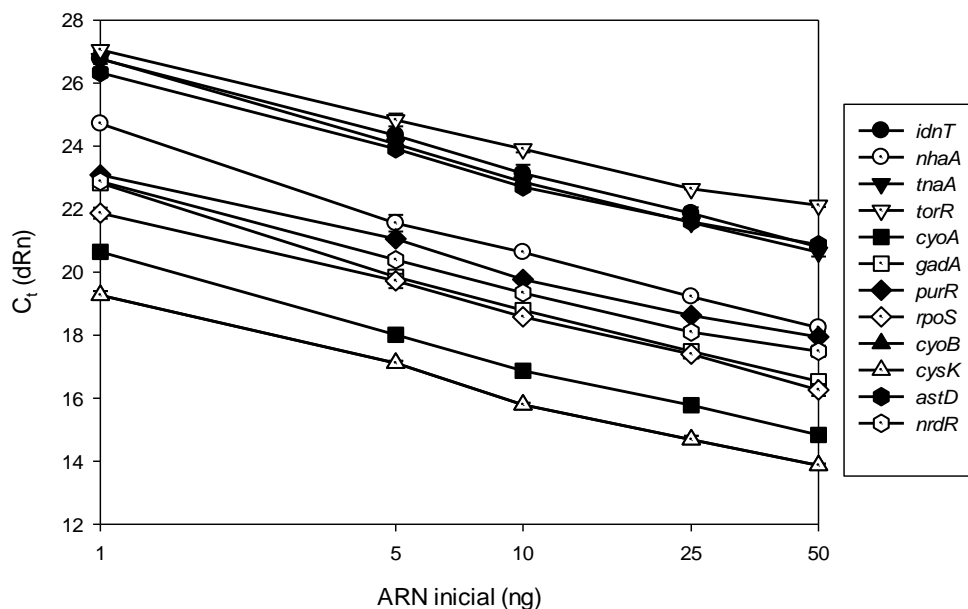


Figura 13. Curvas de calibración de genes utilizados para qRT-PCR.

Tabla 8. Correlación de curvas de calibración de genes utilizados para qRT-PCR.

Gen	Correlación	Eficiencia (%)	R ²
astD	$Ct = -3.26 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 26.21$	102.7	0.994
cyoA	$Ct = -3.42 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 20.50$	96.2	0.995
cysK	$Ct = -3.23 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 19.25$	103.9	0.996
gadA	$Ct = -3.69 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 22.64$	86.5	0.994
idnT	$Ct = -3.52 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 26.75$	92.5	0.999
nhaA	$Ct = -3.78 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 24.50$	83.8	0.993
nrdR	$Ct = -3.23 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 22.74$	103.9	0.993
purR	$Ct = -3.10 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 23.07$	110.0	0.994
rpoS	$Ct = -3.29 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 21.92$	101.3	0.999
tnaA	$Ct = -3.63 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 26.67$	88.4	0.997
torR	$Ct = -2.97 * \text{LOG}(\text{ng}_{\text{ARN}}) + 26.96$	117.1	0.994

4.6.3 Interpretación de los niveles de transcripción

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

- I. $\Delta\Delta C_t=0$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}=1$): Implica que no hay diferencia entre la cantidad de ARNm presente en la muestra de la condición experimental y la cantidad de ARNm presente en la condición control. Por lo tanto, no hay cambio en el nivel relativo de transcripción.
- II. $\Delta\Delta C_t>0$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}<1$): Esto significa que la cantidad de ARNm del gen analizado fue menor en la condición experimental, por lo que hay una disminución en la transcripción con respecto al cultivo control
- III. $\Delta\Delta C_t<0$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}>1$): Representa una mayor cantidad de ARNm en la condición experimental, por lo tanto hay una mayor transcripción que en la condición control.

Debe hacerse notar que los valores determinados por duplicado mediante qRT-PCR pueden diferir en un 30 % (Flores *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2006). Por lo tanto diferencias en los niveles de transcripción de alrededor del 30 % deben tomarse con precaución, ya que se encuentra dentro de los límites de error de la técnica, y se necesita una prueba estadística con más datos para afirmar con seguridad que no hay cambio en el nivel de transcripción de los genes mencionados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cultivos a pH constante

Con el fin de tener cultivos control en donde se aprecie el comportamiento de las células, tanto en presencia como en ausencia de estrés por pH, se realizaron cultivos a pH constante en modo lote, de tal forma que los cultivos mantenidos a un pH de 7.2 son cultivos en ausencia de estrés y los cultivos mantenidos a pH 8.0 se consideran como expuestos a estrés constante.

5.1.2 Efecto del pH sobre la cinética del cultivo y la producción de ADNp

En las **figuras 14** y **15** se muestran las cinéticas a pH 7.2 y 8.0, respectivamente. En la cinética de crecimiento a pH 7.2 se observó un agotamiento de la fuente de carbono a las 8 h, alcanzando una biomasa máxima de 11.13 ± 0.27 g/L (**figura 14 A**) y una concentración máxima de ADNp de 28.9 ± 0.6 mg/L, lo que representa un rendimiento de producto en biomasa de 2.28 ± 0.15 mg/g (**figura 14 B**). En el cultivo a pH 8.0 se observó un agotamiento de la fuente de carbono hasta las 11 h. En este punto se observó una caída en la concentración celular, que en la siguiente hora se recuperó, alcanzando 8.04 ± 0.06 g/L (**figura 15 A**). La concentración máxima de ADNp para este cultivo fue de 31.9 ± 0.6 mg/L y un rendimiento producto en biomasa de 2.72 ± 0.17 mg/g (**figura 15 B**).

En la **tabla 9** se resumen los parámetros cinéticos y estequiométricos de ambas condiciones, donde podemos apreciar una disminución importante en la velocidad específica de crecimiento, siendo, a pH 8, de 35.2 % menor que a pH 7.2. También se observa una disminución en las velocidades específicas de consumo de sustrato y en la producción de ADNp de 0.90 a 0.68 g_X/g_{Glc} y 0.89 a 0.69 $g_{ADNp}/(g_X \cdot h)$, respectivamente. En cuanto al contenido de plásmido súper enrollado (CSE), para ambas condiciones fue cercano al 80 %.

Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos a pH constante.

Parámetro	pH 7.2	pH 8.0
μ (h^{-1})	0.39±0.00	0.25±0.01
$Y_{X/S}$ (g_X/g_{Glc})	0.43±0.02	0.37±0.02
q_S ($g_{Glc}/(g_X \cdot h)$)	0.90±0.04	0.68±0.05
ADNp (mg/L)	20.8±0.4	23.6±4.2
$Y_{P/X}$ (g_{ADNp}/g_X)	2.28±0.15	2.72±0.17
q_P ($g_{ADNp}/(g_X \cdot h)$)	0.89±0.06	0.69±0.06

En los gráficos de control de pH (**figura 14 C y D**; **figura 15 C y D**) de ambos cultivos (pH 7.2 y pH 8.0), se observó que al entrar en la fase estacionaria del cultivo, se pierde el control de la variable de pH, esto debido a que la demanda de base se encuentra al máximo en la fase exponencial del cultivo y, una vez que entra a la fase estacionaria, la demanda de base cesa. Sin embargo, existe un retraso entre la retroalimentación del control y el monitoreo del sistema que da como resultado una acumulación de álcali al final de la fase exponencial. Además, se puede observar que durante la fase estacionaria se incrementó gradualmente el pH. Este incremento puede deberse a que una vez que se consume la glucosa (fuente limitante de carbono), la célula comienza a utilizar aminoácidos como fuente de carbono, en especial triptófano y glutamato que, al ser metabolizados, aportan amonio al sistema, resultando en un incremento en el pH (Wolf, 2005).

Al igual que el control de pH, el control de la TOD en el cultivo a pH 7.2 (**figura 14 C y D**) se pierde en la fase estacionaria, donde el metabolismo celular se ve disminuido como resultado de una escasez de nutrientes y esto se traduce en una menor velocidad de consumo de oxígeno, lo cual provocó que la agitación se reduzca al mínimo. En el gráfico de control se puede observar un incremento brusco en la TOD, que correspondió a la transición hacia la fase estacionaria. Es en este punto donde la agitación comienza a disminuir debido a la disminución en la demanda de oxígeno. Sin embargo, para este experimento, la velocidad de agitación mínima fijada en el bioreactor (200 rpm), permite que la TOD sobrepase las necesidades del cultivo en la fase estacionaria, razón por la cual se observó un incremento en la TOD en esta fase del cultivo.

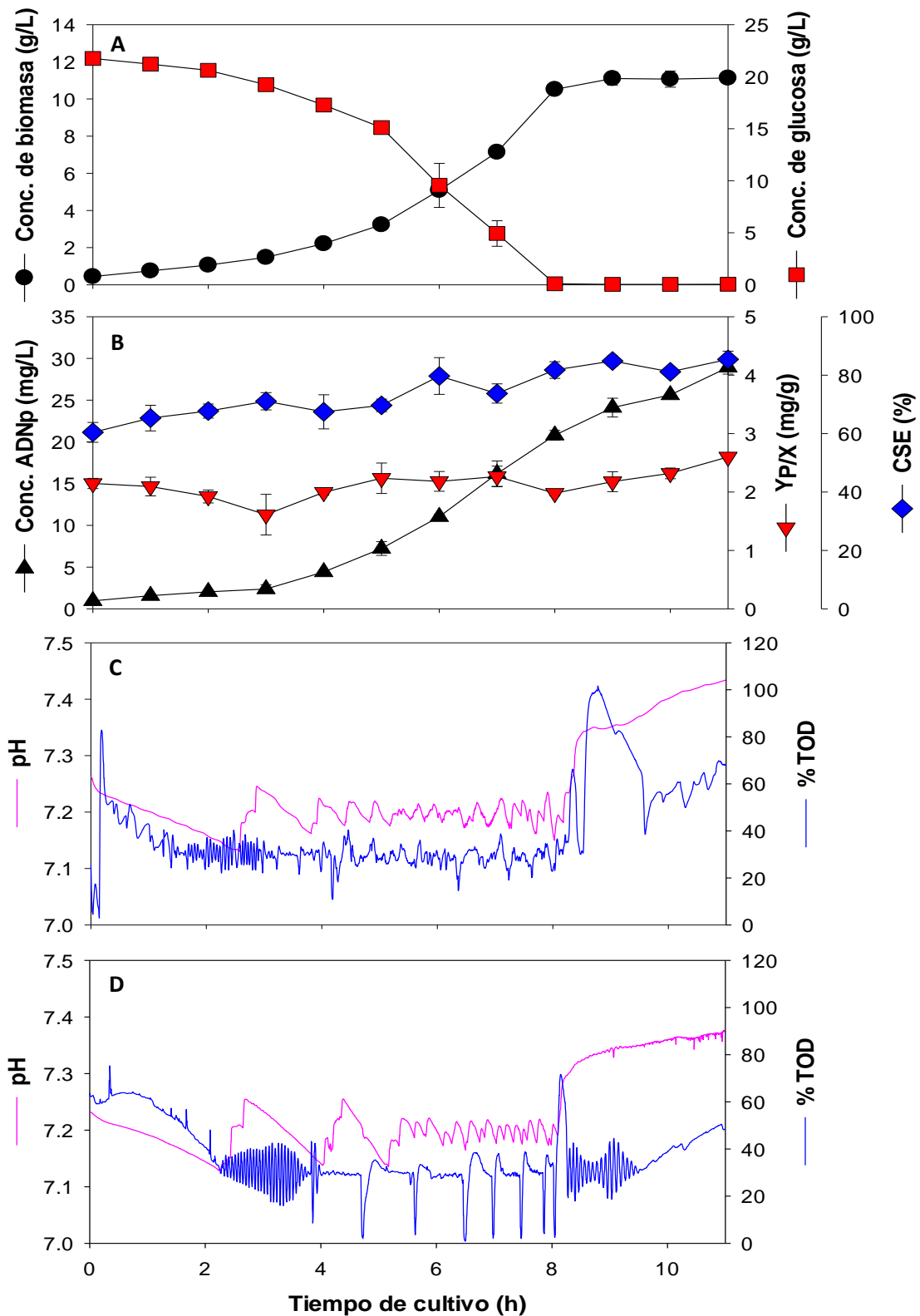


Figura 14. Cinética de cultivo a pH 7.2. **A:** Curva de crecimiento y consumo de glucosa. **B:** Producción de ADNp. **C y D:** Control de pH y TOD de las replicas experimentales. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

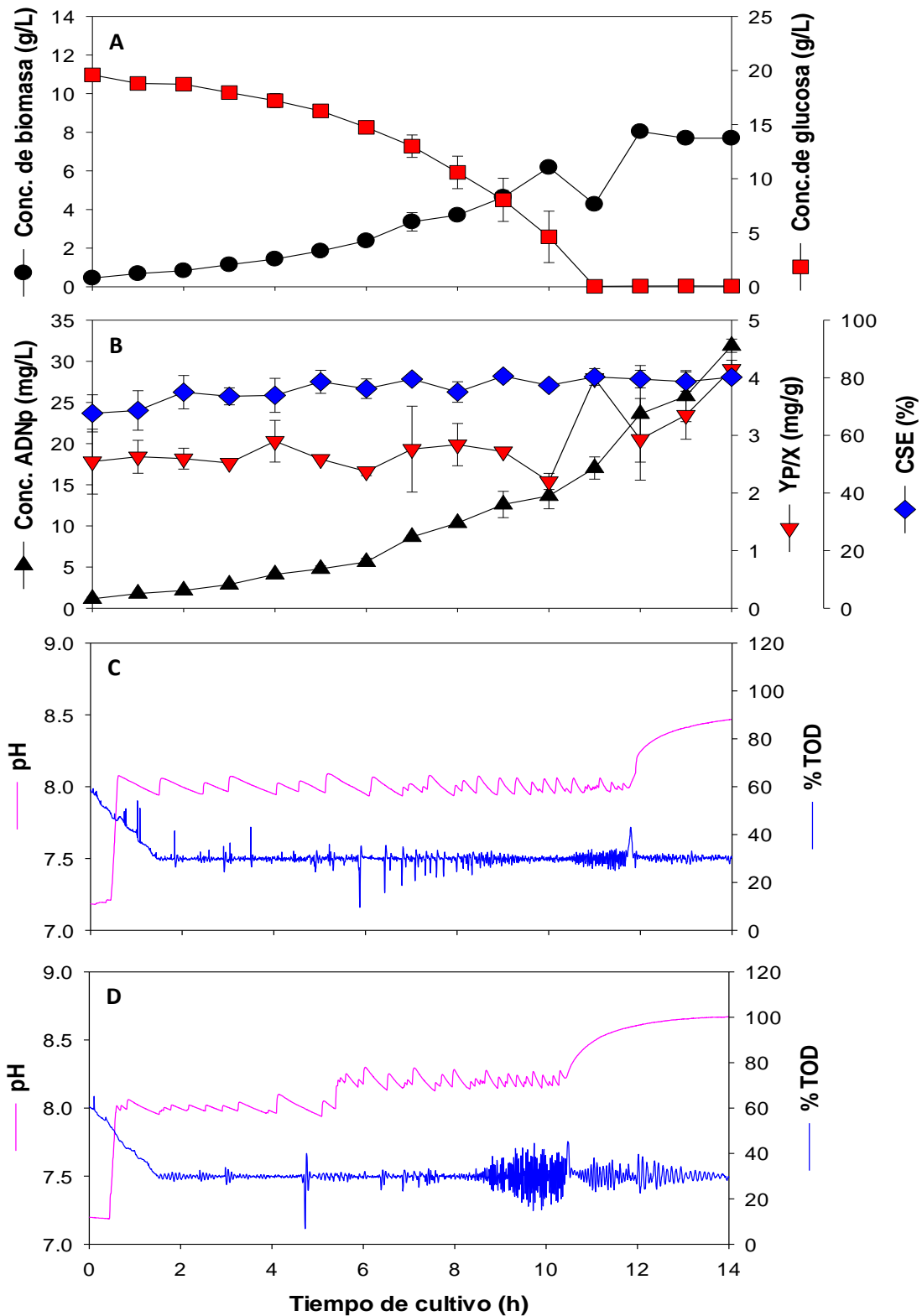


Figura 15. Cinética de cultivo a pH 8.0. **A:** Curva de crecimiento y consumo de glucosa. **B:** Producción de ADNp. **C y D:** Control de pH y TOD de las replicas experimentales. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

Es sabido que pequeñas desviaciones del pH óptimo de crecimiento, incluso de 0.5 unidades de pH, representan una condición de estrés para las células, provocando una disminución en parámetros cinéticos y estequiométricos (Ongkudon *et al.*, 2011). El efecto del pH como un agente estresante estará en función de los valores que se adopten en esta variable. En este estudio se evaluó el efecto de cultivos a pH 8. Es interesante ver que, si bien es marcada la disminución de los parámetros cinéticos y estequiométricos relacionados a sustrato y biomasa, los parámetros estequiométricos relacionados al producto (ADNp), aumentan, obteniendo un incremento del 10 % en la concentración máxima de ADNp (en la fase estacionaria) y 19 % en el rendimiento producto en biomasa. En otros estudios ya se ha reportado que pequeñas desviaciones del pH óptimo de crecimiento (pH 7), incluso de 0.5 unidades de pH, propician un incremento, tanto en el rendimiento volumétrico como específico en la producción del plásmido pcADN3F, de 40 % y 67 %, respectivamente (Ongkudon *et al.*, 2011). Reinikainen y colaboradores en 1998 estudiaron el efecto del pH y la temperatura en la producción de ADNp en donde de igual forma observaron que la producción se veía favorecida por a medida que incrementaba el pH, obteniendo una producción máxima a pH 8.0.

El incremento en la síntesis de ADNp puede deberse al impacto que tiene el pH sobre la velocidad de crecimiento, que se sabe es un parámetro sensible a ligeras variaciones de esta variable (Ongkudon *et al.*, 2011). En general, se asume que bajas velocidades de crecimiento llevan a una mayor síntesis de ADNp (O'Kennedy *et al.*, 2003; Bhole and Ross, 2011; Bentley *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 1991; Wunderlich *et al.*, 2014). Esto se ha atribuido a una mayor estabilidad del plásmido y a que la replicación del plásmido se ve privilegiada sobre otras actividades celulares (Prather *et al.*, 2003); sin embargo, existen reportes contradictorios donde se muestra un incremento en la producción de ADNp a velocidades de crecimiento altas (Seo and Bailey, 1985; Seo and Bailey, 1986; Zabriskie and Arcuri, 1986; Reinikainen and Virkajärvi, 1989). A pesar de que la velocidad de crecimiento parece afectar fuertemente la producción de ADNp, aún no queda muy claro cómo es que este parámetro influye en su producción. También se ha propuesto que mantener un pH ligeramente elevado permite aumentar la fuerza protón motriz que beneficiaría la replicación del ADNp (Ongkudon *et al.*, 2011).

