



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *E. coli* RECOMBINANTE TERMOINDUCIBLE EN
PRESENCIA DE GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y
OXÍGENO DISUELTO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
GRETA ISABEL REYNOSO CERECEDA

DIRECTOR DE TESIS
DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

- Este proyecto fue realizado en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la asesoría del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.
- Al programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- A la beca recibida por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT), CVU 549681.
- Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (proyecto IN-211422) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Este proyecto se desarrolló en el marco del Programa Institucional del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM: “La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos”.
- Agradezco el apoyo técnico y científico del Ing. Abel Blancas Cabrera, la Dra. Norma A. Valdez-Cruz, la Dra. Sara Restrepo Pineda, el Dr. Giroshi Bando Campos y el Dr. Nestor O. Pérez.
- Al comité tutorial por su apoyo científico, al Dr. Juan Miranda Rios y el Dr. Alfredo Martínez Jiménez.
- Al jurado para el examen de grado por su tiempo y sus valiosas aportaciones:
Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, presidente
Dr. Carlos Felipe Peña Malacara, secretario
Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo, vocal
Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos, vocal
Dr. José Utrilla Carreli, vocal

DEDICATORIA

A mis padres y abuelos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente la oportunidad de estudiar, de aprender y crecer durante este proceso formativo.

Agradezco el acceso que brinda la UNAM a todo tipo de espacios, herramientas, conocimiento y experiencia. Especialmente a los diferentes recursos para el cuidado de la salud mental principalmente al Departamento de Psiquiatría y Salud Mental de la Facultad de Medicina y al programa de Espora psicológica.

Al Dr. Mauricio Trujillo y la Dra. Adriana Valdez Cruz por abrirme las puertas de la planta de bioprocesos, su laboratorio y grupo de investigación.

Al ingeniero Abel Blancas Cabrera por todo su apoyo, guía, compañía y comprensión.

A mis padres Gema Cereceda Alatorre y Mario Reynoso Aguilar por su apoyo incondicional y su comprensión siempre.

A Alejandro Salazar Bermúdez por su cálida compañía además de toda su paciencia y su apoyo.

A Larissa Reynoso Cereceda y Javier Arreola Reynoso por ser mis personas favoritas. Agradecimiento especial a Javier Arreola Reynoso por su participación y apoyo durante su estancia en el laboratorio en el verano de 2019 cuando realizamos la caracterización del flujo al interior del biorreactor de flujo pistón.

A mi padrino Francisco Cereceda por su apoyo siempre.

A mi hermano Daniel Juárez por nuestras aventuras y las que nos faltan.

A la Dra. Estefanía Morales Ruiz por su compañía, su asesoría académica y personal y por su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos por todo el tiempo y experiencias compartidas: Dani, Sara, Diego, Ram Gamboa, Ram García, Sandra, Saumel, Paulette, Jesús Rauda, Pato, Richie, Ximena, Daniel, Paola, Mayra, Banda y la Sra. Ma. Elena.

A Bakun por acompañarme siempre y a todos aquellos con los que he tenido la oportunidad de compartir.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	II
CONTENIDO	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. SISTEMA DE EXPRESIÓN TERMOINDUCIBLE EN <i>E. COLI</i>	4
2.2. AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CUERPOS DE INCLUSIÓN	8
2.3. CONDICIONES HETEROGÉNEAS AL INTERIOR DEL BIORREACTOR EN CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD CELULAR	13
2.4. RESPUESTAS MOLECULARES DE <i>E. COLI</i> AL AMBIENTE OSCILANTE EN EL INTERIOR DEL BIORREACTOR	17
2.5. PROTEÍNA MODELO	19
3. HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
5.2. METODOLOGÍA.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. ANÁLISIS DE RÉGIMEN.....	33
6.2. SISTEMA COMPARTAMENTALIZADO STR-PFR	36
6.3. CARACTERIZACIÓN DEL FLUJO AL INTERIOR DEL REACTOR PFR.....	37
6.4. CULTIVO DE <i>E. COLI</i> POR LOTE ALIMENTADO	41
6.5. CULTIVO DE <i>E. COLI</i> POR LOTE ALIMENTADO CON SIMULACIÓN DE LA ZONA DE ADICIÓN DE GLUCOSA	46
6.6. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA EN CULTIVOS POR LOTE ALIMENTADO DE <i>E. COLI</i> RHUGM-CSF.....	55
7. CONCLUSIONES	60
8. PERSPECTIVAS	61
9. REFERENCIAS	62
10. ANEXOS	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Bo	Número de Bodenstein
CI	Cuerpos de inclusión
DTR	Distribución de tiempos de residencia
DTRa	Distribución de tiempos de residencia acumulativa
F	Flujo a la entrada del biorreactor de flujo pistón
HSR	Respuesta de choque térmico
hsp	Proteínas de choque térmico
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
m	Coeficiente de mantenimiento celular
$m_s(t)$, f	Velocidad de flujo de la alimentación
PID	Proporcional-Integral-Derivativo
PFR	Biorreactor de flujo pistón
q	Velocidad de consumo específica
Q_c	Velocidad de circulación
rHuGM-CSF	Factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano.
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
STR	Biorreactor de tanque agitado
t	Tiempo de cultivo / tiempo característico
t_c	Tiempo de circulación
t_R	Tiempo de residencia promedio
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
u.a.	Unidades de absorbancia
V	Volumen
vvm	Volumen de aire por volumen de líquido por minuto
$Y_{X/S}$	Rendimiento estequiométrico de biomasa sobre glucosa
μ	Velocidad específica de crecimiento
μ_{ap}	Velocidad específica de crecimiento aparente
σ	Varianza

RESUMEN

Un desafío relevante en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas humanas es el cultivo celular en biorreactores de gran escala debido a la dificultad de mantener un ambiente homogéneo. Evaluar el efecto de los gradientes presentes en los biorreactores a escala productiva es posible mediante estrategias de laboratorio, como lo es el escalamiento descendente. Sin embargo, normalmente no se evalúan estos gradientes en cultivos por lote alimentado de alta densidad celular usando microorganismos con alta productividad. En estos cultivos, con células de *E. coli* produciendo proteínas recombinantes, los gradientes de la fuente de carbono (glucosa principalmente) y oxígeno disuelto presentes al interior del biorreactor en la zona de alimentación, propician una disminución importante del crecimiento celular y la productividad. En este trabajo se diseñó un sistema de escalamiento descendente de dos compartimentos para simular estos gradientes. Se construyó un biorreactor de flujo pistón (PFR) que simula la zona de adición de la fuente de carbono y se conectó a un biorreactor de tanque agitado (STR) que simula la sección homogénea del cultivo. Mostramos que en los cultivos de *E. coli* disminuyeron el crecimiento y la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos recombinante (rHuGM-CSF) durante la termoinducción al aumentar el tiempo de residencia dentro del PFR. Se pudo observar el agotamiento del oxígeno disuelto en el PFR como consecuencia del consumo de la glucosa alimentada en el puerto de entrada del mismo biorreactor. De igual manera, se presentó acumulación de ácido acético y fórmico, lo que indica la redirección de las rutas centrales del carbono a través del flujo metabólico y la fermentación ácida mixta. Adicionalmente, se observó que los cuerpos de inclusión, conteniendo la proteína recombinante, producidos en este sistema de escalamiento descendente tuvieron diferencias en su composición. Se demuestra aquí que para sistemas termoinducidos, el estrés asociado a la producción de proteínas recombinantes, en conjunto con el estrés térmico y nutricional (oxígeno y fuente de carbono) pueden limitar dramáticamente la productividad de proteína recombinante, al ser comparados con cultivos sin la presencia del estrés nutricional.

ABSTRACT

A relevant challenge in manufacturing human therapeutic recombinant proteins at large scale is the culture growth in large-productive bioreactors due to the difficulty of maintaining a homogeneous environment. Evaluating the effect of the gradients in bioreactors at an industrial scale is possible through laboratory strategies such as scale-down. However, these gradients are not typically evaluated in high cell density fed-batch cultures when using microorganisms with high productivity. In these cultures, having *E. coli* cells producing recombinant proteins, the carbon source (mainly glucose) and dissolved oxygen gradients inside the bioreactor in the feeding zone, promote an important decrease in cell growth and productivity. In this work, a two-compartment scale-down system was designed to simulate these gradients. A plug flow bioreactor (PFR) simulating the carbon source addition zone was constructed and connected to a stirred tank bioreactor (STR) simulating the homogeneous section of the culture. We found that in *E. coli* cultures, growth and production of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rHuGM-CSF) decreased during thermoinduction with increasing residence time within the PFR. The depletion of dissolved oxygen in the PFR was observed associated to the consumption of glucose fed into the inlet port of the same bioreactor. Accumulation of acetic and formic acid was also observed, indicating a metabolic redirection of the central carbon pathways through metabolic flux and mixed acid fermentation. Likewise, it was observed that the inclusion bodies produced in this scale-down system had differences in their composition. It is demonstrated here that for thermo-induced systems, the stress associated with the production of recombinant proteins, together with heat and nutritional stress (oxygen and carbon source), can dramatically limit the productivity of these systems compared to cultures without nutritional stress.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema de expresión termoinducible en *E. coli* de alta densidad celular es atractivo, y ampliamente usado en la producción de proteína recombinante con aplicaciones terapéuticas en la escala productiva (Restrepo-Pineda *et al.*, 2021; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). La estrategia de cultivo con estos sistemas se realiza en dos etapas, en la primera se busca generar un cultivo de alta densidad por lote alimentado y posteriormente inducir la producción mediante calentamiento por arriba de los 37°C (Caspeta *et al.*, 2009, 2013; Caspeta Guadarrama, 2009; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). El incremento de temperatura desencadena al interior de las células la respuesta de choque térmico, dicha respuesta converge con la respuesta a la sobreproducción de proteína heteróloga y su acumulación en cuerpos de inclusión (Restrepo-Pineda *et al.*, 2021; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022).

Por otra parte, se ha evidenciado que al interior de los biorreactores de tanque agitado a gran escala se genera un ambiente heterogéneo donde las células encuentran gradientes de concentraciones de nutrientes (Lara, Galindo, *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2009; Losoi, Kontinen and Santala, 2024). Previamente se ha estudiado el desempeño de cultivos con un sistema de expresión termoinducido en función de las velocidades de calentamiento típicas de biorreactores industriales, mostrando que las velocidades de calentamiento más lentas son favorables para la producción de proteína recombinante, y favorecen su agregación selectiva en cuerpos de inclusión (Caspeta *et al.*, 2009, 2013; Caspeta Guadarrama, 2009). Sin embargo, se desconoce el impacto que pueda tener el ambiente heterogéneo al interior del biorreactor sobre la producción de proteína recombinante en cultivos termoinducidos. En el presente trabajo se discute la presencia de gradientes de glucosa y oxígeno disuelto al interior de biorreactores industriales en cultivos de *E. coli* de alta densidad celular y se busca su reproducción a nivel laboratorio mediante una aproximación por escalamiento descendente. Esto con el fin de estudiar su posible impacto sobre la producción de proteína recombinante, el desarrollo de la respuesta de choque térmico y la formación de los cuerpos de inclusión.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema de expresión termoinducible en *E. coli*

Escherichia coli se ha mantenido como un huésped atractivo para la producción industrial de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas (Huang, Lin and Yang, 2012; Baeshen *et al.*, 2015; Gupta and Shukla, 2016; Jia Baolei and Ok Jeon, 2016; Ferreira, Azzoni and Freitas, 2018; Rani, Katiyar and Rathore, 2024). Es una bacteria de rápido crecimiento en medios simples que puede alcanzar alta densidad celular, de la cual se tiene un amplio conocimiento de su genoma, su fisiología y su metabolismo (Huang, Lin and Yang, 2012; Rosano and Ceccarelli, 2014; Baeshen *et al.*, 2015; Gupta and Shukla, 2016; Incir and Kaplan, 2024), lo que la convierte en un hospedero versátil con la capacidad de alcanzar altos niveles de expresión de proteína heteróloga, llegando hasta 30% de la proteína celular total (Huang, Lin and Yang, 2012; Baeshen *et al.*, 2015; Incir and Kaplan, 2024).

Dentro de la variedad de vectores de expresión que se usan en *E. coli*, el sistema de expresión regulado por temperatura ha resultado conveniente para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (Caulcott and Rhodes, 1986; Makrides, 1996; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). Su principio está basado en el uso del promotor fuerte *pL* y/o *pR* del bacteriófago λ que es regulado finamente en combinación con el represor *ci857* (sensible a temperatura) que interacciona con las regiones del operador (*oL3/oR3*, *oL2/oR2* y *oL1/oR1*). Dicha interacción con el represor *ci857* pierde estabilidad a temperaturas mayores a 37°C, permitiendo la transcripción por parte de la RNA polimerasa (Figura 1) (Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). Este sistema termoinducible ha probado ser altamente productivo, hasta 30% de la proteína celular total (Schmidt *et al.*, 1999; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022), teniendo la ventaja de evitar el uso de inductores químicos y de reducir el manejo del cultivo (Caulcott and Rhodes, 1986; Makrides, 1996; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021).

El cultivo de alta densidad celular de *E. coli* con el sistema de expresión termoinducible sigue una estrategia de dos etapas (Figura 1); en la primera se busca

lograr una concentración alta de biomasa y las células se alimentan y crecen a 29-34°C. En la segunda etapa se induce la sobreexpresión de la proteína heteróloga mediante calentamiento (>38°C) (Schmidt *et al.*, 1999; Caspeta *et al.*, 2009, 2013; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). El incremento de la temperatura durante la inducción desencadena la respuesta de choque térmico (HSR) que mantiene la homeostasis celular e incrementa la termotolerancia. La HSR está regulada por el factor σ^{32} , que induce la sobreexpresión de las proteínas de choque térmico (hsp) que incluyen chaperonas (como IbpA/B, ClpB, DnaK/J y GroEL/S) y proteasas (como Lon, ClpP, ClpC, y FtsH) que protegen a la célula de las proteínas desnaturalizadas térmicamente y previenen la agregación (Nonaka *et al.*, 2006; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021).

La actividad del factor σ^{32} es regulada mediante un circuito de retroalimentación negativa mediante su interacción con chaperonas como DnaK/J y GroEL/S impidiendo su interacción con la RNA polimerasa y promoviendo su degradación mediada por FtsH (Yamamori and Yura, 1980; Guisbert *et al.*, 2008; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021).

Por otra parte, la sobreexpresión de proteína heteróloga por si sola puede desencadenar una respuesta tipo HSR, promoviendo la actividad de σ^{32} mediante el reclutamiento de chaperonas y proteasas requeridas por las proteínas mal plegadas resultado de una elevada velocidad de síntesis y una alta concentración citoplasmática (Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). Las respuestas moleculares al calentamiento y la sobreexpresión de proteína recombinante convergen en la sobreexpresión de chaperonas y proteasas y siguen un comportamiento transitorio: arriba de los 34°C el título de estas proteínas incrementa rápidamente durante (~5 min) hasta alcanzar un máximo, en seguida se da una fase de adaptación en la que el número de las hsp disminuye (Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011;

Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). En respuesta al calentamiento, las hsp disminuyen después de aproximadamente 40 min hasta un nivel estacionario característico de la nueva temperatura; mientras que la respuesta desencadenada por la sobreexpresión de proteína recombinante se mantiene por más tiempo (Yamamori and Yura, 1980; Guisbert *et al.*, 2008; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011). La convergencia de ambas respuestas fue analizada a nivel transcripcional en cultivos de *E. coli* expresando rPIH (preproinsulina humana) regulada bajo el promotor λpL , donde se encontró que las hsp (DnaK/J, ClpB, GroEL, IbpA/B) fueron sobreexpresadas (2-40x) al incrementar la temperatura de 30 a 42°C, mientras que los niveles transcripcionales de genes relacionados a la regulación de la HSR (*rpoH* y *ftsH*) incrementaron en menor medida (0.5-1.5x) (Caspeta *et al.*, 2009).

Otra vía que es inducida mediante sobreexpresión de proteínas recombinantes es la respuesta de choque térmico en el espacio extracitoplasmático (Chou, 2007). Esta respuesta está regulada por el factor σ^{24} y responde a estímulos como: el incremento de temperatura, proteínas de la membrana externa mal plegadas, y a cambios en los lipopolisacáridos de la membrana externa (Mecsas *et al.*, 1993; Tam and Missiakas, 2005). Los genes que induce esta respuesta tienen funciones relacionadas con la integridad de la envoltura celular, el transporte, la traducción, y la lisis celular en fase estacionaria. Las principales chaperonas periplásmicas inducidas por esta vía son DegP y FkpA (Nitta *et al.*, 2000; Kabir *et al.*, 2005; Rhodius *et al.*, 2006; Chou, 2007). En consecuencia, a las respuestas desencadenadas, la síntesis proteica puede triplicarse (Hoffmann and Rinas, 2001), incrementando la inversión energética y de precursores anabólicos que competirán con el aparato de traducción (Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Carneiro, Ferreira and Rocha, 2013; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). Cuando los aminoácidos disponibles se agotan la alarmona (p)ppGpp activa la respuesta estricta y el proceso de traducción se detiene (Harcum and Bentley, 1999; Sandén *et al.*, 2003).

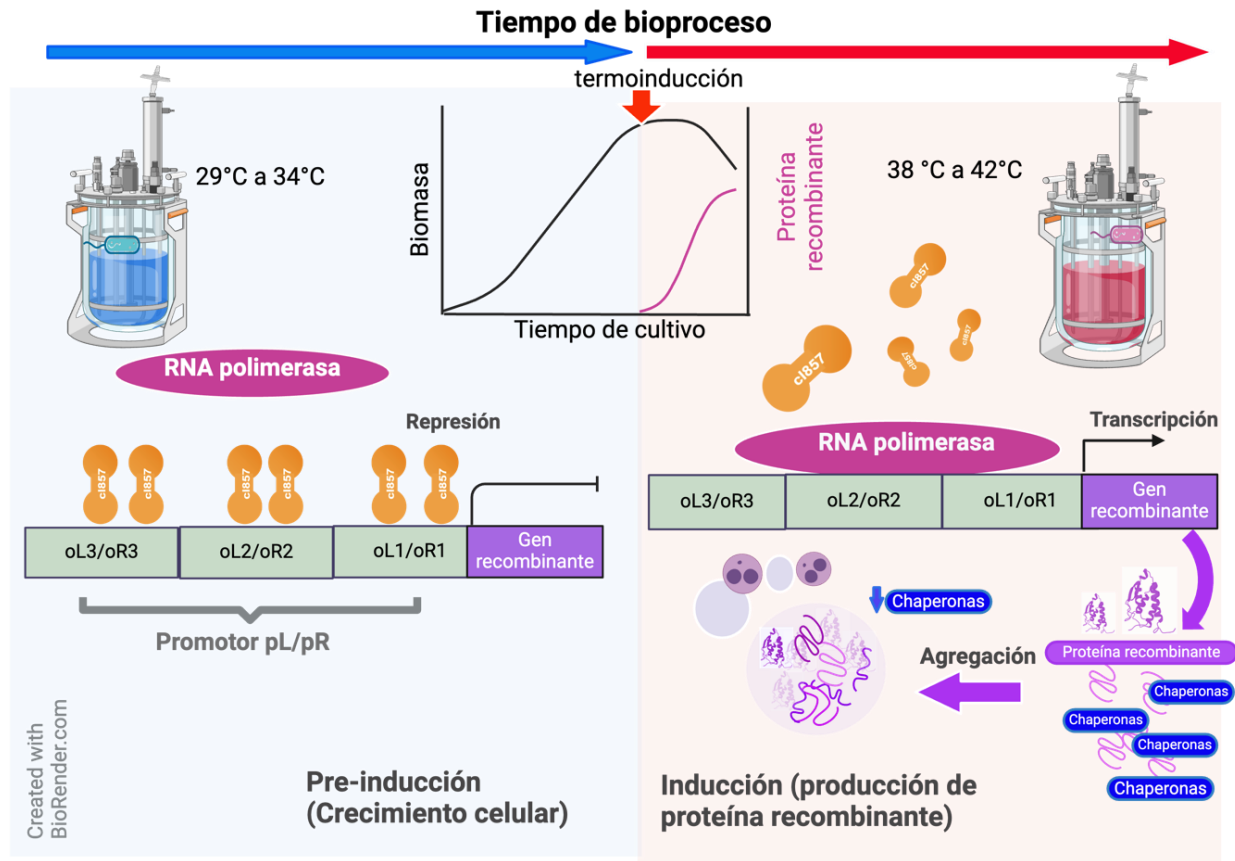


Figura 1. El cultivo de *E. coli* con el sistema de expresión termoinducible sigue una estrategia de dos etapas; en la primera se busca lograr una concentración alta de biomasa y las células se alimentan y crecen a 29-34°C. En la segunda etapa se induce la sobreexpresión de la proteína heteróloga mediante calentamiento (>38°C). La sobreproducción de la proteína heteróloga puede superar la capacidad para el plegamiento asistido de polipéptidos y favorecer su acumulación en cuerpos de inclusión. Figura generada con BioRender, permiso de uso en Anexo I.

Los cambios fisiológicos que experimentan las células durante la termoinducción y producción de proteína recombinante incluyen la modificación de la velocidad de síntesis proteica, la disminución en la velocidad de crecimiento, cambios en la composición de lípidos y proteínas integrales de la membrana, destrucción de ribosomas y relajación del ADN (Yamamori and Yura, 1980; Grossman, Erickson and Gross, 1984; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz, Ramírez and Trujillo-Roldán, 2011; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021). Existen varias estrategias para disminuir los efectos, que pueden ser negativos en productividad, del incremento de la temperatura en los sistemas termoinducidos. Estos pueden ser tan diversos como

reducir la temperatura de inducción o de pre-inducción (Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022), controlar la velocidad de calentamiento (Caspeta *et al.*, 2009, 2013; Caspeta Guadarrama, 2009), o modificar otras condiciones ambientales como pH y oxígeno disuelto (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Gómez Gil, 2020; Rauda Ceja, 2020).

Caspeta *et al.*, (2009), realizaron el primer estudio de escalamiento descendente que evaluó los gradientes de temperatura que son requeridos para inducir una cepa de *E. coli* con el sistema de expresión λpL -cl857. En su trabajo ellos reprodujeron diferentes velocidades de calentamiento de entre 0.4 y 6°C/min, típicas de reactores de entre 0.1 y 100 m³, respectivamente. Los autores evaluaron el desempeño de los cultivos de alta densidad en cuanto a crecimiento y producción de metabolitos y de la preproinsulina humana recombinante (rHPPI), además de la respuesta transcripcional. A velocidades bajas de calentamiento el proceso fue más productivo y hubo una respuesta disminuida al estrés generado por la inducción, sugiriendo una adaptación de las células con velocidades de calentamiento de entre 0.4 y 1.7°C/min. A velocidades altas de calentamiento se dieron desbalances entre la glicólisis y el ciclo de TCA, se encontró una mayor concentración de ácidos orgánicos excretados al medio de cultivo y se redujo la productividad (disminuyó cerca de un 40%), probablemente como resultado del gasto energético adicional requerido para generar una rápida respuesta al estrés inducido por el cambio de temperatura (Caspeta *et al.*, 2009, 2013).

2.2. Agregación de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión

Las proteínas heterólogas producidas en el ambiente reductor del citosol de *E. coli* difícilmente alcanzan en su totalidad la conformación nativa. La estructuración funcional de las proteínas al interior de *E. coli* es un proceso dependiente de energía asistido por chaperonas (Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021; Rajacharya, Sharma and Yazdani, 2024). La sobreexpresión de proteína heteróloga puede superar la capacidad para el plegamiento asistido de polipéptidos y favorecer su acumulación en cuerpos de inclusión (Figura 1) (CI) (Villaverde and Carrió, 2003; Ventura and Villaverde, 2006; Sabate, De Groot and Ventura, 2010; Humer and

Spadiut, 2018; De Marco *et al.*, 2019; Igwe *et al.*, 2024; Rani, Katiyar and Rathore, 2024). Los CI se caracterizan por ser partículas densas, refractiles, insolubles en agua, porosas, mecánicamente estables, de forma esférica o cilíndrica (Villaverde and Carrió, 2003; Ventura and Villaverde, 2006). Aunque la acumulación de proteína recombinante en CI requiere posteriores pasos de solubilización y replegamiento (Nabiel *et al.*, 2023), la producción industrial de proteínas recombinantes en CI es una práctica común que se beneficia de sus ventajas, ya que son sistemas altamente productivos con altos rendimientos de proteína, facilitan su aislamiento con alta concentración y pureza, además de protegerla del ataque de proteasas (Makrides, 1996; Fahnert, Lilie and Neubauer, 2004; Baeshen *et al.*, 2015; De Marco *et al.*, 2019; Slouka *et al.*, 2019).

Los CI tienen una importante concentración de la proteína heteróloga, que puede llegar a tener valores tan altos como del 90%, que estaría presente en diferentes estados conformacionales, que van desde la estructuración nativa correctamente plegada, la estructura de intermediarios de plegamiento y productos de degradación proteolítica (Ventura and Villaverde, 2006; Jürgen *et al.*, 2010; García-Fruitós *et al.*, 2012; De Marco *et al.*, 2019). Además, contienen estructuras ricas en hojas- β de tipo amiloide (Carrió *et al.*, 2005; de Groot and Ventura, 2006; Sabate, De Groot and Ventura, 2010; García-Fruitós *et al.*, 2012; De Marco *et al.*, 2019). Otros componentes de los CI son proteínas de hospedero, componentes de la membrana y ácidos nucleicos (Ventura and Villaverde, 2006; Rinas *et al.*, 2007, 2017; De Marco *et al.*, 2019).

Particularmente, las proteínas de hospedero asociadas a los CI incluyen a las chaperonas IbpA/B, DnaJ, DnaK, GroEL / ES, ClpB y EF-TU (Allen *et al.*, 1992; Rinas and Bailey, 1992; Jürgen *et al.*, 2000, 2010; Carrió and Villaverde, 2005; Rinas *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2017) cuya presencia se asocia con la dinámica molecular de su agregación/desagregación. De igual manera, se encuentran proteínas de la maquinaria transcripcional como las subunidades ribosomales L7, L12 y L2 (Rinas and Bailey, 1992; Chen, 2009). Además, proteínas citosólicas con diversas funciones metabólicas que pueden quedar atrapadas en los CI durante su formación como MetE, GatZ, GatY, MalB, TnaA, LpdA y GS (Rinas *et al.*, 2007; Caspeta

Guadarrama, 2009; Chen, 2009). Por otra parte, han sido reportadas proteínas relacionadas con los sistemas de sobreexpresión como la proteína que confiere resistencia a kanamicina, el precursor de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, β -galactosidasa sobreexpresada por la adición del inductor IPTG, y la proteína represora cl857 utilizada en los sistemas de expresión termoinducibles (Rinas *et al.*, 2007; Caspeta Guadarrama, 2009; Chen, 2009; Jürgen *et al.*, 2010). También pueden encontrarse proteínas de membrana que co-precipitan durante la purificación de los CI como OmpT, OmpF, OmpC, OmpA y SdhA como parte de la fracción insoluble del lisado celular y que pueden ser retiradas incluyendo pasos posteriores de lavado con detergentes. Me llama la atención esta proteína que es una subunidad de la succinato deshidrogenasa (Rinas and Bailey, 1992; Fahnert, Lilie and Neubauer, 2004; Rinas *et al.*, 2007; Caspeta Guadarrama, 2009).

Las estructuras de los CI resultan del equilibrio dinámico entre los procesos de plegamiento, desagregación y proteólisis asistidos por la maquinaria de control de calidad proteica de la célula y la continua y acelerada síntesis de proteína recombinante (Villaverde and Carrió, 2003; Sabate, De Groot and Ventura, 2010). Es así, como la diversidad de la composición proteica y estructural de los CI puede ser altamente variable como resultado de las características de proteína recombinante y del mismo hospedero, y se ve fuertemente afectada por cambios en las condiciones de cultivo, el fondo genético del hospedero y los procedimientos de purificación (Jürgen *et al.*, 2010; Rinas *et al.*, 2017; De Marco *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda *et al.*, 2021).

Las condiciones de cultivo impactan en diferente medida las características de los CI, actualmente se estudia su potencial para lograr CI con características específicas en función de su control durante el cultivo (Slouka *et al.*, 2018, 2019; De Marco *et al.*, 2019). Por ejemplo, el tiempo de cultivo aumenta el tamaño de los CI, se incrementa la concentración de proteína recombinante y del contenido tipo amiloide (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014). Aumentar la temperatura favorece la agregación de los CI y reducirla favorece los procesos de plegamiento (de Groot and Ventura, 2006). El pH ácido del cultivo promueve la formación de CI, mientras que las condiciones de pH básico durante la inducción rinden menos estructuración

tipo amiloide (Calcines-Cruz *et al.*, 2018). Disminuir la concentración del inductor (IPTG) disminuye la agregación y puede aumentar la concentración de proteína recombinante en el CI (Margreiter *et al.*, 2008). En cuanto a los parámetros fisiológicos se ha reportado que disminuir la velocidad de crecimiento resulta en CI menos abundantes y con menor proteína recombinante; e incrementar la velocidad específica de consumo de glucosa durante la inducción por IPTG favorece la productividad, la pureza y el tamaño de los CI (Slouka *et al.*, 2018).

Las cinéticas de agregación de CI fueron evaluadas durante la termoinducción de rHPPI, en el trabajo de Caspeta y colaboradores (2009) en función de la velocidad de calentamiento durante la inducción (como se describió en la sección anterior). Las velocidades rápidas de calentamiento promovieron una agregación de proteína en CI acelerada durante las primeras 4 h de la inducción alcanzando un máximo de 0.1 g_{CI}/g_x (g de proteína en el CI por g de biomasa celular), con una concentración de rHPPI del 40%. En cambio, a la menor velocidad de calentamiento (0.4°C/min), que rindió la mejor productividad y rendimiento de rHPPI, los CI alcanzan 0.08 g_{CI}/g_x y una pureza del 70%. Los autores concluyen que una velocidad lenta de calentamiento propicia una agregación selectiva de la proteína recombinante en los CI (Caspeta *et al.*, 2009). Adicionalmente, evaluaron diferentes estrategias de alimentación de fuente de carbono durante la inducción. Si bien la estrategia a menor velocidad de alimentación generó menores concentraciones de rHPPI en las primeras 4 h, la agregación en todas las condiciones fue de 0.08 g_{CI}/g_x con una pureza del 70% de rHPPI (Caspeta Guadarrama, 2009).

En términos de cuerpos de inclusión producidos en sistemas termoinducidos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que tanto la temperatura de pre-inducción como la temperatura de inducción afectan la productividad de la proteína recombinante rHuGM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano) y la composición de los CI (Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). De igual manera, llevar los cultivos bajo condiciones controladas en biorreactores de tanque agitado, donde el oxígeno disuelto siempre estaría disponible y el pH controlado, modifica la estructura y composición de los cuerpos de inclusión de una proteína recombinante

de *M. tuberculosis* (ESAT-6) al ser comparados con cultivos en matraces agitados, donde el oxígeno disuelto es limitante y el pH disminuye como respuesta a la producción de ácidos orgánicos (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019). De igual manera, el tamaño de los cuerpos de inclusión y su arquitectura, en la producción termoinducida de rHuGM-CSF está afectada por la tensión de oxígeno disuelto en cultivos sumergidos en biorreactor (Gómez Gil, 2020). A bajas tensiones de oxígeno disuelto (5 y 10%) se presenta mayor productividad de la proteína recombinante, acompañado en una disminución de la velocidad específica de crecimiento, al ser comparado con valores más altos y comúnmente usados en la industria (30 y 70% de TOD) (Gómez Gil, 2020). Estudios preliminares han mostrado que el pH tiene un efecto relevante sobre los parámetros estequiométricos de los cultivos termoinducidos en la producción de rHuGM-CSF (Rauda Ceja, 2020), pero no determinante en la arquitectura de los cuerpos de inclusión. En este sentido, se puede pensar que la temperatura y el oxígeno disuelto tienen un mayor efecto en la determinación de las características estructurales de los cuerpos de inclusión sobre el pH (Rauda Ceja, 2020).

La arquitectura de los CI está dada por su composición, la cantidad de la proteína recombinante contenida en los CI y sus características estructurales, que son parámetros que definen la calidad de los CI (Slouka *et al.*, 2019). El rendimiento de la recuperación de los CI y la purificación de la proteína recombinante, derivado de la obtención, lavado, solubilización, replegamiento y purificación de las proteínas recombinantes depende de su calidad (Jürgen *et al.*, 2010). La purificación es el paso limitante de los bioprocesos basados en CI (Lee *et al.*, 2006), por lo que lograr una calidad definida y reproducible es de gran interés para el desarrollo de bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Entender y desarrollar estrategias basadas en el control de las condiciones de cultivo para modular las características de los CI producidos es un área de estudio en crecimiento (De Marco *et al.*, 2019).

2.3. Condiciones heterogéneas al interior del biorreactor en cultivos de alta densidad celular

En comparación a los procesos desarrollados a escala laboratorio, los cultivos en la escala productiva han mostrado dificultades para reproducir los resultados obtenidos con disminución en cuanto a concentraciones de biomasa, viabilidad celular y productividad (Larsson *et al.*, 1996; Onyeaka, Nienow and Hewitt, 2003; Lara, Leal, *et al.*, 2006; Neubauer and Junne, 2010). Lo anterior es resultado de las deficiencias en la agitación del biorreactor, que incrementan los tiempos de mezclado y de circulación al interior del biorreactor dando lugar a gradientes de concentración de los sustratos necesarios para el crecimiento (Larsson *et al.*, 1996; Amanullah, McFarlane, Emery and Nienow, 2001; Neubauer and Junne, 2010; Noorman, 2011). La disponibilidad de los nutrientes puede variar en concentración desde la ausencia total en algunas regiones hasta alta concentración y viscosidad cerca del punto de alimentación. Previamente se han medido concentraciones de 5-2000 mg/L de glucosa en un biorreactor en función de la posición y el tiempo de cultivo (Bylund *et al.*, 1998). Es posible tener zonas con 0 de concentración de nutrientes en un biorreactor, conocidas como "zonas de inanición" o "zonas muertas", donde al menos un nutriente está agotado. Estas zonas pueden representar entre el 15% y el 50% del volumen operativo del biorreactor. La distribución desigual de nutrientes se ve exacerbada por la demanda celular. Además, la solubilidad de los nutrientes puede variar dentro del biorreactor debido a diferentes factores físicos y químicos, como la presión hidrostática y la temperatura. Por ejemplo, la solubilidad del oxígeno, dióxido de carbono y otros gases aumenta en el fondo de los recipientes altos debido a la presión hidrostática (Bylund *et al.*, 1998, 1999).

