

03062
10-4

"DESARROLLO DE METODOLOGIAS QUE PERMITAN EL ESCALAMIENTO A NIVEL DE
PLANTA PILOTO DE LA OBTENCION Y AISLAMIENTO DE INTERMEDIARIOS PARA
LA PRODUCCION DE INSULINA HUMANA"

TESIS

que para optar por el grado de

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

presenta

Enrique Galindo Fentanes

C.C.H.

Departamento de Biotecnología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

México, D. F., Octubre de 1983

TESIS CON
FALLA FE ORIGEN



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 está 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.

INDICE GENERAL

Capítulo

- RESUMEN
- 1 INTRODUCCION
- 2 Antecedentes
 - 2.1 Importancia Social y Económica de la Diabetes Mellitus
 - 2.2 La Diabetes y la Insulina
 - 2.3 Producción de Insulina Humana
 - 2.4 Insulina humana a partir de ADN recombinante
- 3 OBJETIVOS
- 4 MATERIALES Y METODOS
 - 4.1 Materiales
 - 4.1.1 Reactivos
 - 4.1.2 Equipos
 - 4.1.3 Cepas
 - 4.2 Métodos
 - 4.2.1 Medios de cultivo
 - 4.2.2 Técnicas de medición
 - 4.3.(A) Procedimientos experimentales (Cadena A)
 - 4.3.(B) Procedimientos experimentales (Cadena B)
- 5 RESULTADOS Y DISCUSION
 - 5.1 Cadena A
 - 5.2 Cadena B
- 6 Conclusiones y Redomendaciones
- Bibliografía

RESUMEN

El objetivo global del presente trabajo consistió de manera general en optimizar la expresión de las proteínas híbridas β -galactosidasa Cadena A y β -galactosidasa-Cadena B, intermediarios en la síntesis de insulina humana, las cuales son codificadas por plásmidos recombinantes, usando como receptores cepas de E. coli. Los estudios se encaminaron fundamentalmente hacia aquellos aspectos que podrían ser críticos en el escalamiento: la estabilidad de los plásmidos, sus niveles de expresión y la utilización de materias primas industriales en la formulación de un medio de cultivo susceptible de escalarse, entre los más importantes.

El sistema de Cadena A se encuentra en una cepa Lac^- , i^- por lo que la producción de proteína híbrida es constitutiva. La estabilidad de esta última en células intactas es elevada debido a su naturaleza insoluble. La conservación de la cepa en glicerol presenta variaciones drásticas en su viabilidad y en los niveles de expresión de proteína híbrida. La presión selectiva de la ampicilina solo se ejerce en las fases iniciales del crecimiento en vista de su rápida degradación. Sin embargo, en ausencia de antibiótico, el nivel de segregación no es mayor al 1% en un cultivo. En cultivo retroalimentado el nivel de segregantes es apreciable (10%) solo después de 7 pases. Con el uso de ampicilina, las segregantes prácticamente no aparecen. Los niveles de expresión dependen fundamentalmente de la composición del medio de cultivo en el que son desarrollados, muy probablemente debido a ajustes dinámicos del número promedio de copias del plásmido por célula. Los niveles máximos de expresión se -

obtienen cuando los inóculos se desarrollan en medios mínimos, y cuando el cultivo final se crece en un medio con alto contenido de nitrógeno y sin necesidad de presión selectiva. El medio de cultivo se optimizó mediante técnicas estadísticas y se logró la expresión de la proteína híbrida en un medio a base de sacarosa y peptona industriales. Los experimentos en fermentadores de 14 lts. permiten concluir que no existirán limitaciones importantes en el escalamiento del proceso de fermentación de Cadena A.

El sistema de Cadena B requiere inducirse para lograr la expresión, en vista de que se encuentra en una cepa que sobreproduce represor lac. Inicialmente se estudió la inducción con el galactósido IPTG y posteriormente las alternativas mediante el uso de lactosa. Variando fundamentalmente las concentraciones de lactosa y fosfatos se logró, mediante métodos estadísticos de optimización, la expresión de la proteína híbrida β -galactosidasa-Cadena B; en niveles comparables a los obtenidos usando IPTG. Se detectó que el metabolismo oxidativo juega un papel decisivo en la inducción con lactosa y requiere de más experimentación para escalar el proceso. Respecto a los niveles de segregación, degradación de ampicilina y la dependencia entre los niveles de expresión y las condiciones de cultivo son fundamentalmente los mismos que para el caso del sistema de la Cadena A. Esto es; baja segregación ($< 2\%$), desaparición acelerada del antibiótico e incremento en la síntesis específica de proteína híbrida al someter a la bacteria transformada a subcultivos en medio mínimo. En el caso de la Cadena B, se pudo concluir que un sistema inducible puede tener ventaja sobre uno constitutivo reflejado probablemente en una mayor estabilidad del plásmido. Además se requieren más

datos respecto a la influencia de factores fisicoquímicos, para lograr - así la expresión adecuada en fermentadores de mayor capacidad en un medio de cultivo optimizado a base de materias primas industriales y susceptible de escalarse.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que padece una parte importante de la población mexicana y es un serio problema de salud pública que tiene múltiples repercusiones socioeconómicas. La forma de controlar este padecimiento generalmente es a través de dietas y en los casos más graves por medio de la aplicación de insulina. Esta hormona no se produce en el país y ha tenido que importarse del exterior a precios cada vez más altos, con la consecuente fuga de divisas y la dependencia estricta de un proveedor monopólico.

La insulina que se ha venido consumiendo a nivel mundial hasta fines de 1982 fué exclusivamente la proveniente de páncreas de bovinos y porcinos. Las insulinas porcina y bovina son muy parecidas a la humana, pero no idénticas, aunque cumplen adecuadamente su función hormonal en el organismo humano. Debido a estas pequeñas diferencias, en muchos casos se presentan problemas alérgicos en el paciente que hacen más difícil su tratamiento.

Recientemente, con las técnicas de recombinación de ácidos nucleicos in vitro ha sido posible la obtención de insulina idéntica a la humana a partir de cultivos bacterianos. Con ello es posible obtener un producto en el que presumiblemente no se presentan problemas alérgicos; y más importantemente, permite contar con un proceso en el que no se depende del mercado de vísceras animales para producir insulina.

La metodología para la síntesis de insulina humana por estos procedimientos consiste fundamentalmente en sintetizar el ADN respectivo para cada una de las cadenas que forman la insulina, fusionarlo a un gene de una proteína estable e introducirlo a una bacteria a través de un vehículo molecular y lograr su expresión en el citoplasma bacteriano. Una vez producidas las proteínas híbridas respectivas, las cadenas se desligan de la proteína a la que fueron fusionadas, se purifican y se reasocian in vitro para establecer los puentes disulfuro necesarios para que la insulina sea biológicamente activa. Esta finalmente es purificada con el objetivo de lograr un producto de uso terapéutico. Una estrategia diferente consiste en insertar los genes de la proinsulina, lo cual, elimina el paso de reasociación de las cadenas. En este último caso la proinsulina se convierte en la hormona activa mediante tratamientos enzimáticos.

La demostración de los conceptos fundamentales del proceso --
fue publicada por Goeddel et al. en enero de 1979. En 1980, se publicó la primera experiencia clínica y a principios de 1983, la compañía Lilly de Indianapolis, USA, inició la producción comercial de este tipo de --
insulina, la cual ha sido autorizada legalmente en muchos países. --
(Johnson, 1983).

En los antecedentes del presente trabajo se revisaron los problemas socioeconómicos ocasionados por la Diabetes Mellitus. Asimismo se incluye un breve bosquejo relacionado con el papel que actualmente juega la insulina en el tratamiento de la Diabetes; así como los esfuerzos tendientes a mejorar la práctica terapéutica. También se describen las alternativas para producir insulina humana, ya sea mediante modificación enzi-

mática de la insulina porcina, o bien por síntesis bacteriana mediante -- técnicas de ADN recombinante. De estos dos tipos de insulina humana, co-mercialmente disponibles se revisaron brevemente sus características de - pureza y los resultados más relevantes de las pruebas clínicas a las que han sido sometidas. Finalmente, se incluye la revisión de la literatura referente al desarrollo de los aspectos técnicos del proyecto de insulina humana mediante ADN recombinante. Esta revisión abarca desde los prime--ros esfuerzos hasta el escalamiento y comercialización del proceso.

A principios de 1981 se estableció un convenio entre el Ins--tituto Mexicano del Seguro Social y la Universidad Nacional Autónoma de - México a través del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con el fin - de establecer colaboración para lograr la producción de insulina humana - a nivel de planta piloto. Lo anterior con el propósito de implementar la tecnología que permita producir una insulina igual a la humana por medio de fermentación que evite la dependencia absoluta del extranjero para su adquisición.

El proyecto, de carácter multidisciplinario, se planteó me--diante la interacción de varios grupos de trabajo: el de Biología Mole-cular, que se encargaría de la síntesis de ADN, clonación y transforma--ción de cepas adecuadas de E. coli para su expresión; el de Ingeniería - Bioquímica, quien se responsabilizaría de establecer las condiciones para el escalamiento del proceso y la operación de la planta piloto; el de --Purificación, quien llevaría a cabo los estudios de recuperación y puri-ficación de las cadenas a partir de las proteínas híbridas; el grupo de Química, responsable de desarrollar las metodologías de reasociación de

cadena, su purificación y el establecimiento de la autenticidad de los productos, y finalmente, un grupo de Inmunología, que desarrollaría métodos de detección, purificación y control biológico de calidad de los productos obtenidos.

El presente trabajo se encuentra enmarcado dentro del grupo de Ingeniería Bioquímica. Específicamente, se refiere al desarrollo de metodologías a nivel laboratorio que permitan el posterior escalamiento del proceso a nivel de planta piloto para la producción de las proteínas híbridas β -galactosidasa-cadena A y β -galactosidasa-cadena B. Ello a partir de las clonas desarrolladas por el grupo de Biología Molecular. También, se planteó como fin obtener pastas celulares que sirvieran como materia prima para los grupos de purificación, química e inmunología.

La experimentación en una planta piloto es requisito fundamental para el desarrollo de tecnologías comerciales; en vista de que proporciona información sobre los problemas que se encontrarán en el escalamiento. Principalmente, aquellos referentes a la calidad y disponibilidad de materias primas, así como a diversos aspectos relacionados con el equipo disponible, su operación y la seguridad del proceso, entre otros. En el presente estudio se detectaron los principales problemas que surgirían en el escalamiento, mediante experimentación en matraces y en fermentadores de dos y 14 lts. y que servirán de base para el escalamiento a equipos de 100, 500 y 850 lts.

Se estudiaron los parámetros que podrían ser críticos en el escalamiento. En el caso del sistema de la Cadena A se incluyen: métodos de conservación de la cepa, estabilidad de almacenamiento de la pro-

teína híbrida, estudios cinéticos de la fermentación, la necesidad de pre si ón se lect iva, la segregación del plásmido, métodos para maximizar la -- producción de proteína híbrida y la evaluación de componentes del medio - de cultivo que sean susceptibles de escalarse. El trabajo concluye con - la optimización estadística del medio de cultivo.

En el caso del sistema de Cadena B, en vista de que requiere inducirse, la mayor parte del trabajo experimental tuvo como objetivo el encontrar las mejores condiciones de inducción y especialmente la sustitu ción del galactósido IPTG como inductor. Este compuesto tiene un costo - relativamente alto y su disponibilidad es limitada, lo que podría influir negativamente al escalar el proceso. Algunos de los experimentos que resultaron de mayor relevancia en el caso de la Cadena A se llevaron a cabo también para la Cadena B. La optimización estadística del medio de culti vo permitió contar con un medio a base de lactosa y componentes industria les en el que se lograba inducción comparable al caso con IPTG.

De manera general, en el caso de Cadena A, los resultados per miten concluir que no existirán limitantes importantes para el escalamien to de la fermentación y que muy probablemente el paso más crítico a contro lar sea la estabilidad del plásmido.

En el caso de Cadena B la inestabilidad del plásmido no parece ser crítica. Sin embargo, es aún necesario resolver problemas de -- escalamiento relacionados con aspectos del metabolismo oxidativo . para lograr una expresión adecuada de la proteína híbrida en fermentadores mayores de 2 litros.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Importancia Social y Económica de la Diabetes Mellitus

La enfermedad denominada Diabetes mellitus es un importante problema de salud pública a nivel mundial ya que afectaba en 1977 a una población cercana a los 100 millones de personas (Anónimo, 1977). Una -- tasa de crecimiento anual entre el 5 y el 6% (Anónimo, 1977, Anónimo, -- 1981a) significa que el número total de personas con Diabetes se duplica -- cada 15 años.