5.1.2 Efecto del pH sobre la producción de subproductos metabólicos

La producción de ácidos orgánicos para los cultivos a pH constante se muestra en la **figura 16**, donde se puede apreciar que a pH 8 (**figura 16 B**), la producción de ácidos orgánicos se incrementó en un 117, 147, 583 y 87 %, para acetato, formiato, lactato y succinato, respectivamente. Lo anterior con respecto a los cultivos a pH 7.2. Las concentraciones máximas de ácidos orgánicos se presentan en la **tabla 10**.

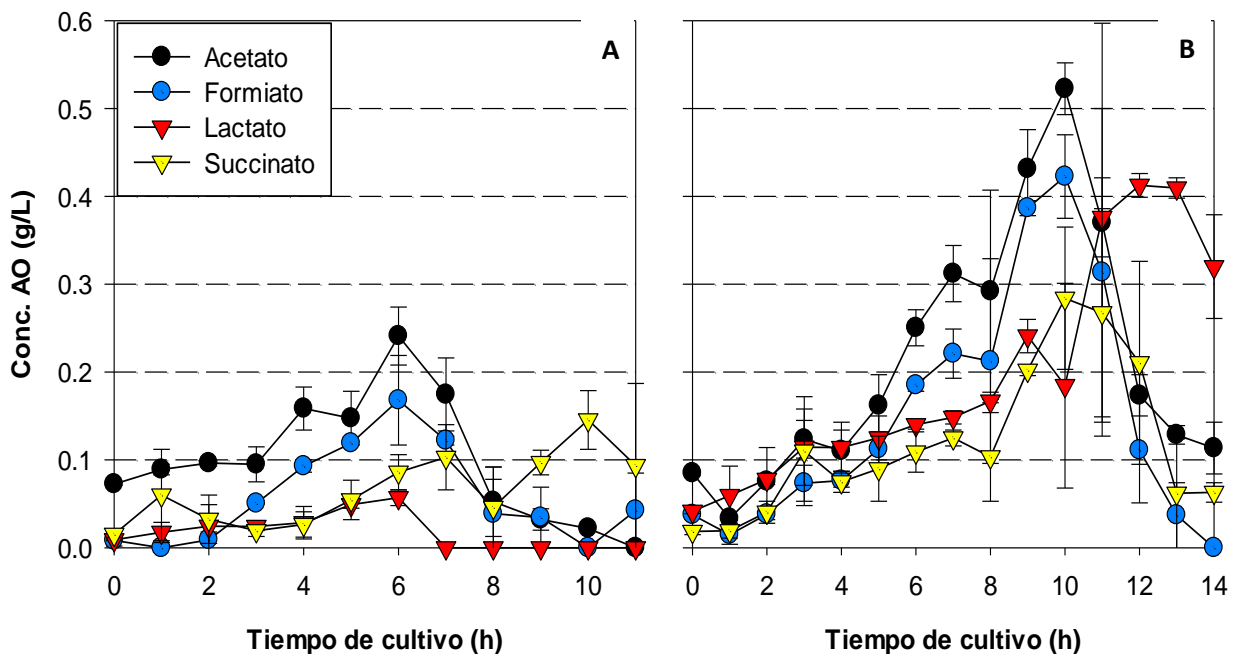


Figura 16. Cinéticas de producción de ácidos orgánicos. **A:** cultivo a pH 7.2 y **B:** cultivo a pH 8.0. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

El rendimiento de ácido orgánico en biomasa resultó ser superior bajo las condición de pH 8.0 (**figura 17 A**) al igual que la velocidad específica de acumulación de estos metabolitos. Sin embargo, es posible apreciar que la velocidad específica de acumulación para acetato y formiato fueron muy similares, mientras que para lactato y succinato, resultó ser mucho mayor a pH 8.0 (**figura 17 B**).

Tabla 10. Concentración máxima de ácidos orgánicos en cultivos a pH constante.

Parámetro	pH 7.2	pH 8.0
Acetato _{max} (g/L)	0.24±0.02	0.52±0.02
Formiato _{max} (g/L)	0.17±0.04	0.42±0.03
Lactato _{max} (g/L)	0.06±0.01	0.41±0.01
Succinato _{max} (g/L)	0.15±0.02	0.28±0.06

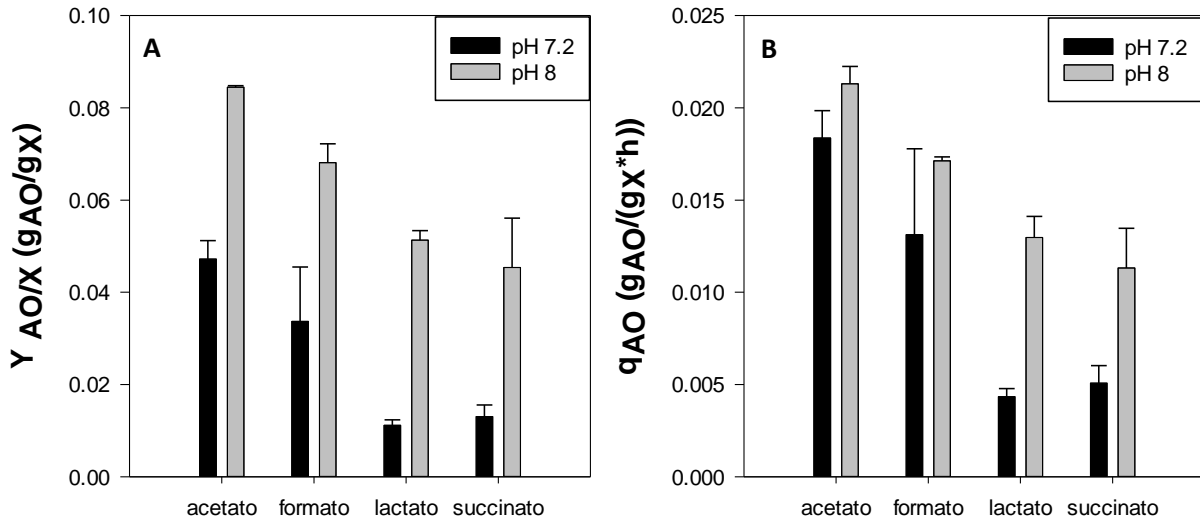


Figura 17. Producción de ácidos orgánicos. **A:** rendimiento específico de ácido orgánico con respecto a biomasa y **B:** velocidad específica de producción de ácidos orgánicos. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

El aumento en el sobreflujo metabólico a pH 8 concuerda con el hecho, aceptado de forma general, de que a pH alcalino se favorece la producción de ácidos orgánicos (Amanullah *et al.*, 2001). Es importante destacar que el lactato y el succinato parecieran estar mayormente ligados al estrés por pH, ya que tanto su producción específica (164 % y 246 % para lactato y succinato, respectivamente), como la velocidad de acumulación (225 % y 120 %, para lactato y succinato, respectivamente) fue mayor que a pH 7.2 y en mayor medida que acetato y formato.

Como se menciona en el apartado de antecedentes, el catabolismo de aminoácidos es una de las respuestas presentes en *E. coli* al estrés por pH. El resultado de dichas reacciones puede desembocar en la producción de ácidos orgánicos, ya que un producto que tienen en común la enzima TnaA y CysK, es piruvato, que puede ser procesado a acetato, mediante PTA y la ACK

(fosfotranscetilasa y acetato cinasa, respectivamente). El piruvato también puede ser convertido en formiato y lactato mediante la PFL (piruvato formiato liasa) y la LDH (lactato deshidrogenasa), respectivamente. Por último, la síntesis de succinato es a partir de oxaloacetato, el cual, mediante una serie de reacciones que terminan en la reducción de fumarato por el complejo enzimático fumarato reductasa, produce succinato.

Tanto la producción de succinato como de formiato se asocian a un metabolismo anaerobio (Wolf, 2005). Sin embargo, para formiato se ha reportado un nivel basal de expresión en *E. coli* en condiciones aerobias (Pecher *et al.*, 1982), por lo que la producción de formiato puede deberse a un aumento en la actividad de la PFL presente. En cuanto a succinato, existen vías alternas a la vía de fermentación ácido-mixta para su síntesis, una de ellas es mediante la degradación de arginina por la arginina succiniltransferasa o AST (Barbara *et al.*, 1998; Cunin *et al.*, 1986). Esta es una de las vías que comprende el catabolismo de aminoácidos, que es activada debido al estrés por pH (Stancik *et al.*, 2002). Sin embargo, como más adelante se mostrará, no hay un aumento en los niveles relativos de transcripción de *astD* a través del tiempo. De hecho son menores que en el cultivo control a pH 7.2, por lo que el aumento en la concentración de succinato podría ser análoga al caso de la PFL, donde existe un nivel basal de expresión que podría desembocar en la activación de la enzima ya presente. La enzima responsable de la producción de lactato en *E. coli* es la lactato deshidrogenasa (LDH). Esta enzima se encuentra presente tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Mat-Jan *et al.*, 1989). Se ha reportado que para la producción de lactato bajo condiciones aerobias, se requiere de la acidificación del medio; sin embargo, en el presente estudio se observó un incremento en la producción de este metabolito, bajo condiciones que suponen un estrés alcalino. El importante incremento en la producción de lactato puede deberse a una respuesta por parte de la célula por mantener la relación NADH/NAD⁺, ya que, durante el estrés alcalino, la NADH deshidrogenasa I y II (*ndh* y *nuo*, respectivamente) disminuyen sus niveles de transcripción, lo cual podría indicar una disminución en la expresión de estas enzimas. Dicha disminución, puede ser una medida por parte de la célula para evitar la salida de protones (Maurer *et al.*, 2005). Debido a lo anterior, se puede esperar un aumento en la relación NADH/NAD⁺ y por lo tanto una disminución en el poder oxidativo de la célula. Durante la síntesis de lactato, el NADH proporciona poder reductor, generando NAD⁺+H⁺, que podría estar contribuyendo al balance de la proporción NADH/NAD.

5.1.3 Efecto de cultivos a pH 8 sobre las respuestas transcripcionales de genes de interés

Con el propósito de evaluar la presencia de estrés por pH alcalino en células de *E. coli* se analizó la transcripción de 10 genes, mediante qRT-PCR, y se compararon contra un control endógeno, *idnT*. Los genes estudiados se pueden incluir en 3 grupos, de acuerdo a su función: transportadores (*cyoA* y *nhaA*), catabolismo de aminoácidos (*astD*, *cysK*, *gadA* y *tnaA*) y reguladores transcripcionales (*torR*, *rpoS*, *nrdR* y *purR*). En la **figura 18** se muestran los niveles relativos de expresión de cada uno de los grupos mencionados en distintas fases del cultivo: exponencial temprana (Exp. I, 2 h de cultivo), exponencial media (Exp. II, 5 h de cultivo), exponencial tardía (Exp. III, 8 h de cultivo) y estacionaria (Est., 11 h de cultivo). Dentro de los reguladores transcripcionales, *rpoS* es un regulador maestro en la respuesta a estrés no solo por pH sino también por temperatura, osmolaridad, estrés oxidativo y escasez de nutrientes (Battesti *et al.*, 2011). *torR* es un regulador positivo de *tnaA*, bajo condiciones alcalinas (Simon *et al.*, 1994; Jourlin *et al.*, 1996). *nrdR* es un regulador negativo de la expresión de diferentes operones que codifican para ribonucleotido reductasas, en función de la abundancia de desoxiribunucleotidos trifosfatos (Mckethan *et al.*, 2013; Rodionov *et al.*, 2005). Por último, *purR* está involucrado en el control de distintos genes que intervienen en la síntesis de nucleótidos de purina (He *et al.*, 1990; Meng *et al.*, 1990; Rolfes *et al.*, 1990).

A pH 8.0, el antiportador *nhaA* (**figura 18 A**) mostró un incremento en su nivel relativo de expresión desde la fase exponencial temprana del cultivo y fue incrementando a lo largo del cultivo, de tal forma que, en la fase estacionaria, aumentó 4.5 veces con respecto a pH 7.2. Como se sabe, este antiportador es uno de los elementos más importantes en la respuesta a estrés por pH alcalino en *E. coli*, ya que permite el ingreso de iones hidronio, con lo que se logra mantener el pH intracelular, durante el estrés alcalino. Además se sabe, que exhibe una gran dependencia con el pH, aumentando su actividad en tres órdenes de magnitud entre un pH externo de 6.5 y uno de 8.5 (Taglicht *et al.*, 1991). También se ha observado que al mutar *nhaA*, las células de *E. coli* son incapaces de crecer en pH alcalino (Padan *et al.*, 1989; Padan 2008). Otra característica importante de este antiportador es que se ha propuesto como un sensor del pH extracelular (Padan 2008).

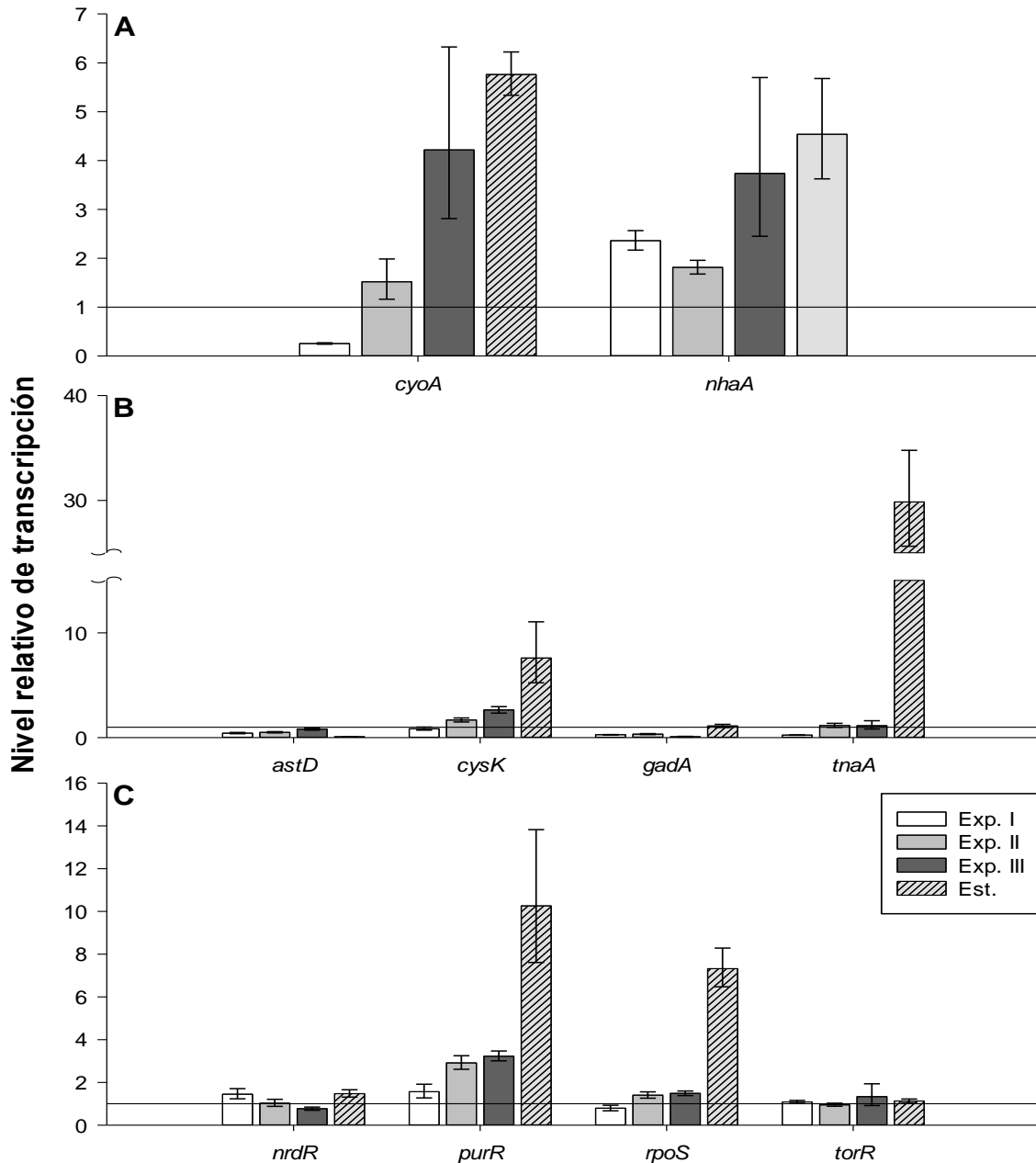


Figura 18: Niveles de transcripción de genes de interés de *E. coli* a pH 8 en diferentes fases del cultivo. **A:** Transportadores, **B:** Catabolismo de aminoácidos, **C:** Reguladores transcripcionales. Exp. I (exponencial temprana, 2 h de cultivo), Exp. II (exponencial media, 5 h de cultivo), Exp. III (exponencial tardía, 8 h de cultivo), Est. (estacionaria, 11 h de cultivo). Los niveles de transcripción de cada gen se normalizaron contra el gen calibrador, *idnT*, y se compararon con cultivos de referencia a pH 7.2. Las barras de error estandar representan la diferencia experimental entre dos réplicas independientes (en cada réplica se realizaron 3 determinaciones por gen).

Los niveles de expresión del citocromo *bo*, denotados por *cyoA* (**figura 18 A**), al inicio del cultivo se encuentran disminuidos y, a medida que avanza el cultivo, se incrementa su expresión 5.8 veces más que el control a pH 7.2 en la fase estacionaria. Algo similar observaron Cotter y colaboradores (1990) al incrementar el pH extracelular de 6.0 a 7.5, donde el citocromo *bo* incrementó 4 veces su expresión. Al incrementarse la expresión de esta cadena de transporte de electrones, se permite una mayor acidificación que favorece el crecimiento celular a pH alcalino, contrario a lo que sucede a pH ácido, donde la acidificación debe ser minimizada y el citocromo *bd*, que tiene una menor afinidad por oxígeno, incrementa su 2 veces su expresión, al cambiar el pH de 6.5 a 5.5 (Cotter *et al.*, 1990).