La mayoría de los cultivos de *E. coli* a escala industrial se realizan en biorreactores de tanque agitado, de entre 0.05 y 20 m³, con técnicas de lote alimentado con el fin de conseguir altas densidades celulares (>20 g/L) (Larsson *et al.*, 1996; Amanullah, McFarlane, Emery and Nienow, 2001; Neubauer and Junne, 2010; Noorman, 2011). En general se suelen utilizar medios de cultivo definidos donde se controla la velocidad de crecimiento mediante la alimentación de glucosa (~500 g/L) como

fuelle de carbono (Larsson *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999; Fahnert, Lilie and Neubauer, 2004; Neubauer and Junne, 2010; Mayer *et al.*, 2023). Dicha alimentación se realiza típicamente en un punto fijo del biorreactor, en consecuencia, se forma una zona de alta concentración de glucosa en la región adyacente a dicho punto (Larsson *et al.*, 1996; Bylund *et al.*, 1998). En dicha zona se presenta alta actividad metabólica del microorganismo, con un alto consumo de oxígeno, y en algunos casos la limitación de oxígeno y la alta concentración de la fuente de carbono favorece la producción de subproductos que acidifican el medio (Palomares, Lara and Ramírez, 2010). Lo mismo sucede con los puertos de adición de álcali, o base para controlar pH; en dichas zonas se pueden encontrar zonas con diferencias de más un punto del valor de pH (Neubauer and Junne, 2010; Palomares, Lara and Ramírez, 2010).

Por otro lado, la glucosa se agota por completo en las regiones alejadas del punto de alimentación dejando sin fuente de carbono a las células durante su paso por dichas zonas (Palomares, Lara and Ramírez, 2010; Löffler *et al.*, 2016; Nadal-Rey *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2024). Los gradientes se intensifican en cultivos de alta densidad celular propiciando que al interior del biorreactor se formen al menos dos regiones: una zona de mezclado homogéneo, en la cual la concentración de todos los nutrientes es la misma durante la duración del cultivo y la zona de adición de glucosa, con concentraciones superiores de glucosa y baja disponibilidad de oxígeno disuelto (7-10% del volumen total del reactor) (Xu *et al.*, 1999; Onyeaka, Nienow and Hewitt, 2003; Haringa *et al.*, 2016, 2017; Löffler *et al.*, 2016; Nieß *et al.*, 2017; Haringa, Mudde and Noorman, 2018; Olughu *et al.*, 2019).

Al transcurrir por cada una de estas zonas las células desencadenan respuestas para contender y adaptarse a cada una de las condiciones experimentadas (Palomares, Lara and Ramírez, 2010; Noorman, 2011; Nadal-Rey *et al.*, 2021). Por ejemplo, en la región de mezclado homogéneo, la fuente de carbono se mantiene en una concentración limitante, y las células adaptan la transcripción de transportadores de membrana para incrementar el espectro de consumo de azúcares (Schweder *et al.*, 1999; Ferenci, 2001; Lara *et al.*, 2009; Löffler *et al.*, 2016). El tiempo que pasen las células en otras regiones del biorreactor definirá las respuestas moleculares (Palomares, Lara and Ramírez, 2010). En este sentido, el

análisis de régimen es una aproximación útil para predecir los fenómenos limitantes del bioproceso; cuando el tiempo de mezclado es del mismo orden o mayor al de los procesos celulares se limita la velocidad de diferentes procesos fisiológicos (Lara, Leal, *et al.*, 2006; Nadal-Rey *et al.*, 2021).

Los tiempos de mezclado de biorreactores industriales para cultivos microbianas van de 10-60 s pudiendo ser aún mayores. Por ejemplo, para un biorreactor con 22 m³ de volumen de operación el tiempo de mezclado puede ser hasta de 250 s dependiendo las condiciones de aireación y agitación (Vrábel *et al.*, 2000; Delvigne, Destain and Thonart, 2006; Noorman, 2011; Nadal-Rey *et al.*, 2021). En estos biorreactores el tiempo que le toma a una célula recorrer las diferentes regiones del biorreactor antes de volver al mismo punto, es decir, el tiempo de circulación, alcanza los 40 s (Haringa, Mudde and Noorman, 2018; Nadal-Rey *et al.*, 2021). Algunos de los procesos que ocurren en la misma ventana de tiempo y que pueden verse limitados en las células de *E. coli* incluyen: catálisis enzimática (10^{-8} - 10^{-6} s), recambio de metabolitos centrales del carbono (0.6-3.1 s), recambio de aminoácidos (80-229 s), recambio de nucleótidos de adenina (0.8-9.4 s), transcripción (23-83 s para 1 kb), síntesis de proteínas (10-100 s), vida media de mensajeros de RNA (120-360 s) y el plegamiento de proteínas (10^{-5} - 10^2 s) (Baracchini and Bremer, 1987; Palomares, Lara and Ramírez, 2010; Lara *et al.*, 2017; Nadal-Rey *et al.*, 2021).

El análisis experimental de las respuestas celulares a los microambientes que encuentran en el reactor es complicado y costoso en la escala productiva. El escalamiento descendente (scale-down) es una estrategia útil para imitar y estudiar estas respuestas en sistemas de escala laboratorio, y consiste en la reproducción de los gradientes a estudiar en función del tiempo y/o del espacio (Oosterhuis *et al.*, 1985; Neubauer and Junne, 2010, 2016; Palomares, Lara and Ramírez, 2010; Anane *et al.*, 2019; Anane, Knudsen and Wilson, 2021; Nadal-Rey *et al.*, 2021). Para lo anterior se han utilizado sistemas de uno, dos o más compartimentos por los que obligan a las células a contender con ambientes cambiantes y en muchos casos limitantes (Hewitt *et al.*, 2000, 2007; Neubauer and Junne, 2010, 2016; Anane *et al.*, 2019; Paul and Herwig, 2020; Anane, Knudsen and Wilson, 2021). En los sistemas de dos o más compartimentos, se recirculan las células: cada compartimento

reproduce una condición (por ejemplo, alta o baja concentración del nutriente limitante). La configuración de dos compartimentos conformados por un STR (biorreactor de tanque agitado) y un PFR (biorreactor de flujo pistón) conectados en serie permite reproducir los tiempos de circulación como tiempos de residencia en el PFR (Delvigne, Destain and Thonart, 2006; Anane, Knudsen and Wilson, 2021; Mayer *et al.*, 2023; Thi Doan, Kremling and Morchain, 2024). Estos sistemas han mostrado su utilidad para generar gradientes de concentración, reproduciendo el comportamiento de los cultivos en biorreactores de escala industrial, principalmente de microorganismos con alta demanda metabólica (George, Larsson and Enfors, 1993; Xu *et al.*, 1999; Onyeaka, Nienow and Hewitt, 2003; Hewitt *et al.*, 2007; Paul and Herwig, 2020; Thi Doan, Kremling and Morchain, 2024).

Aunque la mayoría de los estudios de escalamiento descendente han resuelto la simulación de los gradientes ambientales de un parámetro, la existencia de más de un gradiente simultáneamente es la situación más probable (Palomares, Lara and Ramírez, 2010; Anane, Knudsen and Wilson, 2021). Previamente se incluyó la evaluación de los gradientes de pH, de glucosa y de oxígeno disuelto mediante la reproducción de las zonas de adición de glucosa y de álcali a la entrada de un reactor PFR conectado a un STR, impactando negativamente la concentración celular de *E. coli* (Hewitt *et al.*, 2000, 2007; Onyeaka, Nienow and Hewitt, 2003). Los resultados de un cultivo industrial de 20 m³ fueron mejor imitados en este sistema cuando se reprodujo un tiempo de residencia en el PFR de 50 s (Onyeaka, Nienow and Hewitt, 2003). Los experimentos se repitieron con una cepa recombinante, donde se reprodujo el impacto negativo en la concentración celular, efecto que se vio intensificado cuando se indujo la sobreexpresión y sobreproducción de la proteína recombinante, disminuyendo también la viabilidad celular. Aunque los autores reportaron la producción de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión, no se mostraron datos del análisis sobre la cantidad o calidad de la proteína sobreexpresada (Hewitt *et al.*, 2007).

2.4. Respuestas moleculares de *E. coli* al ambiente oscilante en el interior del biorreactor

Antes de revisar las posibles respuestas celulares ante los gradientes de concentración de nutrientes generados por las deficiencias de mezclado en los biorreactores, es importante tener en cuenta que los cultivos alimentados que alcanzan alta densidad celular mantienen concentraciones limitantes de uno más nutrientes. Estos representan en sí mismos un estrés para las células que pueden encender la respuesta general de estrés, la respuesta estricta y la respuesta de choque térmico en el espacio extracitoplasmático (Ferenci, 2001; Löffler *et al.*, 2017). Por ejemplo, las chaperonas DnaK y GroEL, dos de las muchas conocidas como proteínas de choque térmico, se encontraron previamente sobreexpresadas en el análisis transcriptómico y proteómico de cultivos de alta densidad celular (Yoon *et al.*, 2003). Este conocimiento ha generado propuestas tan interesantes como el uso de la misma respuesta a estrés para contender con ambientes cambiantes. Así, se ha reportado que la sobreexpresión heteróloga de estas proteínas de choque térmico da mayor tolerancia a cultivos de *E. coli* expuestos a gradientes en escalas industriales y de alta densidad celular, al igual que pueden aumentar la producción de proteínas recombinantes (Ahn and Im, 2020).

Los estudios de escalamiento descendente han evidenciado experimentalmente los mecanismos que desencadenan las células de *E. coli* para contender con las heterogeneidades al interior del biorreactor, con la detección de marcadores moleculares que cambian sus niveles dentro de la ventana de tiempo típica de los tiempos de circulación y mezclado (~1 min). En este sentido, el incremento en la concentración de acetato y formato después del pulso de glucosa a la entrada de un biorreactor de flujo pistón (PFR) en condiciones anaerobias fue detectado desde los 2 s, y a los 20-40 s en condiciones aerobias (Lara *et al.*, 2009). El sobre flujo metabólico y la fermentación ácido-mixta se presentan principalmente en la región de adición de glucosa, en las zonas donde la disponibilidad de oxígeno es muy baja, y cuando se expone a las células a cambios de pH (de 7.2 a 8 en periodos de tiempo de 60-240 s). La evidencia de estos procesos incluye tanto la acumulación de metabolitos como acetato, lactato, formato, succinato y etanol, como cambios en la

expresión de mRNA de genes participantes en las rutas fermentativas, reguladores del metabolismo aerobio/anaerobio, citocromos y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Xu *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2016). Por otra parte, condiciones oscilantes de pH también ocasionan cambios en la expresión de genes de transportadores de iones, catabolismo de aminoácidos y reguladores transcripcionales (Cortés *et al.*, 2016).

A pesar de que solo una fracción de la población celular experimenta las heterogeneidades relacionadas a diferentes regiones al interior del biorreactor en intervalos cortos de tiempo, la exposición repetida a lo largo del cultivo puede desencadenar respuestas a nivel metabólico, transcripcional y proteómico. El estrés inducido localmente en el PFR induce la respuesta molecular, que es propagada en el STR, propiciando subpoblaciones que coexisten temporalmente. La evidencia experimental mostró que una respuesta transcripcional se desarrolla completamente en segundos, sin embargo, lograr los consecuentes niveles estables de proteína puede requerir hasta 10 h (Löffler *et al.*, 2016; Nieß *et al.*, 2017), que se equipara con el tiempo que duran los cultivos. El análisis del proteoma extracelular de una cepa recombinante de *E. coli* mostró cambios importantes luego de 24 h en un sistema STR-PFR simulando la zona de adición de glucosa en el PFR, en comparación a un cultivo homogéneo (STR). El reporte muestra una mayor concentración de porinas y transportadores periplasmáticos, y una disminución en cuanto al nivel de proteínas citoplasmáticas, asociado a la disminución de lisis celular (Broгнаux *et al.*, 2014).

Es interesante destacar que en las zonas reproducidas de gradientes de concentración de glucosa se ha visto reportado también la sobreexpresión de mRNA de hsp como *dnaK*, *groL* y *clpB* (Löffler *et al.*, 2016). Esto coincide con los antecedentes que muestran que σ^{32} responde también a otros estímulos ambientales: como pH alcalino, choque hiperosmótico e inanición por carbono. Además, también se ha reportado un incremento en la concentración de hsp (DnaK, GroEL y ClpB) durante el desarrollo de un cultivo industrial de *E. coli* (22 m³) con alta densidad celular (95 ua 500nm) (Schweder *et al.*, 1999).

Los efectos fisiológicos reportados en células de *E. coli* creciendo en sistemas de escalamiento descendente son: una disminución de la concentración celular, menores velocidades de crecimiento, mayor velocidad de consumo de sustrato y de producción de metabolitos, menor viabilidad y lisis celular (Neubauer *et al.*, 1995; Sandoval-Basurto *et al.*, 2005; Lara, Galindo, *et al.*, 2006; Lara, Leal, *et al.*, 2006; Broгнаux *et al.*, 2014). Mientras que al evaluar cepas recombinantes también se puede afectar negativamente el mantenimiento de los plásmidos y la producción de la proteína recombinante (Bylund *et al.*, 2000; Sandoval-Basurto *et al.*, 2005; Delvigne *et al.*, 2009; Cortés *et al.*, 2016). Profundizar el análisis de estudios con este enfoque servirá para aproximarnos en la predicción de bioproceso de producción de proteínas recombinantes y la formación de los CI al interior de los biorreactores en la escala productiva.

Con base en el análisis previo de los distintos mecanismos moleculares desencadenados en las células de *E. coli* ante los microambientes propios del biorreactor industrial, además de los desencadenados durante el incremento de la temperatura y la sobreexpresión de proteína recombinante, es de esperarse un impacto negativo de la productividad de proteínas reguladas bajo promotores termoinducibles en los cultivos que experimentan los microambientes típicos del biorreactor industrial. Asimismo, se pueden presentar variaciones en la intensidad y duración de la respuesta de choque térmico, impactando la dinámica de formación de los CI y por lo tanto su calidad. Entender como ocurren dichos procesos será útil para diseñar bioprocesos que rindan CI con características predecibles que permitan incrementar el rendimiento en los subsiguientes pasos de purificación y replegamiento, conocidos por ser los pasos limitantes de bioprocesos basados en la producción y recuperación de proteína recombinante a partir de los CI.

2.5. Proteína modelo

Se trabaja con una cepa de *E. coli* W3110, que es una cepa ampliamente usada en la producción de proteínas recombinantes, y que expresa de manera recombinante el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano (rHuGM-CSF) bajo la regulación de un promotor termoinducible. El GM-CSF es una proteína

de 14.4 kDa que consta de 127 aminoácidos, con dos enlaces disulfuro, que forman 4 hélices α y dos láminas β antiparalelas, con dos posibles sitios de *N*-glicosilación y cuatro posibles sitios de *O*-glicosilación (Shanafelt and Kastelein, 1989; Walter *et al.*, 1992; Forno *et al.*, 2004). Sin embargo, existe clara evidencia de que la glicosilación de esta proteína no es necesaria para su actividad biológica, por lo que su producción en procariotas puede ser una proteína de uso médico humano (Burgess *et al.*, 1987; Moonen *et al.*, 1987). El GM-CSF estimula el desarrollo de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas (Metcalf, 2013; Sun *et al.*, 2018; Lotfi *et al.*, 2019). Su importancia médica radica en que esta proteína en su formulación como biofarmacéutico se ha utilizado en tratamientos para la neutropenia y, más recientemente, como estimulante inmunológico en la terapia tumoral y adyuvante de vacunas en pacientes con cáncer (Zhao *et al.*, 2017; Kelley *et al.*, 2018; Lotfi *et al.*, 2019). Desde 1991, la FDA aprobó la producción de rHuGM-CSF producido en *E. coli* por Sanofi-Aventis U.S., diferenciándose de la proteína nativa por una sustitución R23L (Bridgewater, NJ, USA) y ahora se produce como biosimilar en varios países del mundo (Walsh and Walsh, 2022). La producción del rHGM-CSF suele realizarse a partir de cultivos de alta densidad celular en biorreactores industriales, prefiriéndose los sistemas sin aditivos, como los termoinducidos.

3. HIPÓTESIS

El ambiente oscilante en un modelo de escalamiento descendente de las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto que experimentan las células de *E. coli* W3110 afecta negativamente la producción de rHuGM-CSF expresado bajo un promotor termoinducible, formando CI con menor concentración de rHuGM-CSF.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos por lote alimentado de alta densidad celular en un modelo de escalamiento descendente de células de *E. coli* W3110 termoinducible productoras del factor recombinante humano estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (rHuGM-CSF) contenido en cuerpos de inclusión, cuando son expuestos a ambientes oscilantes de concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto.

4.2. Objetivos específicos

- Diseñar y caracterizar un sistema compartamentalizado de un biorreactor de tanque agitado y un biorreactor de flujo pistón (STR-PFR) para la reproducción de gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto asociados a la zona de adición de glucosa mediante una aproximación de escalamiento descendente.
- Implementar y caracterizar un cultivo por lote alimentado de alta densidad celular de *E. coli* W3110 produciendo rHuGM-CSF termoinducible en función de parámetros cinéticos del proceso en un biorreactor de tanque agitado.
- Caracterizar los cultivos de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF termoinducible en función de parámetros cinéticos del proceso creciendo en presencia de gradientes de glucosa y oxígeno disuelto.
- Analizar la pureza de rHuGM-CSF en los cuerpos de inclusión, obtenidos en cultivos de *E. coli* W3110 creciendo ante gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estrategia experimental

El escalamiento descendente incluyó el montaje de un sistema de dos componentes: un biorreactor de tanque agitado y uno de flujo pistón STR-PFR (Figura 2) para la reproducción de las zonas que dan lugar a los gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto con base en el análisis de régimen. En este trabajo se diseñó la sección tubular del PFR y se caracterizó el flujo en su interior en función de la distribución de los tiempos de residencia.

Posteriormente se realizaron los cultivos de *E. coli* W3110 por lote alimentado con un esquema de alimentación exponencial. En primer lugar, se realizó el cultivo control de las células creciendo únicamente en el reactor de tanque agitado STR. La expresión de rHuGM-CSF fue inducida mediante el incremento de temperatura de 30 a 39°C. El cultivo se caracterizó cinéticamente en función de la concentración celular, concentración de glucosa, concentración de ácidos orgánicos, concentración de proteína total y concentración de rHuGM-CSF.

Para evaluar la producción de proteína recombinante en presencia de los gradientes de concentración de glucosa y disponibilidad de oxígeno disuelto esperados en un cultivo industrial, se realizaron cultivos alimentados de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF y se caracterizaron cinéticamente igual que el cultivo control, pero en el sistema diseñado para reproducir la zona de adición de glucosa con dos tiempos de residencia en el PFR. Los cuerpos de inclusión obtenidos se analizaron en geles de electroforesis SDS-Page.

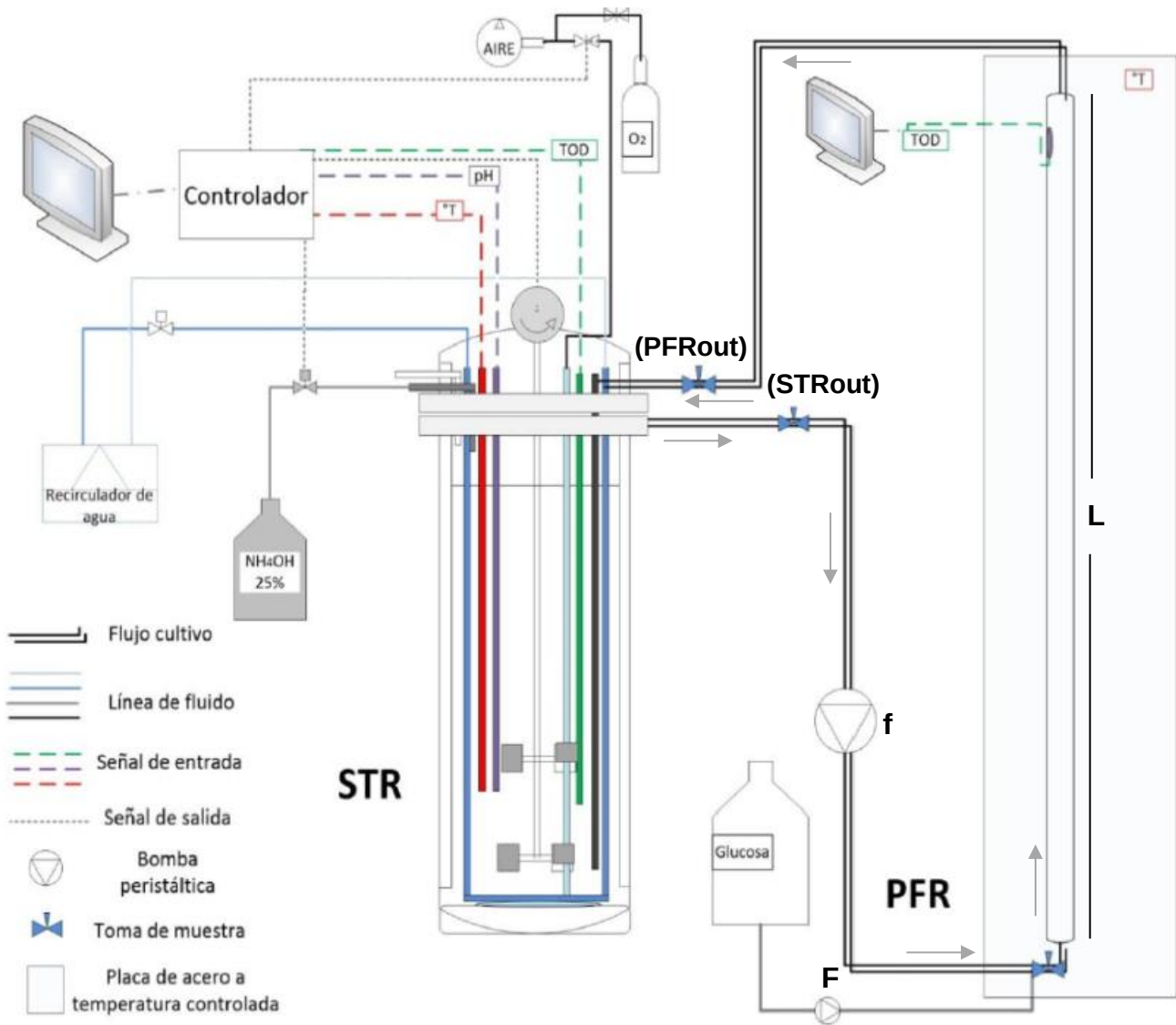


Figura 2. Esquema del sistema de escalamiento descendente de dos componentes (biorreactores de tanque agitado y biorreactor de flujo pistón: STR-PFR), el tiempo de residencia dentro de la sección tubular del PFR se ajustó en función del flujo (f) y la longitud (L). Para cultivos de *E. coli* W3110 productores de rHuGM-CSF por lote alimentado con un esquema de alimentación exponencial, el cultivo se recirculó entre los dos compartimentos al flujo (f). La solución de alimentación se suministró a la entrada del PFR al flujo (F) para reproducir la zona de adición de glucosa. El PFR se colocó dentro de un horno para mantener la temperatura. Se colocaron dos puertos de muestreo en las salidas del STR (STRout) y el PFR (PFRout). Las flechas representan la dirección del flujo (f). El Anexo II muestra una fotografía del sistema durante un cultivo de células de *E. coli* W3110.

5.2. Metodología

5.2.1. Banco celular

La cepa *E. coli* W3110 rHuGM-CSF usada durante la realización de este trabajo es propiedad de Probiomed S.A. de C.V. pertenece al linaje K-12 W3110 y tiene una copia de *cl857* integrada en cromosoma que se expresa de forma constitutiva (Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). Las células tienen el plásmido pV3-uri200N de 5123 pb con el gen codificante para el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano HuGM-CSF (molgramostim), cuya expresión está regulada por el promotor termoinducible *pL* (Figura 3, Tabla 1). El plásmido le confiere resistencia a kanamicina.

El banco de trabajo se prepara a partir de una suspensión celular en medio LB con kanamicina (30 µg/mL) en fase exponencial de crecimiento. Las células se resuspenden en medio fresco (1.6 u.a. 600 nm), se agrega glicerol a una concentración final de 20%, y se conservan alícuotas de 1 mL a -70°C.

5.2.2. Medio de cultivo

Todos los cultivos crecen en medio semi-definido, previamente usado en cultivos en lote y por lote alimentado de *E. coli* termoinducible (Caspeta *et al.*, 2009, 2013; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022; Restrepo Pineda, 2023). La composición del medio de cultivo es la siguiente (g/L): (NH₄)₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 13.3, ácido cítrico 1.7, MgSO₄·7H₂O 1.2, solución de oligoelementos 1x (1000x: Citrato férrico 100.8, Zn(CH₃COO)₂·2H₂O 22.5, MnCl₂·4H₂O 15.0, EDTA 14.1, H₃BO₃ 3.0, CoCl₂·6H₂O 2.5, Na₂MoO₄·2H₂O 2.1 y CuCl₂·2H₂O 1.5), kanamicina 0.03 y tiamina 0.045. La concentración de glucosa inicial es de 10 g/L. La solución de alimentación se prepara con (g/L): glucosa 500, kanamicina 0.12, tiamina 0.09 y solución de oligoelementos 2x. El medio es adicionado con dos pulsos de cas-aminoácidos, al inicio del cultivo (3 g/L) y justo antes del calentamiento para inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante (10 g/L). Las soluciones de tiamina,

Respuesta fisiológica de *E. coli* recombinante termoinducible en presencia de gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto

ampicilina y casaminoácidos se esterilizaron por filtración (0.22 μ m mixed cellulose ester membrane filter, Merck-Millipore, USA).

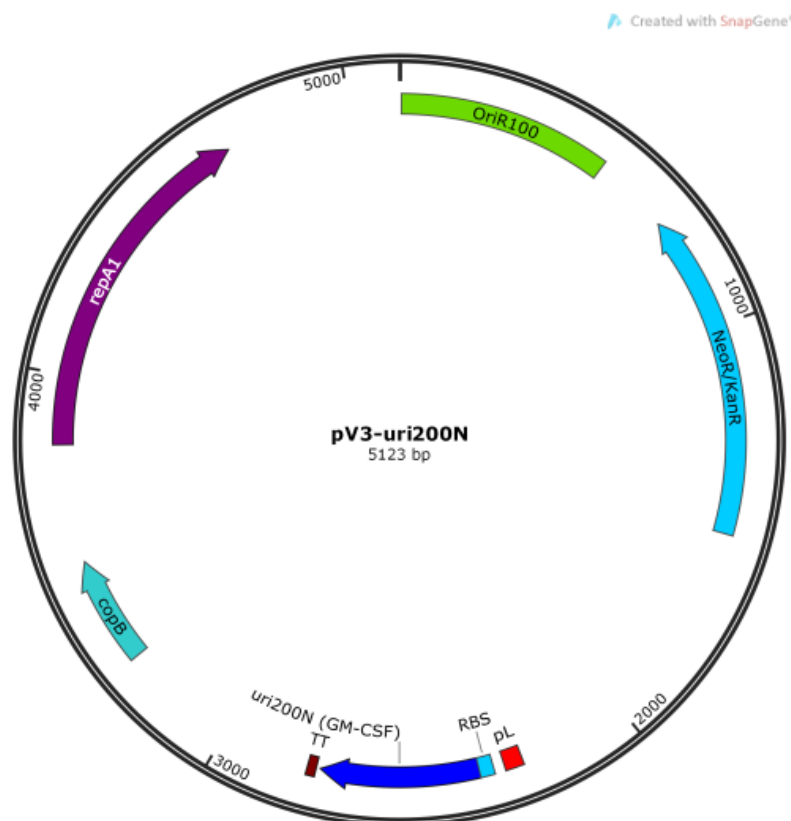


Figura 3. Diseño del plásmido pV3-uri200N de 5123 pb con el gen codificante para el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano HuGM-CSF (molgramostim), cuya expresión está regulada por el promotor termoinducible *pL*.

Tabla 1. Elementos genéticos del plásmido pV3.

<i>Elemento genético</i>	<i>Función</i>	<i>Posición</i>
<i>OriR100</i>	Origen de replicación	6-520
<i>kanR</i>	Resistencia a kanamicina, medio de selección	714-1508
<i>par</i>	Secuencia de partición	1878-2245
<i>pL</i>	Promotor reprimido por la proteína cl857 a 30°C; inducible a 42°C	2262-2307
<i>RBS</i>	Sitio de unión a ribosoma	2334-2368
<i>rHuGM-CSF</i>	Codifica para el gen optimizado de HuGM-CSF	2369-2755
<i>TT</i>	Terminador transcripcional	2765-2786
<i>copB</i>	Mantiene bajo el número de copias del plásmido	3283-3543
<i>repA1</i>	Proteína iniciadora de la replicación	3833-4690

5.2.3. Cultivo por lote alimentado e inducción

Los cultivos se realizan usando un biorreactor de tanque agitado (STR) que se esteriliza con 1.2 L (Gettlinge – Applikon, USA) de medio base con calor húmedo en autoclave a 121°C por 20 min (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). El resto de los componentes del medio se esterilizan por separado y se añaden antes de inocular (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). El inóculo se crece a partir de un vial del banco de trabajo en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio a 30°C y 350 rpm durante aproximadamente 12 h (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). Se añade el volumen suficiente para iniciar con una densidad celular de 0.1-0.2 u.a. 600 nm.

El cultivo comienza con una fase de lote hasta el agotamiento de la glucosa, enseguida se comienza la fase de lote alimentado adicionando la solución de alimentación de forma exponencial para mantener una velocidad específica de crecimiento de 0.14 h⁻¹ (Ecuación 1). Durante la inducción, una vez alcanzados los 39°C se reajusta la velocidad de la alimentación para mantener una velocidad específica de crecimiento de 0.05 h⁻¹. Los perfiles de alimentación, glucosa añadida y volumen del cultivo calculados por el modelo de alimentación junto a los valores experimentales se encuentran en el Anexo III.

$$m_s(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right) V_{tF} X_{tF} e^{\mu_{set}(t - t_F)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El STR está instrumentado con sensores de oxígeno disuelto (TOD), temperatura y pH (Metler Toledo, USA y Applikon Biotechnology, Netherlands) (Figura 2). Durante el cultivo, se controla la TOD a 40% mediante cascada de agitación y enriquecimiento con oxígeno puro. Se comienza alimentando solo aire, y después de iniciar el lote alimentado se va abriendo manualmente la entrada de oxígeno. Este flujo de gas a la entrada del STR de aire enriquecido con oxígeno se va ajustando manualmente (0.1-4 vvm) para satisfacer la demanda del cultivo y

asegurar que no hubiera limitación de oxígeno en el STR. Los valores de los componentes PID del controlador (Proporcional-Integral-Derivativo) para la cascada de agitación también fueron ajustados manualmente después de iniciado el lote alimentado.

Además, se adicionaron pulsos de antiespumante cuando el cultivo lo requería. El pH se mantuvo a 7.2 con la adición de pulsos on-off de NH₄OH 25%. La temperatura se mantiene a 30 °C durante las fases en lote y durante la alimentación exponencial. Durante la inducción se incrementa a 39°C en aproximadamente 22-25 min.

Muestras cinéticas del cultivo son tomadas a diferentes tiempos en alícuotas de 1 mL y se centrifugan (13000 rpm, 25 min, 4°C, Eppendorf, USA), el pellet celular y el sobrenadante se conservan por separado a -20°C.

5.2.4. Análisis de régimen

El análisis de régimen se basa en la comparación de tiempos característicos de los sistemas biológicos y físicos que están interconectados. Para el caso del biorreactor se toma el tiempo de circulación (t_c) como el tiempo característico de los fenómenos de mezclado usando valores reportados en la literatura ($\leq 22m^3$). Para los fenómenos celulares se utilizan los tiempos característicos de consumo de glucosa (Ecuación 2) y oxígeno (Ecuación 3) y el tiempo característico de acumulación de acetato (Ecuación 4) (Oosterhuis *et al.*, 1985; Caspeta Guadarrama, 2009).

$$t_{Gluc} = \frac{c_G}{(q_s \cdot x)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$t_{O_2} = \frac{c_{O_2}}{(q_{O_2} \cdot x)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde: c_G y c_{O_2} son las concentraciones de glucosa y oxígeno disponible, q_s y q_{O_2} son las velocidades de consumo específico y x es la concentración celular.

$$t_{Ac} = \frac{c}{(q_{Ac} \cdot x)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde: c es la concentración crítica del fenómeno, q_{Ac} es la velocidad específica de acumulación y x es la concentración celular.

5.2.5. Diseño del sistema de biorreactores compartimentalizado STR-PFR.

La distribución de tiempos de mezclado en reactores STR industriales puede ser reproducida en sistema de escalamiento descendente donde una o más secciones de PFR son conectadas a un STR (Delvigne, Destain and Thonart, 2006). Las secciones del PFR permiten reproducir gradientes de concentración axiales y el tiempo de residencia reproduce el tiempo de circulación de los biorreactores a mayor escala (Delvigne, Destain and Thonart, 2006). En el presente trabajo proponemos el montaje de STR-PFR para reproducir los gradientes esperados en las zonas de adición de glucosa y la región homogénea. Para el diseño se busca reproducir un tiempo de residencia en el PFR y el volumen representativo de cada región a simular.

El PFR se construye a partir de secciones tubulares de vidrio que permitan el uso de sensores ópticos para monitorear TOD (lector óptico Fibox 3 con el sensor PSt3 y el software OxyView PST3v602 PreSens, Regensburg, Germany) y se facilite la operación, el lavado y la esterilización. Los parámetros que se tienen que fijar en el diseño son: el diámetro del PFR (d_{PFR}), la longitud del PFR ($L=h_{PFR}$) y la velocidad de flujo (f). El flujo entre las secciones STR y PFR se mantiene con una bomba peristáltica Masterflex L/S de velocidad variable (Masterflex L/S 7523-60 con Easy Load Head 77200-50, Cole-Palmer, USA) usando mangueras de silicona (Masterflex 96440-25 platinum first silicon 3355L, Cole-Palmer, USA).

Para caracterizar el flujo no aireado dentro del compartimento del PFR, realizamos experimentos con cristal violeta como marcador del flujo off-line detectado en la salida del PFR por densidad óptica a 590 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo USA). Para los experimentos de inyección del marcador, se inyectó un pulso del marcador al tiempo 0 s a la entrada de la sección tubular, los datos obtenidos sirven para construir las curvas de distribución de tiempos de residencia (DTR).

El tiempo de residencia medio teórico se calculó a partir de la Ecuación 5.

$$t_R = \frac{V}{f} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Siendo V el volumen total de líquido y f el flujo que se introduce al PFR.

Para caracterizar el flujo al interior de las secciones del PFR se determina el número de Bodestein (Bo) a partir de la Ecuación 6.

$$Bo = \frac{2t^2}{\sigma^2} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde t es el tiempo de residencia promedio, y la desviación estándar σ se calcula como la mitad del tiempo en la curva de distribución de tiempos de residencia acumulativa (DTRa) donde la señal alcanza el 16 y el 84% (George, Larsson and Enfors, 1993). Las curvas de DTR acumulativas (DTRa) se construyen a partir de un cambio de la solución recirculada en el tiempo 0 s, de agua a solución de cristal violeta, se registra la concentración a la salida del PFR medida como densidad óptica a 590 nm.

5.2.6. Cultivo por lote alimentado en el sistema de biorreactores compartimentalizado STR-PFR

Para la reproducción de la zona de adición de alimentación, utilizamos la configuración de dos compartimentos de la sección PFR conectada al STR. Los cultivos se iniciaron en el STR con una fase por lote y se realizaron en las mismas condiciones que el cultivo control como se indica en la sección 5.2.3. Cuando se agotó la glucosa al final de la fase lote, se conectó la sección tubular y se inició la alimentación en la entrada del PFR. El tiempo medio de residencia dentro del PFR se mantuvo en 25 o 40 s controlando el flujo de recirculación del cultivo a 300 o 190 mL/min respectivamente.