Según el informe de la Comisión Nacional de Diabetes al Congreso de los Estados Unidos, esta enfermedad afecta a un 5% de la población total, la cual, en 1975 se estimaba en 10 millones de norteamericanos y -- cada año se diagnostican alrededor de 600,000 nuevos casos. Ello equiva -- le a un crecimiento anual del 6%, que significa que la población diabéti -- ca se duplicará cada 12 años. Entre 1965 y 1973 el número de diabéticos en los Estados Unidos se incrementó en un 50%, con esta tasa de crecimiento se calcula que para 1990 existirán en ese país cerca de 20 millones de diabéticos. De manera general se estima que actualmente en promedio un individuo que logre sobrevivir hasta los 70 años tiene un 20% de posibilidades de desarrollar Diabetes a menos que se descubra algún método para -- curar o prevenir la enfermedad (Anónimo, 1975).

En la República Mexicana, no existen datos precisos y organizados respecto al problema de la Diabetes, sin embargo es posible encontrar datos dispersos provenientes de fuentes diversas. Rodríguez (1979) menciona que la Diabetes es padecida por el 2% de los obreros mexicanos jóvenes y hasta por el 10% en personas con más de 50 años. Lozano-Castañeda (1976) indica que un 2% de la población general padece Diabetes, -- variando estos porcentajes según la edad; el 5% inicia antes de los 20 años; entre los 40 y 49 años el 5% padece la enfermedad; entre los 50 y 59 el 10% y entre los 60 y 69 años el 14,2%.

Solano (1979) en estudios realizados en Guadalajara en 1976 indica que se ha detectado Diabetes hasta en el 8% de una población al azar de 200 individuos no diagnosticados con edad promedio de 55 años. - El mismo autor reporta que el 40% de la población joven y sana tiene parentela diabética y en el caso de los diabéticos crónicos el porcentaje se eleva al 60%. Estas cifras son mayores a las reportadas por los americanos y de acuerdo a Solano "hacen suponer que la herencia diabética - es importante en nuestro medio". Este autor, de acuerdo a sus estudios en Guadalajara concluye que "... en nuestro medio la enfermedad representa un problema más serio (que en Estados Unidos), observando frecuentemente la historia natural de la Diabetes en forma prematura. Probablemente esto es en gran parte derivado por la detección tardía de la enfermedad, ya que la gran mayoría de los pacientes diabéticos son económicamente pobres y solo acuden a los hospitales en condiciones de emergencia".

Otras fuentes indican que, según cifras obtenidas entre 1966 y 1970 en México, el 4.5% de la población padecía Diabetes (Anónimo, 1977).

La Secretaría de Salubridad y Asistencia declaró que en el -- país existen entre 1.4 y 3.1 millones de diabéticos (lo que de acuerdo a los datos del censo de 1980 corresponde a porcentajes que van del 2 al -- 4.6% del total de la población) de los cuales se estima que el 5% comenzó a desarrollar el padecimiento antes de los 20 años de edad. Respecto a -- la distribución por edades se estima que la población entre los 40 y 49 -- años, el 5% padece la enfermedad, mientras que los mayores de 60 años el porcentaje es cercano al 14.3% (Anónimo, 1981a). Finalmente, otra fuente menciona que entre el 5 y el 10% de la población mexicana padece Diabetes mellitus (Anónimo, 1981b).

En otros países latinoamericanos la prevalencia por ciento de Diabetes en la población total es como sigue: Argentina, 6; Brasil, 2.7; Colombia 6.8; Cuba, 3.8; Chile, 1.17; Jamaica, 1.26; Uruguay, 6.9; Venezuela, 7.3. Estos datos fueron recopilados por expertos de la Organización Panamericana de la Salud entre 1966 y 1970, quienes indican: "Si bien -- las cifras varían, en gran parte debido a los diferentes parámetros elegi dos para realizar las estadísticas, en todos los casos se revela un pro-- gresivo aumento y una magnitud que anteriormente no se habían imaginado -- en países en vías de desarrollo". (Anónimo, 1977).

Los riesgos potenciales de la Diabetes son realmente alarmantes; los diabéticos son 25 veces más propensos a la ceguera que los no -- diabéticos, con una posibilidad 17 veces mayor de desarrollar enfermedad crónica de los riñones, 5 veces más propensos a la gangrena y con un riesgo doble de enfermedades cardíacas y apoplejía cerebral. De manera general se asegura que la expectativa de la vida de los diabéticos, es un ter

cio menor a la de la población general (Anónimo, 1975, Solano, 1979).

Se sabe que la Diabetes se conocía desde tiempos ancestrales (2000 A.C.) sin embargo fue posible tratarla hasta 1921 cuando se descubrió la insulina. Antes de ese año los pacientes con Diabetes dependiente de insulina (Tipo I) solo lograban sobrevivir uno o dos años después de diagnosticada la enfermedad. En la actualidad la insulina permite controlar la Diabetes y prolongar la vida a tales pacientes; pero también, gracias a ello, se han descubierto las complicaciones ocasionadas por la enfermedad, tales como la ceguera y los padecimientos renales y cardio--vasculares. Existen evidencias que indican que la diabetes y sus complicaciones causan aproximadamente 300,000 muertes anualmente en los Estados Unidos siendo aparentemente el 75% de ellas derivadas de problemas circulatorios. Con ese número ocupan el tercer lugar entre las causas de muerte, solo antecedida por las enfermedades cardiovasculares y el cancer -- (Albisser & Spencer, 1982). En México en 1972, la Diabetes ocupó la décima causa de muerte en la población general y la sexta para sujetos de más de 45 años de edad. (Lozano-Castañeda, 1976).

Las mujeres tienen un 50% más de probabilidades de padecer la enfermedad que los hombres. Desde el punto de vista étnico, los no-blancos tienen un 20% mayor de probabilidad de tener diabetes con respecto a los blancos. Desde el punto de vista socioeconómico la población con escasos recursos es tres veces mas propensa a padecer Diabetes respecto a la población de ingresos medios o elevados. La probabilidad de ser diabético es más de dos veces mayor por cada 20% de exceso de peso y se duplica por cada diez años de vida. (Albisser & Spencer, 1982).

En Estados Unidos se calcula que aproximadamente el 50% de los niños con Diabetes Tipo I morirán de padecimientos renales en un promedio de 25 años después de su diagnóstico. En la actualidad existen alrededor de 100,000 niños diabéticos dependientes de insulina con elevada posibilidad de ceguera y de muerte por causas renales antes de cumplir los 40 --- años. (Albisser & Spencer, 1982).

Además de los problemas estrictamente físicos ocasionados por la Diabetes, existen un gran número de problemas económicos y psicosociales en el paciente diabético y en su familia. En Estados Unidos, el 14% de la población diabética tiene que ser encamada por un promedio de 1.5 - meses por año. Ninguna otra enfermedad crónica provoca tantos hombre-día en cama entre las personas que no tienen servicios institucionales de salud. Los pacientes diabéticos viven con el temor permanente de quedarse ciegos y de morir prematuramente, por lo que es necesario el empleo de -- recursos para instruirlos, educarlos e integrarlos a la sociedad. El impacto directo e indirecto de la Diabetes en la economía de los Estados -- Unidos se estimó en más de 5,000,000,000 dólares por año en 1975, aún sin considerar el costo de las complicaciones. Tal impacto económico en 1975 resultó ser el doble del estimado para el año de 1967, esto es, creció -- desde el punto de vista económico a un ritmo promedio del 25% anual en -- ese período. (Albisser & Spencer, 1982).

En México, no se dispone de información de este tipo. Sin em bargo un rubro importante del impacto económico es simplemente la fuga de divisas ocasionadas por las importaciones de insulina. La compra de este producto representó para el Instituto Mexicano del Seguro Social, una ero

gación de 13.5 millones de pesos en 1979 y a nivel nacional se estimó en 40 millones de pesos, los que se destinaron a la adquisición de insulina. Si estas cifras se comparan con los erogadas en 1975, se observa que hubo un incremento del 500% en el costo de este producto (Anónimo, 1980b).

2.2 La Diabetes y la Insulina

El signo más evidente de la Diabetes es el elevado nivel de glucosa presente en la sangre y originalmente se pensó que esta enfermedad era causada por disturbios en el metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la Diabetes es un fenómeno mucho más complejo que también involucra disturbios en el metabolismo de las grasas y proteínas, principalmente.

La diabetes es un padecimiento muy heterogéneo en su naturaleza. Aunque todavía se sabe poco de su etiología y patogénesis, los estudios recientes indican que la diabetes no es una enfermedad única sino se trata de un síndrome, esto es, el resultado final de muchas enfermedades posiblemente no relacionadas entre sí, que causan un conjunto de signos y síntomas, en este caso el elevado nivel de azúcar en la sangre es el más importante, aunque no el único. (Zonana & Rimoin, 1976, Solano, 1979, -- Fajans, 1981).

Actualmente, se distinguen dos clases principales de Diabetes: diabetes tipo I, dependiente de insulina y diabetes tipo II, no dependiente de insulina. Adicionalmente existe una clasificación para caracterizar otros tipos especiales de diabetes y otras categorías de intolerancia a la glucosa que no se clasifican como diabetes (Anónimo, 1979b, West, --

1979, Fajans, 1981). Los pacientes que padecen diabetes del tipo I constituyen cerca del 20% del total de diabéticos. El 80% restantes se encuentran constituido principalmente por diabéticos del tipo II. (Roth, 1981).

De manera general el tratamiento de los diferentes tipos de diabetes esta basado en dietas, drogas antidiabéticas e insulina. (Petridis & Weiss, 1978). La dieta, con o sin el uso de los otros recursos terapéuticos es la piedra angular en el tratamiento de la diabetes. Esta depende fundamentalmente del grado o severidad del desorden metabólico y de la presencia o ausencia de obesidad. Mas de la tercera parte de todos los diabéticos pueden ser adecuadamente controlados solo por medio de dietas (Petridis & Weiss, 1978) lo que significa de acuerdo a los datos de Roth, (1981) que aproximadamente el 41% de los diabéticos Tipo II pueden ser controlados solo con dietas.

Cuando la dieta no es suficiente, los pacientes son tratados con hipoglicemiantes orales (a excepción de los diabéticos Tipo I). Ciertas drogas de este tipo estimulan la secreción de insulina (ver detalles en Petridis & Weiss, 1978 y Oakley et al, 1978).

Cuando los síntomas de la diabetes no pueden ser controlados por medio de las dietas y/o hipoglicemiantes orales es necesario el uso de insulina. Cuando se presentan las consecuencias mas graves de la diabetes, tales como el coma diabético o la cetoacidosis es indispensable el uso de la insulina. Los pacientes con diabetes Tipo I no tienen alternativa de tratamiento. La insulina también se usa en casos de infección, cirugía o embarazo, de pacientes que no dependen de insulina pero que pre

CADENA A

Borrego ————— AlaGlyVal —————

Res ————— Ala— Val —————

Cerdo }
Conejo }
Humano }

 S S
 | |
GlyIleValGluGlnCisCisTrcSerIleCisSerLeuTirGlnLeuGluAsnTirCisAsn

CADENA B

Humano FenValAsnGlnHisLeuCisCisGlySerHisLeuValGluAlaLeuTirLeuValCisGlyGluArgGlyFenFenTirTreProLisTre

Conejo } ————— Ser

Cerdo }

Res } ————— Ala

Borrego }

FIGURA 2.2.2.1 Secuencia de aminoácidos de diversas insulinas de mamíferos.

sentan hiperglicemia (Petrides & Weiss, 1978, Galloway & Davidson, 1981). Sin duda, la insulina es la hormona más importante ligada con la diabetes. Sin embargo, no es la única (Oakley, et al., 1978, Petrides & Weiss, 1978).

La insulina es una hormona peptídica que está constituida por dos cadenas conteniendo 21 aminoácidos (Cadena A) y 30 aminoácidos (Cadena B). Las dos cadenas están interconectadas por dos puentes disulfuro - entre cisteínas de ambas cadenas: el primero entre las posiciones 7 de - ambas cadenas y el segundo entre la posición 20 de la Cadena A y la 19 de la Cadena B. Dentro de la cadena A existe otro puente disulfuro que une a la cisteína de las posiciones 6 y 11. (Figura 2.2.1). Aunque existen diferencias en la secuencia de aminoácidos de las insulinas de animales - mamíferos y no mamíferos, la estructura fundamental se conserva y si su - actividad biológica, determinada en mamíferos, se compara con la presenta - da por la insulina bovina o porcina, se encuentra que se conserva entre - un 10 y 100%, dependiendo de la especie.

La insulina en el hombre es sintetizada por las células β de los islotes de Langerhans, ubicados en el páncreas (Oakley, et al., 1978, Grodsky; 1970). Este proceso es una compleja serie de eventos de codifi - cación genética (Bell et al., 1980, Ganon et al., 1979, Kinninburg & -- Ross, 1979), biosíntesis y excreción (Steiner, 1977, Petrides & Weiss, -- 1978). La excreción de la insulina a la sangre se encuentra controlada - de manera compleja por los niveles de glucosa, así como por una diversi - dad de estímulos adicionales (Oakley et al., 1978, Petrides & Weiss, 1978, Halter, & Porte, 1981, Unger, 1981).