En cuanto a los genes relacionados al catabolismo de aminoácidos (**figura 18 B**), podemos observar que *tnaA* es el que mostró el mayor incremento en su expresión (29 veces), en la fase estacionaria del cultivo. Es sabido que *tnaA* juega un papel muy importante durante el estrés por pH, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, generando metabolitos ácidos, mediante la desaminación de distintos aminoácidos como triptófano, serina y cisteína (Stanik *et al.*, 2002; Yohannes *et al.*, 2004), con lo que contribuye a mantener un pH intracelular dentro de valores fisiológicos. Es importante destacar que *tnaA* es un gen inducido por *rpoS* (Lacour y Landini 2004), por lo que el incremento en los niveles relativos de transcripción fue hasta la fase estacionaria. Por otro lado, *cysK* mostró un aumento en sus niveles de transcripción a partir de las 5 h de cultivo y hasta alcanzar en la fase estacionaria un valor 7.6 veces mayor que a pH 7.2. La enzima codificada por el gen *cysK* remueve el grupo sulfidrilo de la cisteína, para producir serina, que después puede ser desaminada a piruvato, contribuyendo a la síntesis de metabolitos ácidos y a mantener valores de pH fisiológicos durante el estrés por pH alcalino (Stanik *et al.*, 2002). Los niveles de transcripción de *astD* se mantuvieron disminuidos durante todo el cultivo. Esto difiere de lo reportado por Stanik y colaboradores en el 2002, quienes observaron un incremento en la expresión de esta enzima a partir de pH 8. Por último, *gadA* muestra de igual forma una disminución en su expresión a pH 8, en comparación con los cultivos a pH 7.2, lo cual concuerda con lo observado con Stanik y colaboradores en el 2002, quienes observaron un incremento en la expresión de esta enzima a pH 9.0, pero en condiciones de anerobiosis.

Con respecto a los reguladores transcripcionales (**figura 18 C**), se observó que el regulador transcripcional *torR* no incrementó sus niveles de expresión en ninguna fase del cultivo. Este regulador forma parte del sistema de fosoforelevo TorR/TorS que se ha propuesto participa durante el estrés por pH alcalino a través de la inducción de *tnaA* (Bordi *et al.*, 2003). El hecho de que los niveles de transcripción de *torR* no se incrementaran es congruente con la aerobividad de los cultivos, ya que este sistema detecta TMAO, que es un aceptor de electrones durante la respiración anaerobia. El regulador transcripcional *rpoS* mostró un decremento en su expresión a las 2 h de cultivo, en comparación con los cultivos a pH 7.2. A medida que avanzó el cultivo se incrementó su nivel de transcripción, hasta alcanzar 7.3 veces más que a pH 7.2. Esto confirma la presencia de estrés en las células y su incremento en la fase estacionaria concuerda con lo reportado antes para este regulador transcripcional, ya que se asocia a la limitación de sustratos que se da en la fase estacionaria (Lange y Hengge, 1994; Merrikkh *et al.*, 2009) y distintas situaciones de estrés, incluyendo el estrés por pH (Berson *et al.*, 1996; Waterman y Small, 1996; Nair y Finkel, 2004). *nrdR* y *purR* son reguladores negativos de enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos. Podemos observar que, para *nrdR*, los niveles de expresión al inicio del cultivo están ligeramente elevados. Posteriormente disminuyen y nuevamente en la fase estacionaria del cultivo se incrementan ligeramente (1.5 veces), mientras que *purR* está incrementado desde las 2 h del cultivo y a medida que avanza, también lo hacen los niveles de expresión de *purR*, hasta alcanzar un incremento de 10.3 veces mayor que a pH 7.2, en la fase estacionaria. Estos resultados sugieren una disminución en la síntesis de nucleótidos a pH 8.0, que se ve regulada a la baja desde la fase exponencial media y hasta la fase estacionaria.

5.2 Simulación de gradientes utilizando la metodología de escalamiento descendente

Para la simulación de gradientes se utilizaron flujos de recirculación de 1.04, 1.38, 2.08 y 4.16 mL/s entre STR 1 (5 L) y STR 2 (0.25 L), para asegurar tiempos de residencia en STR 2 de 60, 120, 180 y 240 s, respectivamente. De esta forma, la frecuencia en que las células entran a la zona de adición de álcali (STR 2), fue de un mínimo de $2.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a un máximo de $8.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, con lo que se respeta el parámetro de diseño de frecuencia máxima ($1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

La configuración del sistema de escalamiento descendente permitió simular gradientes de pH en función del tiempo de residencia en STR 2, que, a medida que aumentaba, también lo hacía el pH en este compartimento. En la **figura 19** se puede observar la diferencia de pH entre los dos compartimentos a lo largo del cultivo. STR 1 se mantuvo a un pH de 7.2 ± 0.2 y STR 2, dependiendo del flujo de recirculación, el pH alcanzó valores de hasta 9.4 unidades (en flujos de recirculación de 1.04 mL/s) (**figura 19 D**). Se observó además que en éste flujo de recirculación de 1.04 mL/s, el pH en STR 2 presentó un comportamiento oscilatorio, que no se observó en las otras condiciones experimentales. Esto fue debido a que al ser el tiempo de recirculación más bajo que se ensayó, presentó una mayor acumulación de álcali en STR 2 y una menor transferencia de éste álcali a STR 1. De tal forma, que para cuando se satisfacía la demanda de álcali necesaria para neutralizar los metabolitos ácidos en STR 1, se apagaba el control de pH, bloqueando la bomba que alimentaba álcali en STR 2. Sin embargo, para entonces la acumulación de álcali en STR 2 era suficiente para satisfacer la demanda de álcali en STR 1 durante unos minutos más, provocando así un comportamiento oscilatorio en la variable de pH en STR 2. La presencia de las perturbaciones de pH simuladas tuvieron efecto en diferentes aspectos del cultivo, como son el crecimiento celular, la producción de ADNp, la presencia de subproductos metabólicos y la expresión de algunos genes relacionados a estrés. En **tabla 11** se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales y en la **figura 20** se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos a un tiempo de residencia de 60 s. Al igual que en los experimentos control, podemos observar que al final de la fase exponencial se pierde el control de pH (**figura 19**) en ambos compartimentos (STR 1 y STR 2). Como se discutió anteriormente, esto se debe al retraso del controlador en la transición de la fase exponencial a la estacionaria, donde se da una acumulación de álcali, que eleva el pH al final de la fase exponencial. Además la utilización de aminoácidos como fuente de carbono, contribuye al incremento del pH, en la fase estacionaria. En lo que respecta a la TOD (**figura 20 C y D**), podemos observar que en STR 2 el control se pierde al inicio y al final del cultivo. Este comportamiento se debe a que la agitación en STR 2 se mantuvo constante durante todo el cultivo, lo que permitió que la TOD sobrepasara las necesidades del cultivo en la fase exponencial temprana y en la fase estacionaria. Mientras que STR 1 siguió el mismo comportamiento observado en los cultivos a pH constante, donde solo se

perdió el control de la TOD al final del cultivo. Los gráficos correspondientes a las distintas condiciones experimentales se pueden consultar en el **apéndice A 2**.

Tabla 11. Resultados obtenidos en las diferentes condiciones experimentales

Experimento	V _{STR1} (L)	V _{STR2} (L)	Q _R (mL/s)	Frecuencia, F, (s ⁻¹)	Tiempo de residencia, t _R , (s)	Biomasa máxima (g/L)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g _x /g _{ADNP})	ADNP _{max} (mg/L)	Y _{P/X} (g _{ADNP} /g _X)	CSE (%)
*1	0.7	-	-	-	-	11.13 ± 0.27	0.39 ± 0.00	0.43 ± 0.02	28.9 ± 0.6	2.28±0.15	83 ± 2.
**2	0.7	-	-	-	-	8.04 ± 0.06	0.25 ± 0.01	0.37 ± 0.01	31.9 ± 0.6	2.72±0.17	80 ± 1
3	5	0.25	4.16	0.00083	60	11.91 ± 0.12	0.38 ± 0.01	0.52 ± 0.02	30.0 ± 1.0	2.41±0.09	84 ± 2
4	5	0.25	2.08	0.00042	120	11.51 ± 0.01	0.39 ± 0.00	0.43 ± 0.02	25.5 ± 2.2	2.15±0.24	81 ± 2
5	5	0.25	1.36	0.00027	180	11.68 ± 0.22	0.39 ± 0.02	0.49 ± 0.01	25.3 ± 1.6	2.06±0.10	88 ± 2
6	5	0.25	1.04	0.00021	240	10.89 ± 0.22	0.35 ± 0.00	0.45 ± 0.01	17.6 ± 0.5	1.87±0.07	85 ± 2

* Experimento control a pH 7.2.

**Experimento control a pH 8.0.

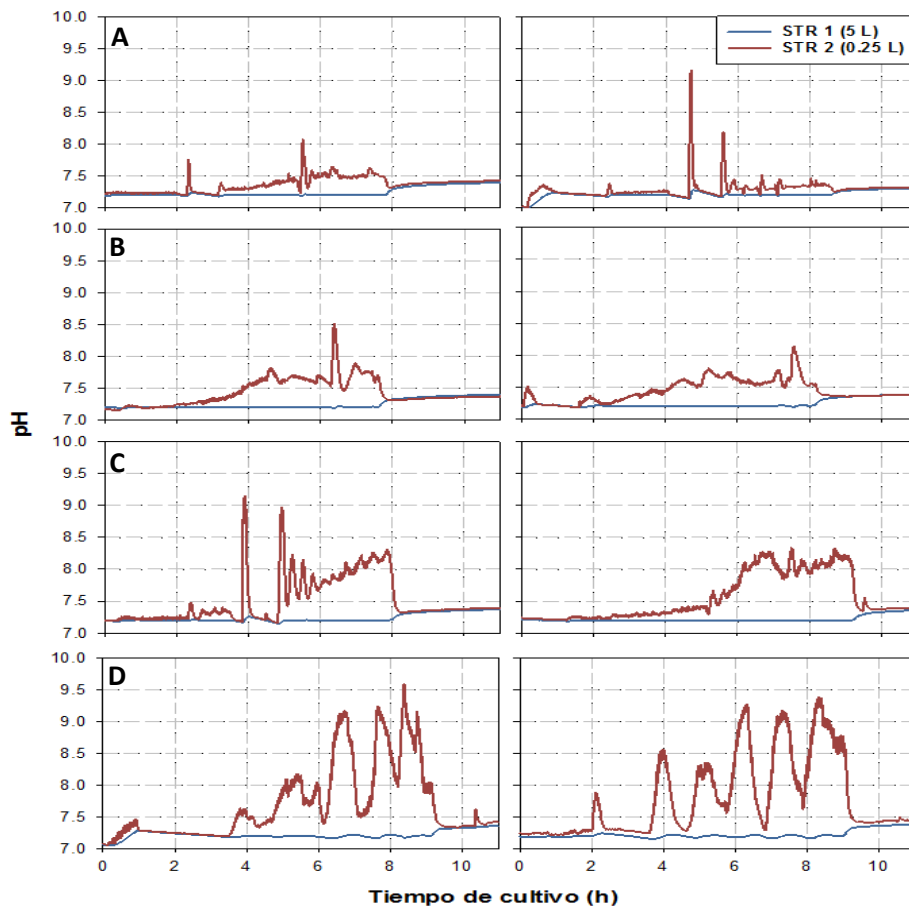


Figura 19. Diferencia de pH entre los dos compartimentos del sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR 2. **A:** $t_R= 60$ s ($Q_R= 4.16$ mL/s), **B:** $t_R= 120$ s ($Q_R= 2.08$ mL/s), **C:** $t_R=180$ s ($Q_R= 1.38$ mL/s), **D:** $t_R= 240$ s ($Q_R= 1.04$ mL/s).

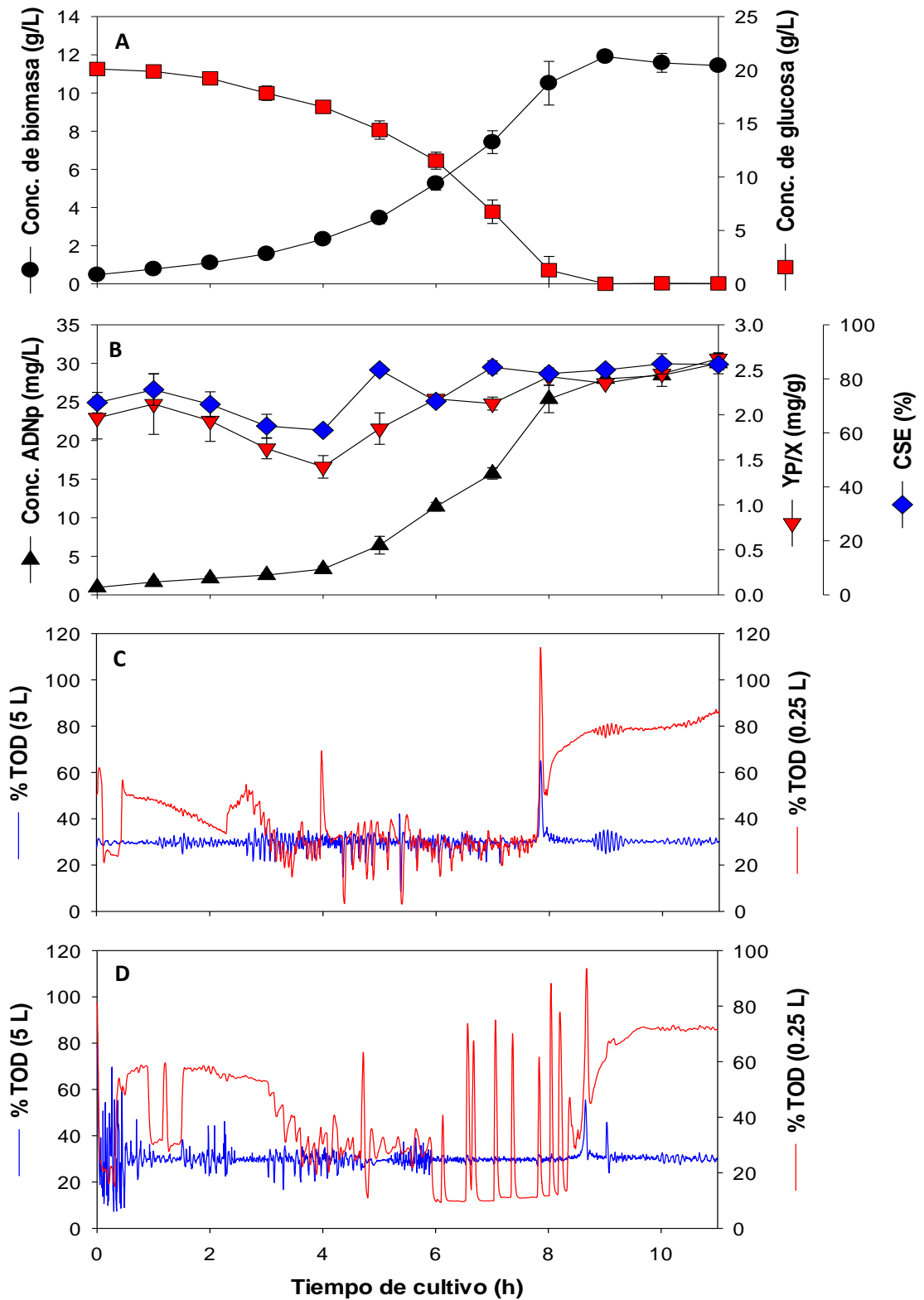


Figura 20. Cinética con simulación de gradientes de pH con un tiempo de residencia en STR2 de 60 s ($Q_R=4.16\text{mL/s}$). **A:** Curva de crecimiento y consumo de glucosa. **B:** Producción de ADNp. **C y D:** Control de TOD (STR 1 y STR 2) de las replicas experimentales. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

5.2.1 Efecto de los gradientes de pH sobre la cinética del cultivo y la producción de ADNp

En general para todas las condiciones experimentales probadas en el SED, se observó un agotamiento de la fuente de carbono entre las 8 y 9 h del cultivo. Donde la biomasa alcanzada fue de 11.91 ± 0.12 , 11.51 ± 0.01 , 11.68 ± 0.22 y 10.89 ± 0.22 g/L para un t_R de 1, 2, 3 y 4 min, respectivamente. Si bien parece no haber diferencia entre las primeras tres condiciones experimentales, a un tiempo de residencia en STR 2 de 4 min, se observó un pequeño decremento en la biomasa máxima (9 %) y la velocidad de crecimiento (8 %) con respecto a un t_R de 60 s. En el 2003, Onyeaka y colaboradores utilizaron un sistema de escalamiento descendente que consistía de un STR y un PFR recirculados entre sí, con el que lograron simular gradientes de TOD, sustrato y pH, utilizando como modelo biológico una cepa de *E. coli*. Dentro de los resultados reportados por estos investigadores, se observó una caída en la viabilidad celular de 99 a 94 % y de igual forma se vio disminuida la concentración de biomasa máxima alcanzada (de 37 a 16 g/L) cuando se incrementó el tiempo de residencia en el PFR de 50 a 110 s. Sin embargo, tales efectos fueron atribuidos a la presencia de gradientes de TOD, sustrato y pH simultáneos, ya que no se evaluaron por separado. Amanullah y colaboradores en el 2000, al implementar un sistema de escalamiento descendente para la simulación de gradientes de pH, utilizando como modelo biológico una cepa de *Bacillus subtilis* y la producción de acetoina y butanodiol, no observaron efecto alguno en el crecimiento celular. Sin embargo, al utilizar otros modelos biológicos como células eucariotas se ha observado no solo una caída en la viabilidad celular (Miller *et al.*, 1988; Osman *et al.*, 2002) si no también eventos de lisis celular (Ozturk 1996).

En lo que respecta a la producción de ADNp (**figura 21**), se puede observar que, a medida que se incrementa el tiempo de residencia en el reactor pequeño, y por lo tanto la magnitud de los gradientes simulados, hay una disminución en el rendimiento volumétrico y específico de ADNp (**figura 21 B**). Sin embargo, la productividad específica solo ve afectada en un t_R de 240 s (**figura 21 A**). En un t_R de 60 s en STR 2, no se observó diferencia en la producción de ADNp, en comparación con los cultivos a pH constante (pH 7.2). Sin embargo, a partir de 120 s de T_r en STR 2, la concentración máxima de ADNp disminuyó alrededor del 12 %, con respecto a cultivos a un pH constante de 7.2. El mayor efecto en la producción de ADNp, se observó en un tiempo de residencia de 240 s, donde hay una disminución del 39 % en la concentración máxima de ADNp,

que representa en un decremento en el rendimiento producto en biomasa del 18 %, con respecto a cultivos a un pH constante de 7.2. En lo que respecta a la topología del ADNp, la isoforma súper enrollada no mostró diferencia en las distintas condiciones experimentales evaluadas, manteniéndose siempre alrededor del 80 % (**figura 21 A**).