Muestras cinéticas del cultivo fueron tomadas a diferentes tiempos en alícuotas de 1 mL y se centrifugan (13000 rpm, 25 min, 4°C, Eppendorf, USA), el pellet celular y el sobrenadante se conservan por separado a -20°C. Las muestras se tomaron a través de conectores sin aguja (MaxZero™ BD, EE. UU.) colocados en línea con el flujo a la salida del STR (STRout) y algunas muestras fueron tomadas también a la salida del PFR (PFRout) (Figura 2). El PFR se instrumentó con un parche sensor óptico PSt3 adherido a la pared cerca de la entrada o salida de la sección tubular,

utilizado para el registro de TOD en línea con el medidor óptico de oxígeno Fibox3 (PreSens, Regensburg, Alemania).

5.2.7. Mediciones analíticas

La concentración celular se cuantificó mediante turbidimetría, midiendo la densidad óptica a 600 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo USA) y mediante gravimetría haciendo determinaciones de biomasa por peso seco, se estableció la equivalencia de 1.0 u.a. a 0.40 g/L de peso seco (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022).

El consumo de glucosa se determinó midiendo la concentración mediante un analizador bioquímico YSI2900 (YSI Life Sciences, USA) (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022).

La concentración de ácidos orgánicos en el medio de cultivo se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: Shimadzu, Japan equipado con un detector UV) usando una columna de intercambio catiónico AminexHPX-87H (Bio-Rad Hercules, CA). Se usa la solución estándar comercial (No. catálogo 125-0586 Bio-Rad Hercules, CA, Anexo A1.6) para cuantificar las sales correspondientes: acetato, oxalato, citrato, malato, succinato y formato (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022).

La proteína total y proteína en los CI se cuantifica por el método de Bradford para microplacas (BioRad, USA) y el espectrofotómetro UV-2450 (DU 730 Beckman Coulter, USA). Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA, Equitech-Bio Inc., USA) (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022).

5.2.8. Cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos

La velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial está descrita por la Ecuación 7.

$$\frac{dx}{dt} = X\mu t \quad (\text{Ecuación 7})$$

La integración y reacomodo de la ecuación 7 se muestra en la ecuación 8, y se usa para calcular la velocidad específica de crecimiento a partir de la pendiente durante la fase exponencial de crecimiento.

$$\ln X = \mu(t - t_0) + \ln X_0 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde x y x_0 es la concentración celular en el tiempo t y t_0 . La ecuación 8 también se utilizó incluso cuando las células dejaron de crecer, lo que denominamos la velocidad específica de crecimiento aparente (μ_{ap}).

El rendimiento biomasa sustrato ($Y_{x/s}$) fue calculado mediante la ecuación 9:

$$Y_{x/s} = \frac{(x_2 - x_1)}{(s_1 - s_2)} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Siendo x_1 y x_2 la concentración de biomasa inicial y final, y s_1 y s_2 la concentración inicial y final de glucosa medida en el medio de cultivo respectivamente.

La velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) se obtuvo mediante la ecuación 10.

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

5.2.9. Electroforesis SDS-PAGE.

Las proteínas totales y en CI se separaron de acuerdo con su peso molecular y carga mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel separador se compone al 15% de acrilamida-bisacrilamida en condiciones reductoras y se prepara precedido por un gel concentrador al 4%. Los geles se corren a corriente constante (60-100 V), se tiñen con azul de Coomassie y se retira el exceso con una solución de destañido (ácido acético, Metanol, agua). La imagen de cada gel se digitaliza en el equipo Gel Doc TM EZ Imager (Biorad, USA) y el análisis densitométrico se hace con el programa Image Lab v5.2 (BioRad, USA) (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022).

5.2.10. Purificación de los cuerpos de inclusión

Los CI se obtienen a partir del pellet celular que se resuspende en una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH=7.5) con fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM (PMSF, Sigma, USA). Este inhibidor ha mostrado su utilidad para proteger a las proteínas de la proteólisis durante la purificación de los CI (Jürgen *et al.*, 2010; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022), sin embargo, es muy inestable en soluciones acuosas (James, 1978), por lo que se mantiene un stock de solución en isopropanol siguiendo las indicaciones del fabricante (100 mM, -20°C).

Las células se someten a ciclos (4-10) de sonicación de 30 segundos a 10 micrones de amplitud (SoniPrep 150 Richmond Scientific, UK), seguidos de congelación/descongelación a -20/4°C (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Restrepo-Pineda, Rosiles-Becerril, *et al.*, 2022; Restrepo-Pineda, Sánchez-Puig, *et al.*, 2022). Mediante centrifugación se separa el pellet (12000 rpm, 20 min), se resuspende en solución de lisis con NP-40 1% v/v (Sigma, USA) y se incuba con agitación a 4°C por 30 min. En seguida se centrifuga nuevamente y se lava el precipitado primero con Tritón X-100 0.5% v/v en solución de lisis (Sigma, USA), y posteriormente de 3-5 veces con agua milli-Q. Los CI obtenidos se conservan a -20°C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de régimen

Este análisis teórico ayuda a predecir la presencia de interacciones entre los fenómenos biológicos en las células ante los gradientes de concentración que se esperan en la escala productiva. Para esto se determinan los tiempos característicos de los fenómenos esperados y se considera que la interacción puede darse si dichos tiempos son del mismo orden de magnitud.

Los principales gradientes en cultivos de lote alimentado de células de alta densidad de *E. coli* son de concentración de glucosa y de disponibilidad de oxígeno, y son propiciados por deficiencias en cuanto al mezclado. Un parámetro útil para definir la ventana de tiempo en la que se producen los gradientes es el tiempo de circulación (t_c), que es el tiempo que le tomaría a la célula recorrer las diferentes regiones del reactor y volver al mismo punto, y este tiempo puede reproducirse a escala laboratorio como el tiempo de residencia (t_R) al interior de un reactor de flujo pistón (PFR) (Delvigne, Destain y Thonart, 2006). En la literatura se encuentran reportados tiempos de circulación de $t_c=9-60$ s para biorreactores de $0.5-22$ m³ (Vrábel *et al.*, 2000; Delvigne, Destain and Thonart, 2006; Haringa, Mudde and Noorman, 2018).

De acuerdo con el análisis de régimen, si el t_c (como tiempo característico de los gradientes en el biorreactor) es del mismo orden de magnitud (o mayor) que los tiempos característicos de los procesos celulares, entonces dichos procesos celulares serán limitados por la deficiencia del mezclado (Oosterhuis *et al.*, 1985; Caspeta Guadarrama, 2009). Por ejemplo, podemos tomar el tiempo de duplicación celular (t_x) como el tiempo característico del crecimiento. Su valor se obtiene a partir de la velocidad específica de crecimiento (μ) como $t_x=\ln 2/\mu$, en el caso de los cultivos que realizamos esta se controla a $\mu=0.14$ h⁻¹, obteniendo entonces que $t_x=1.8 \cdot 10^4$ s. Este valor es mayor en 3 órdenes de magnitud en comparación al t_c , se puede concluir que las células de *E. coli* en presencia de un gradiente en la disponibilidad de nutrientes durante esa ventana de tiempo (9-60 s) no verán afectado su crecimiento.

Tiempos característicos de consumo de glucosa y de oxígeno son útiles para predecir el tiempo que les toma a las células agotar por completo la concentración de dichos nutrientes en el medio, y se calculan a partir de las ecuaciones 2 y 3. Para el t_{gluc} se utiliza $q_s=0.6 \text{ g}_{\text{GLUC}}/\text{g}_x.\text{h}$ y $C_{\text{Gluc}}=0.1 \text{ g/L}$, estos valores experimentales se tomaron de los cultivos control por lote alimentado de *E. coli*, durante la fase de alimentación, realizados como se describe en la sección anterior (5.2.3., Figura 8), y representan las condiciones esperadas durante un cultivo por lote alimentado en el cual la concentración de glucosa es limitada. Para el tiempo de consumo de oxígeno se toman valores de la literatura siendo $q_{\text{O}_2}=0.0042 \text{ mmol}_{\text{O}_2}/\text{g}_x.\text{s}$ (Ying Lin and Neubauer, 2000), y $C_{\text{O}_2}=0.084 \text{ mmol}_{\text{O}_2}/\text{L}$ (Giese *et al.*, 2014) considerando que en el cultivo se tiene una TOD=40% de saturación de aire.

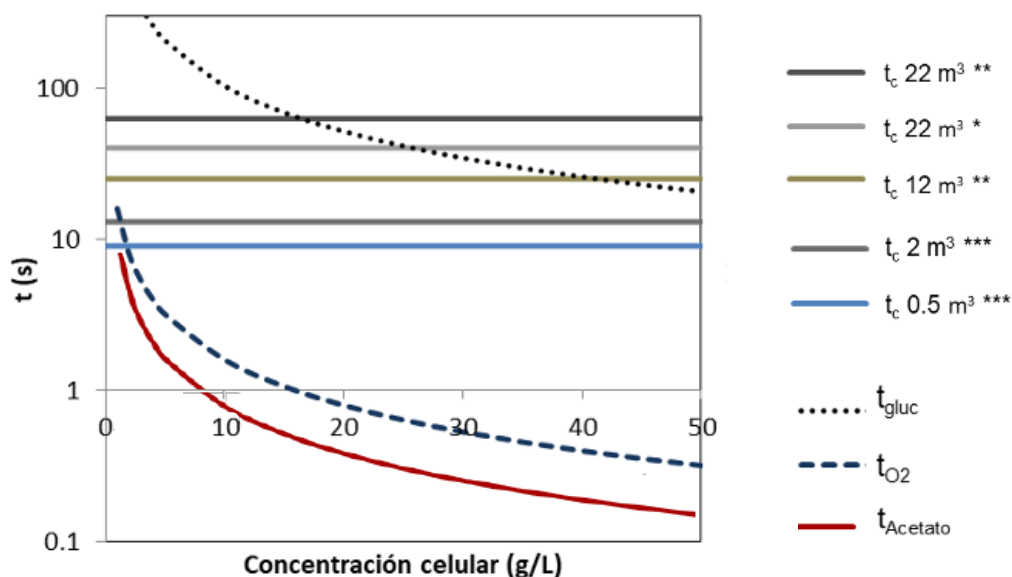


Figura 4. Comparación de tiempos característicos en cultivos de *E. coli*. t_c : tiempo de circulación de biorreactores de diferente escala. t_{gluc} y t_{O_2} son tiempos característicos de consumo de glucosa y oxígeno (Ecuaciones 2 y 3), y t_{Acetato} es el tiempo característico de acumulación (Ecuación 4). *Haringa, Mudde and Noorman, 2018. ** Vrbel et al., 2000. ***Delvigne, Destain and Thonart, 2006.

En la Figura 4 se puede observar cómo el tiempo t_{O_2} es del mismo orden de magnitud que los t_c en el biorreactor aun a concentraciones celulares bajas, y va disminuyendo a mayor concentración celular, indicando que a su paso por las diferentes zonas del reactor las células agotarán rápidamente el oxígeno disponible

en los puntos alejados del difusor. Algo similar observamos con el tiempo característico de consumo de glucosa t_{gluc} , en este caso la interacción de los fenómenos se da a partir de cierta concentración celular que en este análisis esta alrededor de los 20 g/L. De esto interpretamos que en concentraciones celulares bajas las células no agotan la glucosa disponible aun si deja de suministrarse durante decenas de segundos, mientras que concentraciones celulares por arriba de los 20 g/L la glucosa disponible será consumida por las células hasta agotarla en un tiempo del orden de decenas de segundos, promoviendo la limitación de glucosa en regiones alejadas al punto de adición del biorreactor.

En la región de adición de glucosa, la velocidad de consumo de glucosa y de oxígeno se incrementan, en consecuencia, las células pueden desarrollar sobre flujo metabólico que resulta en la acumulación de acetato. El tiempo característico de acumulación de acetato t_{Ac} , se obtuvo a partir de la ecuación 4 tomando de la literatura el valor de la velocidad específica de acumulación de acetato como $q_{Ac}=0.062 \text{ mg}_{Ac}/\text{g}_{X}.\text{s}$ (Lara *et al.*, 2009), y hace referencia al tiempo que le toma a las células acumular una concentración de acetato de 0.5 g/L, reportada como crítica para afectar el crecimiento (Nakano *et al.*, 1997; Eiteman and Altman, 2006). Se puede ver que esta respuesta se espera desde los 10s del agotamiento de oxígeno cuando la glucosa no es limitante, y se acentúa a mayor concentración celular (Figura 4).

En conclusión, en cultivos por lote alimentado con células de *E. coli* creciendo con glucosa como fuente limitante de carbono, al interior de un biorreactor con tiempos de circulación del orden de decenas de segundos (9-60 s) se generan regiones donde las células agotan por completo la concentración disponible de oxígeno disuelto y glucosa en función de la concentración celular. En respuesta a los gradientes de concentración las células se adaptan con respuestas metabólicas. Previamente se ha reportado que en dichas condiciones las células de *E. coli* pueden inducir mecanismos moleculares como el sobre flujo metabólico, la respuesta general de estrés y la respuesta estricta.

6.2. Sistema compartamentalizado STR-PFR

La distribución de tiempos de mezclado en reactores STR industriales puede ser reproducida con el sistema de escalamiento descendente donde una o más secciones de PFR son conectadas a un STR (Delvigne, Destain and Thonart, 2006). En este trabajo se diseñó un sistema compartamentalizado que se compone por un reactor STR interconectado con un reactor de flujo pistón (PFR). La sección del PFR se construye en vidrio, con un diámetro interno $d_{PFR}=18$ mm, de acuerdo con la disponibilidad del material y en concordancia con reportes previos (George, Larsson and Enfors, 1993; Larsson and Enfors, 1993; Junne *et al.*, 2011; Löffler *et al.*, 2016). Incrementar el diámetro del tubo sería desfavorable para el desarrollo del flujo pistón por que propicia la dispersión (Delvigne, Destain and Thonart, 2006).

La distribución volumétrica en los biorreactores indica un porcentaje aproximado del 7-10% del volumen total del cultivo en las zonas de adición (Xu *et al.*, 1999; Haringa *et al.*, 2016). El volumen de operación inicial de los cultivos es de 1.2 L, por esto se construyen secciones tubulares de 41 cm de largo para permitir la recirculación de aproximadamente un 10% (~120 mL), para simular mayores distribuciones volumétricas se pueden conectar >1 secciones tubulares en serie.

Todos los accesorios para permitir la conexión estéril y la recirculación del cultivo entre los compartimentos STR-PFR son de acero inoxidable y manguera de silicona (25: diámetro interno de 5 mm). Para la toma de muestra en línea sobre las mangueras se conectan conectores libres de aguja (maxzero-BD).

Previamente se ha reportado un $t_c=40$ s en biorreactores de ~ 20 m³ (Vrábel *et al.*, 2000; Haringa, Mudde and Noorman, 2018). De acuerdo con el análisis de régimen (sección 6.1) este tiempo es suficiente para desencadenar mecanismos moleculares en respuesta a los gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto lo que permitirá estudiar su impacto sobre la producción de la proteína recombinante y su acumulación en CI.

Con base en lo anterior, se busca reproducir un tiempo de residencia en el PFR $t_R=t_c$ que sea menor o igual a los 40 s. Se deben usar las condiciones de operación que permitan reproducir un flujo tipo pistón para favorecer los gradientes axiales sobre

los gradientes radiales al interior de la sección del PFR, lo cual permite la simulación de los gradientes de concentración de nutrientes durante el cultivo, como el gradiente de glucosa y disponibilidad de oxígeno en cultivos donde la glucosa se alimenta como fuente limitante de carbono. Para determinar condiciones operacionales adecuadas, se caracteriza el flujo al interior del PFR como se describe en la siguiente sección 6.3.

Al interior del biorreactor se presenta también estrés hidrodinámico generado por la agitación de los impulsores y la aireación con el potencial de dañar las células, si bien no se espera un impacto en células pequeñas como son las bacterias y levaduras (Nienow, 2009). Previamente, se ha mostrado que las células de *E. coli* W3110 son resistentes y no presentan daños significativos en su viabilidad y membrana celular ante el estrés hidrodinámico asociado con la turbulencia generada por los impulsores y/o el estallido de burbujas, bajo condiciones de agitación y aireación esperadas en biorreactores (400-1200 rpm, 1 vvm, 10-40% TOD) (Hewitt *et al.*, 1998). Con base en lo anterior no se considera relevante el estrés hidrodinámico en los cultivos estudiados en el presente trabajo.

6.3. Caracterización del flujo al interior del reactor PFR

Las secciones del PFR permiten reproducir gradientes de concentración axiales donde el tiempo de residencia (t_R) (Ecuación 5) reproduce el tiempo de circulación (t_c) de los biorreactores a mayor escala (Delvigne, Destain and Thonart, 2006). Modular el t_R permite la simulación de los t_c de biorreactores de escala productiva asegurando que en las condiciones de operación el gradiente axial predomine sobre el radial. Esto se logra al interior del PFR ajustando la velocidad de flujo (f) a la que se recircula el cultivo entre las secciones STR y PFR, y también variando la longitud del PFR (L).

Para biorreactores utilizados en la producción de proteínas recombinantes con células de *E. coli* en escalas de 0.5-20 m³ se han reportado tiempos de circulación de entre 9 y 40 s (Vrábel *et al.*, 2000; Delvigne, Destain and Thonart, 2006; Haringa, Mudde and Noorman, 2018). La Tabla 2 muestra las condiciones operacionales que nos permiten reproducir un t_R promedio en el intervalo de 25-86 s al interior de la

sección del PFR. Bajo estas condiciones experimentales medimos la distribución de tiempos de residencia (DTR) y la distribución de tiempos de residencia acumulativa (DTRa).

Tabla 2. Condiciones operacionales del biorreactor de flujo pistón (PFR).

Flujo (mL/min)	no. PFR	L tubería (cm)	Vol (mL)	Vol del cultivo (%)	t _R (s)
190	1	41	128	10	40
250	1	41	128	10	30
300	1	41	128	10	25
250	2	82	240	20	58
250	3	123	355	30	86

La Figura 5 muestra los perfiles de la DTR que se obtienen en el PFR al inyectar un pulso del trazador del flujo (cristal violeta) presentando una distribución log-normal, podemos observar cómo los tiempos de residencia tienden a alargarse cuando se disminuye el flujo manteniendo la longitud, y cuando se aumenta la longitud del PFR a un mismo flujo (Danckwerts, 1995). El mismo patrón se observa en la Figura 6 donde se representan las DTRa medidas al cambiar el líquido que se recircula con el trazador de flujo a diferente concentración. A partir de las DTRa medidas podemos calcular el número adimensional de Bodeinstein (Bo) como describe la ecuación 6. Este número es el inverso del número de dispersión, por tanto, entre mayor es Bo , menor es la dispersión del flujo; valores de $Bo > 10$ reflejan un patrón de flujo acercado al flujo pistón donde predomina el gradiente axial (George, Larsson and Enfors, 1993). Los valores obtenidos de Bo estuvieron dentro de un intervalo de 12-36, siendo siempre mayores a 10, lo que indica que al interior del PFR la dispersión del flujo tiende al patrón de flujo pistón. Las condiciones operacionales evaluadas parecen no afectar el patrón de flujo de manera significativa como se observa en la Figura 7.

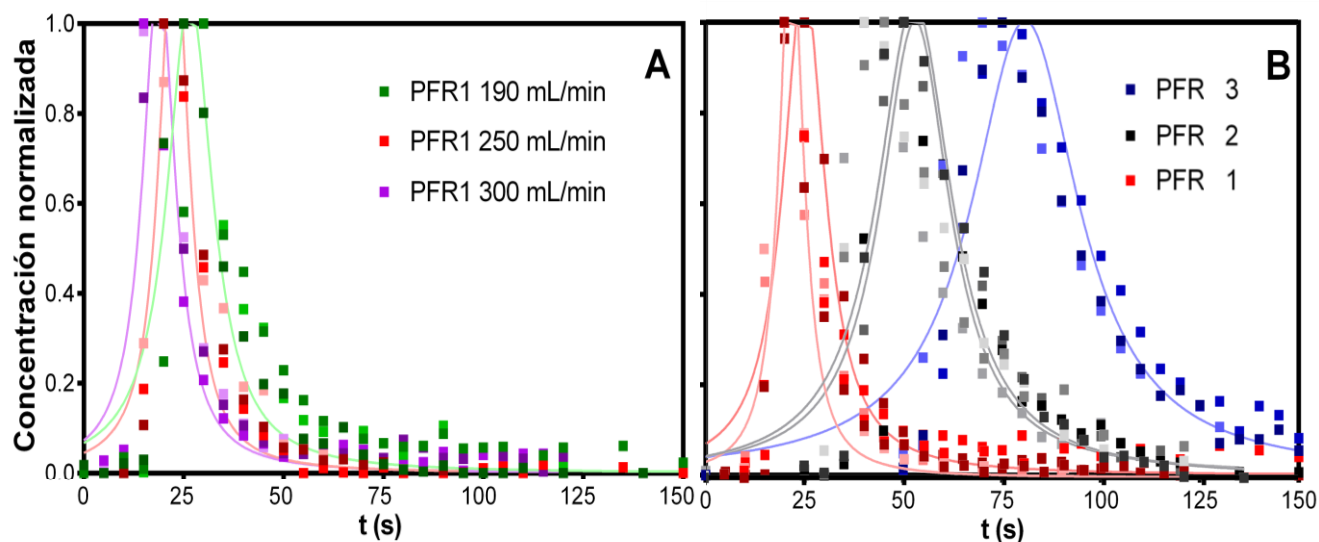


Figura 5. DTR obtenidos mediante la inyección de un pulso de cristal violeta en la entrada del PFR variando el flujo y la longitud. Mediciones por triplicado que se representan del mismo color. A) DTR obtenidos manteniendo la longitud (L) constante (41 cm) y variando el flujo (f). B) DTR obtenidos a flujo constante ($f = 250$ mL/min) variando la longitud (L): PFR3=123 cm; PFR2=82 cm; PFR1=41 cm.

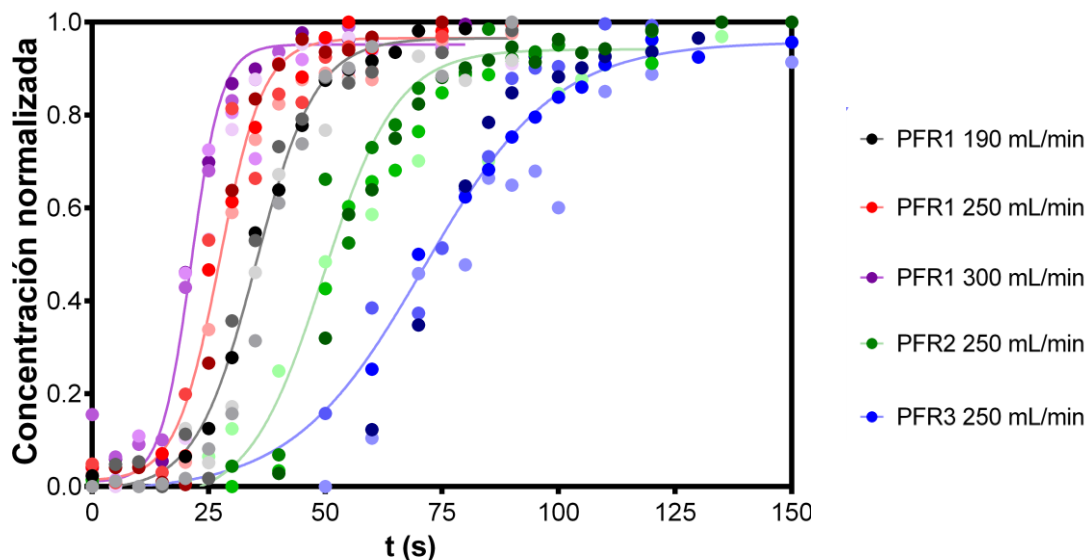


Figura 6. DTRa obtenidos con el cambio de la concentración de cristal violeta en el líquido de recirculación. Las mediciones se realizaron variando el flujo de recirculación (f) y la longitud del PFR (L). dichos valores se muestran en la Tabla 2, donde las longitudes corresponden a PFR1=41 cm; PFR2=82 cm y PFR3=123 cm.

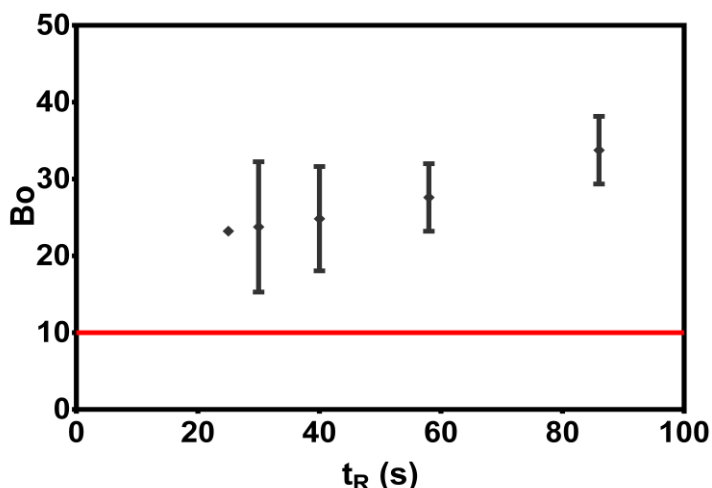


Figura 7. Valores del número Bo , obtenidos a partir del gráfico de DTRa (Figura 6). El valor crítico mínimo de 10 por arriba del cual se considera un comportamiento del flujo con tendencia a pistón se representa con la línea continua color rojo.

En conclusión, el diseño del PFR permite la reproducción de un flujo que se aproxima al comportamiento de un flujo pistón, en el cual se favorece el gradiente axial sobre el radial. Esto minimiza la mezcla radial y promueve la formación de un gradiente de concentración a lo largo del eje del reactor. Esta es una alternativa para la investigación en el laboratorio de los gradientes nutricionales (por ejemplo, gradientes de glucosa y disponibilidad de oxígeno) en cultivos celulares por lote alimentado, permitiendo la reproducción de diferentes condiciones de operación. La versatilidad de este sistema es considerable, ya que permite ajustar los tiempos de residencia en el PFR al modular el flujo en su interior para simular diferentes tiempos de circulación esperados en la escala operativa, y también manipular el volumen del cultivo entre los compartimentos al variar la longitud de la sección tubular. El diseño propuesto es una plataforma flexible para experimentar con diversos escenarios y optimizar desde el laboratorio los cultivos por lote alimentado a diferentes escalas.

6.4. Cultivo de *E. coli* por lote alimentado

El cultivo se realiza como se describe en la sección de materiales y métodos. Es un cultivo por lote alimentado de alta densidad celular que se realiza en el STR donde las concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto son homogéneas. El cultivo comienza como un lote hasta que se agota la glucosa inicial (10 g/L) en el medio y se transita a un cultivo por lote alimentado siguiendo un modelo de alimentación exponencial de glucosa (Ecuación 1, Anexo III), que busca mantener constante una velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{set}}=0.14 \text{ h}^{-1}$) y alcanzar una alta densidad celular ($>20 \text{ g/L}$). Luego de alcanzar una densidad celular aproximada de 25 g/L, se incrementa la temperatura de 30 a 39°C para inducir la expresión de la proteína recombinante y se reajusta el modelo de alimentación ($\mu_{\text{set}}=0.05 \text{ h}^{-1}$). La operación del cultivo se prosiguió de acuerdo con estrategias de cultivo reportadas previamente (Yoon *et al.*, 2003; Fahnert, Lilie and Neubauer, 2004; Caspeta *et al.*, 2009).

El desarrollo de este cultivo control se muestra en las Figuras 8-10. En la Figura 8 se muestran la cinética de crecimiento, de consumo de glucosa y la acumulación de acetato y formato en el medio. La Figura 9 muestra los parámetros cinéticos: la velocidad específica de crecimiento (μ), el consumo específico de glucosa (q_s) y el rendimiento biomasa-glucosa ($Y_{x/s}$). La Figura 10 muestra los gráficos de medición y control de TOD, temperatura y pH. En estas Figuras pueden distinguirse las 3 etapas del cultivo, la primera corresponde a la fase lote y dura 12 h. Durante esta primera fase, las células alcanzan alrededor de 5 g/L, agotando la glucosa inicial, se observan valores máximos de la velocidad de crecimiento ($\mu \sim 0.6 \text{ h}^{-1}$), de q_s ($\sim 0.5 \text{ g}_{\text{gluc}} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$) y de $Y_{x/s}$ ($\sim 0.5 \text{ g}_{\text{gluc}} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}$). Durante el cultivo la TOD se mantuvo a 40% y el pH en 7.2, si bien final de la fase lote y el comienzo de la termoinducción se ve acompañado por un ligero incremento en las señales de pH y TOD, así como una acumulación de acetato aproximada de 0.5 g/L. Durante el periodo de alimentación se alcanza una concentración celular aproximada de 25 g/L, manteniendo limitante la concentración de glucosa en el medio ($\sim 0.1 \text{ g/L}$) (Figura 8A-B), donde no se detectó acumulación de acetato o formato en el medio de cultivo (Figura 8C). Aproximadamente a las 24 h de cultivo se incrementa la temperatura hasta 39°C (Figura 10B), lo que conlleva un incremento en la actividad metabólica reflejado en

el incremento de μ , q_s y $Y_{x/s}$ (Figura 9 B-D); seguida de una disminución por debajo de los valores que se mantuvieron durante la fase alimentada. Las células continúan creciendo y alcanzan una concentración celular por arriba de los 40 g/L. Durante la fase de inducción se observa acumulación de acetato en el medio de cultivo (~0.5 g/L). Los resultados observados en las cinéticas de cultivo control corresponden con perfiles de crecimiento reportados previamente con esquemas de alimentación similares en cultivos termoinducidos (Caspeta *et al.*, 2009).

Durante el cultivo por lote alimentado control de células de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF creciendo en el STR, observamos el crecimiento celular y la adaptación metabólica de las células a las condiciones del medio y las variaciones en la alimentación de glucosa. En la fase lote al inicio del cultivo, las células experimentan un rápido crecimiento, lo cual es evidente por los valores máximos de la velocidad de crecimiento específica (μ) y el consumo específico de glucosa (q_s). El alto consumo de la glucosa inicial resulta en una acumulación de acetato, este fenómeno se asocia con el sobre flujo metabólico, donde parte de la glucosa se convierte en acetato en condiciones aerobias en lugar de ser completamente metabolizada para crecimiento celular (Xu *et al.*, 1999; Lara, Galindo, *et al.*, 2006; Caspeta *et al.*, 2009). Posteriormente se transita al lote alimentado, donde se controla la cantidad de glucosa suministrada de manera exponencial y las células continúan su crecimiento de manera controlada, además se observa el rápido consumo del acetato acumulado durante la fase lote. Al incrementar la temperatura durante la termo-inducción de la proteína recombinante observamos como las células reajustan sus velocidades de crecimiento y consumo de glucosa, incrementando cuando incrementa la temperatura y bajando nuevamente a los valores controlados por la velocidad de alimentación de glucosa. Durante esta fase la glucosa se mantuvo también limitada y no se acumuló en el medio, observando como el rendimiento celular cae de alrededor de 0.4 a 0.2 g_x/g_{gluc}, mientras que se acumula proteína recombinante (ver sección 6.6). Al inicio de esta fase se observa nuevamente acumulación de acetato, el cual no es reasimilado por la célula, que puede explicarse al sobre flujo metabólico asociado al incremento en el consumo de glucosa durante el incremento de la temperatura teniendo oxígeno disponible.