Los efectos metabólicos de la insulina son diversos. De manera general, puede decirse que el efecto global de la insulina es dirigir el metabolismo fundamentalmente hacia procesos biosintéticos. En su ausencia, se propician principalmente las actividades catabólicas o degradativas. (Oakley et al., 1978, Petrides & Weiss, 1978).

El modo de acción de la insulina no ha sido totalmente delucidada, sin embargo, se sabe que se ejerce mediante receptores específicos (Goldfine, 1978, Roth & Muggeo, 1981, Levine, 1981, Gorden et al., 1980, Steiner, 1977, Wood et al., 1975).

Las insulinas utilizadas para el tratamiento de diabéticos -- han sido de origen porcino y bovino principalmente, las cuales difieren -- respecto a la insulina humana en su secuencia de aminoácidos como se ilustra en la Figura 2.2.1. Estas diferencias en su estructura primaria, así como las impurezas que se encuentran en las preparaciones comerciales son los principales responsables de algunos problemas derivados del tratamiento con tales insulinas, entre los que se encuentran principalmente la producción de anticuerpos anti-insulina que puede llevar a alergia local o sistémica, resistencia inmunológica a la insulina y lipoatrofia en los -- sitios de inyección (Skyler, 1982a). En vista de la importancia de los -- problemas ocasionados por la presencia de impurezas, a partir de 1972 se lanzaron al mercado insulinas purificadas por técnicas cromatográficas y/o de intercambio iónico. A estas nuevas insulinas se les denomina SC, SP a MC (de "Single Component", "Single Peak" o "Monocomponent", por su comportamiento cromatográfico) (Yue & Turtle, 1977).

De las insulinas disponibles la porcina purificada es la que tiene menos actividad antigénica. Pero dada la baja disponibilidad de materias primas y las pérdidas que resultan en su purificación (Yue & Turtle, 1977), solo se recomendaba para situaciones muy especiales (Petrides & Weiss, 1978, p. 99). La mayor parte de las presentaciones comerciales -- contienen 2/3 de insulina bovina y 1/3 de insulina porcina. Las características de las diferentes presentaciones de insulina que se encuentran -- disponibles comercialmente se pueden consultar en los trabajos de Petrides & Weiss (1978), Solano (1979) y Galloway & Davidson (1981).

La terapia de la diabetes ha experimentado un gran avance en los últimos años. Sin embargo, puede decirse que en corto y quizá mediano plazo, el tratamiento más común para los diabéticos dependientes de insulina seguirá siendo la aplicación exógena de insulina, posiblemente junto con otras hormonas (Raskin, 1981, Solano, 1979). Los avances más significativos en el futuro, muy probablemente serán en la forma de administrar la insulina por medio de dispositivos electromecánicos implantables -- (Marble, 1981, Albisser & Spencer, 1982, Soeldner, 1982). La aplicación de los otros tratamiento como los trasplantes (Raskin, 1981, Matas et al., 1976), la prevención inmunológica (Solano, 1979, Cahill, 1981) y la manipulación genética (Cahill, 1981) son más remotos. De cualquier modo, de tener éxito, influenciarían decisivamente el papel que actualmente desempeña la insulina en el tratamiento de la diabetes.

2.3 Producción de insulina humana

En gran medida, los esfuerzos tendientes a mejorar el tratamiento de la diabetes se han encaminado a dos objetivos principales: a la producción de insulinas cada vez más puras y a la obtención de insulina idéntica a la humana. Esta insulina, denominada en lo sucesivo insulina humana, puede ser obtenida fundamentalmente por medio de cuatro procedimientos: a) extracción del páncreas de cadáveres humanos, b) síntesis química total, c) conversión enzimática de la insulina de cerdo y d) síntesis bacteriana mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

Los dos primeros métodos tienen grandes limitaciones. La disponibilidad de la materia prima en el primer caso, y el bajo rendimiento, en el segundo, conducen a procesos no viables para la producción de insulina de uso generalizado (Skyler, 1982b, Grodsky, 1970, Klostermeyer & Humbel, 1966).

El tercer método consiste en transformar la insulina de cerdo en insulina humana. Puesto que la insulina porcina difiere en un solo aminoácido respecto a la humana (el aminoácido 30 de la cadena B es treonina en la humana y alanina en la porcina), es posible por métodos enzimáticos sustituir la alanina por la treonina. El resultado de lo anterior es una insulina humana "semisintética". La parte fundamental del proceso es la reacción de transpeptidación con tripsina en mezclas de solventes orgánicos en agua. Este método ha sido desarrollado a nivel industrial por la compañía danesa NOVO (Markussen et al., 1983). Este producto se ha sometido a numerosas pruebas clínicas (Karam & Etwiler, 1983) de las

que se ha concluido que esta insulina tiene un comportamiento casi idéntico a la insulina porcina monocomponente y que los pacientes pueden usar -- o cambiar indistintamente estas insulinas sin precauciones especiales - (Etzwiller, 193, Karam, 1983). Sin embargo, la insulina humana parece absorberse más rápidamente y se ha reportado una menor inmunogenicidad -- (Scherthaner et al., 1983) respecto a la porcina monocomponente. En la actualidad, este tipo de insulina se encuentra disponible comercialmente en el mercado europeo (Karam, 1983).

El último método, la síntesis bacteriana de insulina humana - mediante ADN recombinante, tiene una ventaja fundamental respecto al de - la conversión enzimática de insulina porcina. En este caso no se depende de las vísceras animales. El suministro de vísceras animales cambia en - función de la demanda de carne y no tiene relación respecto a las necesidades de los diabéticos (Johnson, 1983) y es posible que se presente una deficiencia en las fuentes naturales de insulina en vista del elevado cre - cimiento de la población diabética (Anónimo, 1978, Anónimo, 1980v). En la Figura 2.31. se ilustra de manera general, la estrategia para la obtención de insulina humana empleando técnicas de recombinación de ADN. En la sec - ción 2.4 se revisarán con más detalle los aspectos técnicos del proceso.

La expresión de insulina humana a partir de ADN recombinante se anunció en septiembre de 1978. El proyecto fue desarrollado en los - Estados Unidos, gracias a un contrato de la compañía Genentech, Inc. con el "National Medical Center (City of Hope)" de California. Una vez demostrada la factibilidad técnica, Genentech hizo un contrato con la compañía Eli -

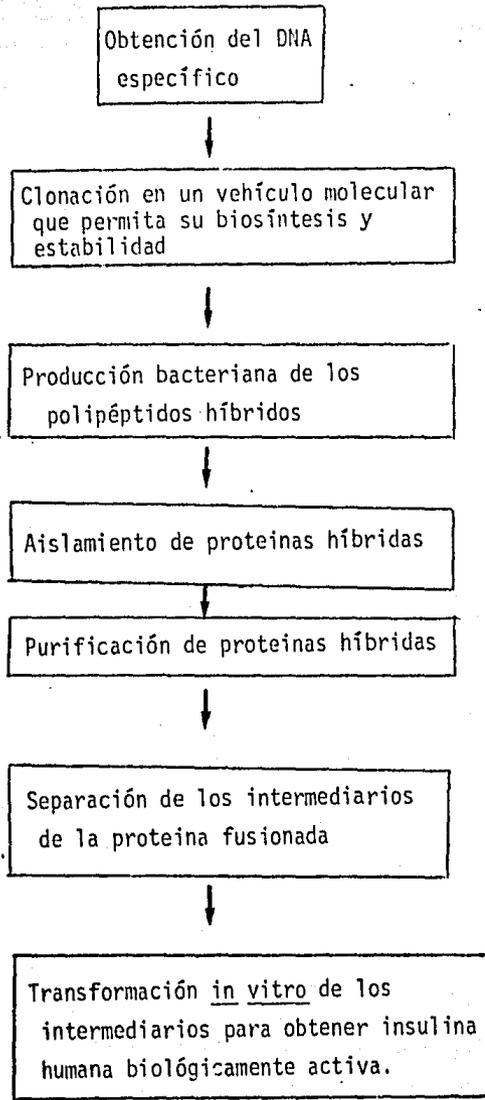


FIGURA 2.3.1 Esquema general para la obtención de insulina humana empleando técnicas de Ingeniería Genética.

Lilly, Inc. de Indianápolis, (U.S.A.) para hacer el escalamiento y desarrollo del proceso. En Junio de 1979 Lilly solicitó al "Recombinant DNA -- Advisory Committee (RAC)" el hacer pruebas en volúmenes mayores a 10 litros (en vista de que la regulación Norteamericana fijaba tal volumen como límite máximo para la experimentación con ADN recombinante); en Diciembre -- del mismo año la solicitud fue aprobada. Un mes después, se autorizó a Lilly llevar a cabo cultivos en tanques de 150 litros. En 1980, se logró permiso para extender el volumen de fermentación hasta tanques de 200 litros, en Julio de ese año se iniciaron las pruebas clínicas con la insulina humana en Inglaterra y poco después en Alemania Occidental, Grecia y U.S.A. En mayo de 1982 se solicitó la aprobación de la "Food and Drug -- Administration (FDA)" de U.S.A., la cual autorizó la venta de insulina humana en Octubre del mismo año, solo 5 meses después, un tiempo record -- para los productos farmacéuticos (Anónimo 1982).

A finales de 1982 se inició la construcción de plantas industriales especialmente diseñadas para la producción bacteriana de insulina tanto en Indianapolis (U.S.A.) como en Liverpool (GB) con una inversión superior a los 40 millones de dólares. Actualmente la insulina humana ha sido aprobada en muchos países. (Johnson, 1983).

La insulina obtenida por este método es química y físicamente equivalente a la insulina humana pancreática y biológicamente equivalente en varios sistemas bioquímicos y animales a la insulina humana natural y a la insulina porcina purificada (Chance et al., 1981b).

Este producto ha sido objeto de numerosas pruebas clínicas -- (Keen et al., 1980, Baker et al., 1981, Skyler & Raptis, 1981, Skyler, --

1982) las cuales concluyeron que no existen diferencias sustanciales en el tratamiento de diabéticos entre la insulina humana y la porcina purificada y que pueden ser intercambiadas sin ninguna precaución adicional. Aparentemente, las probables diferencias radican en una absorción más rápida y la presencia de inmunogenicidad ligeramente menor, respecto a la insulina porcina monocomponente. A manera de resumen se puede afirmar que la insulina humana producida por recombinación de ácidos nucleicos es segura y efectiva en el control de la diabetes mellitus y asegura una disponibilidad ilimitada de esta hormona en el futuro.

2.4 Insulina humana a partir de ADN recombinante

En la sección anterior se han descrito de manera general los procedimientos posibles para la producción de insulina humana, entre ellos el de la biosíntesis bacteriana mediante el uso de ADN recombinante. Se revisaron brevemente las características de autenticidad y de pureza de la insulina humana, sus propiedades, la historia y estado actual de la tecnología, así como los resultados de pruebas clínicas. En esta sección se discutirán con más detalle las estrategias y el desarrollo de los aspectos técnicos esenciales del proceso tanto de lo reportado en la literatura como de lo desarrollado en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

La primera experiencia en la producción de insulina por bacterias fue reportada por Ulrich, et al., (1977) quienes prepararon ARNm de islotes de Langerhans de ratas y posteriormente sintetizaron ADN de doble cadena complementario a tal ARNm usando transcriptasa reversa. En la Fi-

gura 2.4.1. se ilustra la estrategia general utilizada. El ARN se obtuvo de islotes pancreáticos de rata los cuales contienen ARNm que codifica -- para insulina. Este ARNm se encuentra poliadenilado (como sucede en la - mayoría de los organismos superiores) lo que permite su purificación por cromatografía de afinidad en oligo (dT)-celulosa. El ARN así purificado fue "copiado" a ADN complementario de cadena sencilla por medio de la -- enzima transcriptasa reversa. Después de la digestión del ARNm con álcali, el ADNc de cadena sencilla fue nuevamente transcrito reversamente para dar ADNc de doble cadena, este procedimiento genera una región de unión - de cadena sencilla que fue posteriormente digerido con la nucleasa S_1 (la cual digiere exclusivamente ADN de cadena sencilla). Con el fin de evitar posibles residuos de cadena sencilla que no hayan sido digeridos por la - enzima S_1 , el ADN se trata con ADN polimerasa para dar ADNc con extremos "rasurados". Con el fin de permitir la introducción de este fragmento de ADN en un vehículo molecular se agregan pequeños fragmentos de ADN denominados "linkers", que contienen secuencias específicas que reconoce la endonucleasa Eco RI. Estos "linkers" se sintetizaron químicamente y se unieron al fragmento de ADNc con la enzima ligasa. Finalmente el ADNc así obtenido se digiere con Eco RI para dar extremos cohesivos que permitan su - introducción en un plásmido.