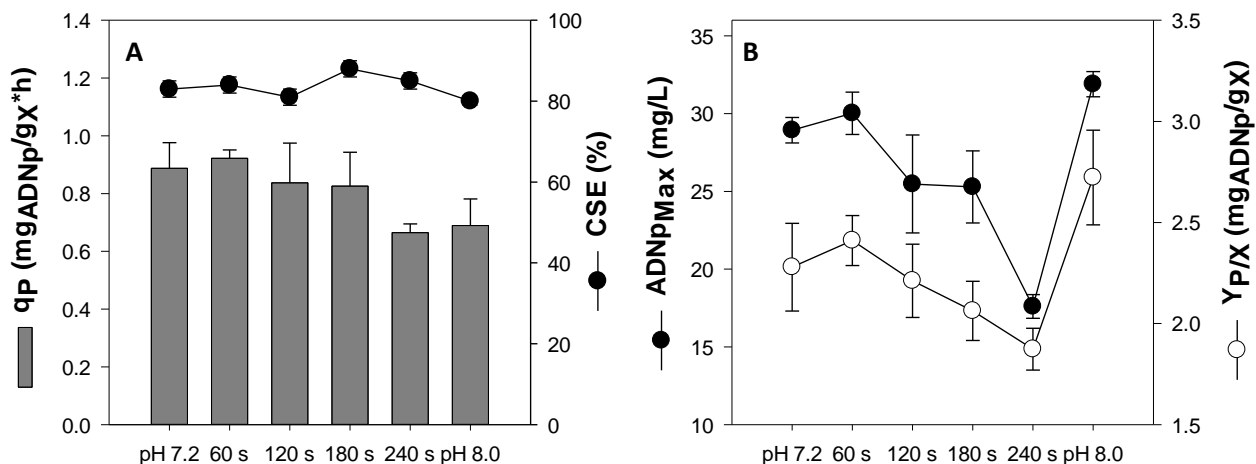


Figura 21. Producción de ADNp a distintos tiempo de residencia en STR2. **A:** productividad específica, **B:** rendimiento volumétrico y específico. Las barras de error estandar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

Anteriormente se ha discutido cómo una baja velocidad de crecimiento parece favorecer la producción de ADNp (O’Kennedy *et al.*, 2003; Bhole and Ross, 2011; Bentley *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 1991; Wunderlich *et al.*, 2014). También se discutió sobre los estudios existentes, en donde se muestra que desviaciones del pH óptimo de crecimiento, hacia valores alcalinos, puede incrementar no sólo en el número de copias de ADNp (Reinikainen *et al.*, 1989; Reinikainen *et al.*, 1988), sino también, en el rendimiento volumétrico y específico de ADNp (Ongkundon *et al.*, 2011), en *E. coli*. A la misma conclusión se llegó con los resultados obtenidos en cultivos a pH constante. Sin embargo, no era posible discernir si el efecto observado se debía a la disminución en la velocidad de crecimiento, al pH alcalino del medio o una posible interacción entre ambos factores. Durante los cultivos utilizando el SED, fue posible exponer a las células a condiciones oscilatorias de pH, sin comprometer su velocidad de crecimiento de forma importante (solo se observó una disminución del 10 % a un t_R de 240 s en STR 2 en comparación con cultivos a pH 7.2), lo que llevó a una disminución en la producción de ADNp. Lo anterior nos permite sugerir que el aumento en la producción de ADNp observada a pH 8.0 es debido a un decremento en la

velocidad de crecimiento, más que un incremento en la fuerza motriz como lo propone Ongkudon y colaboradores (2011). Como ya se mencionó, otros estudios han mostrado resultados contradictorios, ya que han observado que la producción de ADNp se incrementa al aumentar la velocidad de crecimiento (Seo and Bailey, 1985; Seo and Bailey, 1986; Zabriskie and Arcuri, 1986; Reinikainen and Virkajärvi, 1989). Por ello, el comportamiento anterior parece depender del tipo de plásmido que se utiliza; sin embargo, es necesario indagar más sobre la relación entre la velocidad de crecimiento y la producción de ADNp, para comprender cómo es que estas dos variables interactúan entre sí.

Una posible explicación de los resultados obtenidos en los cultivos realizados con el SED, es que el pH, por sí sólo, podría estar afectando la estabilidad del plásmido, ya que como lo ha reportado Schuldiner y colaboradores (1986), un cambio de pH hacia valores alcalinos, detona respuestas del tipo SOS en *E. coli*. Podría ser que el pH actué en la apertura del origen de replicación, en la biosíntesis de proteínas o en la actividad de enzimas involucradas en la replicación del DNA, tal y como lo proponen tales autores. Además, es sabido que el pH alcalino promueve la síntesis de proteínas de choque térmico, algunas de ellas chaperonas que asisten al plegamiento de proteínas como DnaK, DnaJ y GroEL (Maurer *et al.*, 2005), lo cual indica que algunas proteínas podrían estar siendo desestabilizadas. Es posible que durante la exposición a condiciones fluctuantes de pH, no se alcance la inducción necesaria para la expresión de estas proteínas, que podrían estar asistiendo a la maquinaria de replicación, resultando en un déficit en la producción de ADNp. Por otro lado, podría ser que se vean comprometidos algunos precursores de la síntesis de nucleótidos o incluso que una fracción importante de la fuente de carbono se dedique a gastos energéticos, debido al estrés por pH, disminuyendo el rendimiento para la producción de ADNp.

5.2.2 Efecto de los gradientes de pH en la producción de subproductos metabólicos

Las condiciones fluctuantes de pH simuladas con el SED favorecieron la acumulación de ácidos orgánicos, tal y como se muestra en la **figura 22**, donde se puede apreciar que el acetato alcanza una concentración máxima cercana a 0.8 g/L a un t_R de 120 s y prácticamente se mantiene sin cambios a tiempos de residencia entre 120 y 240 s. Formiato y lactato alcanzaron una concentración máxima de 1.0 ± 0.1 y 0.6 ± 0.2 g/L, respectivamente, lo anterior a tiempos de

residencia de 180 s. Al incrementar el T_r a 240 s, disminuye su concentración, pero se mantiene por arriba de las concentraciones máximas alcanzadas a tiempos de residencia de 60 y 120 s. Por último, la concentración de succinato mostró un concentración máxima de 0.7 ± 0.2 g/L a un t_R de 240 s en STR 2, mientras que a tiempos de residencia de 60, 120 y 180 s, se alcanzaron concentraciones cercanas a las observadas en los cultivos control a pH 8.0 (0.3 ± 0.1).

EL mayor rendimiento de ácido orgánico en biomasa para acetato, formiato y lactato (0.16 ± 0.02 , 0.16 ± 0.03 y 0.14 ± 0.05 g/g, respectivamente) ocurrió para la condición de 180 s de t_R , mientras que el mayor rendimiento específico para succinato, fue a 240 s de T_r (0.06 ± 0.01 g/g). La misma tendencia se observó para la velocidad de acumulación de estos metabolitos. En la **figura 23** se muestran tanto el rendimiento específico (panel A), como la velocidad de acumulación (panel B) de ácidos orgánicos.

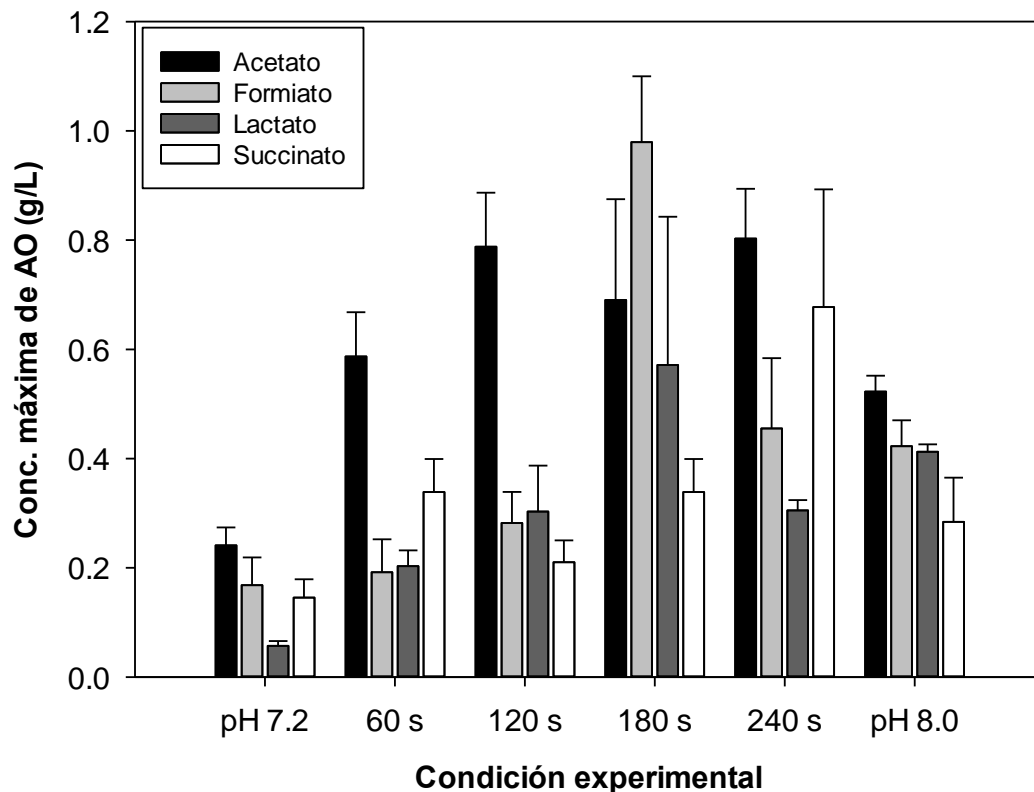


Figura 22. Concentración máxima de ácidos orgánicos en distintas condiciones experimentales. Las condiciones experimentales expresadas en segundos hacen referencia al tiempo de residencia en STR 2. Las barras de error estándar representan la diferencia experimental entre dos réplicas independientes.

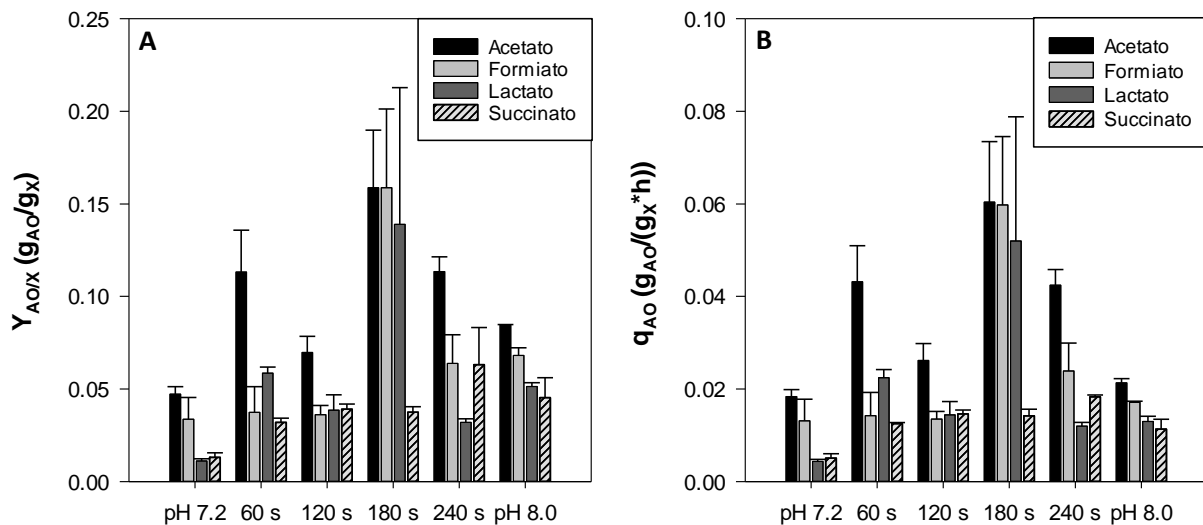


Figura 23. Producción de ácidos orgánicos en distintas condiciones experimentales. **A:** rendimiento específico, **B:** velocidad específica de acumulación de ácidos orgánicos. Las condiciones experimentales expresadas en segundos hacen referencia al tiempo de residencia en STR 2. Las barras de error estándar representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

Si bien la presencia de gradientes parece no tener un efecto tan importante en el crecimiento celular, en la producción de subproductos metabólicos, como son los ácidos orgánicos, tiene un efecto relevante. Al comparar los resultados bajo las distintas condiciones evaluadas en el SED, con cultivos a pH constante, se observó que incluso en un t_R en STR 2 de 60 s, las concentraciones de ácidos orgánicos superan las observadas en el control a pH 7.2 (excepto formiato). En algunos casos, incluso se superan las concentraciones alcanzadas a pH 8.0, como es el caso de acetato, que en todas las condiciones experimentales evaluadas en el SED, la concentración fue mayor (0.6 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 , 0.7 ± 0.1 , 0.8 ± 0.1 g/L a 60, 120, 180 y 240 s, respectivamente) que a pH 8.0 (0.5 ± 0.0 g/L). Por su parte formiato y lactato sólo a 180 s de t_R en STR 2 (1.0 ± 0.1 y 0.6 ± 0.2 g/L, respectivamente) alcanzaron una concentración mayor que a pH 8.0 (0.4 ± 0.0 y 0.4 ± 0.0 g/L, respectivamente). Por último, la concentración de succinato solo fue mayor que a pH 8.0 (0.3 ± 0.1 g/L) a un t_R de 240 s en STR 2 (0.7 ± 0.2 g/L). Algo similar observaron Amanullah y colaboradores en el 2001, en donde incluso en tiempos de residencia de 30 s (en la zona de adición de álcali), la concentración de acetato se incrementó con respecto al control (de 0.00 g/L

a 0.02 g/L) y a medida que se incrementó el t_R , también lo hizo la producción de acetato, hasta alcanzar una concentración de 0.75 g/L a 240 s de T_r , en la zona de adición de álcali.

Cuando se transformaron las concentraciones máximas alcanzadas de ácidos orgánicos en las distintas condiciones experimentales (evaluadas en el SED), a una expresión de producción específica con respecto a la célula (rendimiento ácido orgánico en biomasa, $Y_{AO/X}$), se observó que la condición de 3 min de tiempo de residencia en STR 2, parece tener un mayor efecto en la producción de estos metabolitos ácidos, por lo menos para acetato, formato y lactato. Lo anterior puede deberse a que durante los experimentos a 240 s de t_R en STR 2, los gradientes alcanzados fueron de más de dos unidades de pH, lo cual corresponde a valores cercanos a pH 9. Durante estas excursiones de pH se observó que la inyección de oxígeno para controlar la TOD en STR 2 cesaba (datos no mostrados), de lo cual se infiere que las células estaban disminuyendo su respiración, como efecto de la presencia de valores elevados de pH. Pudiera ser que durante la exposición oscilatoria a valores altos de pH (pH 9), la célula este dirigiendo más recursos energéticos hacia la contención de del estrés ocasionado por el pH y esto decremente el sobreflujo metabólico.

En general, se sabe que el fenómeno de sobre flujo metabólico en *E. coli* es detonado por la presencia de distintos tipos de estrés, como lo son la presencia de gradientes de sustrato (Neubauer *et al.*, 1995; Bylund *et al.*, 1999), gradientes en la TOD (Sandoval-Basurto *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2006) gradientes de TOD y sustrato juntos (Xu *et al.*, 1999; Blyund *et al.*, 2000) y el estrés térmico (Caspeta *et al.*, 2009; Jaén *et al.*, 2013). En lo que respecta al estrés por pH, se sabe que *E. coli* es capaz de mantener su pH intracelular entre 7.4 y 7.8, en un intervalo de pH de 5.5 - 9.0 (Slonczewski *et al.*, 1981). La bacteria logra esto gracias a los diferentes mecanismos que le permiten enfrentar dichos valores de pH, que en intervalos alcalinos básicamente buscan mantener el pH fisiológico del citoplasma, ya sea mediante la intrusión de iones hidronio, o a través de la producción de metabolitos ácidos (Padan *et al.*, 2005; Krulwich *et al.*, 2011; Saito y Kobayashi, 2003). En el presente trabajo, la producción de metabolitos ácidos aumentó de forma importante en comparación con el control a pH 7.2 de igual forma en comparación con el control a pH 8.

5.2.3 Efecto de los gradientes de pH en las respuestas transcripcionales de genes de interés

Durante la exposición a condiciones fluctuantes de pH, se observaron cambios en los niveles relativos de transcripción de genes relacionados al estrés por pH. Para facilitar su análisis, se separaron en 3 grupos, los cuales fueron: a) transportadores (*cyoA* y *nhaA*), b) catabolismo de aminoácidos (*astD*, *cysK*, *gadA* y *tnaA*) y c) reguladores transcripcionales (*nrdR*, *purR*, *rpoS* y *torR*). En el **apéndice A 3** se pueden consultar los cambios en los niveles relativos de transcripción.

I. Transportadores

La expresión relativa del gen *cyoA* (**figura 24-A**), en tiempos de residencia de 180 y 240 s en STR 2, aumentó a medida que el cultivo avanzó, alcanzando una máximo de 2.26 y 3.51 veces más que pH 7.2 (en la fase estacionaria), respectivamente. Mientras que, para un t_R de 60 s solo se observó un incremento en la expresión de *cyoA* en la fase estacionaria (1.81 veces mas que a pH 7.2). Por último a un t_R de 120 s al inicio de cultivo, los niveles de transcripción se encontraron regulados a la baja, incrementándose en la fase estacionaria media y tardía a valores cercanos a 1 (sin diferencia con respecto a pH 7.2), y en la fase estacionaria nuevamente se regula a la baja (4.35 veces menos que a pH 7.2). Los niveles relativos de transcripción alcanzados en condiciones fluctuantes de pH, son considerablemente menores que a pH 8, aún cuando a tiempos de residencia de 240 s se alcanzan valores de pH por arriba de 9 unidades en STR 2. Sin embargo, bajo tal situación, la frecuencia de exposición a la zona de adición fue más baja ($2.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

El aumento en los niveles relativos de transcripción de *cyoA*, aún en tiempos de residencia tan cortos como 60 s, exponen la presencia de estrés alcalino en *E. coli*, ya que como lo demuestra Cotter y colaboradores (1990) y los resultados obtenidos en el presente estudio (cultivos a pH 8.0), *cyoA* es uno de los genes cuya expresión se ve incrementada cuando *E. coli* se expone a condiciones alcalinas.