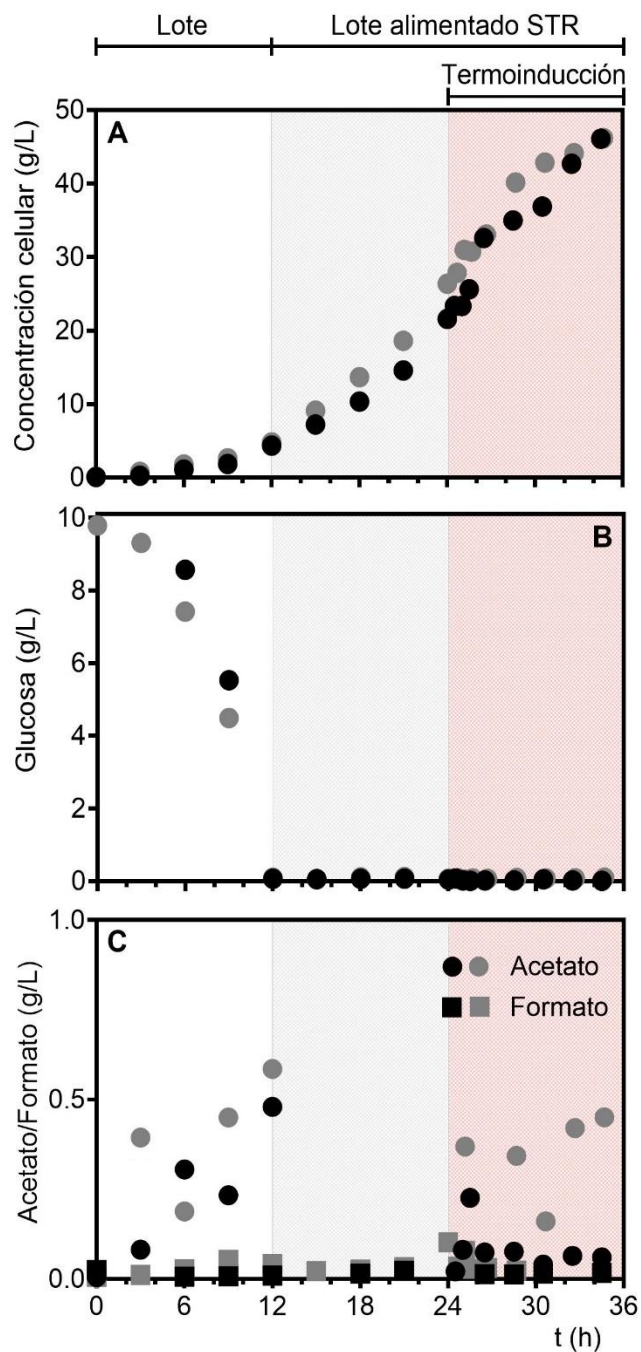


Figura 8. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado control (STR). A) Crecimiento celular. B) Concentración de glucosa en el medio. C) Concentración de acetato y formato en el medio de cultivo. Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

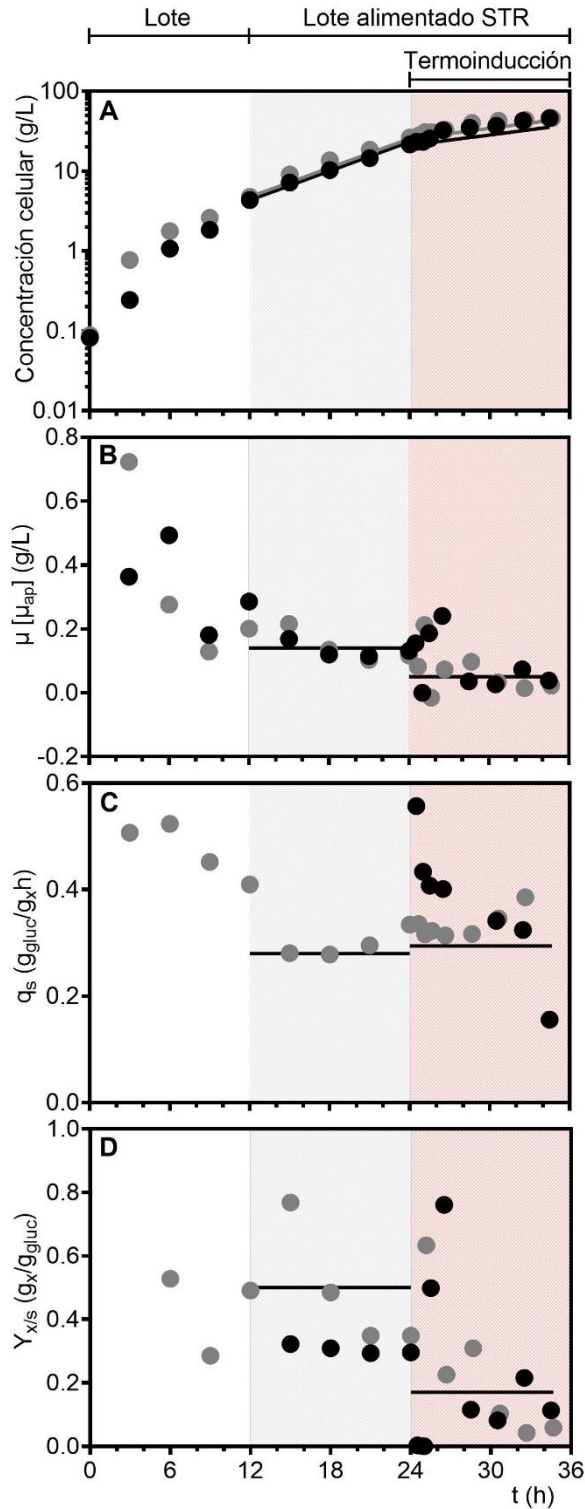


Figura 9. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado control (STR). A) Crecimiento celular. Perfil de B) la velocidad de crecimiento, C) la velocidad específica de consumo de glucosa y D) el rendimiento de biomasa respecto a la glucosa consumida. Los valores esperados de acuerdo con el modelo de alimentación (Ecuación 1) se representan con la línea continua. Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

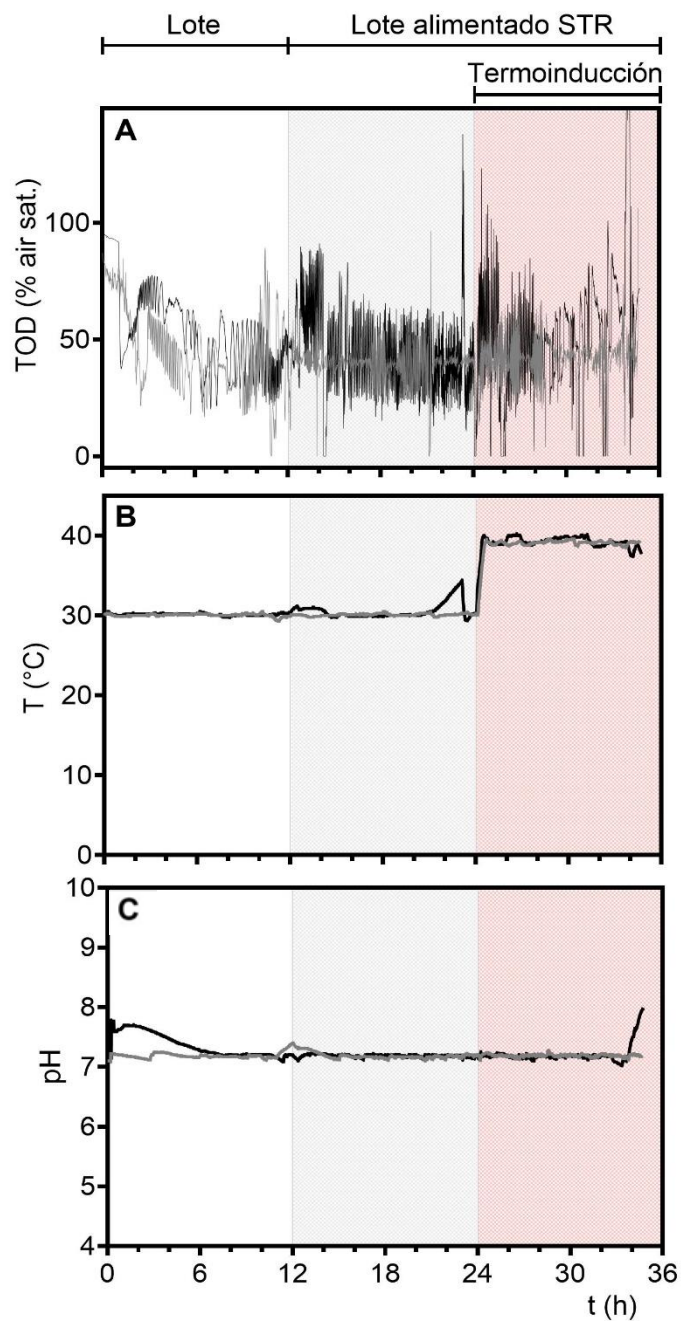


Figura 10. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado control (STR). Gráficos de medición de los parámetros controlados: TOD (40%), pH (7.2) y temperatura (30-39°). Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

6.5. Cultivo de *E. coli* por lote alimentado con simulación de la zona de adición de glucosa

Los cultivos se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos en las mismas condiciones que el cultivo control, con la diferencia de que, al finalizar la fase de lote, se inicia el montaje del sistema de dos compartimentos al conectar el PFR al STR, permitiendo que las células del cultivo recirculen entre ambos compartimentos tal como se muestra en la Figura 2 y el Anexo II, para reproducir el ambiente asociado con la zona de adición formada en cultivos de alta densidad celular por lote alimentado con glucosa como fuente de carbono limitante del crecimiento realizados en biorreactores a gran escala. La fase de lote inicial se realiza igual que en el cultivo control en el STR. Al iniciar la fase de alimentación, la solución de alimentación se añade en el punto de adición colocado a la entrada del PFR (Figura 2). Se realizaron cultivos por duplicado, manteniendo dos tiempos de residencia (t_R) diferentes dentro del PFR: 25 y 40 s, mediante el ajuste del flujo de recirculación f entre las secciones STR y PFR (190 y 300 mL/min). Estos tiempos son relevantes, ya que para los biorreactores utilizados en la producción de proteínas recombinantes con células de *E. coli* en escalas de 0.5-20 m³, se han reportado tiempos de circulación de entre 9 y 40 s (Xu, Jahic and Enfors, 1999; Vrabel *et al.*, 2000; Haringa, Mudde and Noorman, 2018).

El comportamiento cinético de los cultivos creciendo en tales condiciones se observa en las Figuras 11-13 donde se muestran la cinética de crecimiento, de consumo de glucosa, la acumulación de acetato y formato en el medio (Figura 11), los parámetros μ , q_s y $Y_{x/s}$ (Figura 12), y los gráficos de medición y control de TOD, temperatura y pH (Figura 13) de cada cultivo por duplicado. En estos cultivos, aproximadamente el 10% de la población celular experimentó un incremento en la disponibilidad de glucosa durante 25 o 40 segundos, a medida que pasaba por el PFR que simula la zona cercana al punto de adición, donde la concentración de glucosa en la solución de adición es de 500 g/L, la cual se diluye al mezclarse con el flujo del cultivo recirculado. El 90% de la población celular restante encontraba condiciones de limitación de glucosa con una concentración medida menor a los 0.1 g/L, mientras que el oxígeno disponible no era limitante, durante intervalos de

tiempo medio que van desde los 240 a 300 s en el montaje con un t_R de 25 s en el PFR, y de 380 a 475 s cuando el t_R fue de 40 s en el PFR (tiempos calculados utilizando la Ecuación 5). Los perfiles observados en estos gráficos evidencian las adaptaciones sostenidas de la población celular global a las condiciones de estrés repetido, lo que refleja tanto la adaptación fisiológica como metabólica del cultivo ante las condiciones oscilantes de glucosa y oxígeno disuelto que también se conocen como respuestas de largo plazo (long term responses) (Anane *et al.*, 2016; Löffler *et al.*, 2016; Von Wulffen *et al.*, 2016; Nieß *et al.*, 2017; Brand *et al.*, 2018).

Durante la fase lote y la fase de lote alimentado se muestra un comportamiento reproducible respecto al cultivo control (Figuras 11-13). Durante el periodo de alimentación se alcanza una concentración celular aproximada de 25 g/L a las 24 h, manteniendo limitante la concentración de glucosa en el medio (~ 0.1 g/L) (Figura 11A-B, D-E), igual que como se observa para los gráficos control (Figura 8A-B), tampoco se detectó acumulación de acetato o formato en el medio de cultivo (Figura 11C, F), si bien al igual que en los cultivos control se acumuló acetato al final de la fase lote por debajo de 0.5 g/L que fue reasimilado en la fase de lote alimentado. A las 24 h de cultivo se incrementa la temperatura hasta 39°C (Figura 13C, G), lo que conlleva un incremento en la actividad metabólica reflejado en el incremento de μ , q_s y $Y_{x/s}$ (Figura 12B-D, F-H); seguida de una disminución por debajo de los valores que se mantuvieron durante la fase alimentada. Esta disminución del crecimiento fue acentuada en comparación al cultivo control donde la concentración celular superó los 40 g/L, mientras que en el STR-PFR alcanzó alrededor de 30 g/L y por debajo de 20 g/L cuando el t_R fue de 25 y 40 s respectivamente, lo que significa alrededor de un 25 y 50% menos de la concentración celular. La glucosa se mantuvo limitada en el medio durante todas las condiciones, a excepción del cultivo cuando el t_R en el PFR fue de 40 s durante la termoinducción donde se observó acumulación de glucosa de hasta 8 g/L (Figura 11E). Durante la fase de inducción se observa también acumulación relevante de acetato (~ 4 y 6 g/L cuando el t_R en el PFR fue de 25 y 40 s respectivamente) y formato (~ 2 y 3 g/L cuando el t_R en el PFR fue de 25 y 40 s respectivamente) en el medio de cultivo.

En estos cultivos se observa durante la fase de producción inducida por incremento de temperatura, a partir de las 24 horas, la concentración de biomasa disminuye significativamente, la glucosa no se consume completamente y los ácidos orgánicos acetato y formato se acumulan de manera significativa en el medio de cultivo. Esto se acentúa claramente con el aumento del tiempo de residencia dentro del PFR. Los datos sugieren que hubo muerte celular, esto se refleja en valores negativos de la velocidad de crecimiento. Como se muestra en la Figura 12E, la concentración celular medida se desvía del crecimiento exponencial, debido a que la μ obtenida no corresponde a una constante específica de crecimiento, por lo tanto, se denominó "velocidad específica de crecimiento aparente" y se obtuvieron valores negativos. Previamente en condiciones similares se ha reportado lisis celular, que puede ser provocada por fluctuaciones rápidas en la disponibilidad de glucosa y oxígeno disuelto. Cuando las células pasan de una zona rica en glucosa a una zona de inanición, pueden experimentar un choque metabólico que debilita la integridad de la membrana celular, llevando a la lisis. Además, la falta de oxígeno puede inducir la producción de enzimas líticas. Por otra parte, la acumulación de acetato en el medio puede inhibir el crecimiento celular e incluso inducir la muerte de las células. (Bylund *et al.*, 1998; Ying Lin and Neubauer, 2000; Hewitt and Nebe-Von-Caron, 2001; Eiteman and Altman, 2006)

Los resultados muestran cómo el t_R que las células experimentan con concentraciones más altas de glucosa en la zona de adición de glucosa simulada en la sección tubular impacta negativamente el crecimiento celular y el consumo de glucosa. Además, la acumulación de acetato y formato sugiere que las rutas metabólicas centrales del carbono se desvían hacia el sobreflujo metabólico y la fermentación ácido-mixta. Esto ocurre cuando la disponibilidad de oxígeno es limitada o nula, donde las células recurren a vías metabólicas alternas para generar energía, lo que favorece la producción de estos metabolitos. Además, el alto consumo de glucosa, junto a la capacidad limitada de la cadena respiratoria para oxidar completamente el acetil-CoA, promueve la generación de acetato y formato como productos de sobreflujo metabólico. Por último, la activación de la enzima piruvato formiato-liasa (Pfl) bajo condiciones anaeróbicas facilita la conversión del

piruvato en acetil-CoA y formato, contribuyendo significativamente a la acumulación de estos compuestos. (Rasmussen, Møller and Atlung, 1991; Xu *et al.*, 1999; Xu, Jahic and Enfors, 1999).

La Figura 13 muestra los gráficos de medición y control de TOD, temperatura y pH, que son reproducibles con los obtenidos en el cultivo control (Figura 10). Se observa la alta variación en el control de TOD como resultado del control manual del enriquecimiento de oxígeno en la aireación (Figura 13 A y E). El oxígeno disuelto puede ser difícil de mantener de manera precisa cuando el flujo de aire es controlado manualmente, lo que lleva a fluctuaciones en los niveles de oxígeno cuando la demanda de oxígeno es elevada, como en los cultivos de *E. coli* de alta densidad celular (Lee *et al.*, 1991; Lee, 1996).

Los perfiles de TOD al interior del PFR con ambos tiempos de residencia (Figura 13 B y F) muestra la presencia de oxígeno cuando este fue medido a la entrada del PFR, que va oscilando por debajo del 40% de saturación de aire mantenido en el STR, este valor tendió a 0% hacia el final de la fase de lote alimentado y durante la termoinducción, y esta tendencia se vio acentuada al aumentar el t_R a 40 s al interior del PFR. A la salida del PFR se registró un valor de 0% a lo largo del cultivo, lo que indica el consumo y agotamiento del oxígeno presente proveniente de la sección del STR durante el paso de las células por el PFR donde se encuentran además con alta disponibilidad de glucosa, al entrar al PFR las células tienen una mayor disponibilidad de glucosa y agotan el oxígeno en consecuencia.

La recirculación de las células entre el STR y el PFR permite generar un ambiente simulado que representa la zona de adición de glucosa, crucial para reproducir condiciones de cultivos de alta densidad celular en biorreactores a gran escala. Las fluctuaciones en la disponibilidad de glucosa y oxígeno inducen adaptaciones metabólicas, pero también conducen a un mayor estrés celular, lo que puede culminar en la reducción del crecimiento, la acumulación de ácidos orgánicos y, eventualmente lisis celular.

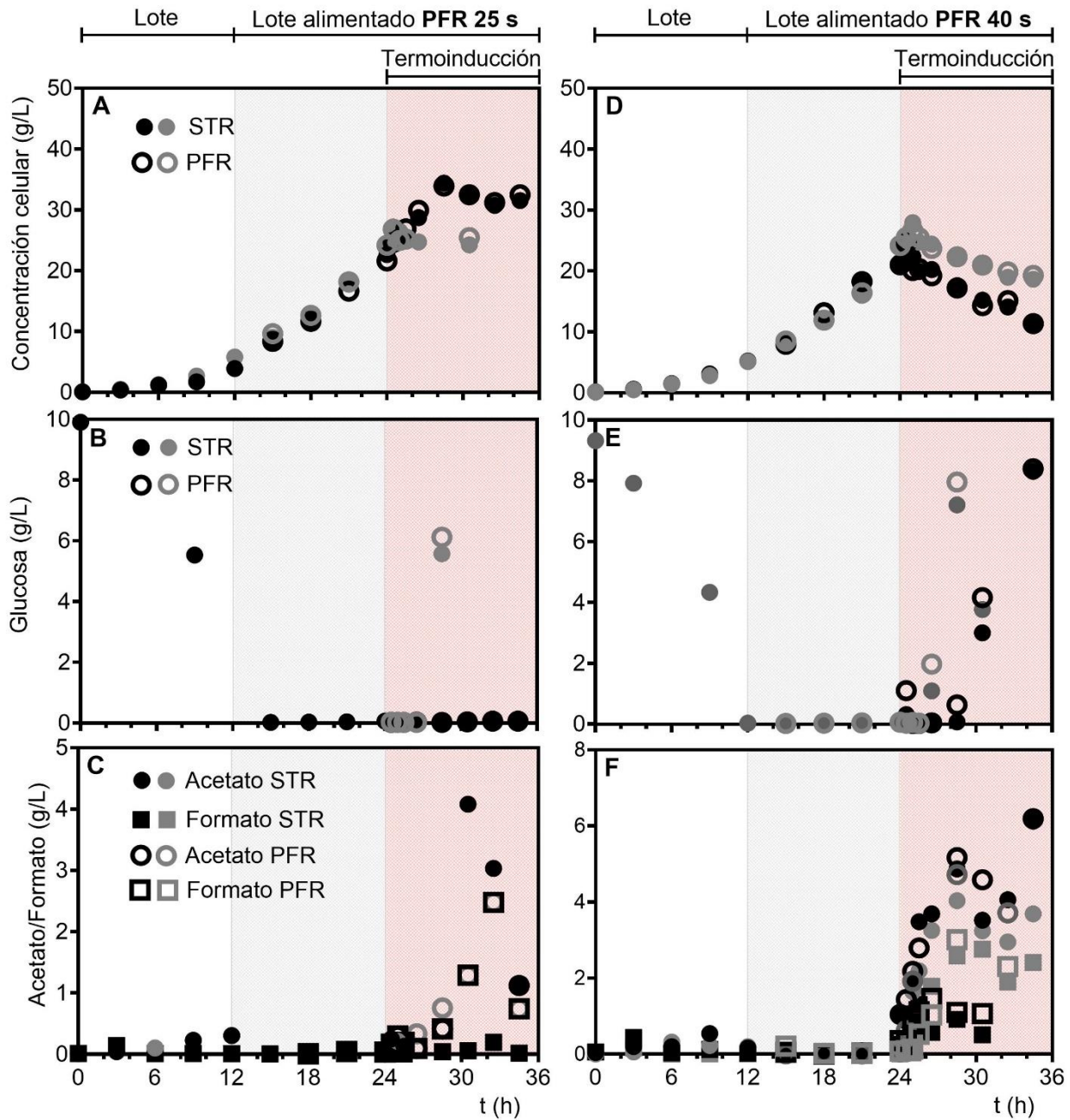


Figura 11. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado en el sistema compartimentalizado STR-PFR con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 y 40 s. A, D) Crecimiento celular. B, E) Concentración de glucosa en el medio. C, F) Concentración de acetato y formato en el medio de cultivo. Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris. Los símbolos completos fueron muestras tomadas a la salida del STR (STRout) y los vacíos fueron muestras tomadas a la salida del PFR (PFRout).

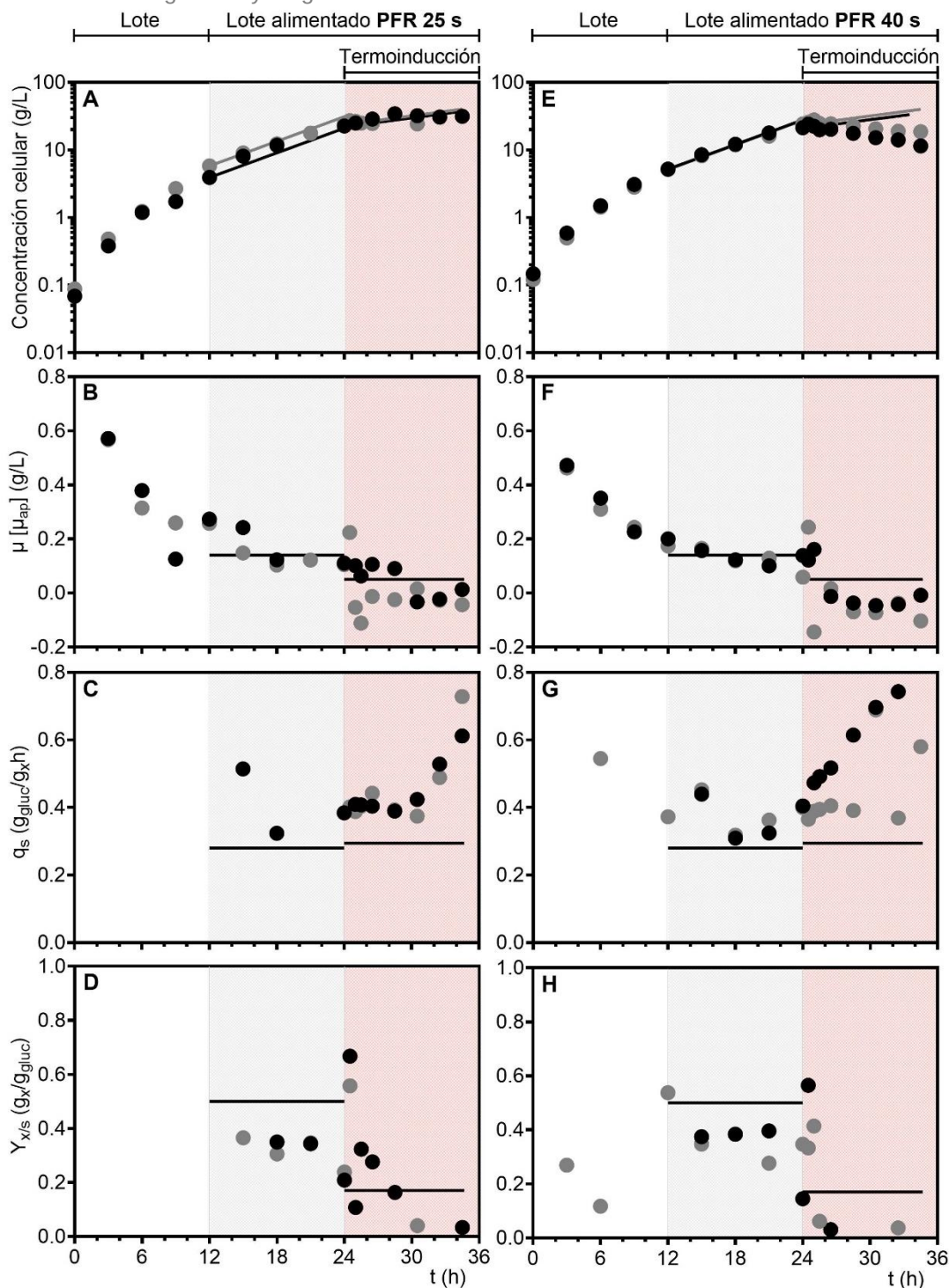


Figura 12. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado en el sistema compartamentalizado STR-PFR con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 y 40 s. A, E) Crecimiento celular. Perfil tomado a partir de las muestras a la salida del STR (STRout) de B, F) la velocidad de crecimiento, C, G) la velocidad específica de consumo de glucosa y D, H) el rendimiento de biomasa respecto a la glucosa consumida. Los valores esperados de acuerdo con el modelo de alimentación (Ecuación 1) se representan con la línea continua. Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

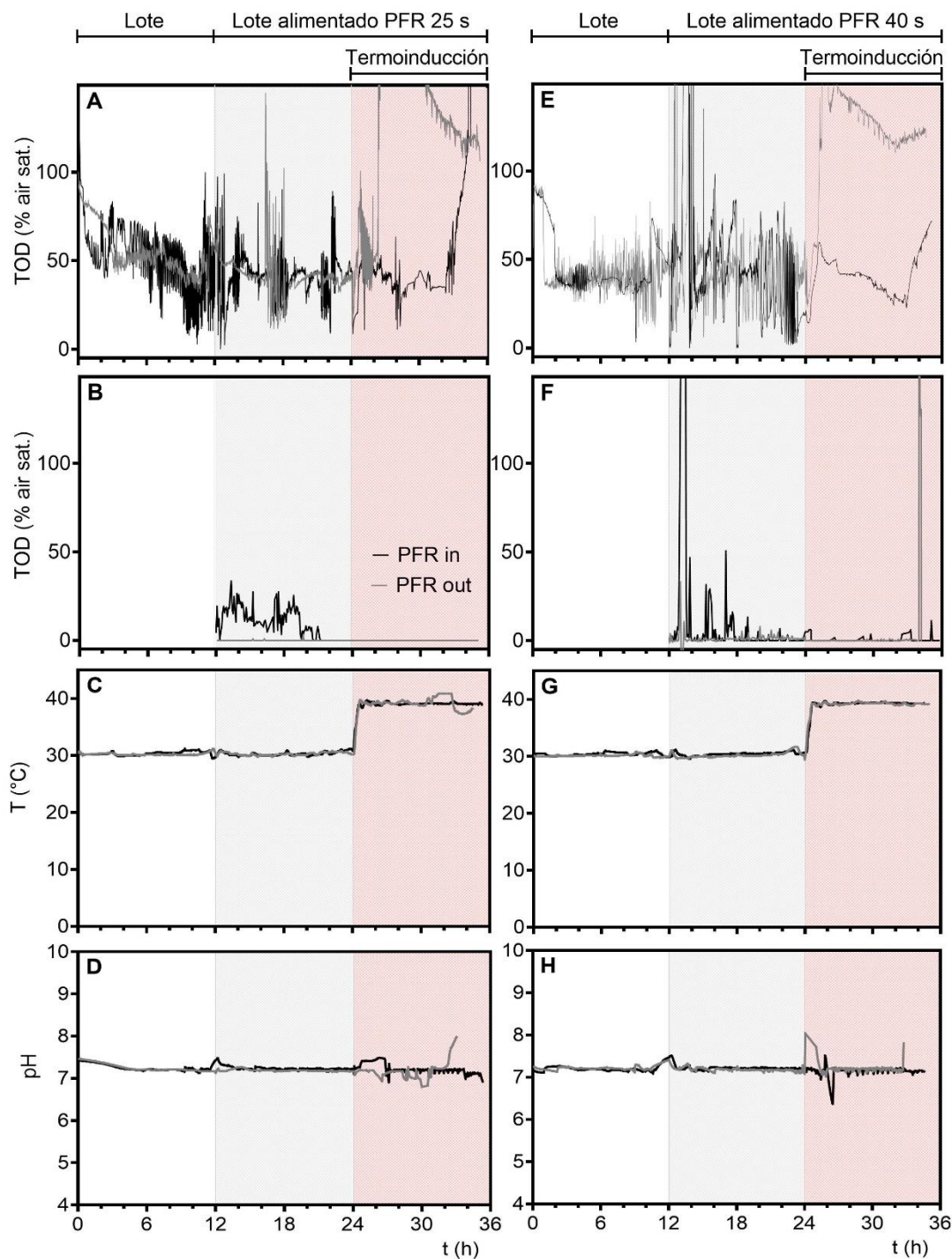


Figura 13. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado en el sistema compartimentalizado STR-PFR con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 y 40 s. Gráficos de medición de los parámetros controlados: TOD (40%), pH (7.2) y temperatura (30-39°). Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

Muestras de cultivo fueron tomadas a la salida del STR, antes de entrar al PFR (STR out, símbolos completos en la Figura 11), y a la salida del PFR, antes de volver al STR (PFRout, símbolos vacíos en la Figura 11). En general las mediciones realizadas en ambos puntos de muestreo (salida del STR y salida del PFR) dieron resultados reproducibles en cuanto a la concentración celular y la concentración de glucosa. La acumulación al paso de las células por la sección del PFR fue estimada a partir de los valores medidos a la salida del STR que se restan de los tomados a la salida del PFR y representan la acumulación, de biomasa, glucosa y metabolitos (acetato y formato) durante el t_R medio que pasaron las células en esta sección, caracterizada por tener una mayor disponibilidad de glucosa al ser el punto de adición, y baja disponibilidad de oxígeno disuelto, dado que esta sección no es aireada, el oxígeno disponible es el remanente que viene del STR y es agotado por las células. La Figura 14 muestra dichos valores, se observa la tendencia de un rápido crecimiento en esta zona que dio lugar a una acumulación aproximada de entre 0.1-1 g/L de células durante su paso por el PFR (Figura 14 A, D). La glucosa tiende a acumularse cuando avanza el cultivo, lo que corresponde con la disminución del consumo de glucosa, principalmente durante la termoinducción, donde las células llegaron a acumular hasta alrededor de 1 g/L de glucosa hacia el final del cultivo (Figura 14 B, E). Se observó también acumulación de ácidos orgánicos por debajo de 0.1 g/L de acetato y formato durante el lote alimentado, y este valor incrementó durante la termoinducción donde se observa hasta alrededor de 0.6-0.8 g/L de acetato y formato cuando el t_R fue de 25 y 40 s en el PFR respectivamente. Lo encontrado coincide con reportes previos donde se ha visto que las células de *E. coli* comienzan a producir acetato y formato en respuesta a la limitación de oxígeno en un tiempo muy corto desde 2 s (en condiciones de anaerobiosis) hasta las decenas de segundos (20-40 s) (Lara, Galindo, *et al.*, 2006; Lara, Leal, *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2009). Estudios de escalamiento descendente han evidenciado la dinámica celular ante las condiciones oscilantes observadas en los biorreactores productivos, sugiriendo una rápida adaptación y el desarrollo de respuestas rápidas o respuestas de corto plazo (short responses) que son las observadas cuando las células transcurren por cambios en las condiciones

ambientales durante algunos segundos, como a su paso por la sección del PFR. En células de *E. coli* estas respuestas incluyen cambios metabólicos rápidos y la activación de programas transcripcionales fundamentales (Amanullah, McFarlane, Emery, Nienow, *et al.*, 2001; Anane *et al.*, 2016; Löffler *et al.*, 2016; Von Wulffen *et al.*, 2016; Nieß *et al.*, 2017; Brand *et al.*, 2018).

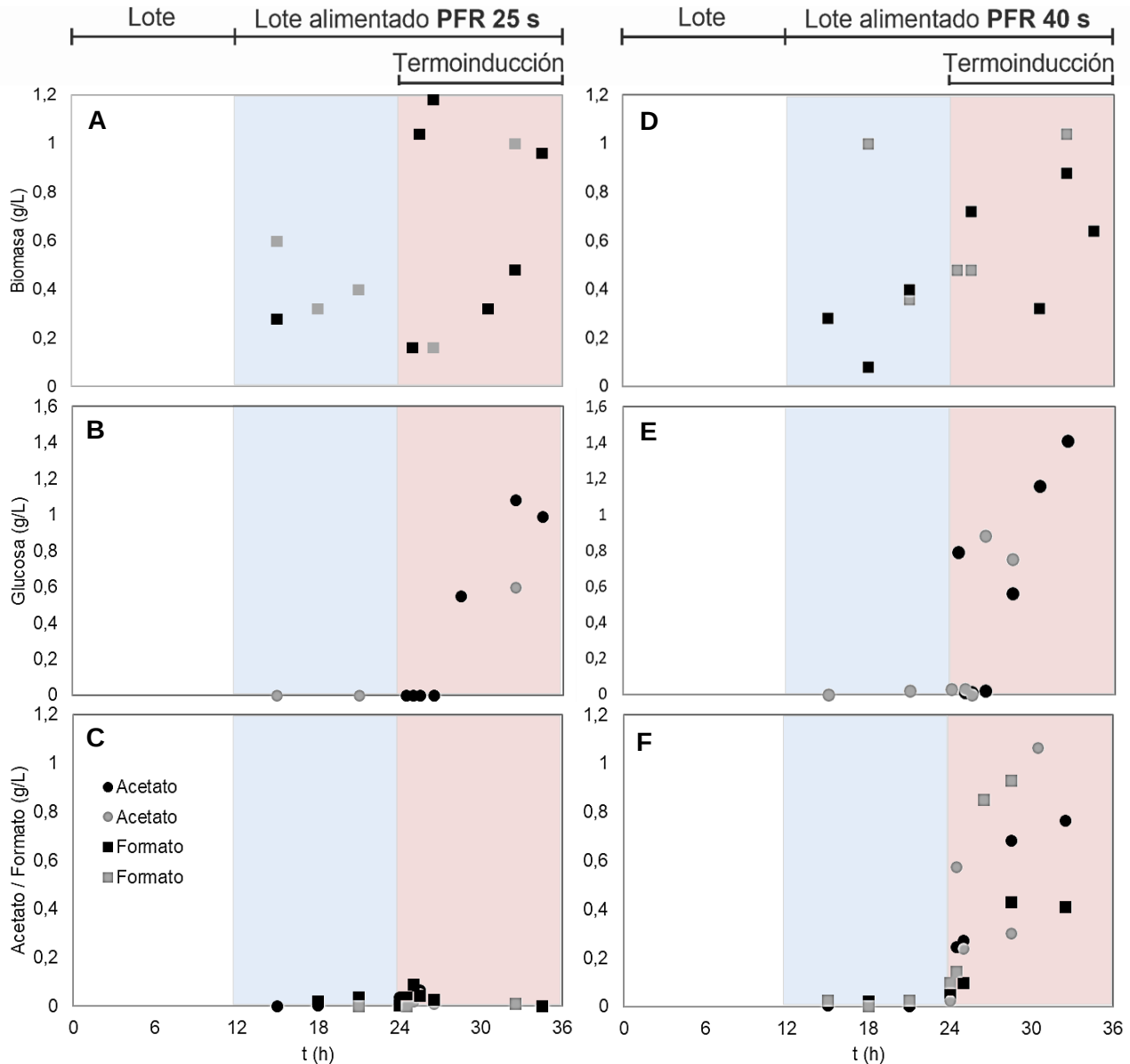


Figura 14. Cultivo de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF por lote alimentado en el sistema compartamentalizado STR-PFR con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 y 40 s. Acumulación medida a la salida del PFR de: A, D) concentración celular, B, E) glucosa y C, F) acetato y formato. Se muestran los resultados de dos cultivos independientes en colores negro y gris.

6.6. Producción de proteína en cultivos por lote alimentado de *E. coli* rHuGM-CSF

Previamente se realizaron cultivos por lote alimentado en un cultivo control considerado homogéneo (STR) y en el sistema de dos compartimentos STR-PFR, donde el punto de adición de la solución de alimentación se realiza a la entrada del PFR, manteniendo tiempos de residencia promedio al interior del PFR de 25 y 40 s.

Las siguientes Figuras (15-17) muestran la separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE de lisado celular (proteína total) y de cuerpos de inclusión (fracción insoluble) de muestras tomadas durante la fase de inducción por temperatura (39°C) de los cultivos realizados ante las diferentes condiciones. Se puede observar la presencia de rHuGM-CSF como la banda correspondiente en el peso molecular esperado de 14.6 kDa. El análisis de la imagen de los geles puede ayudar para comparar cuantitativamente la concentración de la proteína en cada una de las condiciones.