El plásmido resultante fue introducido en una cepa de E. coli y se seleccionaron clonas que contenían el ADN recombinante. En el trabajo de Ullrich et al., (1977) se reportó también la secuencia nucleotídica de ADN recombinante y se demostró que contenía la región completa que codifica para el prepeptido y la secuencia completa que codifica para una --

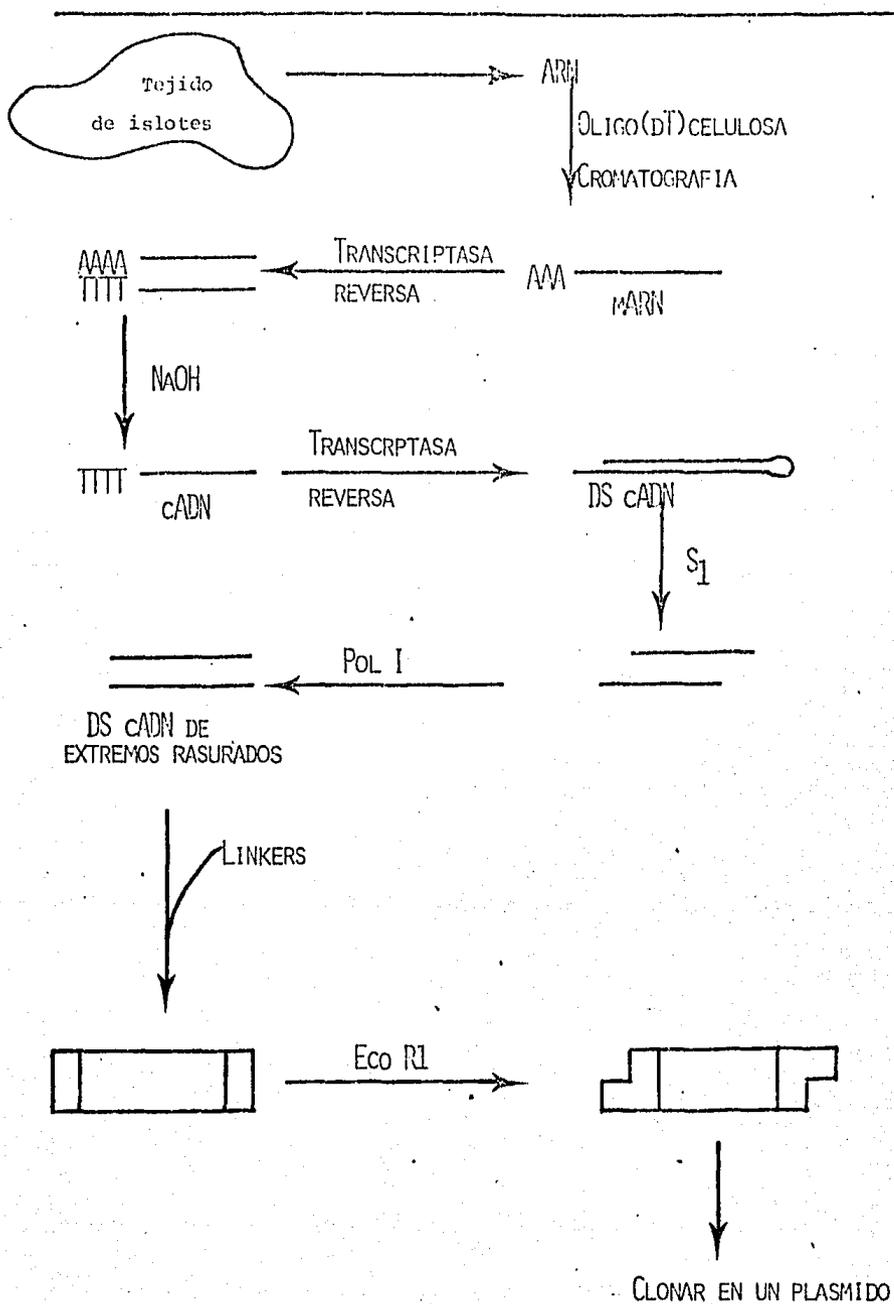


FIGURA 2.4.1. Estrategia general para la obtención de ADN específico mediante transcripción reversa, de acuerdo a Ullrich *et al* (1977).

región no traducible del ARNm en su extremo terminal 3'.

El siguiente paso fue reportado por Villa-Komaroff et al., (1978) quienes generaron clonas bacterianas que sintetizaban proinsulina. Estos investigadores partieron de un ARNm de insulinoma de rata y sintetizaron ADNc de forma similar al reportado por Ullrich et al., (1977) con ciertas modificaciones: en lugar de completar la síntesis de ADNc de doble cadena con ADN polimerasa e incluir sitios de restricción para Eco RI en los extremos terminales, agregaron fragmentos de poli-deoxicitosina de cadena sencilla a los extremos terminales 3' de un plásmido (pBR-322) que había sido linearizado tratándolo con la endonucleasa Pst I. La estrategia general se muestra en la Figura 2.4.2. Puesto que en el pBR-322 solo existe un sitio para Pst I, la digestión con esta enzima resulta en un -- plásmido lineal conteniendo pequeños extremos de cadena sencilla. Agregando residuos de poli-deoxiguanosina a la cadena 3' mediante el uso de la enzima transferasa terminal (que extiende los extremos 3' de ADN de cadena sencilla) se generan "tallos" de cadena sencilla en los extremos 3'. - De la misma forma, se agregan residuos de poli-oxicitosina a los extremos 3' del ADNc aislado del insulinoma. Una vez realizado lo anterior se mezclan ambos ADN y las terminales 3' de poli (G) y poli (C) hibridizan por apareamiento de bases y forman un plásmido circular recombinante. Los -- fragmentos dC y los dG son de aproximadamente 15-30 nucleótidos. Los cuales forman híbridos muy estables que no requieren el tratamiento con ligasa.

Con el plásmido así obtenido se transformaron células de -- E. coli y se seleccionaron clonas adecuadas por medio de radioinmunoensayo

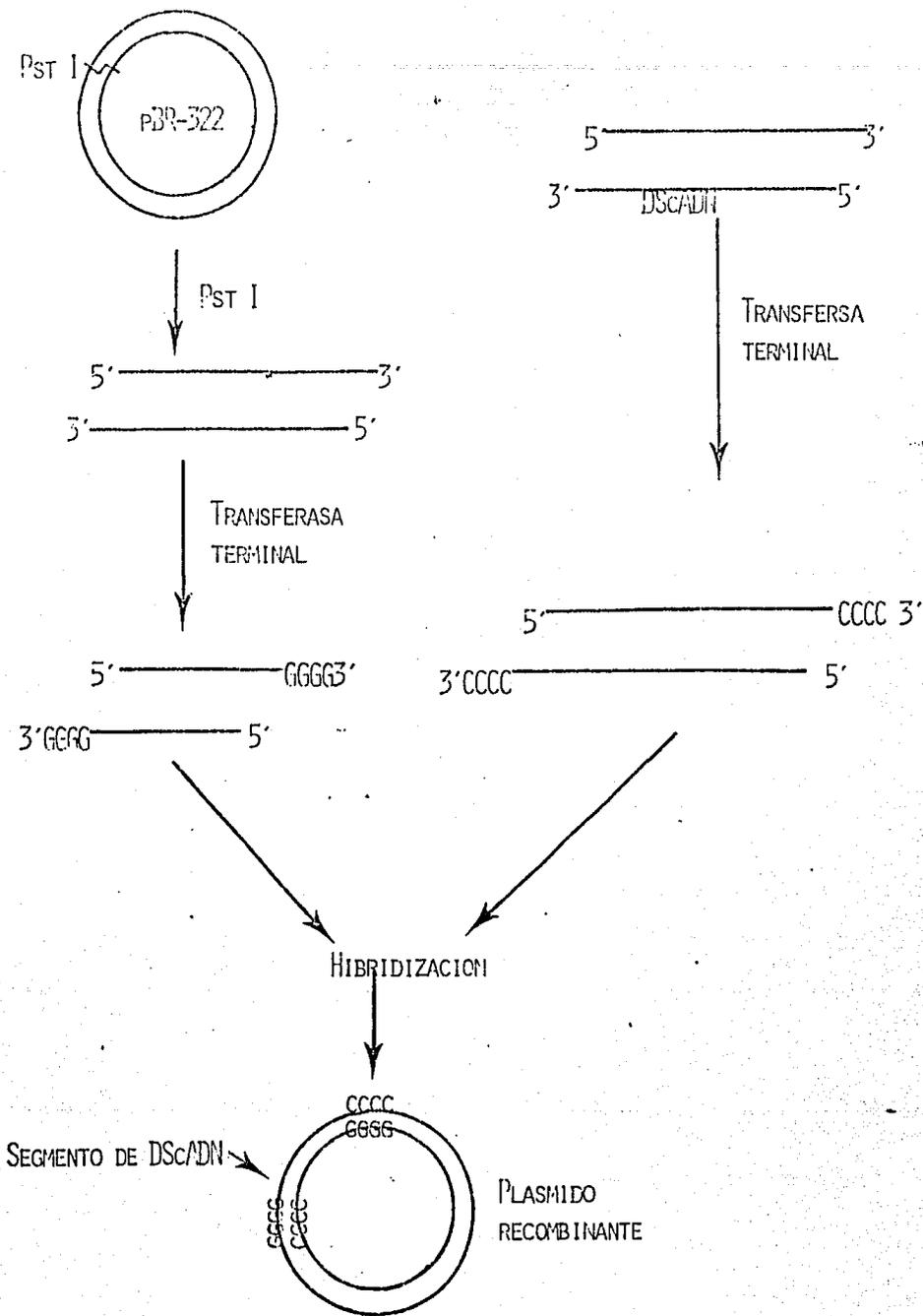


FIGURA 2.4.2 Clonación de ADN complementario mediante hibridación de fragmentos de ADN de cadena sencilla, de acuerdo a Villa-Komaroff et al (1978).

en fase sólida.

El sitio de Pst I en el plásmido pBR-322 se encuentra dentro del gene que codifica para β -lactamasa, la cual le confiere resistencia a la ampicilina a la cepa. La inserción del ADNc en tal gene resulta en la creación de genes fusionados que producen una proteína híbrida constituida por los primeros 182 aminoácidos de la β -lactamasa y el resto por los aminoácidos de la proinsulina. En el trabajo descrito no se logró la producción de insulina como tal, pero fue la primera demostración de que era factible la expresión de proteínas de mamíferos en bacterias. Por otra parte no se trataba de insulina humana sino de rata.

Con el fin de producir insulina humana, en varios laboratorios se ha seguido una estrategia similar a la de Ullrich et al. (1977) y de Villa Komaroff et al. (1978) utilizando insulinomas humanos (Miller & Baxter, 1980). Alternativamente a este procedimiento se encuentra el que involucra la síntesis química total de ADN específico. El primer esfuerzo exitoso de esta alternativa se logró con la hormona somatostatina (Itakura et al., 1977). Lo que demostró que un gene sintético puede ser diseñado a partir de una secuencia de aminoácidos conocida y ser propagado y expresado en bacterias aun a pesar que el gene sintético no contenga exactamente la misma secuencia nucleotídica encontrada en el gene natural.

En 1978, Crea et al. reportaron la síntesis química total de genes para las cadenas A y B de la insulina humana. En vista de que el código genético es degenerado, el diseño de los genes fue realizado bajo

las siguientes restricciones generales:

- a) Los codones se escogieron en función de aquellos que se conocen más apropiados para la expresión en E. coli.
- b) Puesto que la secuencia completa sería construída a partir de -- fragmentos que se sobreponen, los fragmentos se diseñaron a mane-- ra de eliminar uniones inter o intramoleculares no deseables.
- c) Se evitaron secuencias ricas en G-C (guanina-citosina) seguidas de regiones ricas en A-T (adenina-timina) puesto que se sabe que tales secuencias propician la terminación de la transcripción.
- d) En los extremos terminales se diseñó una secuencia que recono--- cieran enzimas de restricción para facilitar su inserción en un vehículo molecular.
- e) En el extremo 5' de cada gene se adicionó previo al sitio de la endonucleasa, un codón extra que codificara para metionina, para poder separar con un tratamiento con Bromuro de cianógeno el pro-- ducto de los genes de insulina que serán fusionados a la β -ga-- lactosidasa.