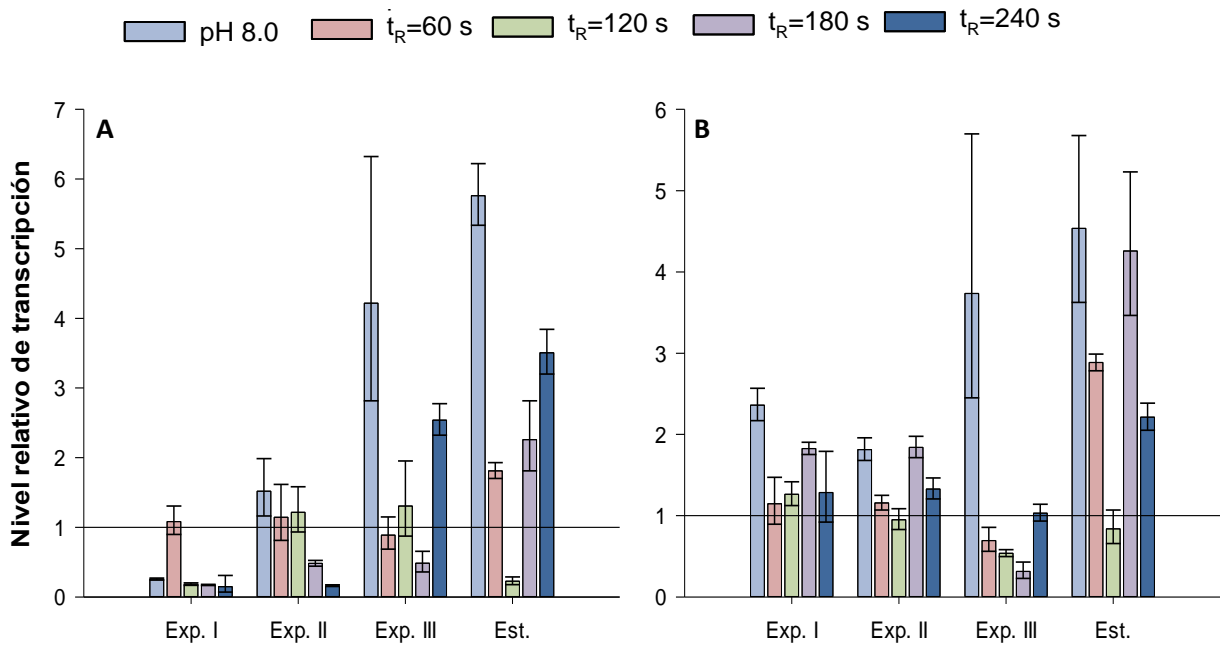


Figura 24. Análisis transcripcional de transportadores en condiciones oscilatorias de pH. **A:** *cyoA*, **B:** *nhaA*. Los niveles de expresión se muestran durante diferentes fases del cultivo: Exp. I (exponencial temprana, 2 h), Exp. II (exponencial media, 5 h), Exp. III (exponencial tardía, 8 h), Est. (estacionaria, 11 h). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a *idnT* y con respecto a cultivos de referencia a pH 7.2. Las barras de error estándar representan la diferencia experimental entre dos réplicas independientes (en cada réplica se realizaron 3 determinaciones por gen).

En cuanto a *nhaA* (**figura 24-B**), que codifica para un antiportador de iones Na^+/H^+ , en la primera fase del cultivo, sólo mostró cambios importantes a tiempos de residencia de 120 y 180 s de 1.26 y 1.83 veces más que a pH 7.2, respectivamente. En la fase exponencial media, sólo a 180 s de t_R se observaron cambios significativos (de 1.84 veces) en comparación con pH 7.2. Durante la fase exponencial tardía, los niveles de transcripción se vieron regulados a la baja para las distintas condiciones experimentales y al igual que a pH 8.0, en la fase estacionaria se incrementó el nivel relativo de transcripción de *nhaA*, para tiempos de residencia de 60, 180 y 240 s (2.88, 4.26 y 2.21, respectivamente). Sin embargo, los cambios en los niveles de transcripción observados, fueron menores que a pH 8.0 y solo a 180 s de t_R , los cambios en los niveles de transcripción, en la fase estacionaria, fueron similares (4.26 a un t_R de 180 s, contra 4.54 a pH 8).

II. Catabolismo de aminoácidos.

En la **figura 25** se muestran los gráficos de transcripción relativa, correspondientes a las enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos. A continuación se detallan los cambios observados en las diferentes condiciones experimentales.

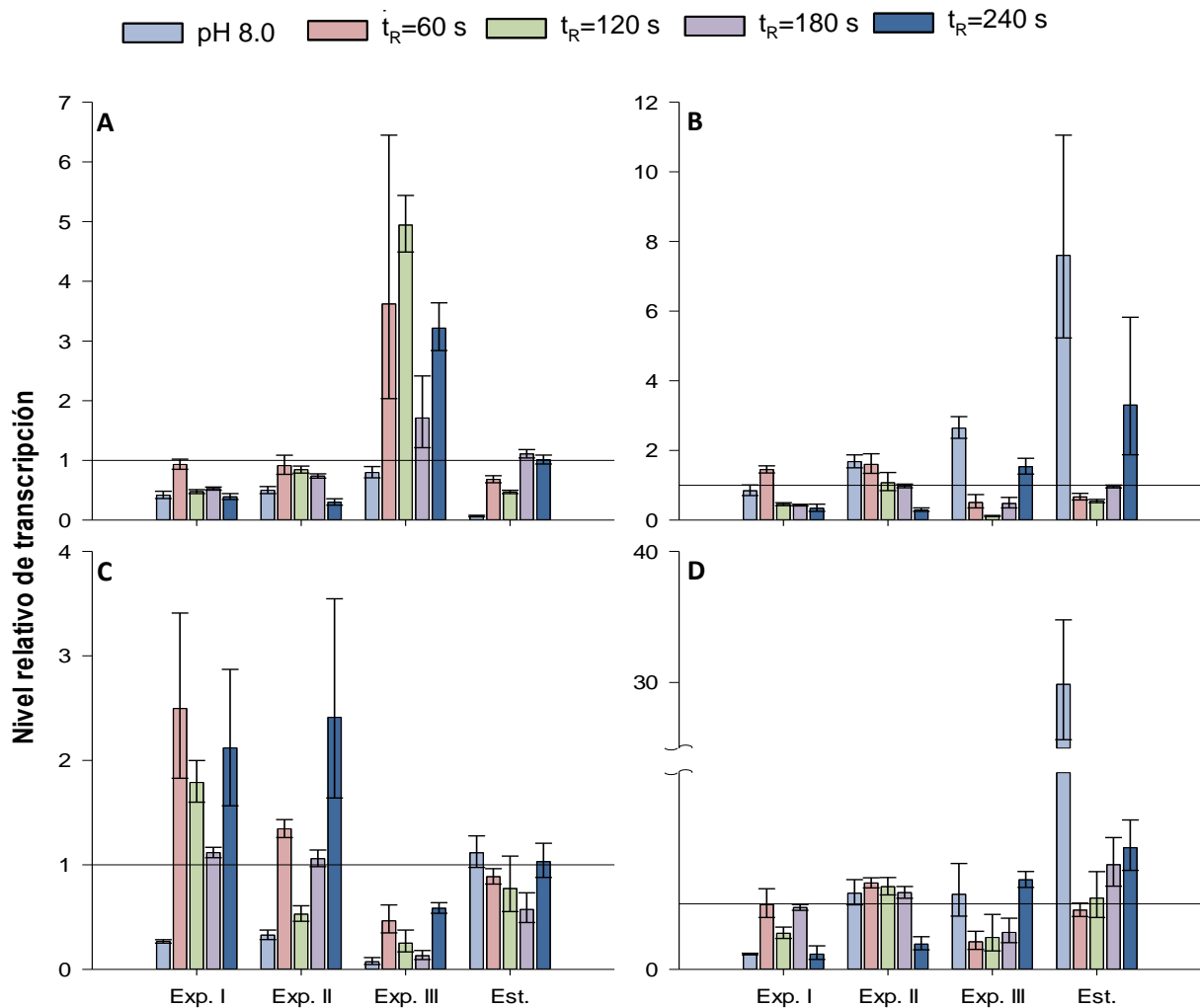


Figura 25. Análisis transcripcional de genes del catabolismo de aminoácidos de *E. coli* expuesta a condiciones fluctuantes de pH. **A:** *astD*, **B:** *cysK*, **C:** *gadA*, **D:** *tnaA*. Los niveles de expresión se muestran durante diferentes fases del cultivo: Exp. I (exponencial temprana, 2 h), Exp. II (exponencial media, 5 h), Exp. III (exponencial tardía, 8 h), Est. (estacionaria, 11 h). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a *idnT* y con respecto a cultivos de referencia a pH 7.2. Las barras de error estándar representan la diferencia experimental entre dos réplicas independientes (en cada réplica se realizaron 3 determinaciones por gen).

A diferencia de los cultivos a pH 8.0, podemos observar que, en condiciones fluctuantes de pH, *astD* (**figura 25 A**) incrementó sus niveles relativos de transcripción hacia la fase exponencial

tardía y una vez entrando a la fase estacionaria de los cultivos estos disminuyeron. Como se explicó en la introducción, la enzima AstD participa en el catabolismo de la arginina, que resulta en la producción de succinato (Yohannes et al., 2004; Stancik et al., 2002; Metzger et al., 1979). Éste último podría servir como mecanismo para contender contra el pH alcalino. Lo anterior concuerda con el hecho, de que durante los cultivos en el SED, la concentración de succinato fue mayor que a pH 8.0 (excepto para un t_R de 120 s); sin embargo, cuando observamos la producción específica de succinato, esta solo fue mayor a un t_R de 240 s (en un 40 %).

En cuanto a GadA (**figura 25 C**), se observó una tendencia a disminuir sus niveles de expresión relativa, alcanzando el mínimo en la fase exponencial tardía y al llegar a la fase estacionaria se incrementó, pero no más de lo observado a pH 7.2. Es importante notar que los niveles relativos de transcripción de *gadA*, en las condiciones evaluadas en el SED, fueron superiores a los observados a pH 8.0, aún cuando en los experimentos en el SED se alcanzaron valores de pH 9 (en STR2). Los resultados obtenidos, son consistentes con lo reportado anteriormente por Blankenhorn y colaboradores (1999), y, Yohannes y colaboradores (2004), en donde los niveles expresión de GadA, aumentaron, solo durante el crecimiento anaerobio de *E.coli* a un pH de 9.0. Contrario a lo observado a pH 8.0, los niveles de transcripción de *cysK* (**figura 25 B**) y *tnaA* (**figura 25 D**), en las condiciones evaluadas en el SED, mostraron pequeñas variaciones con incrementos durante la fase estacionaria del cultivo (congruente con la regulación por *rpoS*), principalmente a un t_R de 180 y 240 s. Es importante destacar que la inducción a nivel transcripcional fue menor que a pH 8.0, donde se observó un cambio en los niveles de transcripción (en comparación a pH 7.2) de 29.9 veces más para *tnaA* y 7.6 veces más para *cysK* (ambos en la fase estacionaria del cultivo).

III. Reguladores transcripcionales

El cambio en los niveles de expresión de los diferentes reguladores transcripcionales de interés se puede observar en la **figura 26**.

El gen *rpoS*, que como ya se ha mencionado, es un regulador maestro de la respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo el estrés tanto por pH ácido como alcalino (Berson *et al.*, 1996;

Waterman y Small, 1996; Nair y Finkel, 2004). Además se ha observado que, mutaciones en este gen, llevan a la pérdida de viabilidad en condiciones que suponen un estrés por pH (ácido y alcalino) (Battesti *et al.*, 2011). Como ya se expuso, para los cultivos a pH 8, este gen mostró pequeños incrementos, en los niveles de transcripción en la fase exponencial media y tardía del cultivo (1.4 y 1.5 veces más que a pH 7.2, respectivamente) y, en la fase estacionaria, el cambio fue mucho más importante (7.3 veces más que a pH 7.2). Para el caso de condiciones fluctuantes de pH, a tiempos de residencia en la zona de adición de 60, 120 y 180 s, los niveles de expresión relativa de *rpoS* (**figura 26 C**) se mantuvieron cercanos 1, por lo que fueron similares a lo observado en cultivos a pH 7.2. Sin embargo, se apreció, que en tiempos de residencia de 240 s el nivel de transcripción en la fase estacionaria, aumentó 2.2 veces más que a pH 7.2. Lo anterior correlaciona con lo observado para *tnaA*, ya que bajo tal tiempo de residencia (240 s), se observaron los niveles más altos de transcripción para *tnaA*, este último se sabe que es regulado positivamente por *rpoS*, en la fase estacionaria (Lacour y Landini 2004).

La expresión de *torR*, como ya se ha dicho, está relacionada a un metabolismo anaerobio y regula positivamente la expresión de *tnaA*. Es mediante la expresión de esta enzima, que participa en la protección durante estrés alcalino (Bordi *et al.*, 2003). En general los niveles de transcripción de para *torR* (**figura 26 D**) se mantuvieron cercanos a 1, durante la fase exponencial temprana, media y tardía, de cultivos con un t_R de 60,120 y 240 s en STR 2, y solo en la fase estacionaria se observaron cambios importantes de 1.7, 0.7 y 1.4 veces (t_R de 60, 120 y 240 s, respectivamente), en comparación con pH 7.2. Para los cultivos con un t_R de 180 s, se observaron incrementos importantes en los niveles de transcripción, en las fases exponencial media, tardía y estacionaria (1.5, 1.3 y 1.4 veces más, respectivamente), en comparación con cultivos a pH 7.2. Los incrementos en los niveles de transcripción relativa en *torR*, pueden deberse a la dificultad que se tuvo en el control de TOD en STR 2, lo cual se evidencia en los graficos de control (**Apéndice A 2**), aunque estas variaciones, no necesariamente, implican condiciones anaeróbicas.

Los niveles de transcripción relativa para *nrdR* (**figura 26 A**), que está involucrado en la síntesis de nucleótidos al ejercer una regulación a nivel transcripcional de carácter negativo (Mckethan *et al.*, 2013; Rodionov *et al.*, 2005), se mantuvieron cercanos a 1 (sin diferencia significativa en comparación con cultivos a pH 7.2), en las distintas condiciones evaluadas en el SED, en las fases exponencial temprana y exponencial media. Sin embargo, en la fase exponencial tardía los niveles

de transcripción para todas las condiciones evaluadas en el SED, disminuyeron entre 0.5 y 0.6 veces, en comparación con pH 7.2. Además en la fase estacionaria de cultivos con un T_r de 180 y 240 s, los niveles relativos de transcripción incrementaron 1.3 (veces más que a pH 7.2), respectivamente.

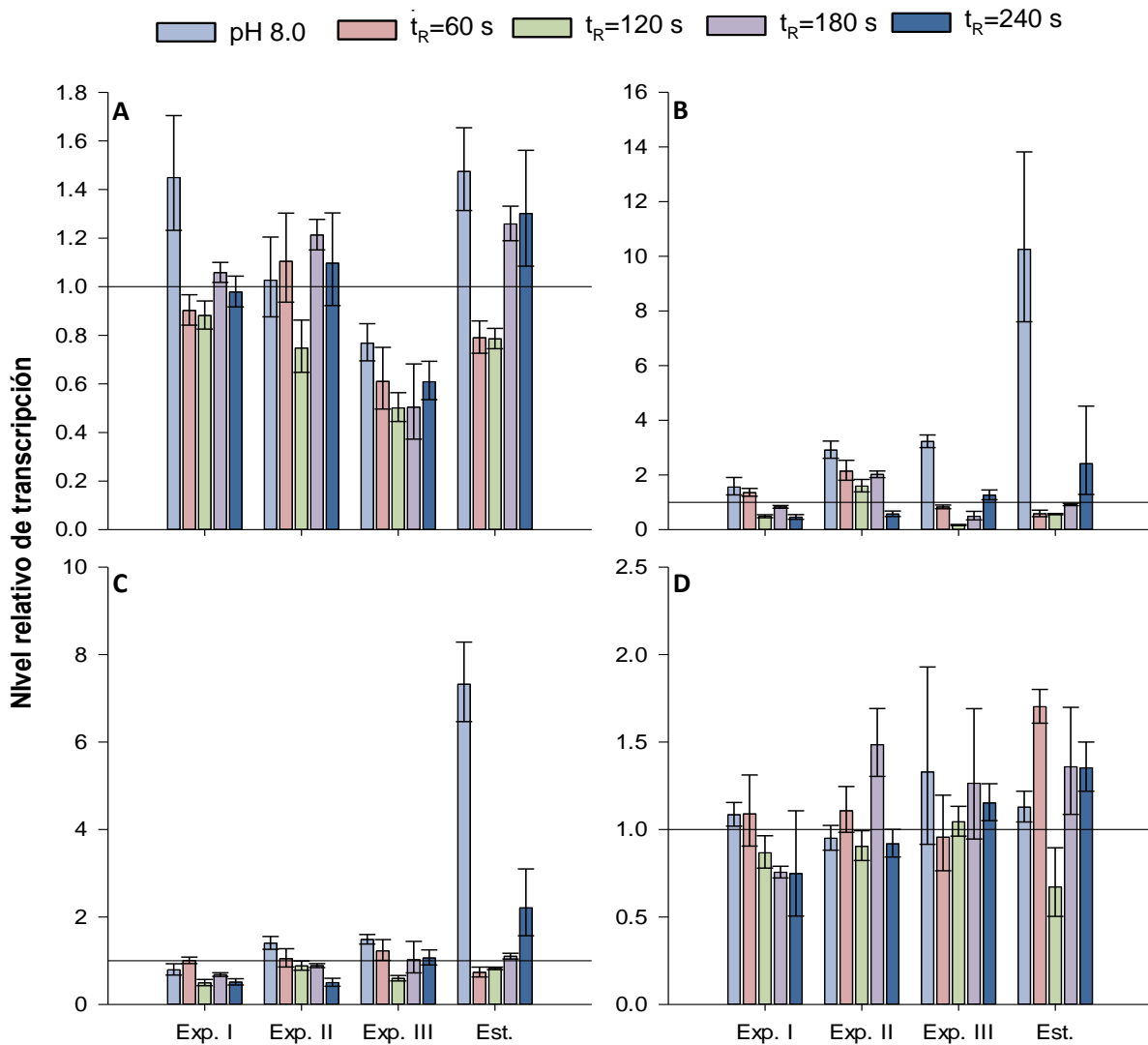


Figura 26. Análisis transcripcional de reguladores transcripcionales de *E. coli* expuesta a condiciones fluctuantes de pH. **A:** *nrdR*, **B:** *purR*, **C:** *rpoS*, **D:** *torR*. Los niveles de expresión se muestran durante diferentes fases del cultivo: Exp. I (exponencial temprana, 2 h), Exp. II (exponencial media, 5 h), Exp. III (exponencial tardía, 8 h), Est. (estacionaria, 11 h). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a *idnT* y con respecto a cultivos de referencia a pH 7.2. Las barras de error estándar representan la diferencia experimental entre dos réplicas independientes (en cada réplica se realizaron 3 determinaciones por gen).