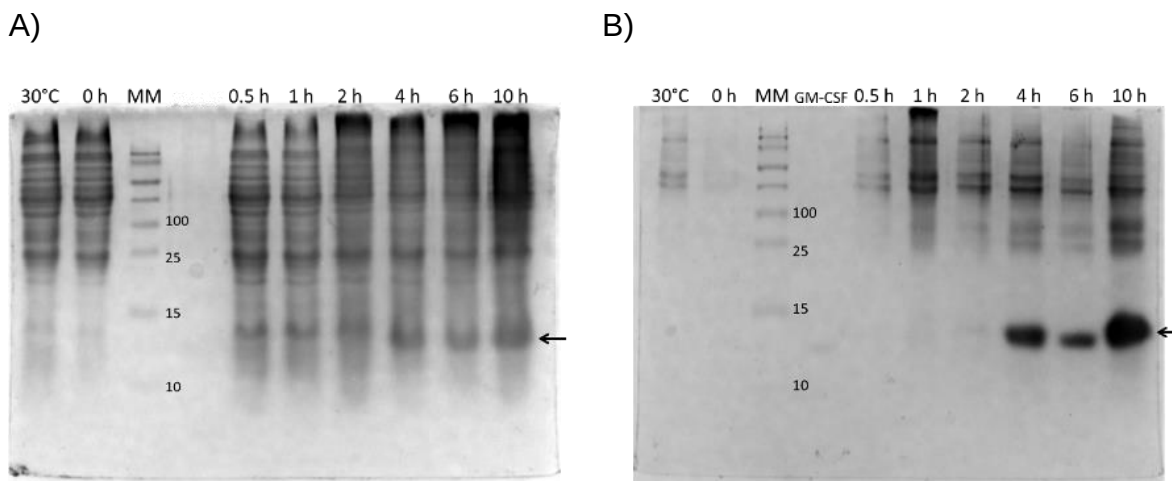


Figura 15. Gel SDS-Page 15% Cultivo alimentado control *E. coli* W3110 rHuGM-CSF durante la fase de termoinducción. A) Muestras de lisado celular (proteína total) tomadas a diferentes tiempos de cultivo. B) Muestras de cuerpos de inclusión tomadas a diferentes tiempos de cultivo. MM: Marcador de peso molecular (kDa); h: tiempo transcurrido a partir del incremento de temperatura de 30 a 39°C. La flecha negra señala la banda que corresponde con rHuGM-CSF (14.6 kDa). GM-CSF: Estándar.

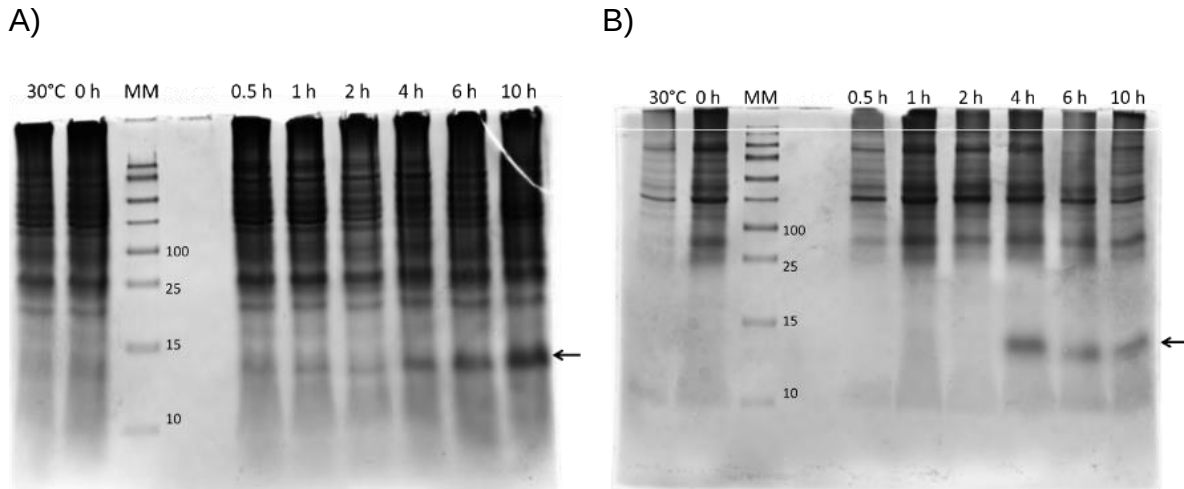


Figura 16. Gel SDS-Page 15% Cultivo alimentado en STR-PFR con tiempo de residencia promedio de 25 s al interior del PFR de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF durante la fase de termoinducción. A) Muestras de lisado celular (proteína total) tomadas a diferentes tiempos de cultivo. B) Muestras de cuerpos de inclusión tomadas a diferentes tiempos de cultivo. MM: Marcador de peso molecular (kDa); h: tiempo transcurrido a partir del incremento de temperatura de 30 a 39°C. La flecha negra señala la banda que corresponde con rHuGM-CSF (14.6 kDa).

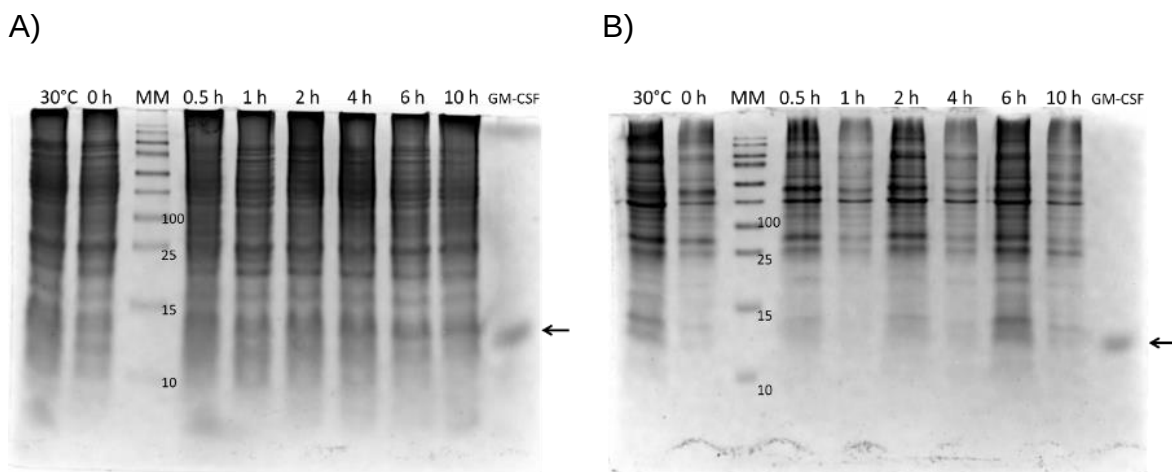


Figura 17. Gel SDS-Page 15% Cultivo alimentado en STR-PFR con tiempo de residencia promedio de 25 s al interior del PFR de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF durante la fase de termoinducción. A) Muestras de lisado celular (proteína total) tomadas a diferentes tiempos de cultivo. B) Muestras de cuerpos de inclusión tomadas a diferentes tiempos de cultivo. MM: Marcador de peso molecular (kDa); h: tiempo transcurrido a partir del incremento de temperatura de 30 a 39°C. La flecha negra señala a la banda que corresponde con rHuGM-CSF (15.4 kDa). GM-CSF: Estándar.

La Figura 18 muestra también el análisis de proteína por SDS-PAGE del lisado celular, IBs purificados e incluye también la fracción citoplasmática soluble de las células de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF creciendo en el cultivo control (A, E, I) y en el sistema compartamentalizado STR-PFR con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 (B, F, J) y 40 s (C, G, K). Las muestras fueron tomadas a la salida del STR (STRout). En los carriles 0h-10h se corrieron las muestras tomadas en diferentes tiempos después de la inducción por incremento de temperatura de 30 a 39°C. En la línea, a 30°C, se encuentra la muestra tomada a las 24 horas de cultivo, justo antes del aumento de temperatura. MM es el marcador de peso molecular. GM-CSF es la proteína estándar. Las flechas negras indican el peso molecular correspondiente a rHuGM-CSF (14.6 KDa).

Los resultados presentados en la Figura 18 muestran una tendencia similar de acumulación de rHuGM-CSF respecto a la proteína total en todas las condiciones de cultivo, con valores máximos aproximados de un 20%, a excepción de cuando las células crecieron en el sistema compartamentalizado STR-PFR con un tiempo de residencia (t_R) de 40 segundos, donde el máximo estuvo cerca del 10%, indicando una importante disminución en la productividad. Además, la concentración de proteína recombinante en los IBs purificados también fue menor en función del t_R , alcanzando un máximo alrededor del 30 % en el cultivo control a unos 20 y 5% cuando el t_R fue de 25 y 40 s respectivamente. Por otro lado, en la fracción soluble, la proteína recombinante alcanzó una proporción similar en todas las condiciones. La concentración máxima obtenida de rHuGM-CSF fue de 4.12 ± 0.35 g/L en cultivos control, mientras que esta producción disminuyó un 60% (1.78 ± 0.14 g/L) y un 90% (0.45 ± 0.02 g/L) cuando el t_R en el PFR fue de 25 y 40 s respectivamente.

Anteriormente se ha reportado disminución de productividad ante gradientes de concentración de glucosa y disponibilidad de oxígeno. Esto se debe a que las células deben adaptarse constantemente a las condiciones cambiantes, lo que consume energía y recursos que podrían haberse utilizado para la producción de proteínas.

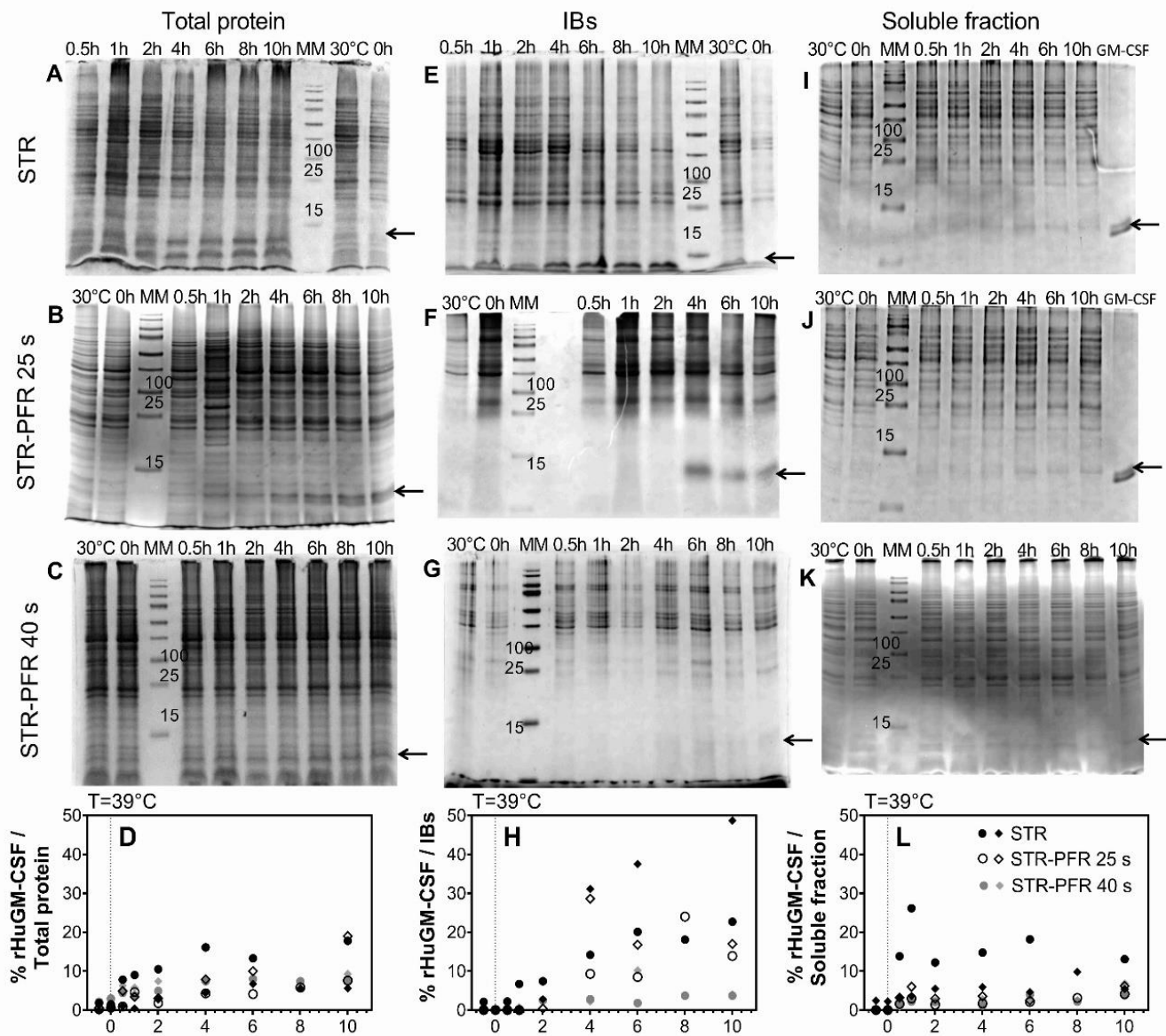


Figura 18. Acumulación de rHuGM-CSF en la proteína total del lisado celular (A-D), IBs purificados (E-H) y la fracción citoplasmática soluble (I-L). Se tomaron muestras de los cultivos por lote alimentado de *E. coli* W3110 rHuGM-CSF después de la termoinducción a 39°C, creciendo en el cultivo control y en el sistema compartimentalizado STR-PFR a la salida del STR (STRout) con la reproducción de la zona de adición de glucosa con tiempos de residencia de 25 y 40 s. Se muestran los resultados obtenidos de dos cultivos independientes como círculos y rombos.

La adaptación del metabolismo al redirigir las rutas del Carbono hacia sobreflujo metabólico y fermentación ácido-mixta promueve la acumulación de metabolitos tóxicos para el crecimiento lo que también va a impactar la producción de la proteína recombinante. También se ha observado que, bajo condiciones de producción a

gran escala, las demandas adicionales de ATP para la transcripción y traducción de genes inducidos para enfrentar las condiciones oscilantes de glucosa y oxígeno disuelto pueden aumentar los requerimientos de mantenimiento independiente del crecimiento en un 40-50%. Esto puede llevar a una limitación de ATP, lo que afecta negativamente la producción de proteínas recombinantes. Además, la activación de genes relacionados con la motilidad celular y la respuesta al estrés general puede desviar recursos energéticos que podrían ser utilizados para la producción de proteínas recombinantes. En resumen, la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se ve comprometida por las demandas energéticas adicionales y las respuestas transcripcionales inducidas por las condiciones de producción a gran escala (Bylund *et al.*, 1999, 2000; Löffler *et al.*, 2016; Nadal-Rey *et al.*, 2021).

Para mitigar las limitaciones que afectan la productividad de proteínas recombinantes termoinducidas en cultivos industriales bajo condiciones de fluctuación de glucosa y oxígeno disuelto, se pueden desarrollar cepas de *E. coli* más robustas y adaptadas a situaciones de estrés. Esto se puede lograr mediante la eliminación de genes que consumen grandes cantidades de energía, así como la sobreexpresión de genes asociados con la respuesta al estrés celular. Además, es posible diseñar cepas con mutaciones en el sistema de consumo de glucosa, lo que permitiría un control más eficiente del consumo de este nutriente, incluso frente a pulsos que generen concentraciones elevadas. Estas estrategias se han propuesto como alternativas para mejorar la estabilidad metabólica de las células y optimizar la producción de proteínas recombinantes en condiciones de cultivo subóptimas (Lara, Galindo, *et al.*, 2006; Lara, Leal, *et al.*, 2006; Sharma, Blattner and Harcum, 2007; Lara *et al.*, 2009; Borja *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2013).

7. CONCLUSIONES

- El análisis de régimen de los cultivos alimentados a gran escala de células de *E. coli* ($\sim 20 \text{ m}^3$) predice la presencia de gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto en las diferentes zonas que se generan en el biorreactor causadas por un mezclado deficiente. Adicionalmente, la evidencia en la literatura refleja las respuestas moleculares que se esperan en una cepa de *E. coli* con la termoinducción de proteínas recombinantes incluyendo el sobre flujo metabólico y la inducción de la respuesta general de estrés y la respuesta estricta.
- El diseño propuesto de un sistema de compartimentos STR-PFR reproduce los gradientes de concentración de oxígeno disuelto cuando se simula la región de adición de glucosa, e inhibe el crecimiento y la producción de la proteína recombinante cuando el tiempo de residencia en el biorreactor de flujo pistón es de 40 s.
- La producción de la proteína recombinante rHuGM-CSF disminuye cuando *E. coli* termoinducible es expuesta al ambiente oscilante de concentraciones de glucosa y oxígeno disuelto en cultivos por lote alimentado de alta densidad celular mediante una aproximación de escalamiento descendente siendo menor la producción cuando el tiempo de residencia en el biorreactor de flujo pistón es de 40 s.

8. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la determinación de la arquitectura de los cuerpos de inclusión obtenidos bajo las tres condiciones evaluadas. En este sentido, poder evaluar el contenido de hélice alfa, beta plegada y contenido amiloide por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier. De igual manera, resistencia a la degradación proteolítica con ensayos usando proteinasa-K. A su vez, capacidad de desnaturalización por agentes caotrópicos como el cloruro de guanidinio y urea.
- Llevar a cabo estudios de proteómica comparativa entre los cultivos control y aquellos llevados bajo condiciones de escalamiento descendente.
- Determinar la transcriptómica de los cultivos bajo condiciones de cultivos alimentados de alta densidad celular en biorreactores de tanque agitado y compararlos con aquellos cultivos que simulan biorreactores industriales con gradientes de oxígeno y fuente de carbono.
- Evaluar el impacto en la respuesta fisiológica de *E. coli* recombinante termoinducible en presencia de otros gradientes simulados usando el PFR diseñado en este trabajo con diferentes configuraciones PFR-STR-PFR que permitan por ejemplo la simulación simultánea de la zona de adición de glucosa, la zona de inanición y la zona homogénea.
- Evaluar la productividad y calidad de proteína recombinante termoinducida en cepas con genomas reducidos y una capacidad disminuida de asimilación de glucosa en condiciones de gradientes oscilantes de nutrientes.

Además, este diseño puede ser utilizado para el desarrollo de estrategias de cultivo más eficientes y personalizadas, promoviendo un avance significativo en la biotecnología industrial y la producción de células y biomoléculas como metabolitos y proteínas de interés.

9. REFERENCIAS

- Ahn, Y.J. and Im, E. (2020) 'Heterologous expression of heat shock proteins confers stress tolerance in Escherichia coli, an industrial cell factory: A short review', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, p. 101833. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101833>.
- Allen, S.P. et al. (1992) 'Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in Escherichia coli.', *Journal of bacteriology*, 174(21), pp. 6938–6947. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.174.21.6938-6947.1992>.
- Amanullah, A., McFarlane, C.M., Emery, A.N., Nienow, A.W., et al. (2001) 'Physiological responses to mixing in large scale bioreactors', *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2), pp. 175–185. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00365-5).
- Amanullah, A., McFarlane, C.M., Emery, A.N. and Nienow, A.W. (2001) 'Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors', *Biotechnology and Bioengineering*, 73(5), pp. 390–399. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.1072>.
- Anane, E. et al. (2016) 'Modelling dissolved oxygen and glucose gradients in pulse-based fed batch culture of Escherichia coli', (April), pp. 1–2.
- Anane, E. et al. (2019) 'Modelling concentration gradients in fed-batch cultivations of E. coli – towards the flexible design of scale-down experiments', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(2), pp. 516–526. Available at: <https://doi.org/10.1002/jctb.5798>.
- Anane, E., Knudsen, I.M. and Wilson, G.C. (2021) 'Scale-down cultivation in mammalian cell bioreactors—The effect of bioreactor mixing time on the response of CHO cells to dissolved oxygen gradients', *Biochemical Engineering Journal*, 166, p. 107870. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107870>.
- Baeshen, M.N. et al. (2015) 'Production of biopharmaceuticals in E. Coli: Current scenario and future perspectives', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), pp. 953–962. Available at: <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>.
- Baracchini, E. and Bremer, H. (1987) 'Determination of synthesis rate and lifetime of bacterial mRNAs.', *Analytical biochemistry*, 167(2), pp. 245–260. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90160-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90160-6).

Borja, G.M. *et al.* (2012) 'Engineering Escherichia coli to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode', *Microbial Cell Factories*, 11(40), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-132>.

Brand, E. *et al.* (2018) 'Importance of the cultivation history for the response of Escherichia coli to oscillations in scale-down experiments', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(9), pp. 1305–1313. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1958-4>.

Brognaux, A. *et al.* (2014) 'Scale-down effect on the extracellular proteome of Escherichia coli: Correlation with membrane permeability and modulation according to substrate heterogeneities', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(8), pp. 1469–1485. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1119-8>.

Burgess, A. *et al.* (1987) 'Purification and Properties of Bacterially Synthesized Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor', *Blood*, 69(1), pp. 43–51. Available at: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V69.1.43.43>.

Bylund, F. *et al.* (1998) 'Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation', *Bioprocess Engineering*, 18(3), pp. 171–180. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004490050427>.

Bylund, F. *et al.* (1999) 'Scale down of recombinant protein production: A comparative study of scaling performance', *Bioprocess Engineering*, 20(5), pp. 377–389. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004490050606>.

Bylund, F. *et al.* (2000) 'Influence of scale-up on the quality of recombinant human growth hormone', *Biotechnology and Bioengineering*, 69(2), pp. 119–128. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000720\)69:2<119::AID-BIT1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000720)69:2<119::AID-BIT1>3.0.CO;2-9).

Calcines-Cruz, C. *et al.* (2018) 'Recombinant-phospholipase A2 production and architecture of inclusion bodies are affected by pH in Escherichia coli', *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, pp. 826–836. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.178>.

Carneiro, S., Ferreira, E.C. and Rocha, I. (2013) 'Metabolic responses to recombinant bioprocesses in Escherichia coli', *Journal of Biotechnology*, 164(3), pp. 396–408. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>.

Carrió, M. *et al.* (2005) 'Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies', *Journal of Molecular Biology*, 347(5), pp. 1025–1037. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.030>.

Carrió, M.M. and Villaverde, A. (2005) 'Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies.', *Journal of bacteriology*, 187(10), pp. 3599–3601. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3599-3601.2005>.

Caspeta Guadarrama, L. (2009) *Escalamiento descendente del proceso de producción de proteína heteróloga por termo-inducción de cultivos de alta densidad celular de Escherichia coli: Estudio de la respuesta transcripcional al choque térmico. (Tesis de Doctorado)*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Available at: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/89596> (Accessed: 31 October 2024).

Caspeta, L. et al. (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', *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), pp. 468–482. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.22084>.

Caspeta, L. et al. (2013) 'Enhancing thermo-induced recombinant protein production in Escherichia coli by temperature oscillations and post-induction nutrient feeding strategies', *Journal of Biotechnology*, 167(1), pp. 47–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.001>.

Castellanos-Mendoza, A. et al. (2014) 'Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in Escherichia coli', *Microbial Cell Factories*, 13(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0137-9>.

Caulcott, C.A. and Rhodes, M. (1986) 'Temperature-induced synthesis of recombinant proteins', *Trends in Biotechnology*, 4(6), pp. 142–146. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(86\)90164-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(86)90164-2).

Chen, R.H.-J. (2009) *Increasing inclusion body extractability and recoverability by altering fermentation conditions in high cell density Escherichia coli cultures. (Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy)*. Cornell University, USA. Available at: <https://hdl.handle.net/1813/13895> (Accessed: 31 October 2024).

Chou, C.P. (2007) 'Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), pp. 521–532. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1039-0>.

Cortés, J.T. et al. (2016) 'Physiological effects of pH gradients on Escherichia coli during plasmid DNA production', *Biotechnology and Bioengineering*, 113(3), pp. 598–611. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.25817>.

Cruz, N.A.V. *et al.* (2017) 'Production of a recombinant phospholipase A2 in *Escherichia coli* using resonant acoustic mixing that improves oxygen transfer in shake flasks', *Microbial Cell Factories*, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0746-1>.

Danckwerts, P. V. (1995) 'Continuous flow systems. Distribution of residence times', *Chemical Engineering Science*, 50(24), pp. 3857–3866. Available at: [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(96\)81811-2](https://doi.org/10.1016/0009-2509(96)81811-2).

Delvigne, F. *et al.* (2009) 'Bioreactor mixing efficiency modulates the activity of a *prpoS*::GFP reporter gene in *E. coli*', *Microbial Cell Factories*, 8, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-15>.

Delvigne, F., Destain, J. and Thonart, P. (2006) 'A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models', *Biochemical Engineering Journal*, 28(3), pp. 256–268. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.11.009>.

Eiteman, M.A. and Altman, E. (2006) 'Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations', *Trends in biotechnology*, 24(11), pp. 530–536. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2006.09.001>.

Fahnert, B., Lilie, H. and Neubauer, P. (2004) 'Inclusion bodies: formation and utilisation.', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 89(May 2014), pp. 93–142. Available at: <https://doi.org/10.1007/b93995>.

Ferenci, T. (2001) 'Hungry bacteria - Definition and properties of a nutritional state', *Environmental Microbiology*, 3(10), pp. 605–611. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00238.x>.

Ferreira, R.D.G., Azzoni, A.R. and Freitas, S. (2018) 'Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: The case of recombinant β -glucosidase', *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1077-0>.

Forno, G. *et al.* (2004) 'N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line', *European journal of biochemistry*, 271(5), pp. 907–919. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.2004.03993.X>.

Fuentes, L.G. *et al.* (2013) 'Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: Physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production',

Microbial Cell Factories, 12(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-42>.

García-Fruitós, E. *et al.* (2012) 'Bacterial inclusion bodies: making gold from waste', *Trends in Biotechnology*, 30(2), pp. 65–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.003>.

George, S., Larsson, G. and Enfors, S.O. (1993) 'A scale-down two-compartment reactor with controlled substrate oscillations: Metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae*', *Bioprocess Engineering*, 9(6), pp. 249–257. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01061530>.

Giese, H. *et al.* (2014) 'Liquid films on shake flask walls explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity', *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), pp. 295–308. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.25015>.

Gómez Gil, X. (2020) *Evaluación del efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano en un sistema termoinducido de Escherichia coli. (Tesis de Maestría)*. Available at: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3614562> (Accessed: 31 October 2024).

de Groot, N.S. and Ventura, S. (2006) 'Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies', *FEBS letters*, 580(27), pp. 6471–6476.

Grossman, A.D., Erickson, J.W. and Gross, C.A. (1984) 'The htpR gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters', *Cell*, 38(2), pp. 383–390. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90493-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90493-8).

Guisbert, E. *et al.* (2008) 'Convergence of Molecular, Modeling, and Systems Approaches for an Understanding of the *Escherichia coli* Heat Shock Response', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), pp. 545–554. Available at: <https://doi.org/10.1128/mubr.00007-08>.

Gupta, S.K. and Shukla, P. (2016) 'Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications', *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), pp. 1089–1098. Available at: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>.

Harcum, S.W. and Bentley, W.E. (1999) 'Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. Implications for heterologous protein yield.', *Applied biochemistry and biotechnology*, 80(1), pp. 23–37. Available at: <https://doi.org/10.1385/abab:80:1:23>.

Haringa, C. *et al.* (2016) 'Euler-Lagrange computational fluid dynamics for (bio)reactor scale down: An analysis of organism lifelines', *Engineering in Life Sciences*, 16(7), pp. 652–663. Available at: <https://doi.org/10.1002/elsc.201600061>.

Haringa, C. *et al.* (2017) 'Euler-Lagrange analysis towards representative down-scaling of a 22 m³ aerobic *S. cerevisiae* fermentation', *Chemical Engineering Science*, 170, pp. 653–669. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.01.014>.

Haringa, C., Mudde, R.F. and Noorman, H.J. (2018) 'From industrial fermentor to CFD-guided downscaling: what have we learned?', *Biochemical Engineering Journal*, 140, pp. 57–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.001>.

Hewitt, C.J. *et al.* (1998) 'The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor.', *Biotechnology and bioengineering*, 59(5), pp. 612–620. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980905\)59:5<612::aid-bit12>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980905)59:5<612::aid-bit12>3.0.co;2-b).

Hewitt, C.J. *et al.* (2000) 'Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration', *Biotechnology and Bioengineering*, 70(4), pp. 381–390. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001120\)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001120)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0).

Hewitt, C.J. *et al.* (2007) 'A comparison of high cell density fed-batch fermentations involving both induced and non-induced recombinant *Escherichia coli* under well-mixed small-scale and simulated poorly mixed large-scale conditions', *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), pp. 495–505. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.21127>.

Hewitt, C.J. and Nebe-Von-Caron, G. (2001) 'An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations', *Cytometry*, 44(3), pp. 179–187. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010701\)44:3<179::AID-CYTO1110>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010701)44:3<179::AID-CYTO1110>3.0.CO;2-D).

Hoffmann, F. and Rinas, U. (2001) 'On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation.', *Biotechnology and bioengineering*, 76(4), pp. 333–340. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.10098>.

Huang, C.J., Lin, H. and Yang, X. (2012) 'Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements', *Journal of Industrial*

Microbiology and Biotechnology, 39(3), pp. 383–399. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>.

Humer, D. and Spadiut, O. (2018) 'Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(11), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2541-5>.

Igwe, C.L. *et al.* (2024) 'Online monitoring of protein refolding in inclusion body processing using intrinsic fluorescence', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(12), pp. 3019–3032. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05249-1>.

İncir, İ. and Kaplan, Ö. (2024) 'Escherichia coli as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production', *Protein Expression and Purification*, 219, p. 106463. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106463>.

James, G.T. (1978) 'Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers', *Analytical Biochemistry*, 86(2), pp. 574–579. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90784-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90784-4).

Jia Baolei and Ok Jeon, Ch. (2016) 'High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives', *Open Biology*, 6, pp. 1–17.

Junne, S. *et al.* (2011) 'A two-compartment bioreactor system made of commercial parts for bioprocess scale-down studies: Impact of oscillations on Bacillus subtilis fed-batch cultivations', *Biotechnology Journal*, 6(8), pp. 1009–1017. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.201100293>.

Jürgen, B. *et al.* (2000) 'Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in Escherichia coli glucose-limited fed-batch fermentations', *Biotechnology and Bioengineering*, 70(2), pp. 217–224. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001020\)70:2<217::AID-BIT11>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001020)70:2<217::AID-BIT11>3.0.CO;2-W).

Jürgen, B. *et al.* (2010) 'Quality control of inclusion bodies in Escherichia coli', *Microbial Cell Factories*, 9, pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-41>.

Kabir, M.S. *et al.* (2005) 'Cell lysis directed by σ E in early stationary phase and effect of induction of the rpoE gene on global gene expression in Escherichia coli', *Microbiology*, 151(8), pp. 2721–2735. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.28004-0>.

Kelley, R.K. *et al.* (2018) 'Phase II trial of pembrolizumab (PEM) plus granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in advanced biliary cancers (ABC).', *Journal of Clinical Oncology*, 36(4_suppl), pp. 386–386. Available at: https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4_SUPPL.386.

Lara, A.R., Galindo, E., *et al.* (2006) 'Living with heterogeneities in bioreactors: Understanding the effects of environmental gradients on cells', *Molecular Biotechnology*, 34(3), pp. 355–381. Available at: <https://doi.org/10.1385/MB:34:3:355>.

Lara, A.R., Leal, L., *et al.* (2006) 'Transcriptional and metabolic response of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system', *Biotechnology and Bioengineering*, 93(2), pp. 372–385. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.20704>.

Lara, A.R. *et al.* (2009) 'Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses', *Biotechnology and Bioengineering*, 104(6), pp. 1153–1161. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.22503>.

Lara, A.R. *et al.* (2017) 'Characterization of Endogenous and Reduced Promoters for Oxygen-Limited Processes Using *Escherichia coli*', *ACS Synthetic Biology*, 6(2), pp. 344–356. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00233>.

Larsson, G. *et al.* (1996) 'Substrate gradients in bioreactors: Origin and consequences', *Bioprocess Engineering*, 14(6), pp. 281–289. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00369471>.

Larsson, G. and Enfors, S.O. (1993) 'Kinetics of *Escherichia coli* hydrogen production during short term repeated aerobic-anaerobic fluctuations', *Bioprocess Engineering*, 9(4), pp. 167–172. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00389925>.

Lee, G.H. *et al.* (2006) 'The economics of inclusion body processing', *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(2), pp. 73–90. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0047-2>.

Lee, S.C. *et al.* (1991) 'Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor', *Biotechnology and Bioengineering*, 37(7), pp. 597–607. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.260370702>.

Lee, S.Y. (1996) 'High cell-density culture of *Escherichia coli*', *Trends in Biotechnology*, 14(3), pp. 98–105. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).

Löffler, M. *et al.* (2016) 'Engineering *E. coli* for large-scale production – Strategies considering ATP expenses and transcriptional responses', *Metabolic Engineering*, 38(October), pp. 73–85. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.008>.

Löffler, M. *et al.* (2017) 'Switching between nitrogen and glucose limitation: Unraveling transcriptional dynamics in *Escherichia coli*', *Journal of Biotechnology*, 258(January), pp. 2–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.011>.

Losoi, P., Konttinen, J. and Santala, V. (2024) 'Modeling large-scale bioreactors with diffusion equations. Part II: Characterizing substrate, oxygen, temperature, carbon dioxide, and pH profiles', *Biotechnology and Bioengineering*, 121, pp. 1102–1117. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.28635>.

Lotfi, N. *et al.* (2019) 'Roles of GM-CSF in the pathogenesis of autoimmune diseases: An update', *Frontiers in Immunology*, 10(JUN). Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01265/PDF>.

Makrides, S.C. (1996) 'Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*', *Microbiological Reviews*, 60(3), pp. 512–538. Available at: <https://doi.org/10.1128/membr.60.3.512-538.1996>.

De Marco, A. *et al.* (2019) 'Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids', *FEMS Microbiology Reviews*, 43(1), pp. 53–72. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>.

Margreiter, G. *et al.* (2008) 'Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation', *Journal of Biotechnology*, 138(3), pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1995>.

Mayer, F. *et al.* (2023) 'Scale-related process heterogeneities change properties of high-cell-density fermentation broths demonstrated with *Escherichia coli* B and K-12 strains', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 98(6), pp. 1443–1452. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.7363>.

Mecas, J. *et al.* (1993) 'The activity of $\sigma(E)$, an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins', *Genes and Development*, 7(12 B), pp. 2618–2628. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.7.12b.2618>.

Metcalf, D. (2013) 'The Colony-Stimulating Factors and Cancer', *Cancer immunology research*, 1(6), p. 351. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0151>.

Moonen, P. *et al.* (1987) 'Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(13), p. 4428. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.13.4428>.

Nabiel, A. *et al.* (2023) 'Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from Escherichia coli inclusion bodies', *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11(3), pp. 47–52. Available at: <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.112204>.

Nadal-Rey, G. *et al.* (2021) 'Understanding gradients in industrial bioreactors', *Biotechnology Advances*, 46, p. 107660. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107660>.

Nakano, K. *et al.* (1997) 'Influence of acetic acid on the growth of Escherichia coli K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor', *Applied microbiology and biotechnology*, 48(5), pp. 597–601. Available at: <https://doi.org/10.1007/S002530051101>.

Neubauer, P. *et al.* (1995) 'Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli', *Journal of Biotechnology*, 43(3), pp. 195–204. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00130-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00130-1).

Neubauer, P. and Junne, S. (2010) 'Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses.', *Current opinion in biotechnology*, 21(1), pp. 114–121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.001>.

Neubauer, P. and Junne, S. (2016) 'Scale-Up and Scale-Down Methodologies for Bioreactors', *Bioreactors*, pp. 323–354. Available at: <https://doi.org/10.1002/9783527683369.ch11>.

Nienow, A.W. (2009) 'Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors', *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 42(11), pp. 789–796. Available at: <https://doi.org/10.1252/jcej.08we317>.

Nieß, A. *et al.* (2017) 'Repetitive short-term stimuli imposed in poor mixing zones induce long-term adaptation of E. coli cultures in large-scale bioreactors: Experimental evidence and mathematical model', *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01195>.