La síntesis de ADN se llevó a cabo por el método del fosfotri-- ester, el cual se esquematiza en la Figura 2.4.3. El proceso se inicia -- con nucleótidos, de los cuales se generan triester-trímeros protegidos -- como los señalados con los números 1 y 2 en la Figura. El trímero del -- tipo 2, con el grupo protector amisol-3' se convertirá en el extremo 3' del oligonucleótido. El trímero del tipo 1 es bifuncional y dependiendo del tratamiento (ácido o básico), podrá constituir tanto el extremo 5' o un componente de la secuencia interna. Debido a que los intermediarios -

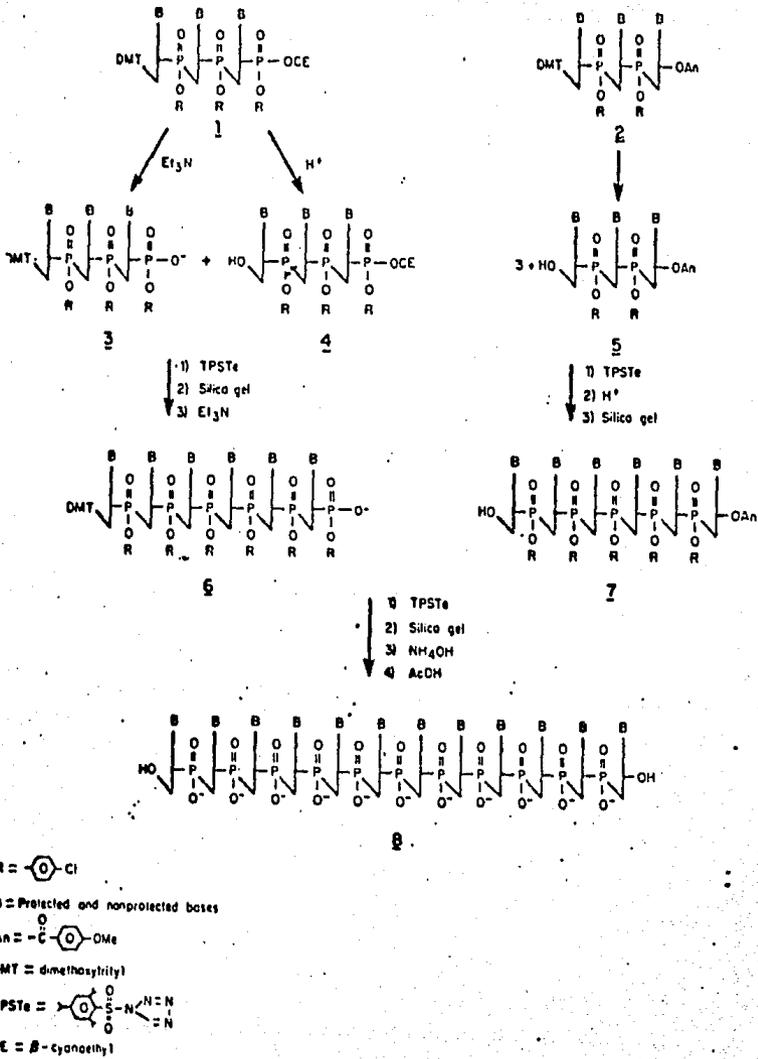


FIGURA 2.4.3 Esquema de la síntesis química de oligodeoxinucleótidos por el método mejorado del fofdotriester. De acuerdo a Crea et al (1978).

de síntesis, tales como los ilustrados con los números 3,4,5,6 y 7 de la -
figura, no son solubles en agua, todos los pasos de condensación y puri-
ficación se hacen en solventes orgánicos tales como cloroformo. Los trí-
meros pueden ser condensados para dar hexámeros (por ejemplo 3 + 4 da 6)
y los hexámeros pueden ser condensados para dar dodecámeros (6 + 7 da 8).
El siguiente paso en la síntesis es la remoción de los grupos protectivos.
Esto se logra mediante tratamientos con ácido acético y NH_4OH , generando
el fragmento deseado de ADN de cadena sencilla soluble en agua.

El paso final de la síntesis es una purificación de los frag-
mentos de ADN mediante cromatografía líquida de alta presión.

Una vez obtenidos los fragmentos de entre 10 y 15 pares de ba
ses y puesto que fueron diseñados para tener sobreposiciones complementa-
rias se unieron entre sí mediante la enzima ligasa. Los extremos terminal
es del gene se diseñaron para tener un sitio de Eco R1 en el extremo iz-
quierdo y uno de Bam H1 en el extremo derecho. En la Figura 2.4.4 se --
ilustra el diseño y forma de síntesis de los genes para Cadena A y Cadena
B de insulina humana.

Posteriormente, Goeddel et al. (1979) clonaron estos genes -
en el plásmido pBR-322 de acuerdo a la estrategia ilustrada en la Figura
2.4.5. El pBR-322 se digirió en las endonucleasas Eco R1 y Bam H1 lo que
permitió la inserción del gene sintético mediante la enzima ligasa T4. El
plásmido resultante se utilizó para transformar células de E. coli, se --
seleccionaron clonas adecuadas y se corroboró mediante la secuenciación -
nucleotídica. Posteriormente se aisló un fragmento del operón lac del --

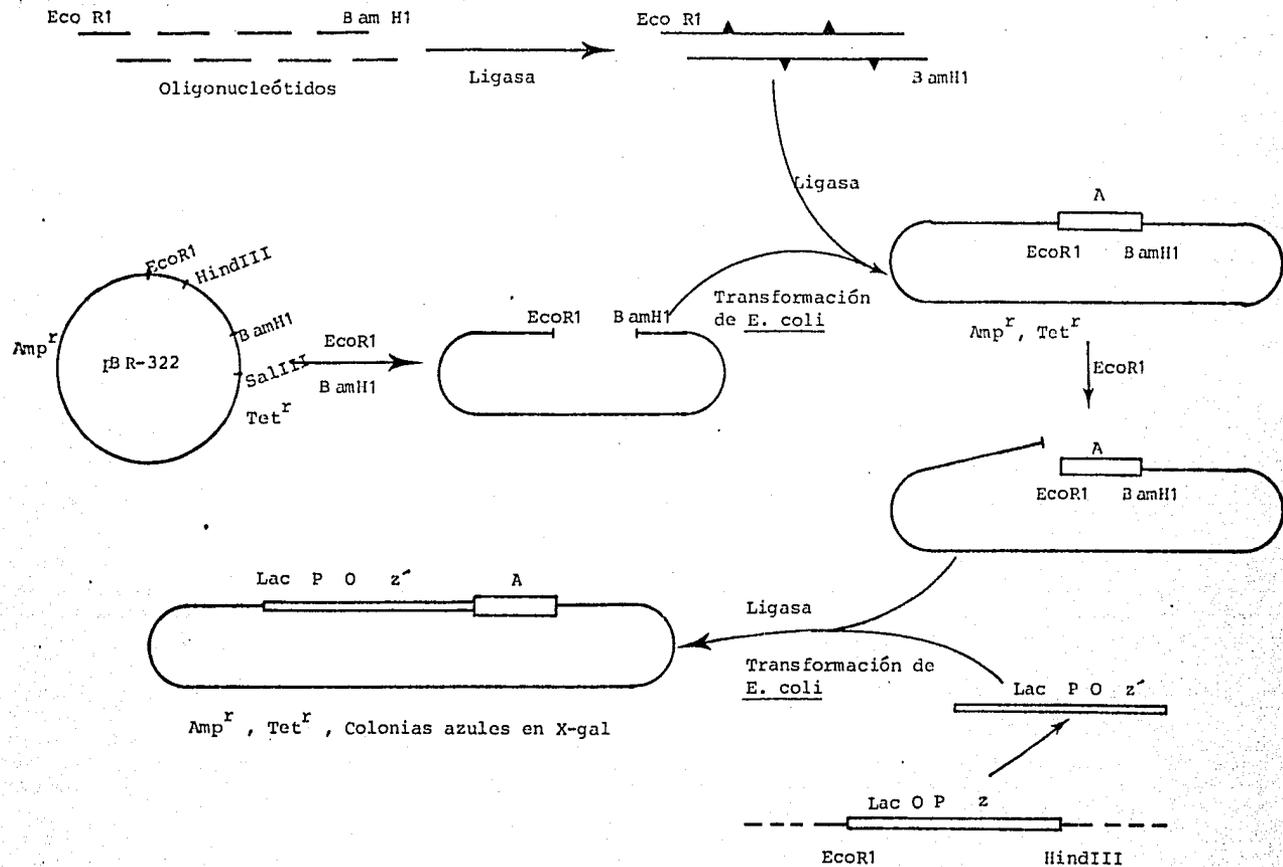


FIGURA 2.4.5 Estrategia general para la clonación de genes sintéticos de insulina humana fusionados a β-galactosidasa en el plásmido pBR-322.

genoma del fago λ que incluía el promotor, el operador y los primeros 1006 codones para β -galactosidasa incluidos entre dos sitios de Eco RI. Este fragmento se insertó en el plásmido conteniendo el gene de cadena A mediante su sitio de Eco RI y la enzima ligasa T4. El plásmido resultante se introdujo en células de E. coli y se seleccionaron clonas adecuadas, las cuales producían una proteína híbrida Cadena A- β -galactosidasa. Para la cadena B el procedimiento fue similar, solo que en este caso se clonaron separadamente fragmentos del gene con un sitio de unión reconocido por la enzima Hind III. El procedimiento general se detalla en la Figura 2.4.6.

El plásmido recombinante para la cadena A una vez establecida su correcta orientación fue introducido en una cepa de E. coli constitutiva para β -galactosidasa y cultivada en un medio rico. El plásmido recombinante para cadena B se introdujo en una cepa de E. coli con una mutación I^q (que sobreproduce represor lac) y se cultivó en un medio rico, para lograr la expresión el sistema se indujo con el galactósido IPTG.

La proteína híbrida resultante es insoluble y constituye aproximadamente el 20% de la proteína bacteriana total. La cadena de insulina tiene que ser posteriormente separada de la proteína a la que ha sido fusionada mediante tratamiento con Bromuro de Cianógeno en ácido fórmico al 70%. Las cadenas libres de insulina se convierten a sus derivados s-sulfonados para prevenir la formación prematura de puentes disulfuro y se purifican posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía líquida de alta presión de fase reversa. Una vez purificada, la cadena B-sulfonada se mezcla con un exceso de cade

na A-sulfonada purificada y se generan sulfihidrilos libres mediante reducción con mercaptoetanol. El exceso de mercaptoetanol se remueve por extracción con acetato de etilo, el pH se ajusta a 10.6 y la reasociación se logra mediante la oxidación con aire, la insulina resultante se detecta mediante radioinmunoensayo. El rendimiento de reasociación se encuentra entre el 10 y el 15%. En la Figura 2.4.7 se ilustra el procedimiento general de obtención de insulina humana por bacterias, haciendo énfasis en los procedimientos de purificación y reasociación.

Respecto al rendimiento de las cadenas, éste es de alrededor de 0.41 mg/g células húmedas, equivalente a 1 mg/litro de cultivo. La producción de proteína híbrida es cercana a 10^5 moléculas por célula. (Goedell et al., 1979). Estos rendimientos son cerca de 10 veces más altos que los encontrados para somatostatina (Itakura, et al., 1977).

El proyecto de insulina no concluyó con la publicación de la viabilidad técnica del proceso, fué necesario todavía una gran cantidad de trabajo para que la insulina humana se convirtiera en un agente clínico útil (Riggs, 1981). El escalamiento del proceso de cultivos de unos pocos litros a cientos de miles de litros, sin duda presentó problemas de desarrollo; sin embargo de acuerdo a Riggs, (1981) "no se encontraron dificultades mayores y a pesar de que el rendimiento necesita ser mejorado, los resultados actuales son satisfactorios, ya que Lilly invertirá 40 millones de dólares para la producción a gran escala de insulina humana por este método".

síntesis química de genes de insulina

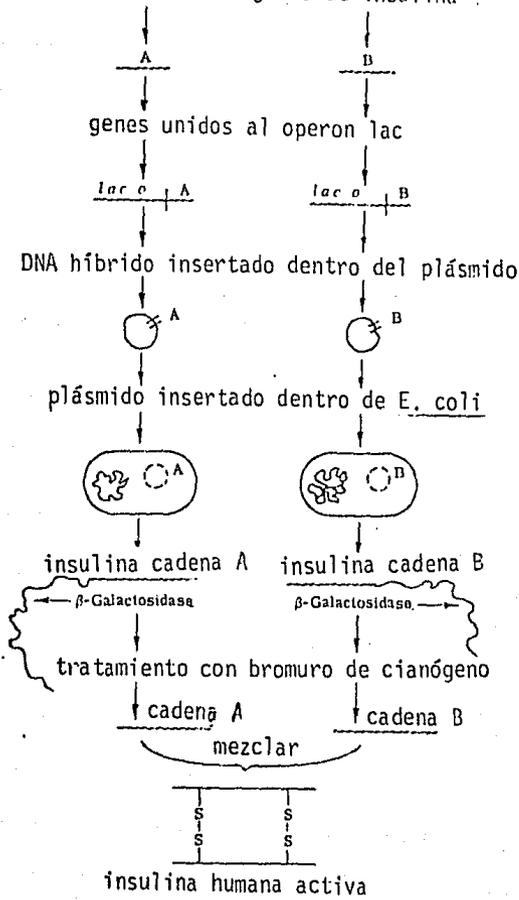


FIGURA 2.4.7 Estrategia general para la obtención de insulina humana por cultivo de bacterias recombinantes.