Por último, se analizó *purR* (figura 26 B), que es un regulador transcripcional negativo, que también está involucrado en la síntesis de nucleótidos, específicamente de los constituidos por bases puricas (He *et al.*, 1990; Meng *et al.*, 1990; Rolfes *et al.*, 1990). Este gen mostró, para tiempos de residencia de 60, 120 y 180 s, un máximo en sus niveles relativos de expresión, en la fase exponencial media del cultivo (2.1, 1.6, 2.0 veces más que pH 7.2). Posteriormente, disminuyeron en la fase exponencial tardía y una vez que ingresó el cultivo en la fase estacionaria, se incrementaron con respecto a la fase anterior del cultivo. Sin embargo, los niveles transcripcionales en este punto fueron menores que los observados a pH 7.2. La tendencia para los cultivos con un tiempo de residencia de 240 s, fue el de un aumento en los niveles de transcripción a medida que avanzaba el cultivo, alcanzando un máximo de 1.3 veces más que a pH 7.2, en la fase exponencial tardía. A diferencia de lo observado a pH 8.0, donde se alcanzaron incrementos importantes en los niveles relativos de transcripción (hasta 10.26 veces más que a pH 7.2, en la fase estacionaria), en condiciones oscilatorias de pH, los niveles de transcripción relativa se mantuvieron regulados a la baja (excepto en la fase exponencial media). Lo anterior resulta interesante, ya que un decremento en los niveles de expresión de *purR* y *nrdR*, sugiere una menor regulación negativa a nivel de síntesis de nucleótidos. Sin embargo, la concentración de ADNp alcanzada en los experimentos realizados en el SED, fueron menores que a pH 7.2 e incluso que a pH 8.0.

De los resultados obtenidos en el análisis transcripcional, podemos inferir que la presencia de condiciones fluctuantes de pH, incluso a 60 s de t_R , son capaces de disparar respuestas a nivel transcripcional, de genes relacionados el estrés por pH. Además la magnitud de los gradientes de pH tienen un efecto proporcional en los niveles de transcripción de éstos genes. Debido a que, los niveles de transcripción de *nrdR* y *purR*, sufrieron cambios a la baja, la pérdida en la producción de ADNp durante los experimentos realizados en el SED, probablemente no está asociada al control negativo que ejercen éstos genes a nivel de síntesis de nucleótidos.

6 INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Los cultivos a pH constante funcionaron como controles para observar el comportamiento del cultivo, en ausencia de estrés por pH (pH 7.2) y en presencia de estrés por pH (pH 8.0). De esta forma al exponer las células a gradientes de pH, mediante el SED, se logró observar si el comportamiento se inclinaba hacia a una condición en presencia o ausencia de estrés por pH. Para determinar lo anterior se monitoreo el crecimiento celular, la producción de ADNp, la producción de ácidos orgánicos y los niveles transcripcionales de genes relacionados al estrés por pH alcalino.

En la **figura 27** se puede apreciar gráficamente un resumen de los resultados obtenidos, tanto a pH constante (7.2 y 8.0), como a condiciones oscilatorias de pH (simuladas con el SED). Los gradientes simulados se representan en la **figura 27 (A)**, en donde se aprecia, que la diferencia de pH entre los dos compartimentos, incremento en función del tiempo de residencia en STR 2. A un t_R de 60 s, el gradiente fue de alrededor de 0.2 unidades de pH, mientras que a un t_R de 240 s, la diferencia entre los dos compartimentos fue cercano a 2 unidades de pH. Los gradientes estuvieron presentes durante todo el cultivo y fueron más estables durante la fase exponencial del cultivo, lo cual es similar a lo que se espera en un cultivo a gran escala.

Durante la exposición a condiciones fluctuantes de pH, el crecimiento celular solo se vio afectado en un 10 % (en comparación con pH 7.2) a 240 s de tiempo de residencia en STR2 (**figura 27 B-I**), esto demuestra el desempeño robusto de la cepa de *E. coli* utilizada, ante condiciones fluctuantes de pH. Por otra parte, la producción de ADNp se vio afectada negativamente, en función del tiempo de residencia en STR 2, de tal forma que se observó una disminución del 39 y 18 % en el rendimiento volumétrico y específico, respectivamente (con respecto a pH 7.2), a un tiempo de residencia de 240 s en STR 2 (**figura 27 B-II**). Lo anterior contrasta con los observado a pH 8.0, donde el rendimiento volumétrico y específico de ADNp se incrementó en un 10 y 12 % respectivamente (**figura 27 B-II**) y el crecimiento celular disminuyó 28 y 36 % (biomasa máxima y velocidad de crecimiento, respectivamente), con respecto a pH 7.2 (**figura 27 B-I**), como resultado del estrés alcalino. El efecto del pH alcalino en la producción de ADNp y el crecimiento de *E. coli*, ya ha sido reportado anteriormente por Reinikainen y colaboradores (1988 y 1989), y, Ongkudon y colaboradores (2011), quienes proponen que el incremento en la producción de ADNp a pH alcalino, se debe a la disminución en la velocidad de crecimiento (Reinikainen *et al.*, 1988; Reinikainen *et al.*, 1989) y a un incremento en la fuerza protón motriz (Ongkudon *et al.*, 2011). Otros autores han llegado a la conclusión de que una velocidad de crecimiento por debajo de la máxima, favorece la producción de ADNp (O'Kennedy *et al.*, 2003; Bhole and Ross, 2011; Bentley *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 1991; Wunderlich *et al.*, 2014). En este estudio, gracias al SED, se logró exponer a las células a condiciones alcalinas de

forma oscilatoria, sin alterar su velocidad de crecimiento. Lo anterior, resultó en una disminución en la producción de ADNp, por lo que estos resultados sugieren que la disminución en la velocidad de crecimiento es lo que favorece la producción de ADNp y no el aumento en la fuerza protón motriz. Los resultados también exponen el impacto que pueden llegar a tener los gradientes de pH en el rendimiento del cultivo, por lo que es importante tener en cuenta el efecto de estas heterogeneidades en cultivos a gran escala.

Muchas de las respuestas de la célula hacia el estrés por pH alcalino, van dirigidas a la producción de metabolitos ácidos y la intrusión de iones hidronio al citoplasma con la finalidad de mantener el pH intracelular en un rango fisiológico (Krulwich *et al.*, 2011). En los cultivos a pH 8.0, podemos observar que la concentración de ácidos orgánicos fue prácticamente el doble que a pH 7.2 para acetato, formiato y succinato; mientras que, para lactato fue de aproximadamente 4 veces más (**figura 27 C**). Este importante incremento en la producción de lactato, puede estar relacionado al incremento en la relación NADH/NAD⁺ causada por la reducción en la expresión de la NADH deshidrogenasa I y II (*ndh* y *nuo*, respectivamente) (Maurer *et al.*, 2005). Por lo tanto, el incremento en la síntesis de lactato puede ser una respuesta por parte de la célula para mantener la relación NADH/NAD⁺. En los experimentos realizados en el SED se observó una mayor acumulación de ácidos orgánicos que a pH 7.2 y pH 8.0 (**figura 27 C**). En general, durante la exposición a condiciones fluctuantes de pH, el acetato fue quien tuvo la mayor acumulación (alrededor de 0.8 g/L), y la mayor acumulación de ácidos orgánicos se observó a un t_R de 180 y 240 s. Esta alta producción de ácidos orgánicos puede atribuirse a la respuesta de *E. coli* para mantener el pH intracelular dentro de valores fisiológicos (Krulwich *et al.*, 2011). La razón por la que en los experimentos realizados en el SED la síntesis de ácidos orgánicos fue mayor que a pH 8.0, puede ser que, durante los cultivos en el SED se alcanzaron valores de pH por arriba de 9 (**figura 27 A**). La cantidad de ácidos orgánicos acumulados en los experimentos realizados en el SED no fueron relevantes para el crecimiento celular ya que en el peor de los casos fue menor de 3 g/L; sin embargo, la producción de estas especies ácidas puede volverse relevante para el crecimiento celular, si se alcanzan mayores densidades celulares.

Los niveles transcripcionales (relativos a *idnT* y comparados contra cultivos a pH 7.2), de los 10 genes seleccionados revelaron la activación de mecanismos de respuesta a estrés por pH, tanto en condiciones constantes de pH, como en condiciones fluctuantes de pH (**figura 27 D**). Durante los cultivos a pH constante de 8.0 los mecanismos activos activados fueron aquellos mediados por *cyoA*, *nhaA*, *cysK*, *tnaA* y *rpoS*. En condiciones fluctuantes de pH los mecanismos activados fueron los mismos y se suma la participación de *astD*, quien incremento sustancialmente sus niveles transcripcionales aún en un t_R de 60 s. La activación de los mecanismos mediados por *cyoA*, *nhaA*, *cysK*, *tnaA* y *rpoS* en condiciones fluctuantes de pH, fue en una menor proporción que en los cultivos a pH 8.0 y fue a un t_R de 240 s donde se observaron

los niveles de transcripción más altos para los experimentos realizados en el SED. Estos mecanismos ya descritos en **1.1.7**, **5.1.3** y **5.2.3** de este documento, permiten a la célula contender contra el pH alcalino del medio, mediante la generación de metabolitos ácidos y la intrusión de iones hidronio (Krulwich *et al.*, 2011) al interior de la célula. Es importante notar como el incremento en los niveles transcripcionales de *astD*, en los experimentos realizados en el SED, concuerda con el incremento en la síntesis de succinato en estos experimentos. Se monitorearon dos reguladores transcripcionales de carácter negativo involucrados en la síntesis de nucleótidos, *nrdR* y *purR*, con la finalidad de observar si estos se ven afectados por el pH alcalino del medio. *nrdR*, tanto a pH constante de 8.0 y en condiciones fluctuantes de pH mantuvo sus niveles transcripcionales cercanos a 1, mientras que *purR* sin muestra incrementos sustanciales tanto en condiciones constantes y fluctuantes de pH. Lo anterior sugiere que la síntesis de nucleótidos podría estar siendo regulada a la baja.

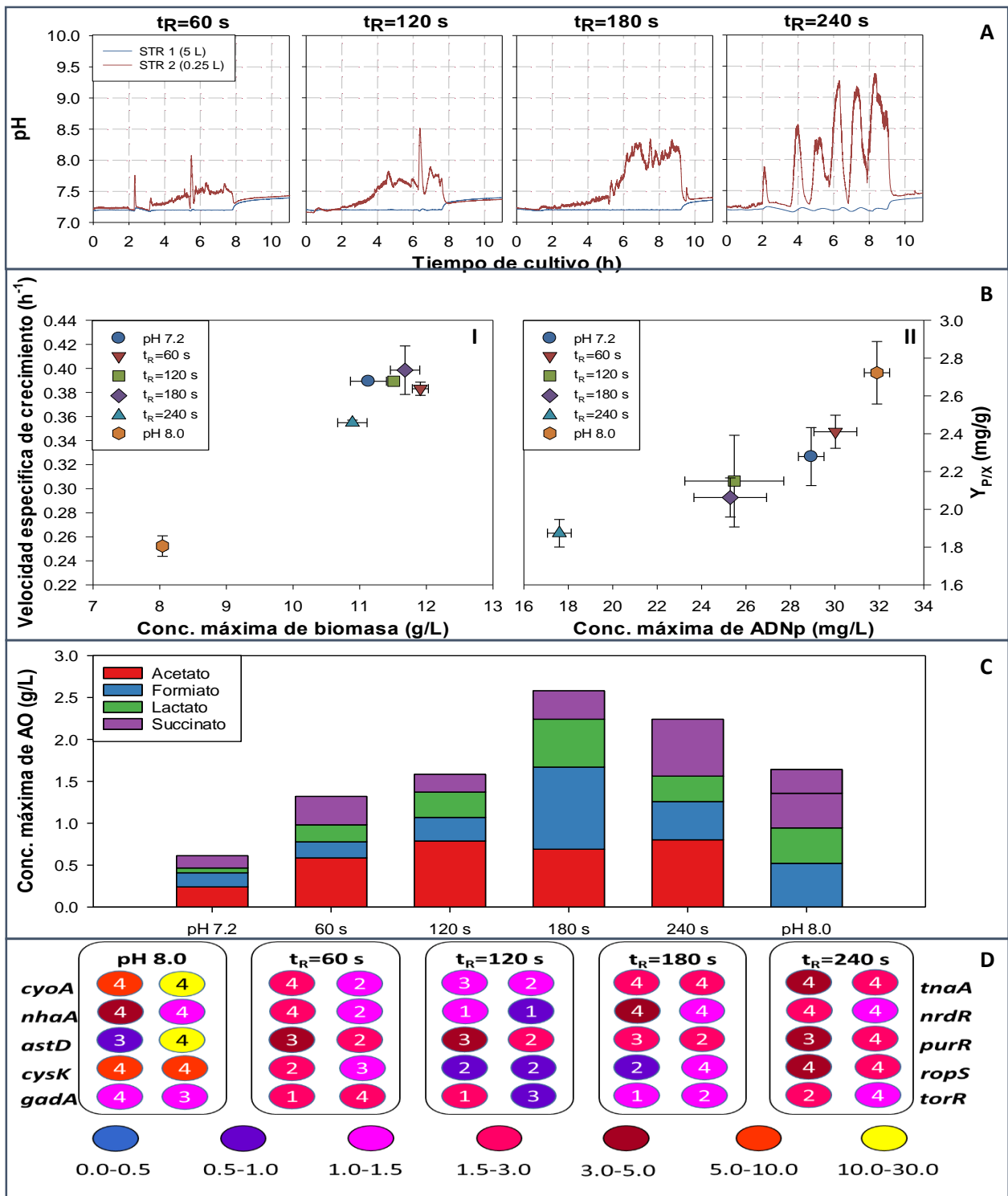


Figura 27. Efecto de la exposición a condiciones constantes y oscilatorias de pH. **A:** Gradientes de pH simulados en el SED, **B:** Efecto de condiciones constantes y oscilatorias de pH sobre el crecimiento (I), y sobre la producción de ADNp (II), **C:** Producción de ácidos orgánicos bajo condiciones constantes y oscilatorias de pH, **D:** Niveles transcripcionales máximos (relativos a *idnt* y comparados contra cultivos a pH 7.2) alcanzados bajo condiciones constantes y oscilatorias de pH (el número dentro de los círculos representa la fase del cultivo. 1: Exponencial temprana, 2: Exponencial media, 3: Exponencial tardía, 4: estacionaria.). Las barras de error representan la diferencia entre dos cultivos independientes.

7 CONCLUSIONES

Se logró, mediante la metodología de escalamiento descendente, estudiar por primera vez el efecto de la presencia de gradientes de pH, típicos de biorreactores de gran escala, sobre el crecimiento, metabolismo y producción de ADN plasmídico por una cepa recombinante de *E. coli*. Durante los cultivos a pH 8, que constituyen un control positivo de estrés ocasionado por la variable de pH, se observaron los siguientes efectos:

- Una reducción en los parámetros cinéticos del cultivo relacionados al crecimiento celular (del 37 % para μ y 28 % para la concentración máxima de biomasa), y un incremento en la producción de ADNp (10 % para el rendimiento volumétrico y 19 % para el rendimiento específico), con respecto a los cultivos control a pH 7.2.
- Re-direccionamiento de la fuente de carbono, resultando en un aumento en rendimiento específico de ácidos orgánicos (79, 102, 360 y 248 %, para, acetato, formiato, lactato y succinato respectivamente), con respecto a cultivos control a pH 7.2.
- Aumento de los niveles de transcripción relativa de *cyoA*, *nhaA*, *cysK*, *tnaA* y *rpoS* (5.8, 4.5, 7.6, 29.9 y 7.3 veces más que a pH 7.2, respectivamente. Valores tomados en la fase estacionaria). Estos genes están relacionados al estrés por pH alcalino.
- Por primera vez se mostró el efecto de condiciones alcalinas en la expresión de los reguladores transcripcionales negativos, *purR* y *nrdR*, los cuales están involucrados en la síntesis de nucleótidos. Para el caso de *nrdR*, la presencia de condiciones alcalinas resultaron en ligeros cambios de expresión (1.5 veces más que a pH 7.2 en la fase estacionaria), mientras que *purR* mostró incrementos en su expresión, que se fueron cada vez más grandes en función de la etapa del cultivo, hasta alcanzar en la fase estacionaria un incremento de 10.3 veces más que a pH 7.2.

El diseño del sistema de escalamiento descendente permitió mantener un diferencial de pH entre los compartimentos que constituyen la zona de adición (STR2) y la zona de los impulsores o bien mezclada (STR1). Esta diferencia entre los compartimentos simuló la presencia de gradientes de pH y la exposición a condiciones fluctuantes de pH que experimentan las células en cultivos de escala industrial. Fue posible, incrementando el tiempo de residencia en la zona de adición,

aumentar el diferencial de pH entre los dos compartimentos (hasta 2.2 unidades de pH, para un tiempo de residencia en STR 2 de 240 s).

La exposición a condiciones fluctuantes de pH resultó en:

- Un efecto negativo en la producción de ADNp, ya que a medida que se incrementó el tiempo de residencia en la zona de adición, disminuyó tanto el rendimiento volumétrico como específico (39 y 18 %, respectivamente), en comparación con los cultivos a un pH constante de 7.2.
- Al igual que los cultivos a pH 8, la producción de ácidos orgánicos se favoreció en condiciones oscilatorias de pH y se observó que se incrementó en función del aumento en el tiempo de residencia en STR 2.
- Incremento en los niveles de transcripción relativa de genes relacionados a estrés por pH (*cyoA*, *nhaA*, *cysK*, *tnaA*, *rpoS* y *astD*). Si bien no se observaron incrementos tan importantes como los vistos a pH 8, esto manifiesta la presencia de estrés por pH alcalino.