Nitta, T. *et al.* (2000) 'Function of the $\sigma(E)$ regulon in dead-cell lysis in stationary-phase escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 182(18), pp. 5231–5237. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.182.18.5231-5237.2000>.

Nonaka, G. *et al.* (2006) 'Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress.', *Genes & development*, 20(13), pp. 1776–1789. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1428206>.

Noorman, H. (2011) 'An industrial perspective on bioreactor scale-down: What we can learn from combined large-scale bioprocess and model fluid studies', *Biotechnology Journal*, 6(8), pp. 934–943. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.201000406>.

Olughu, W. *et al.* (2019) 'Insight into the large-scale upstream fermentation environment using scaled-down models', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(3), pp. 647–657. Available at: <https://doi.org/10.1002/jctb.5804>.

Onyeaka, H., Nienow, A.W. and Hewitt, C.J. (2003) 'Further Studies Related to the Scale-up of High Cell Density *Escherichia coli* Fed-Batch Fermentations: The Additional Effect of a Changing Microenvironment When Using Aqueous Ammonia to Control pH', *Biotechnology and Bioengineering*, 84(4), pp. 474–484. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.10805>.

Oosterhuis, N.M.G. *et al.* (1985) 'Scale-Down and Optimization Studies', *Biotechnology and Bioengineering*, XXVII, pp. 711–720.

Palomares, L.A., Lara, A.R. and Ramírez, O.T. (2010) 'Bioreactor Scale-Down', in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib142>.

Paul, K. and Herwig, C. (2020) 'Scale-down simulators for mammalian cell culture as tools to access the impact of inhomogeneities occurring in large-scale bioreactors', *Engineering in Life Sciences*, 20(5–6), pp. 197–204. Available at: <https://doi.org/10.1002/elsc.201900162>.

Rajacharya, G.H., Sharma, A. and Yazdani, S.S. (2024) 'Proteomics and metabolic burden analysis to understand the impact of recombinant protein production in *E. coli*', *Scientific Reports*, 14(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63148-y>.

Rani, A.K., Katiyar, R. and Rathore, A.S. (2024) 'Bioprocessing of inclusion bodies from *E. coli* to produce bioactive recombinant proteins', *Biochemical Engineering Journal*, 203, p. 109188. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109188>.

Rasmussen, L.J., Møller, P.L. and Atlung, T. (1991) 'Carbon metabolism regulates expression of the *pfl* (pyruvate formate-lyase) gene in *Escherichia coli*', *Journal of*

Bacteriology, 173(20), pp. 6390–6397. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6390-6397.1991>.

Rauda Ceja, J.A. (2020) *Efecto del pH sobre la producción de rHuGM-CSF en Escherichia coli a través de un sistema termoinducido. (Tesis de Licenciatura)*. Instituto Tecnológico de Morelia, México.

Restrepo Pineda, S. (2023) *Caracterización de la expresión de chaperonas y propiedades estructurales de los cuerpos de inclusión de la proteína rHuGM-CSF producida en un sistema termoinducible de Escherichia coli. (Tesis de Doctorado)*. Available at: <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000836496> (Accessed: 1 November 2024).

Restrepo-Pineda, S. et al. (2019) 'Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies', *Cell Stress and Chaperones*, 24(4), pp. 777–792. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>.

Restrepo-Pineda, S. et al. (2021) 'Thermoinducible expression system for producing recombinant proteins in *Escherichia coli*: Advances and insights', *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab023>.

Restrepo-Pineda, S., Rosiles-Becerril, D., et al. (2022) 'Induction temperature impacts the structure of recombinant HuGM-CSF inclusion bodies in thermoinducible *E. coli*', *Electronic Journal of Biotechnology*, 59, pp. 94–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.08.004>.

Restrepo-Pineda, S., Sánchez-Puig, N., et al. (2022) 'The pre-induction temperature affects recombinant HuGM-CSF aggregation in thermoinducible *Escherichia coli*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(8), pp. 2883–2902. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11908-z>.

Rhodus, V.A. et al. (2006) 'Conserved and variable functions of the σ^E stress response in related genomes', *PLoS Biology*, 4(1), pp. 0043–0059. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040002>.

Rinas, U. et al. (2007) 'Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*', *Journal of Biotechnology*, 127(2), pp. 244–257. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.004>.

Rinas, U. *et al.* (2017) 'Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half.', *Trends in biochemical sciences*, 42(9), pp. 726–737. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.005>.

Rinas, U. and Bailey, J.E. (1992) 'Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*.' *Applied microbiology and biotechnology*, 37(5), pp. 609–614. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00240735>.

Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014) 'Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges', *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.

Sabate, R., De Groot, N.S. and Ventura, S. (2010) 'Protein folding and aggregation in bacteria', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), pp. 2695–2715. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0344-4>.

Sandén, A.M. *et al.* (2003) 'Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins', *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), pp. 158–166. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.10457>.

Sandoval-Basurto, E.A. *et al.* (2005) 'Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein', *Biotechnology and Bioengineering*, 89(4), pp. 453–463. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.20383>.

Schmidt, M. *et al.* (1999) 'Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*', *Journal of Biotechnology*, 68(1), pp. 71–83. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00189-8).

Schweder, T. *et al.* (1999) 'Monitoring of genes that respond to process-related stress in large- scale bioprocesses', *Biotechnology and Bioengineering*, 65(2), pp. 151–159. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991020\)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V).

Seeger, A. *et al.* (1995) 'Comparison of temperature- and isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*', *Enzyme and Microbial Technology*, 17(10), pp. 947–953. Available at: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00123-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00123-9).

Shanafelt, A.B. and Kastelein, R.A. (1989) 'Identification of critical regions in mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by scanning-deletion

analysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(13), pp. 4872–4876. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.13.4872>.

Sharma, S.S., Blattner, F.R. and Harcum, S.W. (2007) 'Recombinant protein production in an Escherichia coli reduced genome strain', *Metabolic Engineering*, 9(2), pp. 133–141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.10.002>.

Shiloach, J. and Rinas, U. (2010) '10. Bacterial Cultivation for Production of Proteins and Other Biological Products', *The Kitakanto medical journal*, 57(1), pp. 134–134.

Slouka, C. et al. (2018) 'Custom made inclusion bodies: Impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes', *Microbial Cell Factories*, 17(1), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0997-5>.

Slouka, C. et al. (2019) 'Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing?', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), pp. 1143–1153. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9569-1>.

Sun, L. et al. (2018) 'GM-CSF Quantity Has a Selective Effect on Granulocytic vs. Monocytic Myeloid Development and Function', *Frontiers in Immunology*, 9, p. 358217. Available at: <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01922/BIBTEX>.

Tam, C. and Missiakas, D. (2005) 'Changes in lipopolysaccharide structure induce the σ^E -dependent response of Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 55(5), pp. 1403–1412. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04497.x>.

Thi Doan, D., Kremling, A. and Morchain, J. (2024) 'A Monte-Carlo approach for the simulation of microbial population dynamics in an heterogeneous scale-down bioreactor', *AIChE Journal*, 70(5), p. e18358. Available at: <https://doi.org/10.1002/AIC.18358>.

Valdez-Cruz, N.A. et al. (2010) 'Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters', *Microbial Cell Factories*, 9, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-18>.

Valdez-Cruz, N.A., Ramírez, O.T. and Trujillo-Roldán, M.A. (2011) 'Molecular responses of Escherichia coli caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction', *Bioengineered Bugs*, 2(2). Available at: <https://doi.org/10.4161/bbug.2.2.14316>.

Ventura, S. and Villaverde, A. (2006) 'Protein quality in bacterial inclusion bodies', *Trends in Biotechnology*, 24(4), pp. 179–185. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>.

Villaverde, A. and Carrió, M.M. (2003) 'Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies', *Biotechnology Letters*, 25(17), pp. 1385–1395. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1025024104862>.

Vrábel, P. et al. (2000) 'Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: Modelling and measurements', *Chemical Engineering Science*, 55(23), pp. 5881–5896. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00175-5).

Wallace, R.J. and Holms, W.H. (1986) 'Maintenance coefficients and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML308 at different growth temperatures', *FEMS Microbiology Letters*, 37(3), pp. 317–320. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01816.x>.

Walsh, G. and Walsh, E. (2022) 'Biopharmaceutical benchmarks 2022', *Nature Biotechnology* 2022 40:12, 40(12), pp. 1722–1760. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.

Walter, M.R. et al. (1992) 'Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor', *Journal of molecular biology*, 224(4), pp. 1075–1085. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90470-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90470-5).

Von Wulffen, J. et al. (2016) 'Transition of an anaerobic *Escherichia coli* culture to aerobiosis: Balancing mRNA and protein levels in a demand-directed dynamic flux balance analysis', *PLoS ONE*, 11(7). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158711>.

Xu, B. et al. (1999) 'Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), pp. 564–571. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002530051433>.

Xu, B., Jahic, M. and Enfors, S.O. (1999) 'Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*', *Biotechnology Progress*, 15(1), pp. 81–90. Available at: <https://doi.org/10.1021/bp9801087>.

Yamamori, T. and Yura, T. (1980) 'Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control.', *Journal of*

bacteriology, 142(3), pp. 843–851. Available at:
<https://doi.org/10.1128/jb.142.3.843-851.1980>.

Ying Lin, H. and Neubauer, P. (2000) 'Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli*', *Journal of Biotechnology*, 79(1), pp. 27–37. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00217-0).

Yoon, S.H. *et al.* (2003) 'Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture', *Biotechnology and Bioengineering*, 81(7), pp. 753–767. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.10626>.

Zhao, J. *et al.* (2024) 'Developing rational scale-down simulators for mimicking substrate heterogeneities based on cell lifelines in industrial-scale bioreactors', *Bioresource Technology*, 395, p. 130354. Available at:
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2024.130354>.

Zhao, W. *et al.* (2017) 'Enrichment of Ly6Chi monocytes by multiple GM-CSF injections with HBV vaccine contributes to viral clearance in a HBV mouse model', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(12), pp. 2872–2882. Available at:
<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1344797>.

10. ANEXOS

Anexo I. Permiso para publicación Figura 1.



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

August 20th, 2024

Science Suite Inc.

Subscription: Individual - Academic

Agreement number: HF277ILD0N

Publication name: TESIS DE DOCTORADO GRETA ISABEL REYNOSO CERECEDA

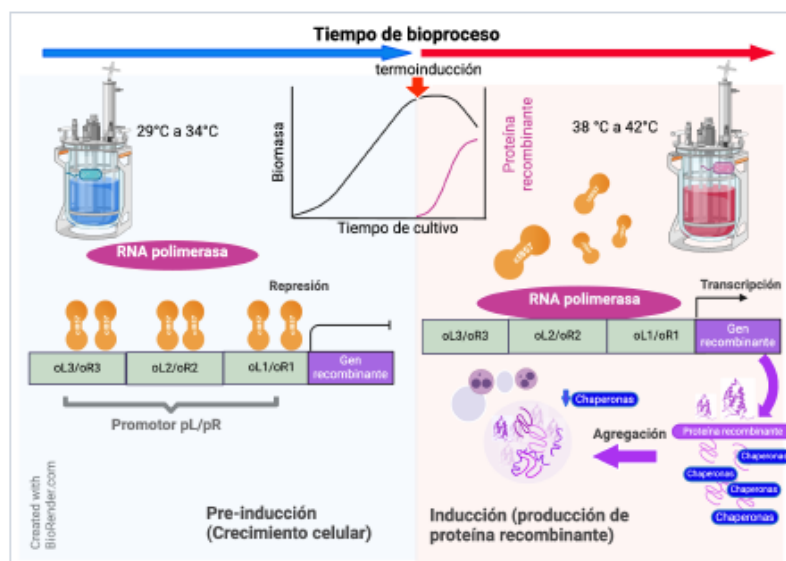
Citation to Use: Created with BioRender.com

To whom this may concern,

This document is to confirm that [Mauricio Trujillo-rolan](#) has been granted a license to use the BioRender Content, including icons, templates, and other original artwork, appearing in the attached Completed Graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender Content to be sublicensed for use in publications (journals, textbooks, websites, etc.).

All rights and ownership of BioRender Content are reserved by BioRender. All Completed Graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

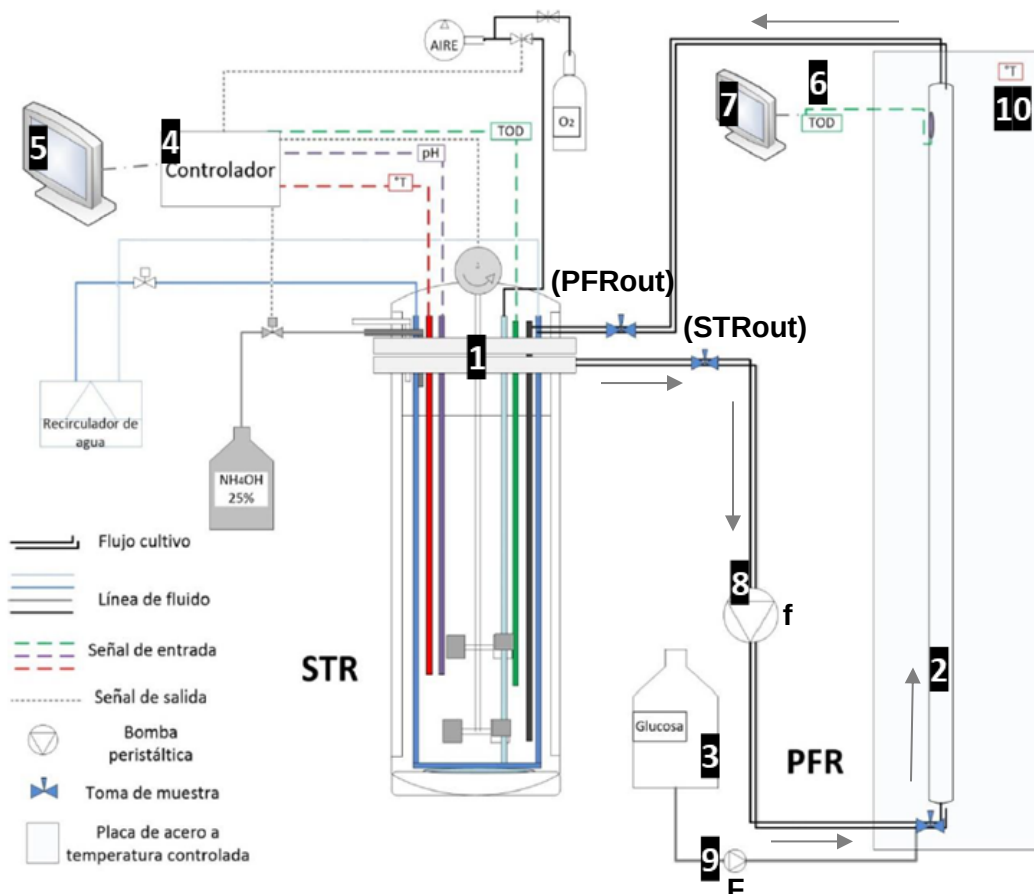
BioRender Content included in the Completed Graphic is not licensed for any commercial uses beyond use in a publication. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



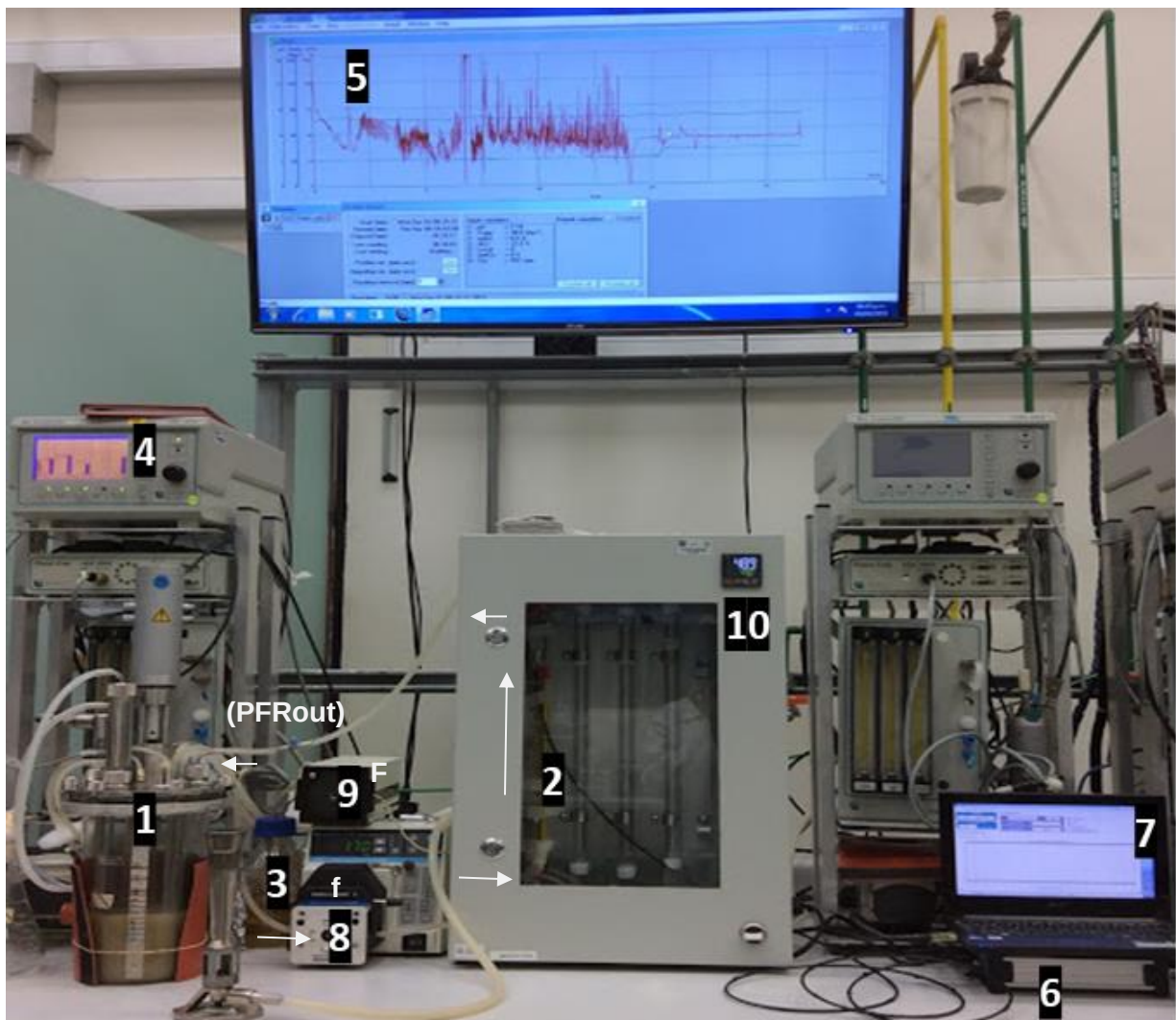
For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Anexo II. Sistema de biorreactores compartimentalizado STR-PFR.

Esquema (Figura 2) y fotografía del sistema de escalamiento descendente de dos componentes (biorreactores de tanque agitado y biorreactor de flujo pistón: STR-PFR) descrito en la Figura 2. El tiempo de residencia dentro de la sección tubular del PFR se ajustó en función del flujo (f) y la longitud (L). Para cultivos de *E. coli* W3110 productores de rHuGM-CSF por lote alimentado con un esquema de alimentación exponencial, el cultivo se recirculó entre los dos compartimentos al flujo (f). Todos los cultivos iniciaron como una fase lote creciendo únicamente en el STR, luego de agotarse la glucosa (12 h de cultivo) se interconecta el PFR, se recircula el cultivo entre ambas secciones y se comienza la alimentación. La solución de alimentación se suministró a la entrada del PFR al flujo (F) para reproducir la zona de adición de glucosa. El PFR se colocó dentro de un horno para mantener la temperatura. Se colocaron dos puertos de muestreo en las salidas del STRout y del PFRout. Las flechas representan la dirección del flujo (f). La fotografía muestra el sistema durante un cultivo de células de *E. coli* W3110.



Respuesta fisiológica de *E. coli* recombinante termoinducible en presencia de gradientes de concentración de glucosa y oxígeno disuelto



Anexo III. Modelo de alimentación.

Los cultivos se realizaron siguiendo un protocolo de alimentación exponencial, con el objetivo de alcanzar alta densidad celular al mantener limitada la velocidad de crecimiento en función de la alimentación de glucosa como sustrato limitante. La alimentación comenzó después del agotamiento de la glucosa inicial (10 g/L), iniciando la fase de lote alimentado. La solución de alimentación se adicionó de forma exponencial ajustando manualmente el flujo de la bomba peristáltica (LKB Bromma 2132 Microperpex, Austria) con manguera PharMed® BPT (Saint-Gobain, France). La velocidad del flujo se calculó con el modelo de alimentación exponencial descrito por la Ecuación 1, manteniendo una velocidad específica de crecimiento de 0.14 h⁻¹ (Shiloach and Rinas, 2010). Durante la inducción, una vez alcanzados los 39°C se reajustó la velocidad de la alimentación para mantener una velocidad específica de crecimiento de 0.05 h⁻¹.

$$m_s(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right) V_{t_F} X_{t_F} e^{\mu_{set}(t - t_F)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

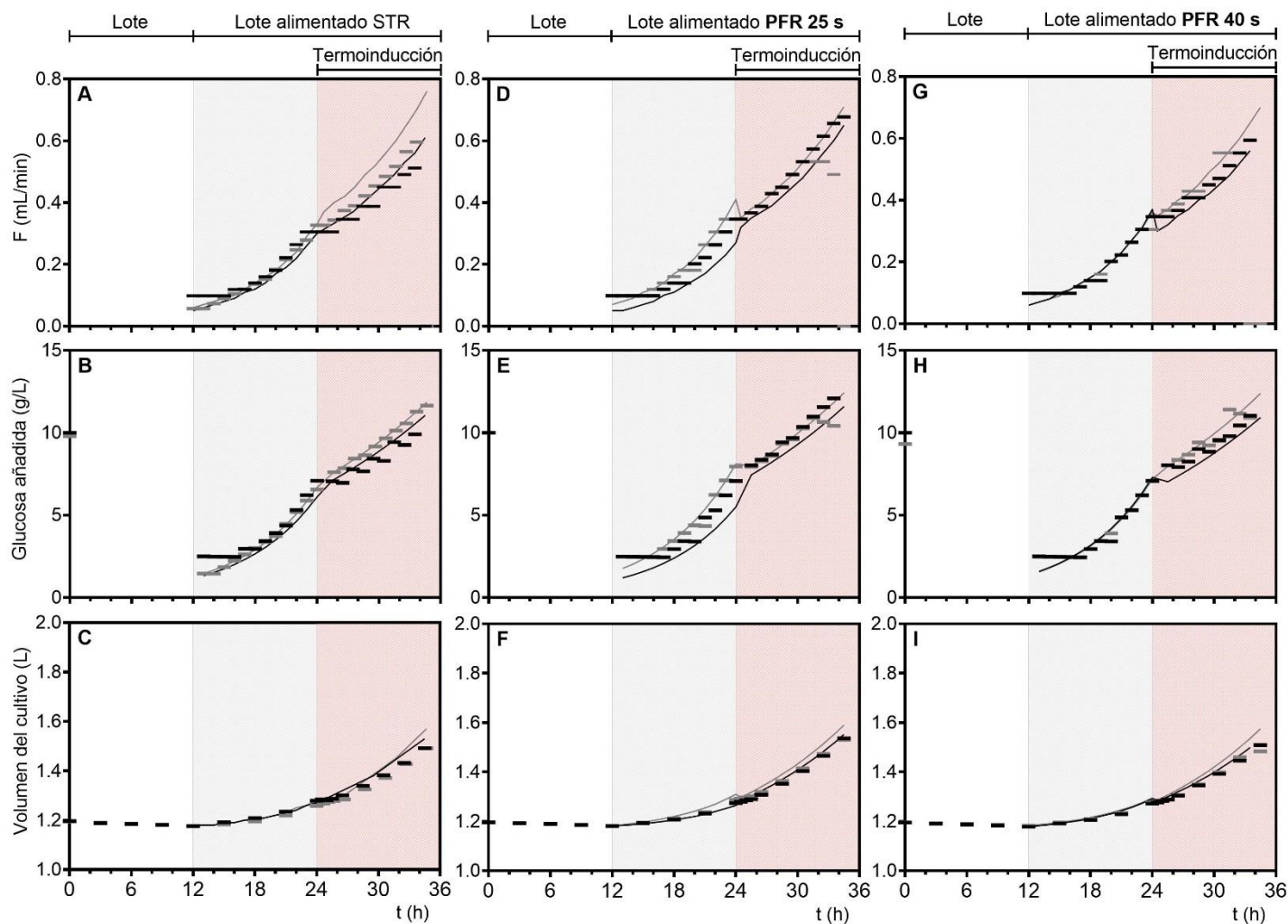
Donde $m_s(t)$ es la velocidad de flujo de la alimentación calculado (F es el flujo de alimentación experimental que busca aproximarse a $m_s(t)$), μ_{set} es la velocidad específica de crecimiento objetivo, $Y_{X/S}$ es el valor del rendimiento celular en función de la glucosa y m es el coeficiente de mantenimiento celular, valores que fueron tomados de la literatura y se enlistan en la tabla siguiente (Wallace and Holms, 1986; Seeger *et al.*, 1995; Shiloach and Rinas, 2010). Y donde t es el tiempo al que se inicia la alimentación, t_F es el tiempo inicial que corresponde al final de la fase lote, V_{t_F} es el volumen inicial del cultivo al tiempo t_F y X_{t_F} es la concentración celular inicial de la fase alimentada.

Fase	Lote alimentado	Termoinducción
Tiempo de cultivo (h)	12 a 24 h	24 a 34
Temperatura (°C)	30	39
μ_{set} (h ⁻¹)	0.14	0.05
$Y_{X/S}$ (g células/g glucosa)	0.5	0.17
m (g glucosa/g células.h)	0.025	0.04

La composición de la solución de alimentación es la descrita en la sección 5.2.2., en g/L: glucosa 500, kanamicina 0.12, tiamina 0.09 y solución de oligoelementos 2x. El medio es adicionado con dos pulsos de cas-aminoácidos, al inicio del cultivo (3 g/L) y justo antes del calentamiento para inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante (10 g/L).

El flujo de solución de alimentación y el suministro total de glucosa en cultivos por lote alimentado de *E. coli* W3110 productores de rHuGM-CSF se observan en la siguiente Figura para los cultivos realizados en un STR bien mezclado (ver Figuras A-C) y en el modelo de escalamiento descendente que simula la zona de adición de glucosa, donde se emplearon tiempos de residencia media dentro del PFR de 25 s (ver Figuras D-F) y 40 s (ver Figuras G-I). En las gráficas, las series de líneas discontinuas representan los datos experimentales obtenidos en cada uno de los sistemas, mientras que las líneas continuas corresponden a la estimación del modelo de alimentación exponencial descrito en la Ecuación 1. Se muestran los datos de dos cultivos independientes representados en color negro y gris.

Los perfiles fueron reproducibles para todas las condiciones evaluadas (tanto en el STR bien mezclado como en el modelo de escalamiento descendente) y se observa la aproximación de los valores experimentales a los perfiles esperados obtenidos con el modelo de alimentación exponencial, lo que sugiere que el modelo es una representación adecuada de la dinámica de la adición de glucosa durante el cultivo. El flujo F de la solución de alimentación inicia a las 12 h de cultivo alrededor de <0.1 mL/min alimentando alrededor de 2 g/L de glucosa, subiendo a cerca de 0.3 mL/min y 8 g/L de glucosa añadida a las 24 h que marcan el inicio de la termoinducción donde se reajusta el modelo de alimentación y el flujo incrementa hasta alrededor de los 0.6 mL/min alcanzando cerca de los 12 g/L de glucosa añadida. El volumen del cultivo incrementa de 1.2 a cerca de 1.3 L durante la etapa de lote alimentado y finalmente a aproximadamente a 1.5 L durante la termoinducción consistentemente en todas las condiciones.

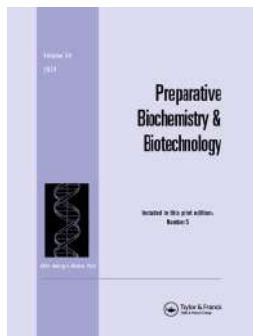


Cultivos por lote alimentado de *E. coli* W3110 productores de rHuGM-CSF Perfiles del flujo alimentado (A, D, G), Glucosa añadida (B, E, H) y Volumen del cultivo (C, F, I). Los valores esperados de acuerdo con el modelo de alimentación (Ecuación 1) se representan con la línea continua.

Anexo IV

Los resultados de este proyecto fueron publicados en Reynoso-Cereceda, G. I., Valdez-Cruz, N. A., Pérez, N. O., & Trujillo-Roldán, M. A. (2024). A comprehensive study of glucose and oxygen gradients in a scaled-down model of recombinant HuGM-CSF production in thermoinduced *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1–12.

<https://10.1080/10826068.2024.2347403>



A comprehensive study of glucose and oxygen gradients in a scaled-down model of recombinant HuGM-CSF production in thermoinduced *Escherichia coli* fed-batch cultures

Greta I. Reynoso-Cereceda, Norma A. Valdez-Cruz, Nestor O. Pérez & Mauricio A. Trujillo-Roldán

To cite this article: Greta I. Reynoso-Cereceda, Norma A. Valdez-Cruz, Nestor O. Pérez & Mauricio A. Trujillo-Roldán (03 May 2024): A comprehensive study of glucose and oxygen gradients in a scaled-down model of recombinant HuGM-CSF production in thermoinduced *Escherichia coli* fed-batch cultures, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, DOI: [10.1080/10826068.2024.2347403](https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2347403)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2347403>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 03 May 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



A comprehensive study of glucose and oxygen gradients in a scaled-down model of recombinant HuGM-CSF production in thermoinduced *Escherichia coli* fed-batch cultures

Greta I. Reynoso-Cereceda^{a,b} , Norma A. Valdez-Cruz^{a,c} , Nestor O. Pérez^d 
and Mauricio A. Trujillo-Roldán^{a,c} 

^aDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México; ^bPosgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Unidad de Posgrado, CDMX, México; ^cCentro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Baja California, Mexico; ^dProbiomed S.A. de C.V. Planta Tenancingo, Cruce de Carreteras Acatzingo- Zumpahuacan SN, Tenancingo, México

ABSTRACT

The effect of gradients of elevated glucose and low dissolved oxygen in the addition zone of fed-batch *E. coli* thermoinduced recombinant high cell density cultures can be evaluated through two-compartment scale-down models. Here, glucose was fed in the inlet of a plug flow bioreactor (PFB) connected to a stirred tank bioreactor (STB). *E. coli* cells diminished growth from 48.2 ± 2.2 g/L in the stage of RP production if compared to control (STB) with STB-PFB experiments, when residence time inside the PFB was 25 s (34.1 ± 3.5 g/L) and 40 s (25.6 ± 5.1 g/L), respectively. The recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rHuGM-CSF) production decreased from $34 \pm 7\%$ of RP in inclusion bodies (IB) in control cultures to $21 \pm 8\%$, and $7 \pm 4\%$ during the thermoinduction production phase when increasing residence time inside the PFB to 25 s and 40 s, respectively. This, along with the accumulation of acetic and formic acid (up to 4 g/L), indicates metabolic redirection of central carbon routes through metabolic flow and mixed acid fermentation. Special care must be taken when producing a recombinant protein in heat-induced *E. coli*, because the yield and productivity of the protein decreases as the size of the bioreactors increases, especially if they are carried at high cell density.

HIGHLIGHTS

- Thermoinduced recombinant *E. coli* grew less in a two-compartment scale-down model.
- Heat-inducible *E. coli* cultures at a large scale significantly decrease recombinant protein production.
- The accumulation of acetic and formic acid increases when *E. coli* is exposed to glucose and oxygen gradients.
- The axial flow pattern inside the PFB mimics glucose and dissolved oxygen gradients at the industrial scale.

Abbreviations: A.U: Absorbance units measured at 600 nm; Bo: Bodenstein number; DOT: Dissolved oxygen tension; DCW: Dry cell weight; F: Flow rate of the feeding solution; IBs: Inclusion bodies; IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; *m*: Maintenance coefficient; μ : Specific growth rate; PFB: Plug flow bioreactor; rHuGM-CSF: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; RP: Recombinant protein; SF: Shake flask; STB: Stirred tank bioreactor; τ : Mean residence time; V: Volume; Qc: Circulation flow rate; $Y_{X/S}$: Cellular yield on glucose; σ : Variance

KEYWORDS

Escherichia coli; fed-batch; inclusion bodies; recombinant proteins; scale-down; thermoinduction

Introduction

Escherichia coli has remained an attractive host for recombinant protein production at an industrial scale due to its fast growth, achieving high yields and productivity, along with the accumulated knowledge of its genome, physiology, and metabolism.^[1,2] Heterologous proteins overexpressed in *E. coli* cells usually aggregate, forming inclusion bodies (IBs). Although recombinant protein accumulation in IBs requires

subsequent solubilization and refolding steps, their industrial production is expected since they are highly productive, easy to isolate, and achieve high recombinant protein concentration and additional protection against proteases.^[3–5] IBs formation inside cells is even considered a preparatory step for purification due to the high concentration of recombinant protein they may contain.^[3–5] In recent years, evidence has shown how the culture conditions such as temperature,

CONTACT Mauricio A. Trujillo-Roldán  maurotru@gmail.com, maurotru@iibiomedicas.unam.mx  Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2347403>.

© 2024 Taylor & Francis Group, LLC

growth rate, inducer concentration, pH, and culture scale have on IBs main features in terms of recombinant protein purity, resistance to degradation, α -helix structures content, and amyloid structuring, size, and quantity per cell.^[6–12] Since downstream processing is cost-limiting and designed in function of IBs features, achieving a fixed and reproducible amount and quality of IBs is of great interest for developing bioprocesses to produce recombinant proteins in *E. coli*.^[2,3,12–14]

On the other hand, the λ pL/pR-cI857 temperature-induced system of *E. coli* has been successfully used to produce RPs with a pharmaceutical grade.^[15–17] The λ pL/pR-cI857 thermoinducible system is based on the insertion of a gene of interest into vectors containing the strong pR and/or pL promoters that can be efficiently regulated by the thermolabile mutant cI857 repressor from Bacteriophage λ .^[15–17] At culture temperature below 37°C, cI857 blocks the transcription of the heterologous gene by RNA polymerase, while the increase in temperature above 37°C results in the release of cI857, permitting transcription.^[6,7,15–17] This is convenient for scaled-up production of RPs in large bioreactors because no external inducers, which may be expensive and toxic, must be added and removed in the final product.^[15–17] Moreover, the risk of contamination by manipulation is minimized since temperature is controlled externally.^[15–17] However, few studies have been conducted on the effects of reaching an industrial scale (like oxygen, pH, temperature, and nutrient gradients) on thermo-induced recombinant *E. coli* systems.

The recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Human GM-CSF is a 14.4kDa protein consisting of 127 amino acids, with two disulfide bonds, two potential N-glycosylation sites, and four potential O-glycosylation sites.^[18–20] However, the glycosylation of GM-CSF is not required for its biological activity.^[21,22] GM-CSF stimulates the development of neutrophils, macrophages, and dendritic cells.^[23–26] Its medical importance lies in that this biopharmaceutical has been utilized in neutropenia treatments and, more recently, as an immune stimulant in tumor therapy and vaccine adjuvant in cancer patients.^[26–28] Since 1991, the FDA approved the production of rHuGM-CSF produced in *E. coli* by Sanofi-Aventis U.S., differing from the native protein by an R23L substitution (Bridgewater, NJ, USA),^[2] and now it is produced as a biosimilar in several countries of the world. The vast majority of rHGM-CSF produced in the world is made under high-cell density cultures in industrial bioreactors and induced under additive-free systems, such as those thermoinduced.