En la Tabla 2.4.1 se resume la historia de los principales acontecimientos del proyecto de insulina humana. Como es claro fué necesaria la experiencia en niveles intermedios a la planta industrial (150 y 2000 lts) con el fin de escalar el proceso al nivel de fermentador de 10,000 galones en la práctica industrial. Sin embargo, de acuerdo a Johnson (1983) los principales problemas en el escalamiento fueron aparentemente de carácter legal, en vista de la legislación vigente en Estados Unidos respecto al ADN recombinante. Fué necesario demostrar la seguridad de la Escherichia coli K-12; la confiabilidad del equipo de escala comercial principalmente en lo que se refiere al confinamiento de los cultivos; y en entrenar adecuadamente al personal respecto al proceso. En la literatura, como es más o menos obvio no se reportan las condiciones técnicas del escalamiento ya que ello forma parte fundamental de la tecnología.

En vista de los bajos rendimientos en la reasociación de las cadenas, una alternativa para producir insulina humana es mediante la inserción del gene de la proinsulina en plásmidos híbridos. La proteína híbrida así sintetizada se trata con bromuro de cianógeno para liberar a la proinsulina de la proteína a la que ha sido fusionada. A la proinsulina cruda se le somete a la sulfitólisis oxidativa para producir el derivado sulfonado. Después de un apropiado acomodamiento de la molécula mediante la formación de los puentes disulfuro adecuados, la proinsulina resultante se purifica por filtración en gel. El péptido C puede ser eliminado enzimáticamente mediante un tratamiento con tripsina o carboxipeptidasa B, lo que produce insulina biológicamente activa. (Johnson, -

TABLA 2.4.1

PRINCIPALES EVENTOS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO DE INSULINA HUMANA

Fecha	Evento
1977	Ullrich <u>et al</u> (1977) logran clonar un gene de insulina de rata en plásmidos.
1977	Itakura <u>et al</u> (1977) reportan por primera vez la expresión de genes sintetizados químicamente, de la hormona somatostatina.
1978	Villa-Komaroff <u>et al</u> (1978) logran clonas bacterianas que sintetizan proinsulina de rata.
1978	Crea <u>et al</u> (1978) sintetizan químicamente los genes que codifican para las cadenas A y B de insulina humana.
1978 (Septiembre)	Se logra la expresión de genes que sintetizan para cadenas de insulina humana en <u>E. coli</u> (Goedell <u>et al</u> , 1979)
1979 (Junio)	Lilly es autorizada para escalar el proceso hasta 150 lts.
1980	Se permite a Lilly escalar el proceso hasta 2,000 lts.
1980	Se publica la primera experiencia clínica con esta insulina humana (Keen, <u>et al.</u> , - 1980).
1982 (Mayo)	Se solicita la aprobación de la FDA
1982 (Octubre)	La FDA aprueba el producto de Lilly
1982 (Finales)	Lilly comienza la construcción de las plantas industriales en Indianapolis (U.S.A.) y Liverpool (U.K.).
1983	Lilly produce insulina humana en fermentadores de 10,000 galones.

1982). La insulina producida por esta vía tiene en el producto final un contenido de proinsulina elevado (11.3 ppm).

La producción de proinsulina puede lograrse a través de "plásmidos de expresión" en los que se inserta también la secuencia del pre-péptido, el cual dirige la excreción de la molécula de interés. Una ventaja adicional es que la proteína puede ser aislada más fácilmente y con menos posibilidad de contaminación con otros productos bacterianos en -- vista de que se localiza en el espacio periplásmico, disminuyendo también la posibilidad de la inestabilidad intracelular y permitiendo la expresión de proteínas sin necesidad de fusionarlas con proteínas bacterianas. Villa Komaroff et al. (1978) demostraron la síntesis y excreción de proinsulina de rata, como resultado de la fusión de los genes de proinsulina y pre-penicilinasa.

Posteriormente Talmadge et al., (1980a) demostraron que la secuencia para pre-proinsulina de rata dirige la secreción de un antígeno - de insulina en E. coli y el mismo año concluyeron que la bacteria es capaz de procesar correctamente las señales eucarióticas como la de la propia - bacteria por medio de una peptidasa bacteriana que genera proinsulina -- (Talmadge et al., 1980b).

Sin duda, un aspecto muy importante para maximizar la expresión de productos de genes recombinantes es la selección del promotor a partir del cual se inicia la transcripción. Mientras más fuerte sea el promotor mayor será la cantidad de ARNm que se forma y en consecuencia se sintetizará más proteína. Los promotores también tienen el efecto de incrementar

la relación del producto deseado a la proteína fusionada, esto es, que si los genes de las cadenas se fusionan a genes de proteínas pequeñas, la -- proporción de las cadenas en la proteína híbrida será mayor y en consecuen- cia se producirán mayor cantidad de cadenas por gramo de proteína híbrida.

Se ha demostrado por medio de microscopía electrónica de ba-- rrido y de transmisión (Williams et al., 1982) que la proteína híbrida, - que consiste en las cadenas A o B o bien proinsulina fusionadas al operón de triptofano, forma en la célula cuerpos de inclusión en forma granular. La cantidad de estos cuerpos de inclusión es proporcional a la cantidad -- de proteína híbrida formada por la célula. Al principio del cultivo estos gránulos se encuentran en menos del 1% de las células pero al final del -- mismo más del 90% de las células contienen cuerpos de inclusión y llegan a ocupar cerca del 20% del volumen celular. Por técnicas inmunocitoquímicas se ha demostrado que los cuerpos de inclusión están formados por la protef- na híbrida (Williams et al., 1981). Aparentemente la formación de estos - gránulos se debe exclusivamente a la naturaleza insoluble de la proteína - híbrida.

Los trabajos desarrollados en el Departamento de Biología Mo- lecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., - dentro del proyecto de producción insulina humana siguieron funda-- mentalmente estrategias similares a las reportadas por Crea et al., (1978) y Goeddel et al., (1979). La síntesis química de los genes fue llevada a cabo por el M. C. Xavier Soberón. El gene de cadena A se clonó en conjun- to con el operón lac del fago λ en el vehículo pBR-322 para dar el plásmi- do pBR-213. El gene de la cadena B fue clonado en el vehículo pBR-322 ge-

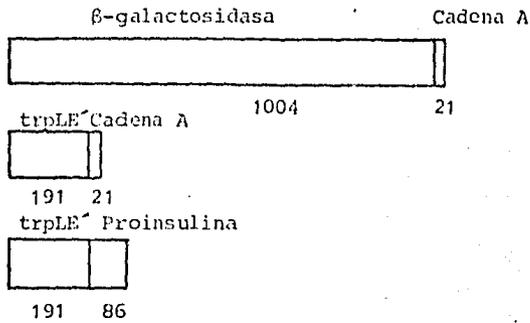


FIGURA 2.4.8 Comparación entre la relación que guarda el número de aminoácidos de las proteínas a las que se fusionan las secuencias de aminoácidos de la cadena A y proinsulina humanas.

TABLA 2.4.1

EFFECTO DE LA PRESENCIA DEL PLASMIDO pBR-213 EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE E. coli MX-614 EN DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO. Datos de Balbás (1981).

Medio de cultivo	Velocidad específica de crecimiento (μ) (hr^{-1})	
	Cepa MX-614	
	Con el pBR-213	Silvestre
Luria	0.43	0.57
Luria (glucosa)	0.64	0.96
M-9 (glucosa)	0.83	0.64
M-9 (glucosa-glicerol)	0.68	0.50
M-9 (glicerol)	0.51	0.67
MM (glucosa)	0.39	0.35
MM (glucosa-glicerol)	0.44	0.34

nerando el plásmido pBR-271. En la Figura 2.4.9 se resumen esquemáticamente los trabajos desarrollados a partir de los plásmidos pBR-213 y pBR-271 reportados por Balbás (1981).

El primer paso fue la secuenciación de los genes sintéticos para corroborar que la secuencia fuera la correcta. Esto se llevó a cabo por el método de Sanger et al. (1977) y se verificó que la secuencia -- era la correcta y correspondía a la reportada por Crea et al. (1978).

Posteriormente el plásmido pBR-213 se trató con Eco R1 y se purificó el fragmento que contiene el operón de lactosa, el cual se clonó en el pBR-271 previa digestión con Eco R1. Con los plásmidos resultantes se transformaron células de E. coli K-12 RR1 y se seleccionaron clonas en Xgal + ampicilina. Se encontró una sola colonia azul a la cual se le determinó la orientación de la inserción con la enzima Hind III y se encontró que era incorrecta. A este plásmido se le denominó pBR-274, el cual se purificó, se digirió nuevamente con Eco R1 y se trató posteriormente con ligasa. Al transformar células de E. coli se seleccionaron 20 colonias azules y mediante digestión con Hind III se encontraron 5 que estaban en posición correcta, este plásmido se le denominó pBR-275 y se le -- caracterizó con 5 combinaciones de enzimas de restricción para demostrar que efectivamente se tenía el plásmido adecuado.

Los plásmidos pBR-213 y pBR-275 fueron usados para transformar células de E. coli K-12 RR1, sin embargo posteriormente se sustituyó la -- cepa receptora por la E. coli MX-614 en vista de que ésta última no produce β -galactosidasa (que podría interferir en la medición de proteína hí--

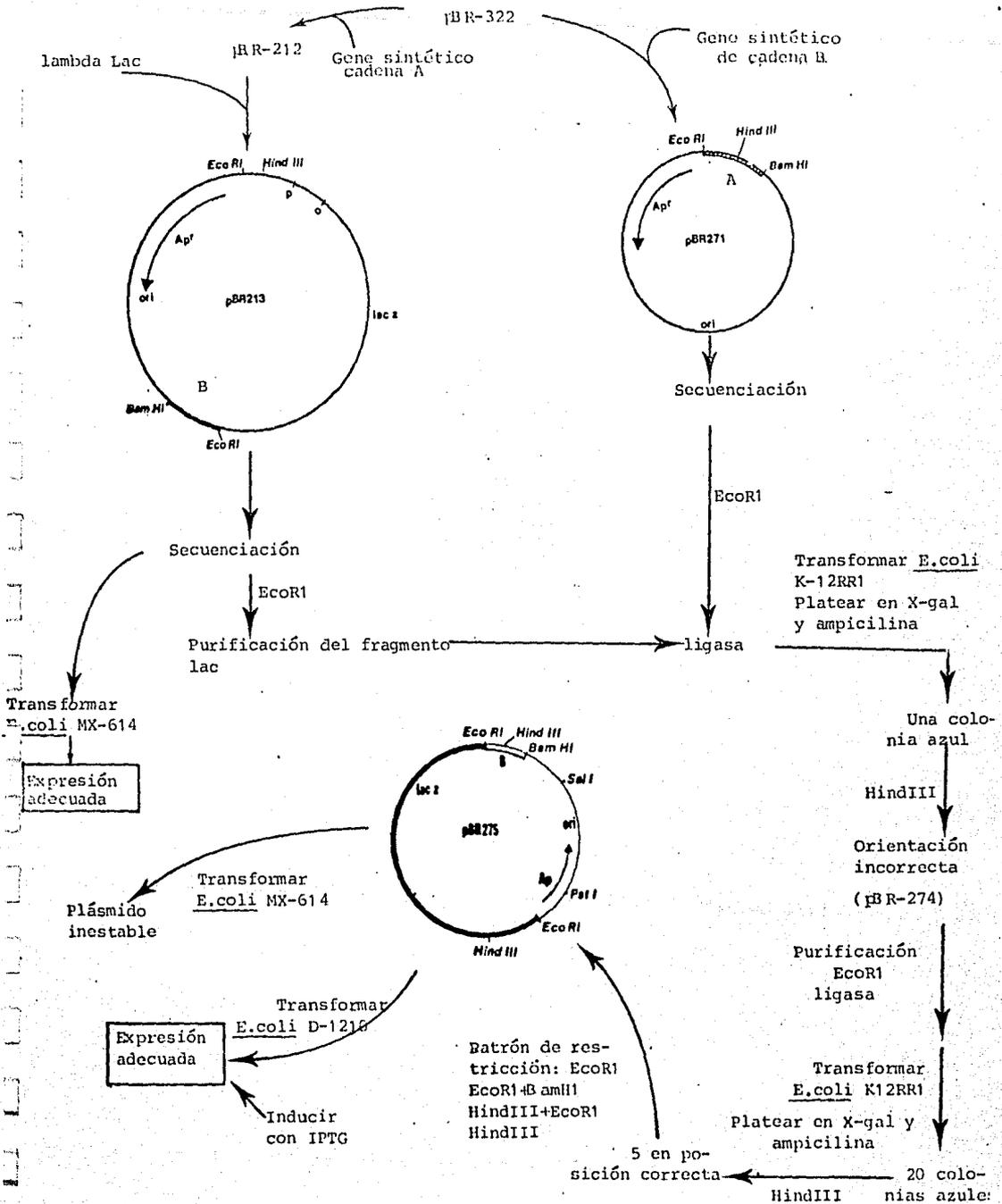


FIGURA 2.4.9 Resumen esquemático de los trabajos desarrollados en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con el fin de obtener plásmidos adecuados para la expresión de proteínas híbridas para cadena A y B de insulina humana. De acuerdo a Balbás (1981).

brida) y es constitutiva, ya que no produce represor lac. Sin embargo en el caso del pBR-275 no se logró una expresión adecuada en esta cepa ya -- que el plásmido resultó inestable durante el cultivo y sufre de lesiones, (Bolívar, 1983). Este problema se solucionó utilizando como cepa receptora E. coli D-1210 cuyas características principales es sobreproducir represor lac (I^q) y no tener capacidad elevada de recombinación de material genético ($RecA^-$). Sin embargo, esta cepa sintetiza β -galactosidasa nativa y necesita ser inducida. Con esta cepa el pBR-275 se mantenía estable y se determinó que el máximo de proteína híbrida se obtenía cuando el cultivo se inducía con el galactósido IPTG a una concentración entre 2 y 5 - mM y en la fase exponencial tardía del crecimiento de la bacteria,

La proteína híbrida β -galactosidasa-cadena B constituye aproximadamente al 12% de las proteínas totales de la bacteria determinada -- por densitometría de geles cuando es crecida en un medio rico. El porcentaje de la proteína híbrida respecto a las proteínas precipitables depende del tiempo de cosecha pero, entre 1 y 4 horas posteriores a la inducción este valor es cercano al 30%. La biosíntesis de proteína híbrida sucede aún en la fase estacionaria.