Los resultados obtenidos en condiciones fluctuantes de pH sugieren que el incremento en la producción de ADNp, observado en cultivos a pH 8.0, se debe a la disminución en la velocidad de crecimiento y no a el aumento en la fuerza protón motriz como lo propone Ongkudon y colaboradores (2011).

La información generada en este trabajo hace evidente que es necesario desarrollar nuevas estrategias que permitan mejorar el control de pH en cultivos de escala industrial con la finalidad de minimizar la presencia de gradientes de pH y su efecto en la producción de ADNp.

8 PERSPECTIVAS

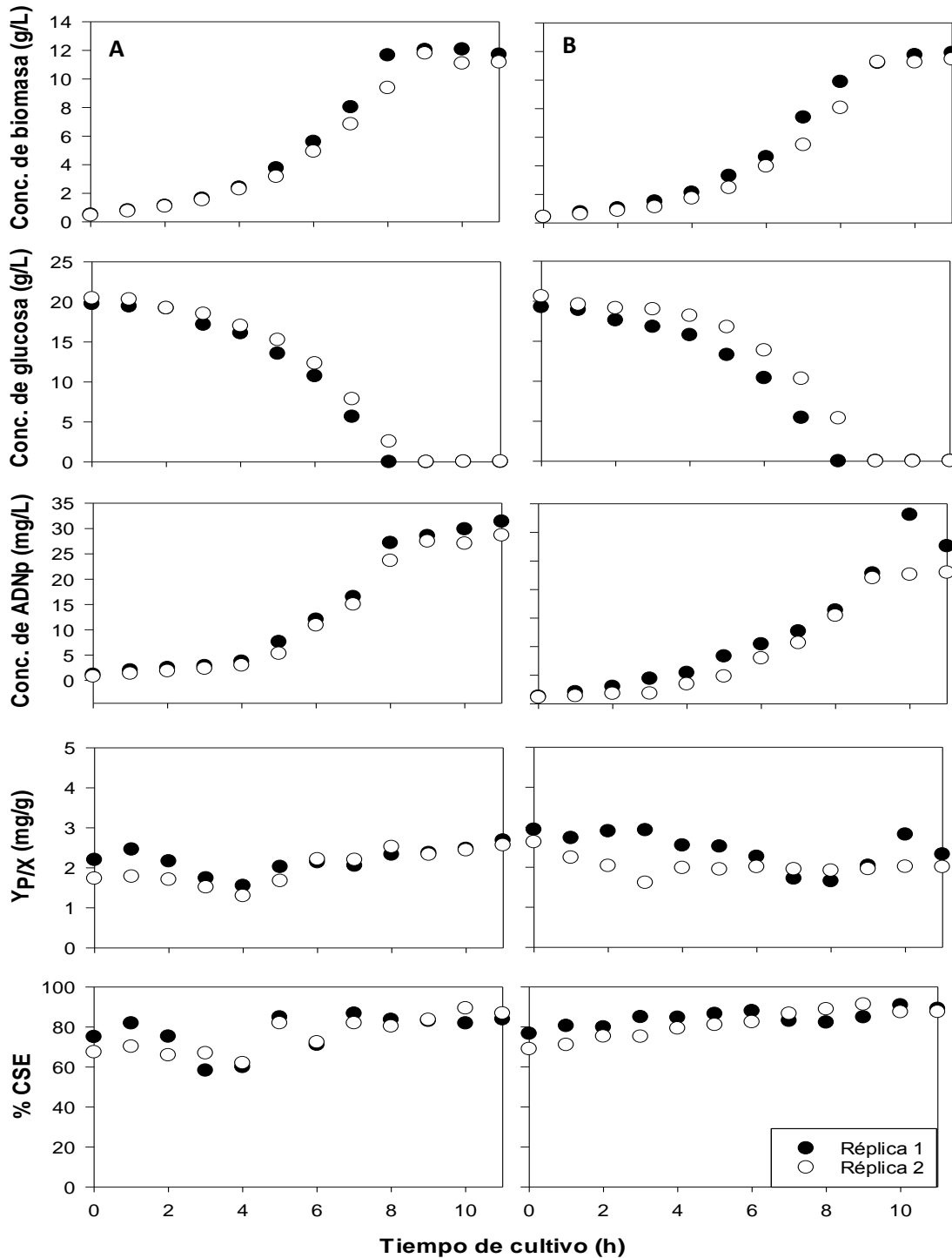
- Modificar las variables proporcional, integral y derivativa del controlador PID, con la finalidad de mejorar el tiempo de respuesta de adición de álcali, esto podría evitar la presencia de grandes diferenciales de pH entre la zona de adición y el resto del líquido. Además, se puede implementar, en cultivos a gran escala, la adición de álcali mediante distintos puertos hubicados en la cercanía de los impulsores, para favorecer la rápida dispersión y homogenización del álcali adicionado, con lo que se disminuiría la formación de gradientes de pH.
- Como medida para mejorar la respuesta de las células hacia el estrés alcalino se puede suplementar al medio de cultivo con triptófano, para así estimular la actividad de TnaA, que proporciona un efecto protector contra el estrés alcalino. Esta medida puede favorecer también a la calidad del plásmido, pues se sabe que el indol (producto de la reacción catalizada por la TnaA) ayuda a evitar la formación de dímeros de ADNp.
- Generar cepas que atenúen la expresión de los represores *purR* y *nrdR*. Esto podría prevenir la baja producción de ADNp durante el estrés por pH. Estas cepas se pueden probar tanto en cultivos a pH constante como en condiciones oscilantes de pH, para observar si ejerce algún cambio significativo en la producción de ADNp.
- La importante acumulación de ácidos orgánicos, principalmente acetato y formato, que fueron los ácidos orgánicos que mostraron una mayor acumulación, puede ser mitigada mediante la delección de genes involucrados su síntesis, como son *poxA* y *ackA* (piruvato oxidasa y acetato cinasa A, respectivamente) que están involucrados en la síntesis de acetato y *pfID* (piruvato formato liasa II) involucrado en la síntesis de formato.
- Determinar la variación de pH intracelular de *E. coli* al exponer a la zona de adición y observar como el tiempo de exposición afecta al pH intracelular. De igual forma, sería interesante observar que sucede con el pH intracelular al cambiar de una condición de estrés a una de no estrés.
- Indagar, de forma más profunda, sobre el efecto de los gradientes de pH en la producción de ADNp. Esto podría lograrse desde una perspectiva transcriptómica y fluxómica, con lo que sería posible determinar hacia donde se está redirigiendo la fuente de carbono,

además de poder observar, a nivel global, la regulación a nivel transcripcional que se da en presencia de gradientes de pH. Con la información generada sería posible proponer mejoras a través de ingeniería de vías metabólicas para obtener cepas con un comportamiento más robusto ante el estrés ocasionado por la presencia de gradientes de pH y que sean mejores productoras de ADNp.

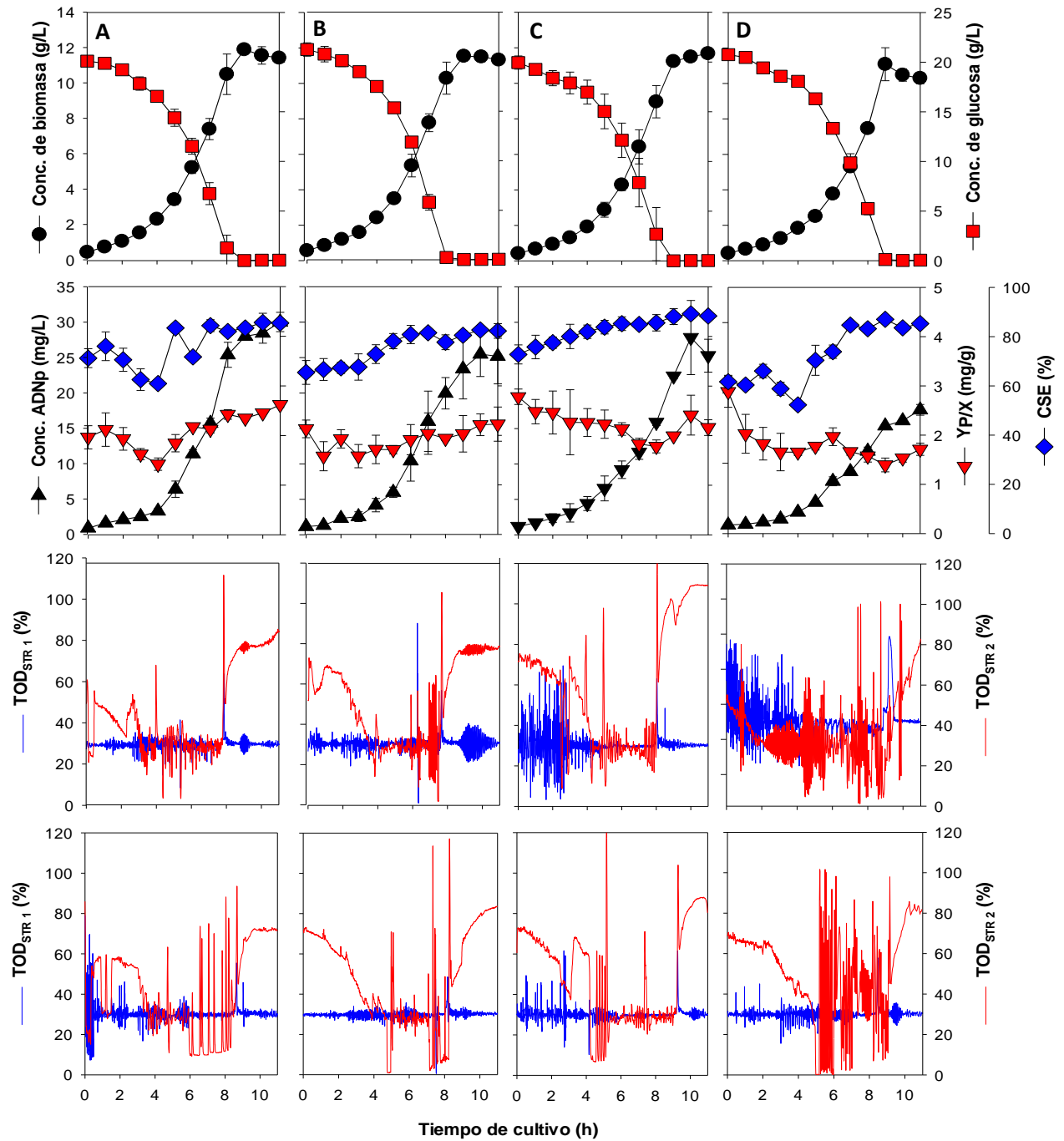
- Evaluar el efecto de gradientes de pH en conjunto con otro tipo de heterogeneidades que suelen encontrarse en biorreactores de gran escala, como la presencia de gradientes de sustrato y gases disueltos (O_2 y CO_2).
- Validar el sistema de escalamiento descendente haciendo cultivos en biorreactores industriales de diferente capacidad. Si se necesita refinar el diseño del SED, se pueden utilizar herramientas computacionales, como la dinámica computacional de fluidos, para crear una mejor representación de las características de mezclado de sistemas a gran escala, en sistema a escala laboratorio.

9 APÉNDICES

Apéndice A1. Cinéticas de cultivo utilizando el sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR2. **A:** $t_R=60$ s ($Q_R=4.1$ 6mL/s), **B:** $t_R=180$ s ($Q_R=1.36$ mL/s). En el grafico se muestran las réplicas experimentales de forma independiente para demostrar la reproducibilidad de los eperimentos.



Apéndice A2. Cinéticas de cultivo utilizando el sistema de escalamiento descendente a diferentes tiempos de residencia en STR2. **A:** $t_R=60$ s ($Q_R=4.16$ mL/s), **B:** $t_R=120$ s ($Q_R=2.08$ mL/s), **C:** $t_R=180$ s ($Q_R=1.36$ mL/s), **D:** $t_R=240$ s ($Q_R=1.04$ mL/s). Las barras de error representan la diferencia entre dos cultivos independientes.



Apéndice A3. Niveles de transcripción de genes de interés de *E. coli* en diferentes condiciones experimentales. Los niveles de transcripción relativa se normalizaron con respecto a *idnt* y se compararon contra cultivos de referencia a pH=7.2. En las tablas se muestra el cambio promedio en los niveles de transcripción así como el error de experimental entre dos replicas independientes (denotado como un intervalo).

Cultivo a pH 8.0				
Nivel relativo de transcripción				
Gen	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Est.
astD	0.42 (0.36-0.48)	0.50 (0.45-0.56)	0.80 (0.71-0.90)	0.07 (0.05-0.08)
cyoA	0.26 (0.24-0.27)	1.52 (1.16-1.99)	4.22 (2.81-6.32)	5.76 (5.34-6.22)
cysK	0.85 (0.71-1.01)	1.68 (1.50-1.88)	2.64 (2.35-2.97)	7.60 (5.23-11.05)
gadA	0.27 (0.25-0.28)	0.33 (0.29-0.38)	0.07 (0.05-0.11)	1.12 (0.97-1.28)
nhaA	2.36 (2.17-2.57)	1.81 (1.68-1.96)	3.74 (2.45-5.70)	4.54 (3.62-5.68)
nrdR	1.45 (1.23-1.70)	1.03 (0.88-1.20)	0.77 (0.69-0.85)	1.47 (1.31-1.65)
purR	1.56 (1.27-1.91)	2.91 (2.61-3.24)	3.23 (3.00-3.47)	10.26 (7.61-13.82)
rpoS	0.79 (0.67-0.93)	1.40 (1.26-1.55)	1.48 (1.38-1.60)	7.32 (6.47-8.28)
tnaA	0.23 (0.22-0.24)	1.16 (0.98-1.37)	1.14 (0.81-1.61)	29.86 (25.63-34.78)
torR	1.08 (1.02-1.15)	0.95 (0.88-1.02)	1.33 (0.92-1.93)	1.13 (1.04-1.22)

Simulación de gradientes de pH (tiempo de residencia en STR2=60 s)				
Nivel relativo de transcripción				
Gen	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Est.
astD	0.93 (0.85-1.02)	0.91 (0.77-1.09)	3.62 (2.03-6.45)	0.68 (0.63-0.74)
cyoA	1.08 (0.90-1.31)	1.14 (0.81-1.61)	0.89 (0.69-1.15)	1.81 (1.70-1.93)
cysK	1.45 (1.36-1.56)	1.60 (1.34-1.91)	0.51 (0.35-0.73)	0.67 (0.58-0.77)
gadA	2.50 (1.83-3.41)	1.34 (1.26-1.43)	0.46 (0.35-0.62)	0.89 (0.82-0.96)
nhaA	1.15 (0.89-1.47)	1.16 (1.07-1.25)	0.69 (0.56-0.86)	2.88 (2.78-2.99)
nrdR	0.90 (0.84-0.97)	1.10 (0.94-1.30)	0.61 (0.50-0.75)	0.79 (0.73-0.86)
purR	1.36 (1.22-1.51)	2.14 (1.81-2.54)	0.83 (0.77-0.90)	0.58 (0.48-0.71)
rpoS	1.00 (0.93-1.08)	1.04 (0.86-1.27)	1.22 (1.01-1.48)	0.79 (0.63-0.85)
tnaA	0.99 (0.79-1.23)	1.32 (1.24-1.40)	0.42 (0.30-0.58)	0.90 (0.81-1.01)
torR	1.09 (0.90-1.31)	1.11 (0.98-1.25)	0.96 (0.76-1.20)	1.70 (1.61-1.80)

Simulación de gradientes de pH (tiempo de residencia en STR2=120 s)				
Nivel relativo de transcripción				
Gen	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Est.
astD	0.48 (0.45-0.51)	0.84 (0.79-0.90)	4.94 (4.49-5.44)	0.47 (0.45-0.50)
cyoA	0.18 (0.17-0.20)	1.21 (0.93-1.58)	1.31 (0.87-1.95)	0.23 (0.18-0.29)
cysK	0.46 (0.42-0.50)	1.08 (0.85-1.37)	0.12 (0.11-0.13)	0.55 (0.50-0.60)
gadA	1.79 (1.60-2.00)	0.53 (0.46-0.61)	0.25 (0.17-0.38)	0.77 (0.55-1.08)
nhaA	1.26 (1.12-1.42)	0.95 (0.83-1.09)	0.54 (0.50-0.58)	0.84 (0.66-1.07)
nrdR	0.88 (0.83-0.94)	0.75 (0.65-0.86)	0.50 (0.45-0.56)	0.79 (0.74-0.83)
purR	0.49 (0.44-0.55)	1.59 (1.38-1.84)	0.17 (0.15-0.19)	0.57 (0.55-0.59)
rpoS	0.49 (0.43-0.57)	0.88 (0.78-0.99)	0.60 (0.54-0.66)	0.82 (0.79-0.85)
tnaA	0.55 (0.47-0.64)	1.26 (1.14-1.40)	0.49 (0.28-0.84)	1.09 (0.79-1.49)
torR	0.87 (0.78-0.96)	0.90 (0.82-0.99)	1.04 (0.96-1.13)	0.67 (0.50-0.90)

Simulación de gradientes de pH (tiempo de residencia en STR2=180 s)				
Nivel relativo de transcripción				
Gen	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Est.
astD	0.53 (0.50-0.55)	0.74 (0.70-0.77)	1.71 (1.21-2.41)	1.11 (1.04-1.18)
cyoA	0.17 (0.16-0.18)	0.48 (0.44-0.52)	0.49 (0.36-0.66)	2.26 (1.81-2.82)
cysK	0.43 (0.41-0.45)	0.98 (0.93-1.03)	0.48 (0.35-0.65)	0.96 (0.93-1.01)
gadA	1.12 (1.07-1.17)	1.06 (0.98-1.14)	0.13 (0.09-0.18)	0.57 (0.45-0.73)
nhaA	1.83 (1.75-1.90)	1.84 (1.71-1.98)	0.31 (0.23-0.43)	4.26 (3.46-5.23)
nrdR	1.06 (1.02-1.10)	1.21 (1.15-1.28)	0.50 (0.37-0.68)	1.26 (1.19-1.33)
purR	0.83 (0.78-0.89)	2.02 (1.91-2.15)	0.49 (0.36-0.67)	0.92 (0.88-0.96)
rpoS	0.68 (0.64-0.72)	0.89 (0.84-0.93)	1.02 (0.72-1.44)	1.10 (1.04-1.17)
tnaA	0.94 (0.90-0.99)	1.17 (1.08-1.26)	0.56 (0.41-0.78)	1.60 (1.27-2.01)
torR	0.76 (0.72-0.79)	1.48 (1.30-1.69)	1.26 (0.95-1.69)	1.36 (1.09-1.70)