Large-scale recombinant *E. coli* cultures are usually performed as fed-batch high-cell-density cultures using glucose as the limited carbon source.^[29,30] The cultures are carried out in stirred tank bioreactors with operational volumes between 0.05 and 20m³, with long mixing times (<9–40s), giving rise to the formation of concentration gradients, which are accentuated by cellular metabolism.^[31–38] Consequently, inside the bioreactor, a dynamic environment prevails where a glucose addition zone is formed, characterized by higher glucose concentrations and low availability of dissolved oxygen.^[38–40] Oscillating glucose concentration gradients studied on an industrial scale, in compartmentalized systems where a stirred

tank bioreactor (STB) is interconnected with a plug flow bioreactor (PFB) or with the simulation of gradients by feeding glucose pulses, have shown a decrease in the concentration of the recombinant protein of interest produced, together with important changes in growth, substrate uptake and metabolite production rates yielding lower cellular concentration. In these cultures, metabolic overflow, cell lysis, protein degradation, plasmid loss, and induction of strict response have been observed.^[40–46] Regarding the analysis of cultures with gradients in dissolved oxygen availability, with the reproduction of aerobic-anaerobic zones in interconnected STB-STB systems or through on-off pulses of the air supply, the decrease in cell concentration, lower yields or lower productivity of the recombinant protein, produced both in soluble form and as IBs has also been observed.^[44–47] The results were mainly associated with metabolic and transcriptional changes related to the mixed acid fermentation pathways, branching of the tricarboxylic acid cycle, and induction of anaerobic respiration, suggesting a negative impact on the production of the recombinant protein at the post-transcriptional level.^[47,48] There are fewer reports where recombinant protein production is analyzed in oscillating environments of glucose and dissolved oxygen availability. These studies have shown a tendency to decrease the recombinant protein and incorporate non-canonical amino acids in accumulated proteins such as IBs, as well as changes in the structure and proteolytic degradation of the soluble recombinant protein. In these studies, the presence of cell lysis and metabolites associated with metabolic overflow and mixed acid fermentation was also observed.^[49–51]

To gain an understanding of elevated recombinant protein (rHuGM-CSF) production of the heat-inducible system in the function of the changing environment inside industrial bioreactors, we performed high cell density fed-batch *E. coli* cultures inside a scale-down model configuration of a PFB connected to an STB. The prevalence of the axial flow pattern inside the PFB allowed us to reproduce glucose and dissolved oxygen gradients near the glucose feed point of fed-batch high-cell density cultures at the production scale.

Materials and methods

Bacterial strain and culture media

Competent cells of *E. coli* strain W3110 (ATCC[®] 27325TM) were transformed with plasmid pV3-uri200N (property of PROBIOMED S.A. de C.V.) that encodes the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rHuGM-CSF, GeneBank accession number OL419360) under the promotor λ pL and expressing constitutively the cI857 repressor and kanamycin resistance marker.^[6,7] Bacterial cell banks were stored at –70°C, with 30% glycerol in a Luria-Bertani culture medium. Here, the same cell bank was used as Restrepo-Pineda et al.^[6,7] Inoculum and bioreactor cultures were grown on a semi-defined medium adapted from previously used heat-inducible *E. coli* cultures.^[6,7,11,52,53] Media composition was (g/L): (NH₄)₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 13.3, citric acid 1.7, MgSO₄·7H₂O 1.2, kanamycin 0.03, thiamin 0.045 and trace element solution 1×

(1000×: Ferric citrate 100.8, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22.5, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15.0, EDTA 14.1, H_3BO_3 3.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1 and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5). All cultures started with 10 g/L of glucose concentration. The feeding solution was prepared with (g/L) glucose 500, kanamycin 0.12, thiamin 0.09, and trace elements solution 2×. The medium was added with two pulses of casamino acids at the beginning of the culture (3 g/L) and just before heating to 39°C (10 g/L). All components were sterilized separately (121°C, 21 lb/in² for 20 min). Thiamin, ampicillin, and casamino acids solutions were sterilized by filtration (0.22 µm mixed cellulose ester membrane filter, Merck-Millipore, USA).

Fed-batch cultures

Cultures were grown in a 3-L stirred tank bioreactor (STB) (Applikon Biotechnology, Netherlands) with an initial culture volume of 1.2 L. STB was instrumented with dissolved oxygen tension (DOT), temperature and pH sensors (Gettinge-Applikon Biotechnology, Netherlands). DOT was controlled at 40% by stirred cascade (200–1000 rpm), and when reaching maxima agitation, pure oxygen was used to enrich the airflow.^[6,7] During culture, the airflow was kept at 1.2 liters per minute. The mass transfer coefficient ($k_L a$) changes continuously due to the increases and decreases in aeration and agitation according to DOT control needs.^[34] The pH was maintained at 7.2 with on-off pulses of 25% NH_4OH in the STB. The temperature was kept at 30°C, using a heating blanket and recirculating cold water, and during the recombinant protein induction phase, it was increased to 39°C (by the blanket, heating takes 25 min). The ADI-1010 control and data acquisition system (Gettinge-Applikon Biotechnology, Netherlands) was connected to a personal computer.

Inoculum was grown from 1 mL of cryopreserved cells in a 500 mL Erlenmeyer flask (Duran, narrow neck, borosilicate glass, USA) with 100 mL of semi-defined medium at 30°C and 350 rpm for approximately 12 h (New Brunswick Scientific Classic C25, 1 inch orbital shaker, USA). Bioreactor cultures started by adding the inoculum volume to a final cell density of 0.2 u.a. at 600 nm. The fed-batch phase began after glucose depletion. The feeding solution was fed exponentially by adjusting the flow rate using a peristaltic pump (LKB Bromma 2132 Microperpex, Austria) with PharMed® BPT tubing (Saint-Gobain, France) each half hour. The flow rate of the feeding addition was calculated to maintain a dilution rate of 0.14 h⁻¹ (Eq. (1)).^[29] During the recombinant protein production, the feed rate was readjusted to maintain a dilution rate of 0.05 h⁻¹.

$$m_s(t) = ((\mu_{\text{set}} / Y_{X/S}) + m)(V_{tF} X_{tF} \exp(\mu_{\text{set}}(t - t_F))) \quad (1)$$

Where $m_s(t)$ is the flow rate of the feeding solution, μ_{set} is the specific growth rate to maintain. $Y_{X/S}$ is the cellular yield on glucose, and m is the maintenance coefficient; both values were taken from literature as 0.5 g/g and 0.025 g/g.h, respectively, for the fed-batch phase at 30°C, and 0.17 g/g and 0.04 g/g.h, respectively for 39°C.^[29,54,55] V_{tF}

and X_{tF} are the culture volume and the cellular concentration at time t_f corresponding to the culture time when feeding was started. The exponential flow rate profile calculated by in Eq. (3) can be found in [Supplementary Figure 1](#). Finally, samples of the culture were taken at different culture times: 1 mL aliquots were centrifuged (12,000 rpm, 25 min, 10°C), the cell pellet and the supernatant were stored separately at -20°C.

Scale-down configuration for fed-batch cultures

We used the two-compartment configuration of the PFB section connected to the STB to simulate the feeding addition zone in large bioreactors ([Figure 1A](#)). The cultures were started in the STB with a batch phase and were performed at the same conditions as the fed-batch control cultures. When glucose was depleted at the end of the batch phase, the tubular section was connected, and feeding was started at the inlet of the PFR. The flow in the PFB was set to 300 or 190 mL/min, which implies mean residence times in the PFB of 25 or 40 s, respectively. Samples were taken through needleless connectors (MaxZero™ BD, USA) placed in line at the STB outlet and PFB outlet ([Figure 1A](#)). PFB was instrumented with an optical sensor patch PSt3 wall-attached near the inlet or outlet of the tubular section, used for DOT recording online with the oxygen optical meter Fibox3 (PreSens, Regensburg, Germany).

Plug flow bioreactor (PFB) description and characterization

The PFB was an in-house-built glass tubular section with an internal diameter of 18 mm and a length of 40.5 cm. Up to four glass tubular sections can be connected to increase the total length of the PFR. Connections between glass tubular sections and recirculation tubing were silicon tubing (Masterflex 96440-25 platinum first silicon 3355 L, Cole-Palmer, USA) by using a peristaltic pump (Masterflex L/S 7523-60 with Easy Load Head 77200-50, Cole-Palmer, USA). The PFB was placed inside an in-house-built oven to keep the temperature constant. We performed tracer experiments to characterize the non-aerated flow inside the PFB compartment. Crystal violet was used as a tracer, detected offline at the PFB outlet, with an optical density of 590 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo USA). The tracer was injected at the inlet of the tubular section.

The theoretical mean residence time was calculated from Eq. (1).

$$t_r = V / Q_c \quad (2)$$

V is the total liquid volume, and Q_c is the circulation flow rate. To characterize the flow inside the PFB sections, the Bodenstein number (Bo) was determined from Eq. (2).

$$Bo = (2t_r^2) / \sigma^2 \quad (3)$$

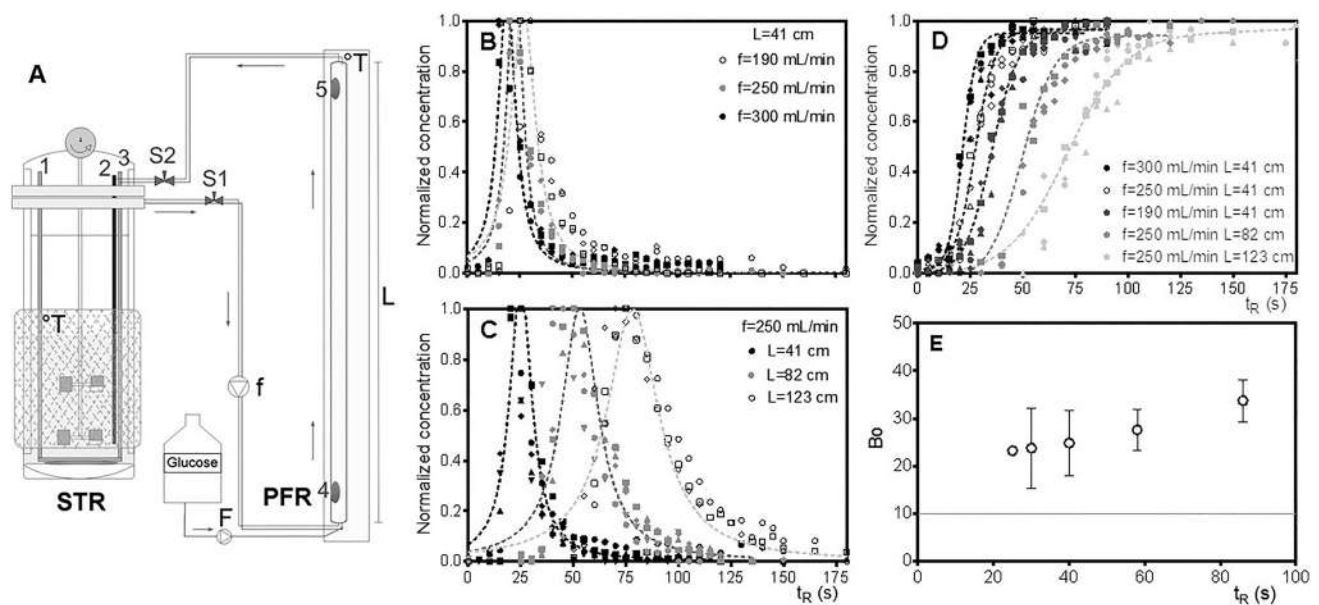


Figure 1. Flow characterization inside the PFB as a part of a two-compartment scale-down model. (A) Representation of the STB-PFB configuration. Residence time inside the PFB tubular section was adjusted in function of the flow rate (f) and the length of the PFB (L); for the scale-down experiments, culture was recirculated between the two compartments at the flow rate f . The feeding solution was supplied at the inlet of the PFB (F) to reproduce the glucose addition zone. Two sampling ports were placed at the STB and the PFB outputs (S1 and S2, respectively). Arrows represent flow direction. STB was instrumented with dissolved oxygen tension (DOT) (1), temperature (2) and pH (3) sensors. PFB was instrumented with a DOT optical sensor patch Pst3 wall-attached near the inlet (4) or outlet (5) of the tubular section. (B, C) Tracer response curves obtained from tracer pulse experiment: (B) effect of the flow rate (f) with $L=41$ cm and (C) effect of L with $f=250$ mL/min. (D) Tracer response curves obtained from step-change experiments with different f and L values. Replicate measurements of each condition are shown with different symbols of the same color. Data trends are shown as dotted lines. (E) Bodenstein number (Bo) was obtained from step-change tracer curves (D). $Bo > 10$ indicates longitudinal flow dispersion approximating the plug flow.

The variance σ indicates the flow spread. It was obtained from the tracer optical density response curve obtained, following the published methodology.^[50,51]

Analytical methods

Cell concentration was quantified by optical density at 600 nm (Spectronic Genesys 20, Thermo USA). Also, it was gravimetrically obtained by filtering culture samples (0.4 μ m membrane filter, Merck-Millipore, USA) and obtaining its dry cell weight (DCW). The equivalence was established with 1.0 absorbance unit (A.U.) equals to 0.36 ± 0.04 g/L of DCW.^[6,7] Glucose was determined from culture supernatants in a YSI2900 biochemical analyzer (YSI Life Sciences, USA) and corroborated in a Y15 automatized analyzer (Biosystems, Barcelona, Spain). Organic acids were quantified by HPLC (Shimadzu, Japan, equipped with a UV detector) using an AminexHPX-87H cation exchange column (Bio-Rad Hercules, CA, USA). The commercial standard solution (Catalog No. 125-0586 Bio-Rad Hercules, CA, Annex A1.6) was used to quantify acetate, oxalate, citrate, malate, succinate, and formate.

Inclusion bodies (IBs) recuperation

IBs were obtained from cell pellets resuspended in lysis solution (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 7.5) with 1 mM phenylmethylsulfonium fluoride (PMSE, Sigma, USA). Cells were subjected to cycles (10–15) of sonication (30 s) at 10-micron amplitude (SoniPrep 150

Richmond Scientific, UK). The pellet was separated by centrifugation ($13,500 \times g$ for 20 min), resuspended in lysis solution with NP-40 1% v/v (Sigma, USA), and incubated with smooth shaking at 4°C for 30 min. After another centrifugation step, the precipitate was washed with Triton X-100 0.5% v/v in lysis solution (Sigma, USA). After IBs were washed five times with milli-Q water. IBs obtained were stored at -20°C .

Protein quantification and rHuGM-CSF identification

Total soluble protein and IBs were quantified by Bradford assay according to the supplier (Bio-Rad, Hercules, California, USA).^[6,7,56] Isoelectric focusing (IEF) buffer (final 1:5 dilution) was used to solubilize IBs at room temperature for at least 2 h. Calibration curves with bovine serum albumin (BSA, Equitech-Bio, Kerrville, TX, USA) were made. Both samples and standards were prepared at least in triplicate, and an optical density of 600 nm was measured on a Stat Fax 2100 Microplate Reader (Awareness Technology Inc., Palm City, FL, USA).

The production of the total soluble protein and rHuGM-CSF accumulation in IBs was observed on 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).^[6,57] To this, equal amounts of protein were solubilized using 2.5% SDS overnight at room temperature, and 20 μ g of protein was loaded in each lane. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to stain gels.^[6,57] The percentage of rHuGM-CSF in IBs was determined by densitometry using the Image-Lab software and

Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).^[6] The Molgramostim European Pharmacopeia (EP) Reference Standard was used as a control.^[6] Western blot corroborated the production of rHuGM-CSF in Restrepo-Pineda et al.^[6] For this project, we used the same master cell bank as Restrepo-Pineda.^[6]

Statistical analysis

All cultures were grown at least in duplicates. Independent samples and multiple-comparison tests were used to estimate the statistical significance of differences in the culture parameters (two-way analysis of variance [ANOVA] and Tukey's *post hoc* test were used). A threshold significance level of 0.05 was applied.

Results

To understand recombinant IBs production in the changing environment inside industrial bioreactors, we performed high cell density fed-batch using a clone of *E. coli* that produces elevated concentrations of a biosimilar therapeutic recombinant protein (rHuGM-CSF) in cultures inside a scale-down model configuration, simulating industrial bioreactors with a particular emphasis in the simulation of the elevated-glucose feeding zone.

Flow characterization inside the PFR

A characterization of the flow in the PFB (Figure 1A) was done. Residence time inside the PFB was a function of the flow rate (f) and the PFB length (L). The tracer curves exhibit a log-normal distribution (Figure 1B and C). A PFB length of 41 cm at recirculation rates of 300, 250, and 190 mL/min results in mean residence times of 25, 30, and 40 s was evaluated (Figure 1B). Keeping the recirculation flow rate at 250 mL/min at PFB lengths of 41, 82, and 123 cm resulted in mean residence times of 30, 58, and 86 s (Figure 1C). The same mean residence times were obtained when a step change concentration in the tracer solution was registered (Figure 1D). The Bo number is estimated from the last data set, which broadly represents the relation between the axial and the radial flow pattern inside the tubular section. $Bo > 10$ indicates longitudinal flow dispersion approximating the plug flow. Therefore, at all conditions tested, the flow pattern inside the PFB approximates the plug flow (Figure 1E). This shows that the in-house PFB can reproduce axial concentration gradients of nutrients such as glucose and dissolved oxygen.^[50,51,58]

E. coli fed-batch cultures

To mimic the environment associated with the addition zone formed at fed-batch large-scale cultures,^[44–51,58] the STB-PFB with glucose fed at the inlet of the PFB was used (Figure 1A). The PFB mean residence times (t_r) were selected to be of the same order as the recirculation times found at larger

bioreactors ($<22\text{ m}^3$). The t_r values of 25 and 40 s were upheld by tuning f (190 and 300 mL/min) and keeping L constant (41 cm).

Biomass growth, glucose consumption, acetate, and formate accumulation profiles of *E. coli* W3110 rHuGM-CSF fed-batch cultures are shown in Figure 2. Control cultures in the STB (Figure 2A–C) were compared to cultures grown in the scale-down STB-PFB configuration with a residence time inside the PFB of 25 s (Figure 2B–F) and 40 s (Figure 2G–I). The cultures are highly reproducible during batch and fed-batch under all conditions tested. However, during the recombinant protein production phase induced by heat (39°C, starting at 24 h of culture), biomass concentration diminished, glucose was not entirely consumed, and acetate and formate accumulated considerably in the culture broth when the scale-down STB-PFB configuration was evaluated. This was accentuated by increasing residence time inside the PFR. In replica control cultures, the biomass reached $48.2 \pm 2.2\text{ g/L DCW}$, maintaining growth during the induction phase of the recombinant protein, according to the dilution rate (0.05 h^{-1}) of the culture (Figure 2A). However, when the PFB is connected to STB (Figure 1A), cell growth stops at $34.1 \pm 3.5\text{ g/L DCW}$ at 25 s of recirculation time (Figure 2D) and at $25.6 \pm 5.1\text{ g/L DCW}$, with a drop in biomass at 40 s (Figure 2G), respectively. Also, recirculation time in PFB negatively affected the consumption of the carbon source; in STB cultures, no accumulation of the carbon source was observed (Figure 2B). However, at 25 s and 40 s of recirculation time in STB-PFB, glucose concentrations close to 6 and 14 g/L were detected, respectively (Figures 2E and H). To the best of our knowledge, in the production of rHuGM-CSF, we have obtained the highest cellular concentration so far published (Supplementary Table 1). This is because most previously reported works use low cell density cultures (without fed culture strategies)^[57–64] or using *E. coli* cell-free system.^[65,66] Our results are close to those reported by Hajinia et al.^[67] who reached values of 57 g/L of biomass in cultures fed with GM-CSF-producing *E. coli* BL21.

The accumulation of acetate and formate suggests that the carbon metabolic central pathways deviate to metabolic overflow and mixed acid fermentation.^[39,68] In the control cultures, no accumulation of organic acids was observed. However, at 25 s and 40 s of recirculation time, accumulation of acetate and formate was detected in concentrations that have already been reported as inhibitory to cell growth (above 4 g/L).^[39,68]

Temperature, pH, and DOT were controlled in the STB, representing the homogeneous part of the large-scale bioreactor (Figure 1A). At the same time, DOT was measured and registered in the PFB. Figure 3 shows the control graphs of *E. coli* W3110 rHuGM-CSF fed-batch cultures inside the lab scale STB (Figure 3A and Figure B) and in the scale-down STB-PFB configuration with a residence time inside the PFB of 25 s (Figure 3C–E) and 40 s (Figure 3F–H). The cultures are highly reproducible during batch and fed-batch not-induced phases at all conditions tested (STB and STB-PFB). However, inside the PFB, the cells quickly consume the remaining DOT (Figure 3D and G), and oxygen limitation lasts the rest of the culture along the

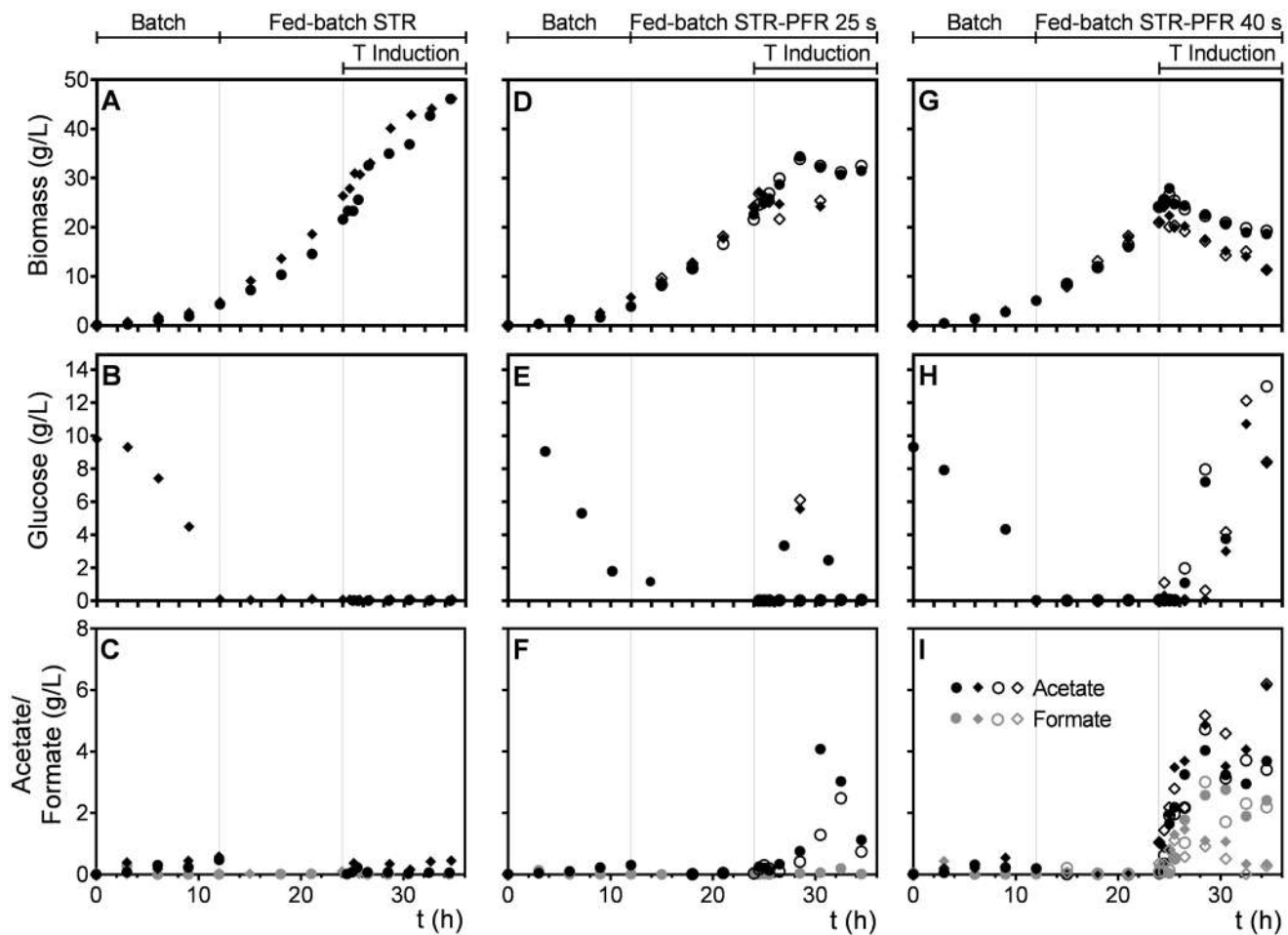


Figure 2. *Escherichia coli* fed-batch cultures growing in a well-mixed STB (A, B, C) and in the scale-down model of the glucose addition zone with a mean residence time inside the PFB section of 25 s (D, E, F) and 40 s (G, H, I). Kinetics of biomass concentration (A, D, G), residual glucose (B, E, H), acetate, and formate (C, F, I) are shown. The upper lines indicate the timeline of the cultures, with the first 12 hours operating in batch mode, followed by the exponential feeding and the thermoinduction of the recombinant protein. The PFB section was connected to the STB at the beginning of the fed-batch operation mode for the experiments performed in the scale-down configuration. Replicate cultures are shown with different symbols or colors.

tubular section. This suggests that the cells are prompted to oxygen limitation while traveling inside the PFB zone.^[69] This limitation continues during the rHuGM-CSF production phase (Figure 3D and G) when increases from 30 to 39°C (Figure 3B, E, and H). Oxygen limitation, accompanied by an excess of the carbon source and thermal stress, seems to be responsible to produce acetate and formate by the culture (Figure 2F–I).

Kinetic and stoichiometric parameters were analyzed throughout culture time for lab scale STB and in the scale-down STB-PFB configuration with a residence time inside the PFB of 25 s and 40 s, such as specific growth rate (Figure 4A, E, and I), specific glucose consumption rate (Figure 4B, F, and J), growth yield on glucose (Figure 4C, G, and K), and specific acetate and formate production rates (Figure 4D, H, and I). In the batch phase, the specific growth rate decreased to values near the dilution rate determined to start the fed-batch mode (0.14 h^{-1}) in the three independent experiments (Figure 4A, E, and I). The low dilution rate (0.14 h^{-1}) has the aim of keeping the specific glucose consumption at low values (Figure 4B, F, and J). With this, we avoid overfeeding the carbon source and metabolic overflow,

at least in control cultures.^[70] However, when thermoinduction began, the specific growth rate was lower than that determined in the dilution rate (0.05 h^{-1}) of this zone in PFR-STB experiments. Moreover, the specific consumption rates were more than four times higher than the value calculated for this culture zone, assuming no oxygen limitations (Figure 4B, F, and J), being this effect more pronounced when 40 s of circulation time is evaluated in the PFR.

To calculate the dilution rates, a yield ($Y_{X/S}$) of 0.5 g/g for the fed-batch at 30°C and 0.17 g/g for 39°C was proposed according to previous reports.^[6,7,28,54,55] In the fed-batch at 30°C , the $Y_{X/S}$ was 0.4 g/g on average (Figure 4C, G, and K), but in the fed and thermoinduced phase, the $Y_{X/S}$ was close to zero when the PFR-STB recirculated system was present; however, in the STB system, the $Y_{X/S}$ was close to that proposed for Eq. (3). This supports that the dilution rate values proposed for Eq. (3) were appropriate (Figure 4C). However, when the oxygen limitation factor is included, because of the glucose-adding port at the PFB input, the culture cannot maintain these yields (Figure 4G and K), with consequent increases in specific production rates of acetate and formate (Figure 4H and I).

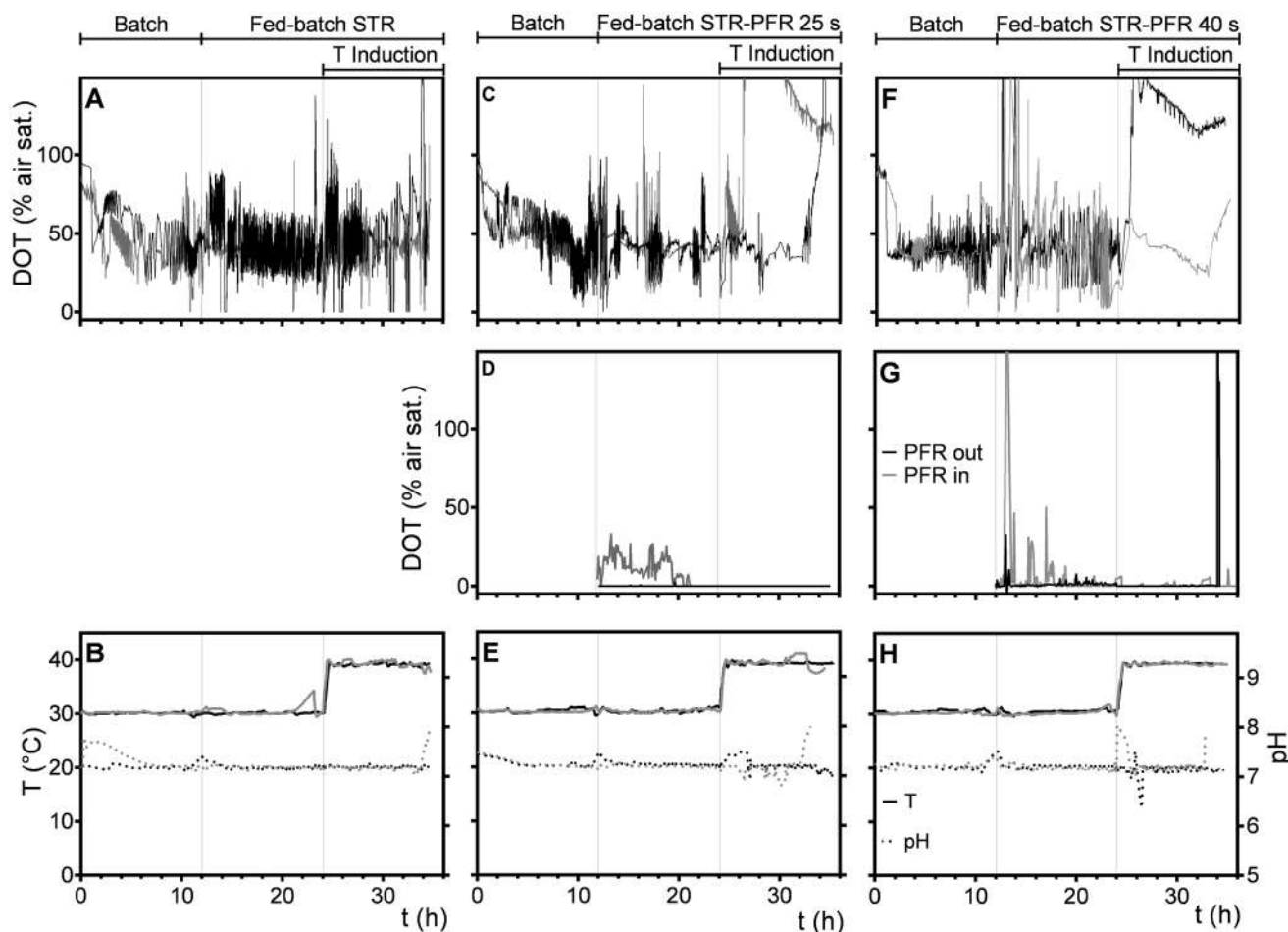


Figure 3. Dissolved oxygen tension (DOT), temperature, and pH profiles of *E. coli* fed-batch cultures growing in a well-mixed STB (A, B) and in the scale-down model of the glucose addition zone with a mean residence time inside the PFB section of 25 s (D, E, F) and 40 s (G, H, I). DOT profiles of two independent cultures measured at the STB are shown (A, C, F). DOT profiles are measured inside the PFB (D, G) at two different length positions: near the inlet (PFB in) and in the outlet of the tubular section (PFB out). Temperature and pH were measured inside the STB of two independent cultures (B, E, H). The upper lines indicate the timeline of the cultures, just as in Figure 1.

rHuGM-CSF production and accumulation as inclusion bodies

In all high-cell-density control cultures, the rHuGM-CSF is detected only in the insoluble fraction (Supplementary Figure 2e, f, and g) and was not detected in the soluble fraction in SDS-PAGE gels (Supplementary Figure 2i, j, and k). The rHuGM-CSF represents $34 \pm 7\%$ of the total proteins in inclusion bodies (IBs) at the end of control cultures (Figure 5A). Using the same cell bank but in low cell density cultures, values of $28 \pm 5\%$ of rHuGM-CSF contained in IBs of cultures grown have been reported.^[6,7] However, when dissolved oxygen limitation occurs, associated with the high concentration of the carbon source in PFB-STB, the recombinant protein amounts in IBs reduced. In the PFRs with residence times of 25 s, the rHuGM-CSF represents $21 \pm 8\%$ of the total proteins in IBs (Figure 5B). When the residence time in the PFB is 40 s, the expression of the recombinant protein was $7 \pm 4\%$ of the IBs proteins (Figure 5C). With the values of biomass, total protein, and the percentage value of rHuGM-CSF in the IBs, the amount of recombinant protein produced in the cultures can be

calculated. Thus, 4.12 ± 0.35 g/L is obtained in STB control cultures, while this production drops by 60% when having a recirculation of 25 s (1.78 ± 0.14 g/L) and to 90% with a recirculation of 40 s (0.45 ± 0.02 g/L) in the STB-PFB scale-down systems. Previously, the rHuGM-CSF purified from IBs from heat-induced low-density cultures of *E. coli*^[6,7] presented a protein secondary structure content like the crystallographic structure of HuGM-CSF, measured by far-UV CD spectroscopy.^[6,7]

Discussion

In this work, we designed and characterized a compartmentalized system of a stirred tank bioreactor (STB) interconnected with a plug flow bioreactor (PFB). The STB-PFB system design was characterized based on the tracer curve profiles. This system allowed us to modulate the residence times inside the PFB. The modulation of the t_r from 25 to 86 s inside the PFB can be achieved by adjusting the flow rate at which the culture is recirculated between the STB and PFB sections and the length of the PFB. These times are relevant since for bioreactors that produce recombinant

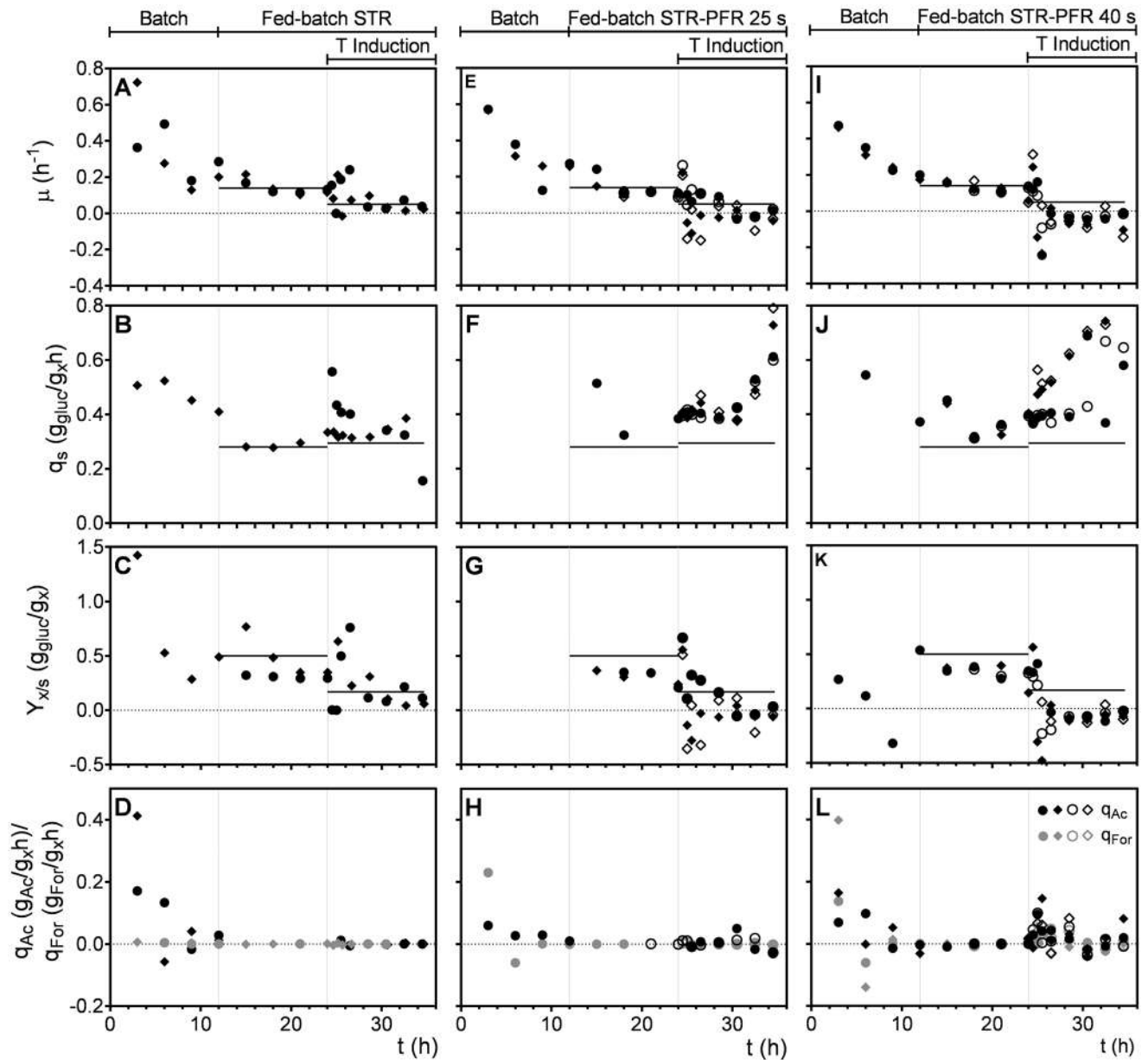


Figure 4. Kinetic parameters of *E. coli* fed-batch cultures growing in a well-mixed STB (A, B, C, D) and in the scale-down model of the glucose addition zone with a mean residence time inside the PFB section of 25 s (E, F, G, H) and 40 s (I, J, K, L). Specific growth rate (A, E, I), specific glucose consumption rate (B, F, J), growth yield on glucose (C, G, K), and specific acetate and formate production rates (D, H, L) are shown. Continuous lines during fed-batch operation mode are the values set (theoretical data) by the exponential feeding model. The upper lines indicate the timeline of the cultures, just as in Figure 1. Replicate cultures are shown with different symbols or colors.