Los estudios reportados por Balbás (1981) respecto a las velocidades de crecimiento de cultivos en diferentes medios para la expresión de proteína híbrida cadena A (plásmido pBR-213) se resumen en la Tabla -- 2.4.1. En general puede decirse que en medios muy complejos, así como en aquellos conteniendo glicerol como única fuente de carbono la cepa silvestre crece más rápido que la transformada. Por el contrario, en medios más definidos y que contienen glucosa como única fuente de carbono, la cepa - transformada crece más rápido que la silvestre.

Con el fin de investigar la responsabilidad de la presencia - del plásmido en la alteración de la velocidad de crecimiento, se cultivó la cepa en ausencia de presión selectiva (ampicilina) con el fin de incrementar la segregación (pérdida del plásmido). En medios sin ampicilina - las velocidades de crecimiento tienden a igualar a la presentada por la - cepa silvestre, en el caso del medio Luria la μ se incrementa con la se-- gregación y con el medio M-9 la μ decrece. De acuerdo a Balbás (1981) - la segregación es cercana al 90% a las 4 horas de cultivo en ausencia de ampicilina. Sin embargo para tratar de definir de manera conclusiva si -- eran los plásmidos los responsables de incrementar la velocidad de creci-- miento, se transformó la cepa de E. coli RR1 con el pBR-213 y se observó que en este caso (en el medio M-9) la presencia del plásmido disminuía - la velocidad de crecimiento; en cambio la cepa MX-614 transformada con el plásmido pBR-322 si incrementa su velocidad de crecimiento respecto a la no transformada. Estos resultados llevaron a concluir que "no son los -- plásmidos pBR-213 y pBR-275 los responsables de aumentar la tasa específi-- ca de crecimiento de la cepa MX-614, sino mas bien es la cepa la que pre-- senta alguna característica (probablemente genética) por la cual la pre-- sencia de un plásmido (derivado del pBR-322) en su citoplasma es capaz de favorecer su velocidad de crecimiento" (Balbás, 1981 p. 93).

Respecto a la cinética de producción de proteína híbrida, -- Balbás (1981) reporta que la producción de proteína total es superior en la cepa transformada y se observa un marcado incremento en la síntesis de proteínas precipitables en esta última cepa aún en la fase estacionaria. La relación proteínas precipitables/proteínas totales es máxima en el me--

dio M-9 con un 14.4%. Con un análisis desintométrico de geles se encontró que la proteína híbrida constituye aproximadamente el 9% de las proteínas totales y el 28% de las proteínas precipitables. La productividad máxima respecto a proteína híbrida (medida como un porcentaje de las proteínas - precipitables) se logró con el medio M-9 en vista de que también presentó la velocidad específica mas alta entre los medios probados.

Aunque la mayor parte del trabajo se ha realizado con proteínas híbridas conteniendo β -galactosidasa, el grupo de Biología Molecular (Bolívar, 1983) ha logrado generar un nuevo sistema en el cual se fusionaron los genes que codifican para la cadena A y B a un fragmento de ADN que codifica para los 71 aminoácidos de la región amino terminal de la -- proteína transacetilasa de cloranfenicol y que se encuentra bajo el con-- trol del operón de triptofano, que es mas eficiente que el del operón lac. Por otra parte elimina la necesidad del IPTG y produce una proteína híbrida soluble que requiere menores cantidades de Bromuro de cianógeno para - separarla de la proteína de la que fué fusionada. Estas proteínas híbridas serán solo de 95 y 106 aminoácidos para las cadenas A (plásmido pBR-730) y B (plásmido pBR-731) respectivamente.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Global:

Establecer las condiciones de producción de proteína híbridas β -galactosidasa- Cadena A y β -galactosidasa - Cadena B de insulina humana a nivel de laboratorio, que permitieran su posterior escalamiento.

Particulares:

- a) Establecimiento de las condiciones de almacenamiento de las cepas y desarrollo de los inóculos.
- b) Estudio de los efectos de variables fisicoquímicas en la producción de proteína híbrida
- c) Caracterización cinética de los cultivos productores de proteína híbrida.
- d) Establecimiento de las condiciones que maximizaran la producción específica de proteína híbrida.
- e) Diseño de medios de cultivo a base de materias primas industriales y su optimización estadística.
- f) Escalamiento inicial a fermentadores de 2 y 14 litros.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1. Reactivos

En el desarrollo experimental se usaron los reactivos que se detallan a continuación en orden alfabético y con su respectiva procedencia:

Acido aspártico (Merck)

Acido glutámico (Merck)

Alanina (Merck)

Acido etilendiamino tetracético, EDTA (Sigma)

Acrilamida (Bio-Rad)

Acido acético (J.T. Baker)

Acido tricloroacético (J.T. Baker)

Ampicilina (Quinonas S.A., Binotal, Bayer)

Antrona (Merck)

Acido sulfúrico (J.T. Baker)

Almidón (J.T. Baker)

Albúmina (Bovina, Sigma)

Alcohol etílico (J.T. Baker)

Azul de Bromofenol (Bio-Rad)

Azul de Coomasic (Bio-Rad)

Bactoagar (Difco)

Bis-acrilamida (Bio-Rad)
 β -galactosidasa (Sigma)
 β -mercaptoetanol (Bio-Rad)
Casaminoácidos (Difco)
Carbonato de sodio (J.T. Baker)
Cloruro de sodio (J.T. Baker)
Dextrosa (J.T. Baker)
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad)
Extracto de levadura (Difco)
Extracto de carne (Difco)
Folin-Ciocalteu, solución (Sigma)
Fosfato dibásico de sodio (J.T. Baker)
Fosfato monobásico de potasio (J.T. Baker)
Glicina (J.T. Baker)
Glicerol (J.T. Baker)
Galactosa (Sigma)
Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
Hidróxido de potasio (J.T. Baker)
Hidroximetilaminometano (Tris Base), (Sigma)
Iodo (Baker)
Isopropil- β -tio-galactopiranosá, IPTG (Sigma)
Lactosa (Merck)
Leucina (Merck)
Metanol (J.T. Baker)
Melibiosa (Sigma)
Membrana Millipore 0.45 μ m

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Temed), (Sigma)

Persulfato de amonio (Bio-Rad)

Papel filtro (Whatman)

Peptona de caseína (Bioxon)

Peptona industrial, "Peptamin C", (Glucosa, S.A.)

Sulfato de cobre (J.T. Baker)

Sacarosa (J.T. Baker)

Sacarosa industrial, azúcar refinada (UNPASA)

Sulfato de magnesio (J.T. Baker)

Tartrato de Sodio y Potasio (J.T. Baker)

Triptona (Difco)

4.1.2. Equipos

Colorímetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb)

Espectrofotómetro (Beckman, modelo 351)

Potenciómetro (Corning)

Sonicador (Soniprep modelo 150)

Centrífuga clínica 5000 rpm (Sol-bat)

Fermentador 14 lts. (New-Brunswick)

Fermentador, 2 lts. (New-Brunswick)

Fuente de poder (ISCO, Modelo 493)

Agitadora para matraces New-Brunswick (modelo G-24)

Controlador de pH (Centro de Instrumentos, UNAM)

Medidor de oxígeno disuelto (Centro de Instrumentos, UNAM)

Ultracentrífuga (Sorvall)

Densitómetro

4.1.3. Cepas

Escherichia coli K-12: MX-614 (Pro⁻, Ile⁻, Val⁻, V_{B1}⁻, Δlac (I⁻, P⁻) transformada con el plásmido pBR-213, proporcionada por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se utilizó también la cepa sin transformar.

Escherichia coli K-12, D-1210 lac⁺ (i^{q+} z⁺ y⁺), transformada con el plásmido pBR-275, proporcionada por el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Sarcina lutea ATCC 9341, la cual se empleó para la determinación microbiológica de ampicilina.

Todas las cepas fueron conservadas en glicerol a -15°C.

4.2 Métodos

4.2.1. Medios de cultivo

Medio M-9	g/l
Peptona	15
Na ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	3
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄	0.246
CaCl ₂	0.011
Isoleucina	0.2
Valina	0.2
Prolina	0.2

Medio M-9	g/l
Vitamina B ₁	0.2
Glucosa	4
Ampicilina	0.1

Este medio se armaba a partir de soluciones concentradas estándares de acuerdo a lo establecido por Balbás (1981, p.34) y el pH final se ajustaba a 7 con solución de NaOH.

Medio Luria	g/l
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
NaOH (2.5 N)	1 ml
pH	7
Agar	20

Medio Mínimo	g/l
Glucosa	2
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄	0.25
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	.3
NaCl	0.5
pH = 7	

Medio ML.	g/l
Peptona Industrial	3.5
Sacarosa industrial	6
KH_2PO_4	5
NH_4Cl	1
Na_2HPO_4	5
pH = 7	

Medio M-B	
Peptona Industrial	5
Sacarosa industrial	4
KH_2PO_4	3
Na_2HPO_4	7
pH = 7	

La composición de otros medios experimentales se describe en el texto: En todos los casos la esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C (21 libras de presión) durante 20 minutos y los azúcares - siempre fueron esterilizados por separado. A menos que señale lo contrario, se utilizó agua destilada para disolver los componentes de los medios de cultivo. El pH se ajustó a 7.2 antes de la esterilización con lo que se lograba en general un pH final de 7.0.

4.2.2. Técnicas de medición.

4.2.2.1. Proteína (método de Lowry, Lowry et al., 1951), de la manera -- descrita por Bautista (1983) p. 62.

4.2.2.2. Proteínas totales en células

Las proteínas totales en células se determinaron resuspendiendo el pellet resultado de la centrifugación de 10 ml de caldo de cultivo en buffer de sonicación y lisando posteriormente la suspensión, de acuerdo a lo establecido por Balbas (1981) p. La proteína total se determinó por el método de Lowry tomando una alícuota del sonicado.

4.2.2.3. Proteínas precipitables y solubles

El sonicado descrito en la sección anterior se somete a una centrifugación a 10,000 rpm en una centrífuga Sorvall durante 10 minutos. Al sobrenadante se le determina proteína por el método de Lowry y constituyen las proteínas solubles. El pellet de centrifugación, una vez decantado se resuspende en amortiguador de sonicación, se agita fuertemente - la medición por Lowry constituye el contenido de proteína precipitables. La resuspensión del pellet en NaOH 1 M y Cloruro de Guanidina 6 M no re-- presentó ventajas en la reproducibilidad, por lo que siguió usando el -- amortiguador de sonicación para resuspender.

4.2.2.4. Determinación microbiológica de penicilina. Bicensayo. (Cole, -- 1969), de acuerdo a lo descrito por Bautista (1983) p. 63.

4.2.2.5. Actividad enzimática (Ross & O'Callaghan, 1975) y de acuerdo a lo establecido por Bautista (1983) p. 65. Puesto que el método empleado se tuvo que adaptar para la determinación de actividad enzimática en - células intactas, se revisaron algunos aspectos de la metodología que a - continuación se detallan:

Se determinó el tiempo al cual la técnica descrita en la literatura presentaba los valores más altos para lo cual se incubó una suspensión de células en fase exponencial tardía y se midió la decoloración del complejo Iodo-Almidón a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 25, 30 min) y se calculó a partir de las mediciones la actividad enzimática.

A la técnica descrita se le agregó un control conteniendo células sin actividad enzimática (esterilizadas a 120°C durante 15 minutos) y se midió la decoloración del control sustrato y del control células durante 30 minutos cada 5 minutos.