Simulación de gradientes de pH (tiempo de residencia en STR2=240 s)				
Nivel relativo de transcripción				
Gen	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Est.
astD	0.39 (0.35-0.45)	0.30 (0.25-0.36)	3.22 (2.84-3.64)	1.01 (0.94-1.09)
cyoA	0.15 (0.07-0.31)	0.16 (0.15-0.17)	2.54 (2.32-2.77)	3.51 (3.20-3.84)
cysK	0.34 (0.25-0.46)	0.30 (0.25-0.35)	1.53 (1.32-1.78)	3.31 (1.88-5.82)
gadA	2.12 (1.56-2.87)	2.41 (1.64-3.55)	0.58 (0.54-0.64)	1.03 (0.88-1.21)
nhaA	1.28 (0.92-1.79)	1.33 (1.21-1.46)	1.03 (0.93-1.14)	2.21 (2.05-2.38)
nrdR	0.98 (0.92-1.04)	1.10 (0.92-1.30)	0.61 (0.54-0.69)	1.30 (1.08-1.56)
purR	0.46 (0.38-0.55)	0.58 (0.48-0.68)	1.26 (1.10-1.45)	2.42 (1.29-4.52)
rpoS	0.51 (0.44-0.59)	0.50 (0.41-0.60)	1.06 (0.90-1.25)	2.21 (1.57-3.10)
tnaA	0.23 (0.15-0.36)	0.39 (0.30-0.50)	1.37 (1.25-1.49)	1.86 (1.51-2.28)
torR	0.75 (0.50-1.11)	0.92 (0.84-1.00)	1.15 (1.05-1.26)	1.35 (1.22-1.50)

10 BIBLIOGRAFÍA

- Amanullah A, Buckland B, Nienow A. 2004. Mixing in the fermentation and cell culture industries. In: Paul E, Atiemo-Obeng V, Kresta S, eds. Handbook of industrial mixing: science and practice. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. pp. 1071-1170.
- Amanullah A, McFarlane C, Emery A, Nienow A. 2001. Scale-Down model to simulate spatial pH variations in large-scale Bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 5:390-399.
- Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez O. 2011. Sustrato: Simulation of dissolved CO₂ gradients in a scale-down system: A metabolic and transcriptional study of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol J.* 6:959–967.
- Bajpai R, Reuss M. 1982. Coupling of mixing and microbial kinetics for evaluating the performance of bioreactors. *Can J Chem Eng.* 60:384-392.
- Barbara L, Schneider, Alexandros K, Kiupakis, Lawrence J. 1998. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180:4278-4286.
- Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. 2011. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 65:189-213.
- Begley M, Gahan C, Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev.* 29:625-651.
- Belmar M. 1984. Revisión bibliográfica, análisis y evaluación sobre la aplicación de los criterios de escalamiento en fermentaciones aerobias. Tesis de licenciatura, Ingeniería de alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuatitlan, UNAM, México, D.F.
- Bentley W, Mirjalili N, Andersen D, Davis R, Kompala D. 1990. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng.* 35:668-681.
- Bhole K, Ross A. 2011. Plasmid DNA production for pharmaceutical use: role of specific growth rate and impact on process design. *Biotechnol Bioeng.* 108:2099-2106.
- Blankenhorn D, Phillips J Slonczewski J. 1999. Acid- and base- induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 181:2209-2216.

Bordi C, Théraulaz L, Méjean V, Jourlin-Castelli C. 2003. Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 48: 211-223.

Borja M, Meza E, Gosset G, Ramírez O, Lara A. 2012. Engineering *E. coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb Cell Fact.* 11:132.

Bylund F, Castan A, Mikkola R, Veide A, Larsson G. 2000. Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone. *Biotechnol Bioeng.* 69: 119–128.

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

Caspeta L, Flores N, Pérez N, Bolívar F, Ramírez O. 2009. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol Bioeng.* 102: 468–482.

Cherng J, Schuurmans-Nieuwenbroek N, Jiskoot W, Talsma H, Zuidam N, Hennink W, Crommelin D. 1999. Effect of DNA topology on the transection efficiency of poly (2-dimethylamino) ethyl methacrylate)-plasmid complexes. *J control release.* 60:343-353.

Cotter P, Chepuri V, Gennis R, Gunsalus R. 1990. Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH and the *fnr* gene product. *J Bacteriol.* 172:6333-6338.

Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, Stalon V. 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev.* 50: 314-352.

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

Feijen J, Homeester J. 1991. Gradients in production scale bioreactors, in: Berovic M, Koloini M, eds. *Bioreactor Engineering Course Workshop Notes*, Boris Kidric Institute of Chemistry, Ljubljana. pp. 93-116.

Flint D, Tuminello J, Miller T. 1996. Studies on the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* crude extract. Isolation of o-acetylserine sulfhydrylases A and B

and beta-cystathionase based on their ability to mobilize sulfur from cysteine and to participate in Fe-S cluster synthesis. *J Biol Chem.* 271:16053–16067.

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

Frandsen S, Nielsen J, Villadsen J. 1993. Application of Regime Analysis of Yeast Fermentation for Down-Scaling, in: Mortensen U, Noorman H, eds. Proceedings International Symposium on Bioreactor Performance. Nordic Programme on Bioprocess Engineering, Denmark. pp. 171-179.

Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Consultada el 20-Feb-14 de <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>.

George S, Larsson G, Enfors S. 1993. A scale-down 2-compartment reactor with controlled substrate oscillations-metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioproc Eng.* 9:249-257.

Gonin P, Gaillard C. 2004. Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther.* 11:98-108.

Guidance for Industry. Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications. Consultada el 20-Ene-14 de <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm074770.htm>.

He B, Shiau A, Choi K, Zalkin, H. and Smith J. 1990. Genes of the *Escherichia coli* pur regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction. *J. Bacteriol.*, 172: 4555-62.

Herrera E, Barcenas P, Hernández R, Méndez A, Pérez-Ishiwara G, Barrón B. 2010. A 176 amino acid polypeptide derived from the mumps virus HN ectodomain shows immunological and biological properties similar to the HN protein. *Virol J.* 7:195.

Jaén K, Lara A, Ramírez O. 2013. Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem Eng J.* 19:230-238.

Johnstone R, Thring M. 1957. Pilot Plant, Models and Scale-up Methods in Chemical Engineering. McGraw-Hill, NY.

- Jourlin C, Bengrine A, Chippaux M, Méjean V. 1996. An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 20: 1297–1306.
- Kobayashi H, Suzuki T, Unemoto T. 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *Biol Chem.* 26: 627-630.
- Kozachkov L, Herz K, Padan E. 2007. Functional and structural interactions of the transmembrane domain X of NhaA, Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*, at physiological pH. *Biochem.* 46:2419–2430.
- Krulwich A, Sachs G, Padan E. 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and Homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 9: 330-343.
- Kutzler M, Weiner D. 2008. DNA vaccines: ready for prime time?. *Nat Rev Genet.* 9: 776-788.
- Lacour S, Landini P. 2004. σ^S -dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of σ^S -dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol.* 186: 7186-7195.
- Lange R, Hengge-Aronis R. 1994. The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8:1600–12.
- Langheinrich C, Nienow A. 1999. Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: alkali addition and pH excursions. *Biotechnol Bioeng.* 66:171-179.
- Lara A, Caspeta L, Gosset G, Bolivar F, Ramirez O. 2008. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng.* 99:893-901.
- Lara A, Galindo E, Ramirez O, Palomares L. 2006. Living with heterogeneities in bioreactors. *Mol Biotechnol.* 34:355-381.
- Lara A, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez O. 2006. Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng.* 93: 372–385.

- Lara A, Ramirez O. 2012. Plasmid DNA Production for Therapeutic Applications. *Methods in Molecular Biology*, 1, Volume 824, Recombinant Gene Expression, Part 2, Pages 271-303.
- Larsson G, George S, Törnkvist M, Enfors S. 1993. Methodology for scale-down of bioprocesses, in: Mortensen U, Noormn H, eds. *Procc. Int. Symp. on Bioreactor Performance*. Biotechnology Research Foundation, Lund, Sweden. Pp. 181-187.
- Leitner W, Ying H, Restifo N. 2000. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*. 18:765–77.
- Levenspiel O. 1999. *Chemical reaction engineering*, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Lian T, Ho R. 2001. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci*. 90:667–80.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25:402-408.
- Luo D, Saltzman W. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*. 18:33–37.
- Luyben K. C. A. M. 1993. Regime Analysis for the Scale-Down of Biotechnological Processes, in: Mortensen U, Noorman H, eds. *Proceedings International Symposium on Bioreactor Performance*. Nordic Programme on Bioprocess Engineering, Denmark. pp. 159-169.
- Mairhofer J, Lara A. 2014. Advances in host and vector development for the production of plasmid DNA vaccines. *Methods Mol Biol*. 1139:505-541.
- Mann R, Mavros P, Middleton J. 1987. A structured stochastic flow model for interpreting flow-follower data from a stirred vessel. *Trans Instn Chem Eng*. 59:271-278.
- Manual de usuario: YSI 2700 *Select Biochemistry analyzer*. Consultado el 10-Ene-14 de www.ysilifesciences.com
- Mat-Jan F, Alam K, Clark D. 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*. 171: 342-348.

- Maurer L, Yohannes E, Bondurant S, Radmacher M, Slonczewski J. 2005. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 187:304–319.
- Maurer M, Yohannes E, Bondurant S, Randmacher M, Slonczewski L. 2005. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 187:30–319.
- McKethan B, Spiro S. 2013. Cooperative and allosterically controlled nucleotide binding regulates the DNA binding activity of NrdR. *Mol Microbiol.* 90: 278–289.
- Meng L, Kilstrup M, Nygaard P. 1990. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of purR in the regulation of purB, purC, purL, purMN and guaBA expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 187: 373–9.
- Merrick H, Ferrazzoli AE, Lovett ST. 2009. Growth phase and (p)ppGpp control of IraD, a regulator of RpoS stability, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 191:7436–46.
- Metzer E, Levitz R, Halpern Y. 1979. Isolation and properties of *Escherichia coli* K-12 mutants impaired in the utilization of gamma-aminobutyrate. *J Bacteriol.* 137:1111–1118.
- Miller W, Blanch H, Wilke C. 1988. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate and pH. *Biotechnol Bioeng.* 32:947–965.
- Moore D. 2001. Commonly Used Reagents and Equipment, In: Gwen P, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. 51(A):2.5A.1–2.5A.9.
- Nair S, Finkel S. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J. Bacteriol.* 186:4192–98.
- Namdev P, Thompson B, Gray M. 1992. Effect of feed zones in fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 40:235–246.
- Neubauer P, Häggström L, Enfors S. 1995. Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth yield in *E. coli* glucose limited fed-batch fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 47: 139–146.

- O'Kennedy R, Ward J, Keshavarz-Moore E. 2003. Effects of fermentation strategy on the characteristics of plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem.* 37:83-90.
- Oldshue J. 1966. Fermentation mixing scale-up technique. *Biotechnol Bioeng.* 8:3-24.
- Olkhova E, Padan E, Michel H. 2007. The influence of protonation states on the dynamics of the NhaA antiporter from *Escherichia coli*. *Biophys J.* 92:3784–3791.
- Ongkudon M, Pickering R, Webster D, Danquah K. 2011. Cultivation of *E. coli* carrying a plasmid-based measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimisation and pH-temperature induction techniques. *Microb Cell Fac.* 10:16.
- Onyeaka H, Nienow A, Hewitt C. 2003. Further studies related to the scale-up of high cell density *Escherichia coli* fed-batch fermentations: the additional effect of a changing microenvironment when using aqueous ammonia to control pH. *Biotechnol Bioeng.* 84: 476-484.
- Oosterhuis N, Kossen N, Oliver A, Schenk E. 1985. Scale-down and optimization studies of gluconic acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol Bioeng.* 27:711-721.
- Osman J, Birch J, Varley J. 2002. The response of GS-NS0 Myeloma cells to single and multiple pH perturbations. *Biotechnol Bioeng.* 79:389-407.
- Ozturk S. 1996. Engineering challenges in high cell density cell culture systems. *Cytotechnol.* 22:3-16.
- Padan E, Maisler N, Taglicht D, Karpel R, Schuldiner S. 1989. Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na⁺/H⁺ antiporter system(s). *Biol Chem.* 264: 20297–20302.
- Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim Biophys Acta.* 30;1717(2):67-88.
- Padan E. 2008. The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na⁺-H⁺ antiporters. *Trends Biochem Sci.* 33:435-443.
- Palomares L, Lara A, Ramirez O. 2000. Bioreactor scale-down. *Bioreactor scale-down. In the Encyclopedia of Cell Technology*, vol. 1 (Spier, R. E., ed), John Wiley & Sons, New York, NY, pp:174–183.

- Prather K, Sager K, Murphy J, Chartrain M. 2003. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design production, and purification. *Enzyme Microb Technol.* 33: 865-883.
- Puustinen A, Finel M, Haltia T, Gennis R, Wikström M. 1991. Properties of the two terminal oxidase of *Escherichia coli*. *Biochem.* 30:3936-3942.
- Reinikainen P, Korpela K, Nissinen V, Olkku J, Söderlund H. Markkanen P. 1988. *Escherichia coli* plasmid production in fermenter. *Biotechnol Bioeng.* 33: 386-393.
- Reinikainen P, Virkajärvi I. 1989. *Escherichia coli* growth and plasmid copy numbers in continuous cultures. *Biotechnol Lett.* 11:225-230.
- Reuss M, Schmalzriedt S, Jenne M. 1994. Structured modelling of bioreactors, in *Advances in Bioprocess Engineering* (Galindo E. and Ramírez, O. T., eds.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp:207-215.
- Robinson H. 2000. DNA vaccines. *Clin Microbiol Newslett.* 23:17–22.
- Rodionov D, Gelfand M. 2005. Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet.* 21: 385-9.
- Rolfes R, Zalkin H. 1990. Autoregulation of *Escherichia coli* purR requires two control sites downstream of the promoter. *J Bacteriol.* 172: 5758-66.
- Ryan W, Parulekar S. 1991. Recombinant protein synthesis and plasmid instability in continuous cultures of *Escherichia coli* JM103 harboring a high copy number plasmid. *Biotechnol Bioeng.* 37:415-429.
- Saito H, Kobayashi H. 2003. Bacterial responses to alkaline stress. *J Sci Progress.* 86:271-282.
- Sandoval-Basurto E, Gosset G, Bolívar F, Ramírez O. 2005. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng.* 89: 453–463.
- Schleef M, Blaesén M. 2009. Production of plasmid DNA as a pharmaceutical. *Methods Mol Biol.* 542:471-495.
- Schneider B, Kiupakis A, Reitzer L. 1998. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180:4278–4286.

Schuldiner S, Agmon V, Brandsma J, Cohen A, Friedman E, Padan E. 1986. Induction of SOS functions by alkaline intracellular pH in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 168: 936-939.

Seo J, Bailey J. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng. 27: 1668-1674.

Seo J, Bailey J. 1986. Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. Biotechnol Bioeng. 28: 1590-1594.

Serrato A. 2009. Impacto de las heterogeneidades medioambientales sobre la glicosilación de anticuerpos monoclonales producidos por cultivo *in vitro* de hibridomas. Tesis de doctorado, Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Shuler M, Kargi F. 1992. Selection scale up, operation and control of bioreactors, in: Bioprocess Engineering Basic Concepts. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall Int. pp. 270-310.

Simon G, Méjean V, Jourlin C, Chippaux M, Pascal M. 1994. The *torR* gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. J Bacteriol. 176: 5601–5606.

Slonczewski J, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich T. 2009. Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol*. 55:1–79.

Slonczewski J, Rosen B, Alger J, Macnab R. 1981. pH homeostasis in *Escherichia coli* cells: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 78: 6271-6275.

Soto R, Caspeta L, Barrón B, Gosset G, Ramírez O, Lara A. 2001. High cell density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. Biochem Eng J. 56:165-171.

Stancik L, Stancik D, Shmidt B, Barnhart D, Yoncheva Y, Slonczewski J. 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 184:4246-4258.

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

- Taglicht D, Padan E, Schuldiner S. 1991. Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by *nhaA* (*ant*) from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 266: 11289–11294.
- Tzuberly T, Rimon A, Padan E. 2004. Mutation E252C increases drastically the K_m value for Na⁺ and causes an alkaline shift of the pH dependence of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 279:3265–3272.
- Ulmer J, Wahren B, Liu M. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med*. 12: 216-222.
- Verkhovskaya M, Verkhovsky M, Wikström M. 1992. pH dependence of proton translocation by *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 267:14559-14562.
- Wallenius J, Uuksulainen T, Salonen K, Rautio J, Eerikäinen T. 2011. The effect of temperature and pH gradients on *Lactobacillus rhamnosus* gene expression of stress-related genes. *Bioprocess Biosyst Eng*. 34:1169-1176.
- Walther W, Minow T, Martin R, Fichtner I, Schlag P, Stein U. 2006. Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral in vivo jet injection. *Hum Gene Ther*. 17:611-624 .
- Waterman S, Small P. 1996. Identification of σ S-dependent genes associated with the stationary phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*. 21:925–40.
- Wolf J. 2005. The acetate switch. *Microbiol and Mol Bio Rev*. 69:12-50.
- Wunderlich M, Taymaz-Nikerel H, Gosset G, Ramirez O, Lara A. 2014. Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains. *Biosci Bioeng*. 117: 336-342.
- Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors S. 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51: 564–571.
- Yau S, Keshavarz-Moore E, Ward J. 2008. Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes. *Biotechnol Bioeng*. 101: 529-544.

Yohannes E, Barnhart D, Slonczewski J. 2004. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 186: 192-199.

Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart C. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioform.* 7:85-97.

Zabriskie D, Acrcuri E. 1986. Factor influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb Technol.* 8:706-717.

Zhou K, Zhou L, Lim Q, Zou R, Stephanopoulos G, Too H. 2011. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol Biol.* 12:18.