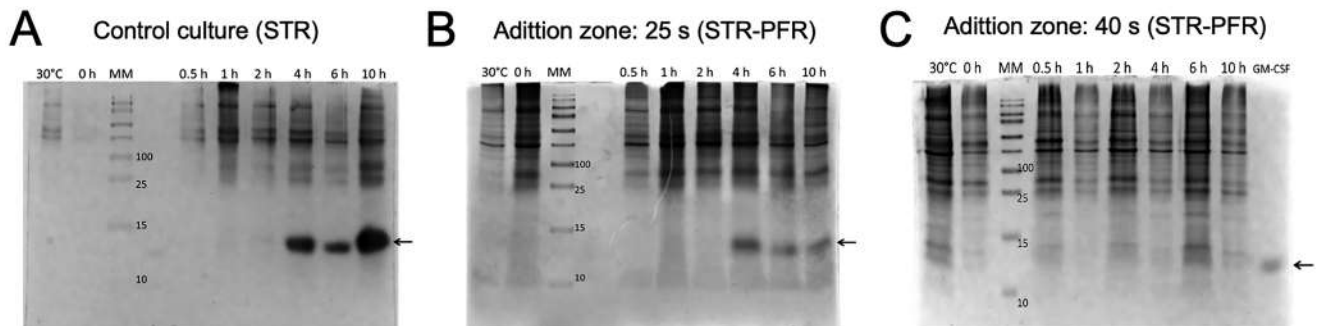


Figure 5. Analysis of proteins in inclusion bodies by SDS-PAGE. Proteins were obtained from cells grown in a well-mixed STB (A) and in the scale-down model of the glucose-addition zone with a mean residence time inside the PFB section of 25 s (B) and 40 s (C). lanes MM: molecular weight marker. Lanes 30°C: Insoluble fractions from samples taken at 24 h of culture at 30°C. Lanes 0 h: Insoluble fractions from samples taken when the culture reaches 39°C. Lanes from 0.5 to 10 h mean the time after thermoinduction when inclusion bodies were harvested. Lane GM-CSF is the Molgramostim European Pharmacopeia (EP) Reference Standard as a control. Black arrows show the molecular weight corresponding rHuGM-CSF.

proteins with *E. coli* cells on scales of 0.5–20 m³, circulation times between 9 and 40 s have been reported.^[31,32,38,50] The Bo values obtained were within a range of 12–36, always greater than 10, which indicates that within the PFB, the dispersion of the flow tends to the plug flow pattern.^[50,71] This is important because the simulation of nutrient gradients is intended to reproduce a flow inside the tubular section that encourages the cells to experience different concentrations of nutrients throughout the PFB.^[33,72,73]

The distribution of mixing times in industrial STBs can be reproduced with the downscaling system where one or more PFB sections are connected to an STB. The PFB sections allow the reproduction of axial concentration gradients, and the residence time (t_r) reproduces the circulation time (t_c) of the bioreactors on a larger scale.^[37,51,74] Therefore, it is important to modulate the t_r to achieve the simulation of the t_c of productive scale bioreactors, ensuring that under operating conditions, the axial gradient predominates over the radial one.^[50,71]

The cultures were designed with a low dilution rate in the feeding zone (0.14 h⁻¹), and it was reduced more in the induction zone (0.05 h⁻¹). These designs were thought with the intention of not having metabolic overflows and avoiding the accumulation of organic acids in the control cultures.^[70,75] The idea of these cultivation strategies allowed the metabolic overflows associated with the increase in residence time. Thus, the accumulation of organic acids at circulation times of 25 and 40 s is caused by oxygen depletion in the PFB section, evidencing the formation of a nutrient gradient due to the large availability of glucose in the PFB inlet. To our knowledge, there are no previous reports of high-cell fed-batch cultures that simulate oscillating glucose and oxygen gradients associated with the different regions that are formed inside bioreactors on a production scale, where recombinant protein-producing *E. coli* cells are grown under the regulation of heat-induced promoters. The productivities and yields of the overexpressed recombinant protein will define the profitability of the bioprocess, so it is essential to perform the quantifications of rHuGM-CSF as the model protein produced during our experiments. Yield is expected to drop when cells are grown in oscillating conditions where carbon redistribution promotes the accumulation of unwanted metabolites, such as acetate and formate, during productive cultures.^[47–49,53,76–78]

However, in this work, when a thermoinducible and high-productivity clone is used in high-cell-density fed-batch cultures, large quantities of recombinant protein can be achieved in elevated proportions in inclusion bodies, even more than what has been reported in the literature for this protein, rHuGM-CSF, in prokaryotic models (Supplementary Table 1). However, when this thermoinducible and high-productivity clone faces elevated C-source gradients associated with DOT limitations, it dramatically affects productivity and, surely, the RP purification yields. This surely has to do with the resilience of *E. coli* to independent stressors, which, when accumulated, can become strong enough to stop the growth and production of the

recombinant proteins.^[15–17,73–78] In that sense, the cells are exposed to a sum of effectors; the stress associated with the heat-induced production of an endogenous protein,^[15–17] added to the heat shock response (due to thermoinduction),^[15–17] the stress due to oxygen limitation,^[40–44,47–49] and metabolic overflow due to excess of the carbon source.^[33,34,39–41]

This work covers the response behavior of *E. coli* cells producing rHuGM-CSF, expressed under the regulation of a heat-inducible promoter, to glucose and oxygen gradients associated with the feeding addition zone of fed-batch cultures at exposure times that are typical of industrial-scale bioreactors. Our results show how recombinant protein produced in *E. coli* cells at a lab scale compared to a simulated industrial-scale environment renders lower yield and productivity with different IB features.

Acknowledgments

Greta Isabel Reynoso Cereceda is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a fellowship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT, CVU 549681). NAV-C and MAT-R thanks the sabbatical to “Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico” PASPA-DGAPA- UNAM. We thank M. Eng. Martha Elena Carrasco Fuentes, and Eng. Abel Blancas-Cabrera for technical support. Technical assistance on bioreactor controllability by Dusstthon Llorente, Eng. is also appreciated. This project was developed under the Institutional Program of the Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM: “La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos.”

CRediT authorship statement

GIR-C: Conceptualization, methodology, investigation, writing – original draft. NOP: Supervision, writing – review and editing. NAV-C: Supervision, writing – review and editing. MAT-R: Conceptualization, supervision, resources, writing – review and editing, funding acquisition.

Disclosure statement

NOP works in Probiomed S.A. de C.V., which manufactures recombinant human therapeutic proteins. No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by “Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México” (NAV-C: PAPIIT-UNAM IN-210822. MAT-R: IN211422). The funders had no role in data collection and analysis, publication decisions, or manuscript preparation.

ORCID

Greta I. Reynoso-Cereceda  <http://orcid.org/0000-0002-8503-4757>
Norma A. Valdez-Cruz  <http://orcid.org/0000-0002-8581-1173>
Nestor O. Pérez  <http://orcid.org/0000-0002-4043-1097>
Mauricio A. Trujillo-Roldán  <http://orcid.org/0000-0002-7497-4452>

References

- [1] Geigert, J. Biopharmaceutical Landscape. In *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals*. Springer, Cham, **2023**.
- [2] Walsh, G.; Walsh, E. Biopharmaceutical Benchmarks 2022. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40*, 1722–1760. DOI: [10.1038/s41587-022-01582-x](https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x).
- [3] Kachhawaha, K.; Singh, S.; Joshi, K.; Nain, P.; Singh, S. K. Bioprocessing of Recombinant Proteins from *Escherichia coli* Inclusion Bodies: insights from Structure-Function Relationship for Novel Applications. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2023**, *53*, 728–752. DOI: [10.1080/10826068.2022.2155835](https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2155835).
- [4] Nabel, A.; Yosua, Y.; Sriwidodo, S.; Maksum, I. P. Overview of Refolding Methods on Misfolded Recombinant Proteins from *Escherichia coli* Inclusion Bodies. *J. App. Biol. Biotech.* **2022**, *11*, 47–52. DOI: [10.7324/JABB.2023.112204](https://doi.org/10.7324/JABB.2023.112204).
- [5] Slouka, C.; Kopp, J.; Strohm, D.; Kager, J.; Spadiut, O.; Herwig, C. Monitoring and Control Strategies for Inclusion Body Production in *E. coli* Based on Glycerol Consumption. *J. Biotechnol.* **2019**, *296*, 75–82. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2019.03.014](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.014).
- [6] S.; Restrepo-Pineda, D.; Rosiles-Becerril, A. V.; Vargas-Castillo, L. P.; Ávila-Barrientos, A.; Luviano, N.; Sánchez-Puig, E.; García, Hernández, N. O.; Pérez, M. A.; Trujillo-Roldán, N. A.; Valdez-Cruz. Induction Temperature Impacts the Structure of Recombinant HuGM-CSF Inclusion Bodies in Thermoinducible *E. coli*. *Electron. J. Biotechnol.* **2022**, *59*, 94–106. DOI: [10.1016/j.ejbt.2022.08.004](https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.08.004).
- [7] S.; Restrepo-Pineda, N.; Sánchez-Puig, N. O.; Pérez, E.; García, Hernández, N. A.; Valdez-Cruz, M. A.; Trujillo-Roldán. The Pre-Induction Temperature Affects Recombinant HuGM-CSF Aggregation in Thermoinducible *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 2883–2902. DOI: [10.1007/s00253-022-11908-z](https://doi.org/10.1007/s00253-022-11908-z).
- [8] Castellanos-Mendoza, A.; Castro-Acosta, R. M.; Olvera, A.; Zavala, G.; Mendoza-Vera, M.; García-Hernández, E.; Alagón, A.; Trujillo-Roldán, M. A.; Valdez-Cruz, N. A. Influence of pH Control in the Formation of Inclusion Bodies during Production of Recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 1–14. DOI: [10.1186/s12934-014-0137-9](https://doi.org/10.1186/s12934-014-0137-9).
- [9] Slouka, C.; Kopp, J.; Hutwimmer, S.; Strahammer, M.; Strohm, D.; Eitenberger, E.; Schwaighofer, A.; Herwig, C. Custom Made Inclusion Bodies: Impact of Classical Process Parameters and Physiological Parameters on Inclusion Body Quality Attributes. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*, 1–15. DOI: [10.1186/s12934-018-0997-5](https://doi.org/10.1186/s12934-018-0997-5).
- [10] De Marco, A.; Ferrer-Miralles, N.; García-Fruitós, E.; Mitraki, A.; Pernel, S.; Rinas, U.; Trujillo-Roldán, M. A.; Valdez-Cruz, N. A.; Vázquez, E.; Villaverde, A. Bacterial Inclusion Bodies Are Industrially Exploitable Amyloids. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43*, 53–72. DOI: [10.1093/femsre/fuy038](https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038).
- [11] Restrepo-Pineda, S.; Bando-Campos, C. G.; Valdez-Cruz, N. A.; Trujillo-Roldán, M. A. Recombinant Production of ESAT-6 Antigen in Thermoinducible *Escherichia coli*: The Role of Culture Scale and Temperature on Metabolic Response, Expression of Chaperones, and Architecture of Inclusion Bodies. *Cell Stress Chaperones*. **2019**, *24*, 777–792. DOI: [10.1007/s12192-019-01006-x](https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x).
- [12] Lee, G. H.; Cooney, D.; Middelberg, A. P. J.; Choe, W. S. The Economics of Inclusion Body Processing, Bioprocess. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2006**, *29*, 73–90. DOI: [10.1007/s00449-006-0047-2](https://doi.org/10.1007/s00449-006-0047-2).
- [13] Han, M.-J.; Lee, S. Y. The *Escherichia coli* Proteome: Past, Present, and Future Prospects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*(2), 362–439. DOI: [10.1128/mmr.00036-05](https://doi.org/10.1128/mmr.00036-05).
- [14] Humer, D.; Spadiut, O. Wanted: more Monitoring and Control during Inclusion Body Processing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*, 1–9. DOI: [10.1007/s11274-018-2541-5](https://doi.org/10.1007/s11274-018-2541-5).
- [15] Valdez-Cruz, N. A.; Caspeta, L.; Pérez, N. O.; Ramírez, O. T.; Trujillo-Roldán, M. A. Production of Recombinant Proteins in *E. coli* by the Heat-Inducible Expression System Based on the Phage Lambda pL and/or pR Promoters. *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 18. DOI: [10.1186/1475-2859-9-18](https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-18).
- [16] Valdez-Cruz, N. A.; Trujillo-Roldán, M. A. **2023**. Thermoinducible *E. coli* for Recombinant Protein Production in Inclusion Bodies. In *Inclusion Bodies: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US; pp. 17–30.
- [17] Restrepo-Pineda, S.; Pérez, N. O.; Valdez-Cruz, N. A.; Trujillo-Roldán, M. A. Thermoinducible Expression System for Producing Recombinant Proteins in *Escherichia coli*: advances and Insights. *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, *45*, fuab023. DOI: [10.1093/femsre/fuab023](https://doi.org/10.1093/femsre/fuab023).
- [18] Shanafelt, A. B.; Kastelein, R. A. Identification of Critical Regions in Mouse Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Scanning-Deletion Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1989**, *86*, 4872–4876. DOI: [10.1073/pnas.86.13.4872](https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.4872).
- [19] Walter, M. R.; Cook, W. J.; Ealick, S. E.; Nagabhushan, T. L.; Trotta, P. P.; Bugg, C. E. Three-Dimensional Structure of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 1075–1085. DOI: [10.1016/0022-2836\(92\)90470-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90470-5).
- [20] Forno, G.; Bollati-Fogolin, M.; Oggero, M.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M.; Conradt, H. S.; Nimtz, M. N- and O-Linked Carbohydrates and Glycosylation Site Occupancy in Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Secreted by a Chinese Hamster Ovary Cell Line. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 907–919. DOI: [10.1111/j.1432-1033.2004.03993.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03993.x).
- [21] Burgess, A. W.; Begley, C. G.; Johnson, G. R.; Lopez, A. F.; Williamson, D. J.; Mermod, J. J.; Simpson, R. J.; Schmitz, A.; DeLamarter, J. F. Purification and Properties of Bacterially Synthesized Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor. *Blood*. **1997**, *69*, 43–51. DOI: [10.1182/blood.V69.1.43.43](https://doi.org/10.1182/blood.V69.1.43.43).
- [22] Moonen, P.; Mermod, J. J.; Ernst, J. F.; Hirschi, M.; DeLamarter, J. F. Increased Biological Activity of Deglycosylated Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Produced by Yeast or Animal Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 4428–4431. DOI: [10.1073/pnas.84.13.4428](https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4428).
- [23] Metcalf, D. The Colony-Stimulating Factors and Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2013**, *1*, 351–356. DOI: [10.1158/2326-6066.CIR-13-0151](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0151).
- [24] Sun, L.; Rautela, J.; Delconte, R. B.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Carrington, E. M.; Schenk, R. L.; Herold, M. J.; Huntington, N. D.; Lew, A. M.; Xu, Y.; Zhan, Y. GM-CSF Quantity Has a Selective Effect on Granulocytic vs. monocytic Myeloid Development and Function. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1922. DOI: [10.3389/fimmu.2018.01922](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01922).
- [25] Zhan, Y.; Lew, A. M.; Chopin, M. The Pleiotropic Effects of the GM-CSF Rheostat on Myeloid Cell Differentiation and Function: more than a Numbers Game. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2679. DOI: [10.3389/fimmu.2019.02679](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02679).
- [26] Lotfi, N.; Thome, R.; Rezaei, N.; Zhang, G. X.; Rezaei, A.; Rostami, A.; Esmaeil, N. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1265. DOI: [10.3389/fimmu.2019.01265](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01265).
- [27] Zhao, W.; Zhou, X.; Zhao, G.; Lin, Q.; Wang, X.; Yu, X.; Wang, B. Enrichment of Ly6Chi Monocytes by Multiple GM-CSF Injections with HBV Vaccine Contributes to Viral Clearance in a HBV Mouse Model. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2017**, *13*, 2872–2882. DOI: [10.1080/21645515.2017.1344797](https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1344797).
- [28] Kelley, R. K.; Mitchell, E.; Behr, S.; Hwang, J.; Keenan, B.; Cheung, A.; Gordan, J. D.; Ko, A. H.; Cinar, P.; Atreya, C. E.; et al. Phase II Trial of Pembrolizumab (PEM) plus Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in Advanced Biliary Cancers (ABC). *JCO*. **2018**, *36*, 386–386. DOI: [10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.386](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.386).
- [29] Shiloach, J.; Rinas, U. Bacterial Cultivation for Production of Proteins and Other Biological Products. *Kitakanto Med. J.* **2010**, *57*, 134–134.
- [30] Krause, M.; Neubauer, A.; Neubauer, P. The Fed-Batch Principle for the Molecular Biology Lab: Controlled Nutrient Diets in Ready-Made Media Improve Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 1–13. DOI: [10.1186/s12934-016-0513-8](https://doi.org/10.1186/s12934-016-0513-8).
- [31] Reuss, M.; Schmalzriedt, S.; Jenne, M. Application of computational fluid dynamics (CFD) to modeling stirred tank bioreactors. In *Bioreaction Engineering: Modeling and Control* (pp. 207–246).

- Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: [10.1007/978-3-642-59735-0_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59735-0_8).
- [32] Vrabel, P.; Van Der Lans, R. G. J. M.; Luyben, K. C. A. M.; Boon, L.; Nienow, A. W. Mixing in Large-Scale Vessels Stirred with Multiple Radial or Radial and Axial up-Pumping Impellers: Modelling and Measurements. *Chem. Eng. Sci.* **2000**, *55*, 5881–5896. DOI: [10.1016/S0009-2509\(00\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00175-5).
- [33] P.; Vrabel, R. G.; J. M.; Van der Lans, F. N.; Van der Schot, K.; C. A. M.; Luyben, B.; Xu.; S. O.; Enfors. CMA: Integration of Fluid Dynamics and Microbial Kinetics in Modelling of Large-Scale Fermentations. *Chem. Eng. J.* **2001**, *84*, 463–474. DOI: [10.1016/S1385-8947\(00\)00271-0](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(00)00271-0).
- [34] Gameil, A. H. M.; Yusof, F.; Azmi, A. S.; Puad, N. I. M. Process Scale-up Criteria in Production of Recombinant Proteins in *E. coli*: A Systematic Review. *Chem. Nat. Resour. Eng. J.* **2021**, *5*, 37–61.
- [35] Sagmeister, P.; Jazini, M.; Klein, J.; Herwig, C. Bacterial Suspension Cultures. *Ind. Scale Suspens. Cult. Living Cells.* **2014**, 9783527335, 40–93. DOI: [10.1002/9783527683321.ch01](https://doi.org/10.1002/9783527683321.ch01).
- [36] Pigou, M.; Morchain, J. Investigating the Interactions between Physical and Biological Heterogeneities in Bioreactors Using Compartment, Population Balance and Metabolic Models. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *126*, 267–282. DOI: [10.1016/j.ces.2014.11.035](https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.11.035).
- [37] Neubauer, P.; Junne, S. Scale-Up and Scale-Down Methodologies for Bioreactors. *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications.* **2016**, *11*, 323–354. DOI: [10.1002/9783527683369.ch11](https://doi.org/10.1002/9783527683369.ch11).
- [38] Haringa, C.; Mudde, R. F.; Noorman, H. J. From Industrial Fermentor to CFD-Guided Downscaling: what Have we Learned? *Biochem. Eng. J.* **2018**, *140*, 57–71. DOI: [10.1016/j.bej.2018.09.001](https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.001).
- [39] Xu, B.; Jahic, M.; Blomsten, G.; Enfors, S. O. Glucose Overflow Metabolism and Mixed-Acid Fermentation in Aerobic Large-Scale Fed-Batch Processes with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 564–571. DOI: [10.1007/s002530051433](https://doi.org/10.1007/s002530051433).
- [40] Olughu, W.; Deepika, G.; Hewitt, C.; Rielly, C. Insight into the Large-Scale Upstream Fermentation Environment Using Scaled-down Models. *J. Chem. Tech. Biotech.* **2019**, *94*, 647–657. DOI: [10.1002/jctb.5804](https://doi.org/10.1002/jctb.5804).
- [41] Bylund, F.; Collet, E.; Enfors, S. O.; Larsson, G. Substrate Gradient Formation in the Large-Scale Bioreactor Lowers Cell Yield and Increases by-Product Formation. *Bioprocess. Eng.* **1998**, *18*, 171–180. DOI: [10.1007/s004490050427](https://doi.org/10.1007/s004490050427).
- [42] Bylund, F.; Guillard, F.; Enfors, S.-O.; Trägårdh, C.; Larsson, G. Scale down of Recombinant Protein Production: A Comparative Study of Scaling Performance. *Bioprocess Eng.* **1999**, *20*, 377–389. DOI: [10.1007/s004490050606](https://doi.org/10.1007/s004490050606).
- [43] Schweder, T.; Krüger, E.; Xu, B.; Jünger, B.; Blomsten, G.; Enfors, S.-O.; Hecker, M. Monitoring of Genes That Respond to Process-Related Stress in Large-Scale Bioprocesses. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 151–159. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991020\)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V).
- [44] Lara, A. R.; Taymaz-Nikerel, H.; Mashego, M. R.; Van Gulik, W. M.; Heijnen, J. J.; Ramírez, O. T.; Van Winden, W. A. Fast Dynamic Response of the Fermentative Metabolism of *Escherichia coli* to Aerobic and Anaerobic Glucose Pulses. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104*, 1153–1161. DOI: [10.1002/bit.22503](https://doi.org/10.1002/bit.22503).
- [45] Taymaz-Nikerel, H.; van Gulik, W. M.; Heijnen, J. J. *Escherichia coli* Responds with a Rapid and Large Change in Growth Rate upon a Shift from Glucose-Limited to Glucose-Excess Conditions. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 307–318. DOI: [10.1016/j.ymben.2011.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.03.003).
- [46] Sunya, S.; Delvigne, F.; Uribealarea, J. L.; Molina-Jouve, C.; Gorret, N. Comparison of the Transient Responses of *Escherichia coli* to a Glucose Pulse of Various Intensities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 1021–1034. DOI: [10.1007/s00253-012-3938-y](https://doi.org/10.1007/s00253-012-3938-y).
- [47] Sandoval-Basurto, E. A.; Gosset, G.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. 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.* **2005**, *89*, 453–463. DOI: [10.1002/bit.20383](https://doi.org/10.1002/bit.20383).
- [48] Lara, A. R.; Leal, L.; Flores, N.; Gosset, G.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. Transcriptional and Metabolic Response of Recombinant *Escherichia coli* to Spatial Dissolved Oxygen Tension Gradients Simulated in a Scale-down System. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 372–385. DOI: [10.1002/bit.20704](https://doi.org/10.1002/bit.20704).
- [49] Bylund, F.; Castan, A.; Mikkola, R.; Veide, A.; Larsson, G. Influence of Scale-up on the Quality of Recombinant Human Growth Hormone. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 119–128. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000720\)69:2<119::AID-BIT1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000720)69:2<119::AID-BIT1>3.0.CO;2-9).
- [50] Anane, E.; García, Á. C.; Haby, B.; Hans, S.; Krausch, N.; Krewinkel, M.; Hauptmann, P.; Neubauer, P.; Cruz Bournazou, M. N. A Model-Based Framework for Parallel Scale-down Fed-Batch Cultivations in Mini-Bioreactors for Accelerated Phenotyping. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*(11), 2906–2918. DOI: [10.1002/bit.27116](https://doi.org/10.1002/bit.27116).
- [51] George, S.; Larsson, G.; Enfors, S. O. A Scale-down Two-Compartment Reactor with Controlled Substrate Oscillations: Metabolic Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Eng.* **1993**, *9*, 249–257. DOI: [10.1007/BF01061530](https://doi.org/10.1007/BF01061530).
- [52] Caspeta, L.; Flores, N.; Pérez, N. O.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. 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.* **2009**, *102*, 468–482. DOI: [10.1002/bit.22084](https://doi.org/10.1002/bit.22084).
- [53] Caspeta, L.; Lara, A. R.; Pérez, N. O.; Flores, N.; Bolívar, F.; Ramírez, O. T. Enhancing Thermo-Induced Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* by Temperature Oscillations and Post-Induction Nutrient Feeding Strategies. *J. Biotechnol.* **2013**, *167*, 47–55. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.001).
- [54] Wallace, R. J.; Holms, W. H. Maintenance Coefficients and Rates of Turnover of Cell Material in *Escherichia coli* ML308 at Different Growth Temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *37*, 317–320. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1986.tb01816.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01816.x).
- [55] Seeger, A.; Schneppe, B.; McCarthy, J. E. G.; Deckwer, W. D.; Rinas, U. Comparison of Temperature- and Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside-Induced Synthesis of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 947–953. DOI: [10.1016/0141-0229\(94\)00123-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00123-9).
- [56] Calcines-Cruz, C.; Olvera, A.; Castro-Acosta, R. M.; Zavala, G.; Alagón, A.; Trujillo-Roldán, M. A.; Valdez-Cruz, N. A. Recombinant-Phospholipase A2 Production and Architecture of Inclusion Bodies Are Affected by pH in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 826–836. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.10.178](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.178).
- [57] Sambrook, J.; Fritsch, E. R.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1989**.
- [58] Sweere, A. P. J.; Luyben, K. C. A. M.; Kossen, N. W. F. Regime Analysis and Scale-down: Tools to Investigate the Performance of Bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 386–398. DOI: [10.1016/0141-0229\(87\)90133-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90133-5).
- [59] Bhattacharya, P.; Pandey, G.; Srivastava, P.; Mukherjee, K. J. Combined Effect of Protein Fusion and Signal Sequence Greatly Enhances the Production of Recombinant Human GM-CSF in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 103–116. DOI: [10.1385/MB:30:2:103](https://doi.org/10.1385/MB:30:2:103).
- [60] Taherian, E.; Mohammadi, E.; Jahanian-Najafabadi, A.; Moazen, F.; Akbari, V. Cloning, Optimization of Periplasmic Expression and Purification of Recombinant Granulocyte Macrophage-Stimulating Factor in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Adv. Biomed. Res.* **2019**, *8*, 71. DOI: [10.4103/abr.abr_166_19](https://doi.org/10.4103/abr.abr_166_19).
- [61] Malekian, R.; Jahanian-Najafabadi, A.; Moazen, F.; Ghavimi, R.; Mohammadi, E.; Akbari, V. High-Yield Production of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in *E. coli* BL21 (DE3) by an Auto-Induction Strategy. *Iran. J. Pharm. Res.* **2019**, *18*, 469.
- [62] Schwanke, R. C.; Renard, G.; Chies, J. M.; Campos, M. M.; Batista, E. L.; Santos, D. S.; Basso, L. A. Molecular Cloning, Expression in *Escherichia coli* and Production of Bioactive Homogeneous Recombinant Human Granulocyte and Macrophage

- Colony Stimulating Factor. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45*, 97–102. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2009.04.005](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.005).
- [63] Khasa, Y. P.; Khushoo, A.; Tapryal, S.; Mukherjee, K. J. Optimization of Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (hGM-CSF) Expression Using Asparaginase and Xylanase Gene's Signal Sequences in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *165*, 523–537. DOI: [10.1007/s12010-011-9272-5](https://doi.org/10.1007/s12010-011-9272-5).
- [64] Das, K. M.; Banerjee, S.; Shekhar, N.; Damodaran, K.; Nair, R.; Somani, S.; Raiker, V. P.; Jain, S.; Padmanabhan, S. Cloning, Soluble Expression and Purification of High Yield Recombinant hGMCSF in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2064–2076. DOI: [10.3390/ijms12032064](https://doi.org/10.3390/ijms12032064).
- [65] Yang, J.; Kanter, G.; Voloshin, A.; Levy, R.; Swartz, J. R. Expression of Active Murine Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in an *Escherichia coli* Cell-Free System. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1689–1696. DOI: [10.1021/bp034350b](https://doi.org/10.1021/bp034350b).
- [66] Zawada, J. F.; Yin, G.; Steiner, A. R.; Yang, J.; Naresh, A.; Roy, S. M.; Gold, D. S.; Heinsohn, H. G.; Murray, C. J. Microscale to Manufacturing Scale-up of Cell-Free Cytokine Production-A New Approach for Shortening Protein Production Development Timelines. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1570–1578. DOI: [10.1002/bit.23103](https://doi.org/10.1002/bit.23103).
- [67] Hajinia, E.; Fatemi, S. S.; Karkhane, A. A.; Safekordi, A. A.; Yakhchali, B. Optimization of Secretory Expression of Recombinant hGM-CSF in High Cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Using Taguchi Statistical Method. *Iran. J. Biotechnol.* **2012**, *10*, 275–280.
- [68] Xu, B.; Jahic, M.; Enfors, S. O. Modeling of Overflow Metabolism in Batch and Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 81–90. DOI: [10.1021/bp9801087](https://doi.org/10.1021/bp9801087).
- [69] Zimmermann, H. F.; Anderlei, T.; Büchs, J.; Binder, M. Oxygen Limitation is a Pitfall during Screening for Industrial Strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 1157–1160. DOI: [10.1007/s00253-006-0414-6](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0414-6).
- [70] Akesson, M.; Hagander, P.; Axelsson, J. P. Avoiding Acetate Accumulation in *Escherichia coli* Cultures Using Feedback Control of Glucose Feeding. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 223–230. DOI: [10.1002/bit.1054](https://doi.org/10.1002/bit.1054).
- [71] Mayer, F.; Cserjan-Puschmann, M.; Haslinger, B.; Shpylovyi, A.; Sam, C.; Soos, M.; Hahn, R.; Striedner, G. Computational Fluid Dynamics Simulation Improves the Design and Characterization of a Plug-Flow-Type Scale-down Reactor for Microbial Cultivation Processes. *Biotechnol. J.* **2023**, *18*, e2200152. DOI: [10.1002/biot.202200152](https://doi.org/10.1002/biot.202200152).
- [72] George, H. A.; Powell, A. L.; Dahlgren, M. E.; Herber, W. K.; Maigetter, R. Z.; Burgess, B. W.; Stirdivant, S. M.; Greasham, R. L. Physiological Effects of TGF α -PE40 Expression in Recombinant *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 437–445. DOI: [10.1002/bit.260400314](https://doi.org/10.1002/bit.260400314).
- [73] Enfors, S. O.; Jahic, M.; Rozkov, A.; Xu, B.; Hecker, M.; Jürgen, B.; Krüger, E.; Schweder, T.; Hamer, G.; O'Beirne, D.; et al. Physiological Responses to Mixing in Large Scale Bioreactors. *J. Biotechnol.* **2001**, *85*, 175–185. DOI: [10.1016/S0168-1656\(00\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00365-5).
- [74] Delvigne, F.; Destain, J.; Thonart, P. Structured Mixing Model for Stirred Bioreactors: An Extension to the Stochastic Approach. *Chem. Eng. J.* **2005**, *113*, 1–12. DOI: [10.1016/j.cej.2005.06.007](https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.06.007).
- [75] Qiu, J.; Swartz, J. R.; Georgiou, G. Expression of Active Human Tissue-Type Plasminogen Activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4891–4896. DOI: [10.1128/AEM.64.12.4891-4896.1998](https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.4891-4896.1998).
- [76] Lara, A. R.; Galindo, E.; Ramírez, O. T.; Palomares, L. A. Living with Heterogeneities in Bioreactors: Understanding the Effects of Environmental Gradients on Cells. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *34*, 355–381. DOI: [10.1385/MB:34:3:355](https://doi.org/10.1385/MB:34:3:355).
- [77] Hoffmann, F.; Rinas, U. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2004**, *89*, 73–92. DOI: [10.1007/b93994](https://doi.org/10.1007/b93994).
- [78] Snoeck, S.; Guidi, C.; De Mey, M. “Metabolic Burden” Explained: stress Symptoms and Its Related Responses Induced by (over) Expression of (Heterologous) Proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **2024**, *23*, 96. DOI: [10.1186/s12934-024-02370-9](https://doi.org/10.1186/s12934-024-02370-9).