En la Figura 4.2.2.1. se presentan los resultados para la determinación de actividad enzimática en función del tiempo de incubación. Como se puede observar, la actividad es máxima cuando se emplean entre 10 y 15 minutos en la determinación. Inicialmente el tiempo de incubación empleado fué de 20 minutos y es posiblemente debido a ello que las mediciones resultaran un tanto erráticas y bajas. En lo sucesivo se empleó un tiempo de 10 minutos.

En la Tabla 4.2.2.1. se muestran los controles empleados en la determinación, así como la decoloración del control células y del control sustrato. La decoloración debida a las células siempre es menor que la ocasionada por el sustrato lo que indica que las células por si mismas no contribuyen apreciablemente en la decoloración y por lo tanto la técnica puede emplearse usando células intactas. De cualquier modo, se consideró el control de células de actividad para todas las determinaciones.

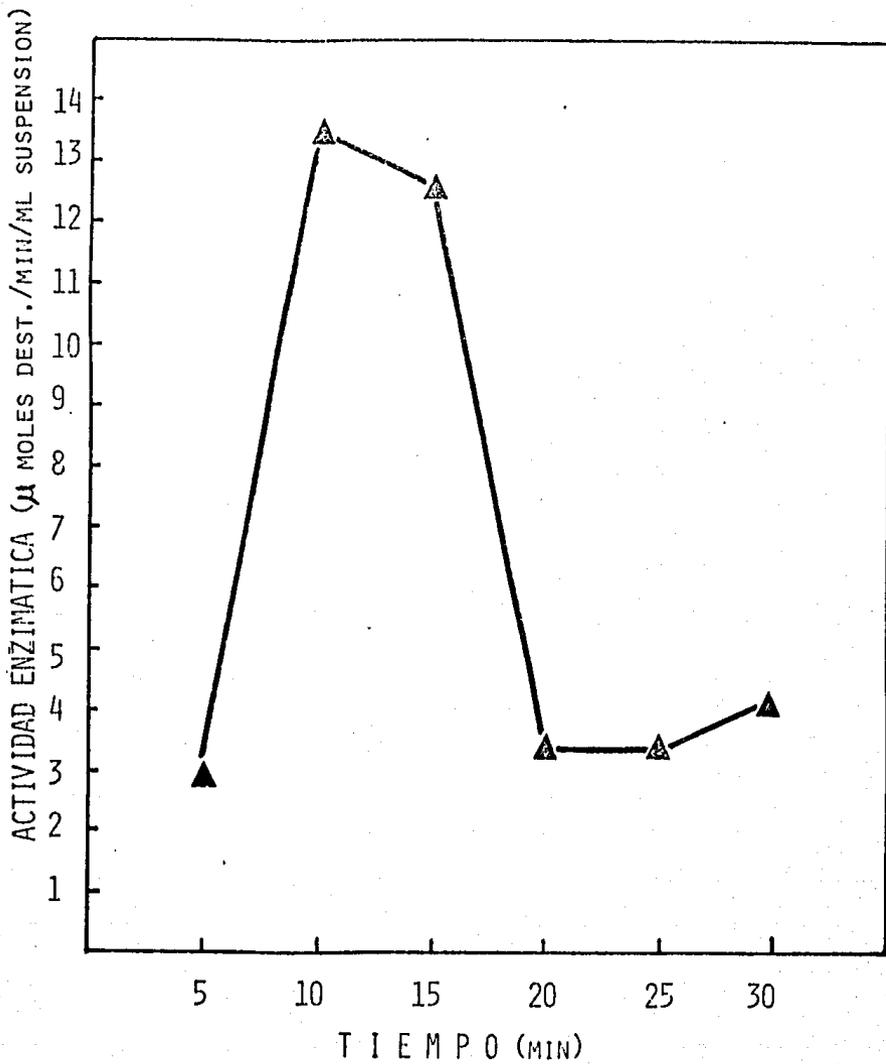


FIGURA 4.2.2.1 Efecto del tiempo de incubación de muestras de una suspensión de células de E. coli MX-614 pBR-213, en la actividad calculada de β -lactamasa. Las células provinieron de un cultivo en medio M9 en fase exponencial tardía. La técnica fué la descrita por Ross & Callaghan (1975) variando los tiempos de incubación. Los puntos corresponden al promedio de dos experimentos individuales.

TABLA 4.2.2.1

ESQUEMA DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE β -LACTAMASA.
 Contribución de las células sin actividad enzimática a la decoloración del complejo Iodo-almidón.

Adición (ml)	Control enzima	Control sustrato	Prueba	Control ^{a)} células
Iodo almidón	1	1	1	1
Sustrato	-	1	1	1
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M	1.9	1	0.9	0.9
Suspensión de células viables	0.1	-	0.1	-
Suspensión de células no viables	-	-	-	0.1

Tiempo de incubación (min)	A ₆₂₀	A ₆₂₀	Diferencia
5	0.718	0.728	0.010
10	0.695	0.720	0.025
15	0.630	0.700	0.070
20	0.578	0.640	0.062
25	0.570	0.640	0.070
30	0.540	0.580	0.040

a) El control células corresponde a una suspensión de células sin actividad enzimática (esterilizadas a 120°C durante 15 minutos)

4.2.2.6. Crecimiento celular

El crecimiento celular fué medido por densidad óptica a 565 nm en diluciones 1:10 con agua destilada, en un colorímetro Baush & Lomb -- (Spectronic 20) contra un blanco de agua destilada y corrigiendo por el color del medio de cultivo. Los valores DO se encuentran reportados en - las gráficas multiplicados por un factor de 10.

4.2.2.7. Azúcares totales

Se empleó la técnica de antrona, (Keleti & Leaderer, 1974), de acuerdo a lo descrito por Rodríguez (1983) p. 92. Las lecturas se relacionaron a curvas patrón de glucosa, sacarosa, lactosa, según sea el caso.

4.2.2.8. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, de acuerdo a lo establecido por Balbás (1981) . La preparación de muestras es -- como sigue: las muestras sonicadas se centrifugan para separar las protef nas precipitables de las solubles y cada fracción es cuantificada por el - método de Lowry. Las proteínas precipitables antes de ser cuantificadas - se resuspenden en solución amortiguadora de sonicación.

Una vez que se han obtenido los resultados del contenido de - proteínas, se efectúan los cálculos para conocer el volumen de muestra ne- cesarios para tener 30 µg de proteína en cada carril del gel. El volumen de muestra que resulta de estos cálculos se disuelve en 20 µl de solución desnaturizadora Mezcla Mágica (M.M), se agitan y se hierven durante 3 - minutos. Después de este tratamiento las muestras pueden procesarse in-- mediatamente o conservarse a -4°C.

Las muestras se colocan en los carriles de los geles y se añade solución amortiguadora de corrida, los geles entonces son colocados dentro de la cámara de corrida que previamente ha sido llenada con 1.5 litros de amortiguador de corrida y se aplica una corriente de 20 mA (corriente constante) hasta que las muestras pasan el primer gel, en este momento se cambia a 40 mA para que pasen al gel inferior. Una vez que los geles se han corrido, se fijan las proteínas con ácido tricloroacético al 50% durante 45 minutos, después de este tiempo se tiñen las proteínas con solución de Coomassie a 65°C por 20 minutos. Los geles se destiñen con ácido acético al 10%, el cual se cambia varias veces hasta que ya no sea posible extraer más colorante.

4.2.2.9. Cuantificación de proteína híbrida

La determinación cuantitativa de proteína híbrida solo se llevó a efecto en experimentos selectos. En el caso de la Cadena A, debido a la función objetivo seleccionada para la optimización (la velocidad de crecimiento) y en virtud de que se trataba de una expresión constitutiva de proteína híbrida, no se llevó a cabo la cuantificación. En el caso de la cadena B, la optimización tenía necesariamente como función objetivo la productividad en función de proteína híbrida ya que se trataba de un sistema inducible.

La detección de la proteína híbrida hasta el momento, se ha venido efectuando por medio de electroforesis, sin embargo esta técnica consume un tiempo considerable y en general es poco reproducible y precisa cuando se quiere cuantificar. Para el control del proceso de fermenta

ción es fundamental contar con técnicas de medición rápidas y precisas -- que permitan tomar decisiones en el transcurso del cultivo o bien llevar un seguimiento del proceso en todas sus etapas. Es por ello que se pensó en desarrollar un método alternativo indirecto y rápido para tal fin. Originalmente Balbás (1981), había reportado que la concentración de proteína precipitable en la cepa transformada se incrementaba fundamentalmente -- debido a la síntesis de proteína híbrida (Cadena A) y que al final de la fase estacionaria la proteína híbrida constituía el 28% de las precipitables. De esta manera era posible correlacionar un parámetro rápidamente medible (proteína precipitable) con la cantidad de proteína híbrida. La evolución de la proteína total, soluble y precipitable de la cepa transformada y la silvestre se ilustran en la Figura 4.2.2.2. En lo que se -- refiere a proteínas totales y solubles el comportamiento es muy similar -- al obtenido por Balbás (1981), en el caso de las proteínas precipitables el incremento de la cepa transformada no es tan pronunciado como el reportado. La cinética de producción de la proteína híbrida (Cadena A) se muestra en el gel (Figura 4.2.2.3.). De manera general se puede decir que no existe un notable incremento en la cantidad de proteína híbrida (Cadena A) en la fase estacionaria, lo que concuerda con la gráfica de proteínas precipitables por diferencia, al menos para los puntos con densidad óptica -- mayores a 0.33. Lo anterior permite sugerir que la producción de proteína híbrida se lleva a cabo fundamentalmente mientras la bacteria se en---cuentra creciendo. Aunque no se determinó cuantitativamente la densidad de las bandas en ese gel, es posible observar cualitativamente que los ni---veles bajos de proteína precipitables por diferencia corresponden a las -- bandas más delgadas, mientras que los valores altos coinciden con aquellos

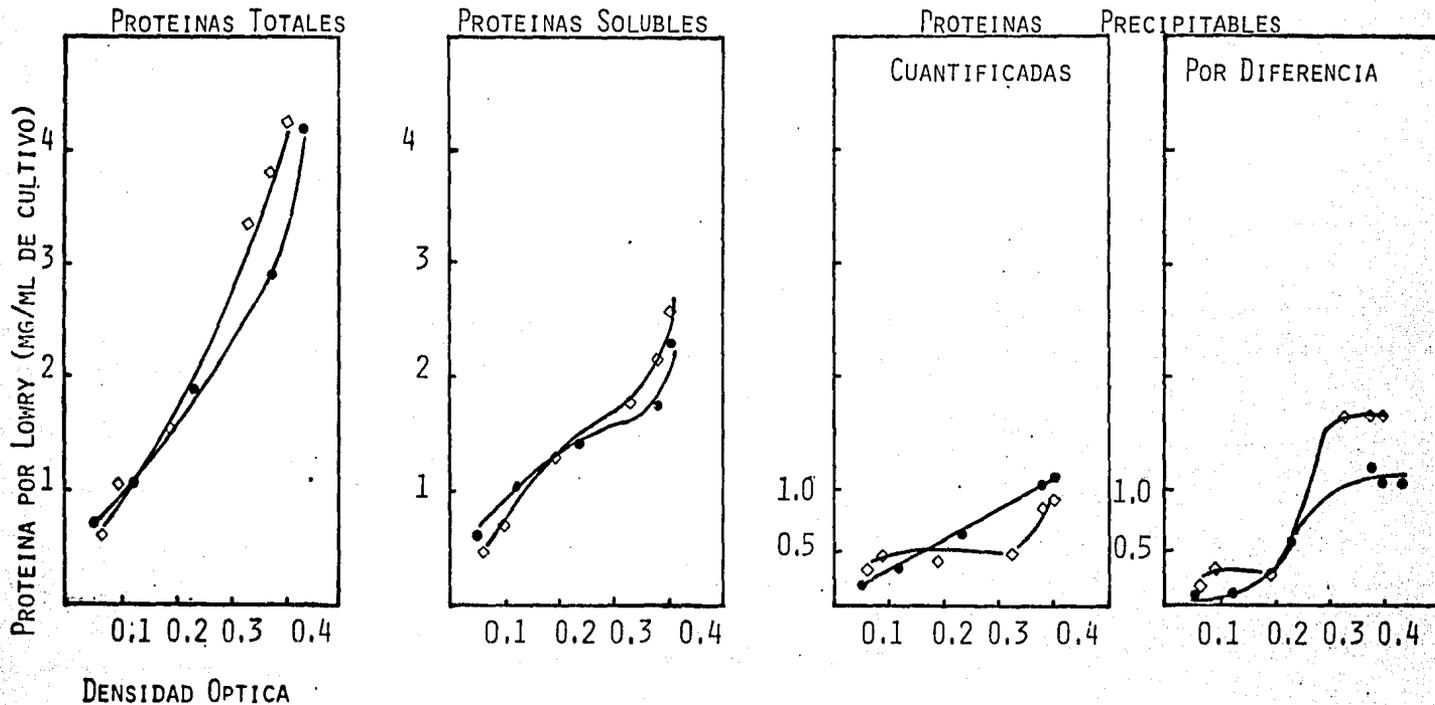
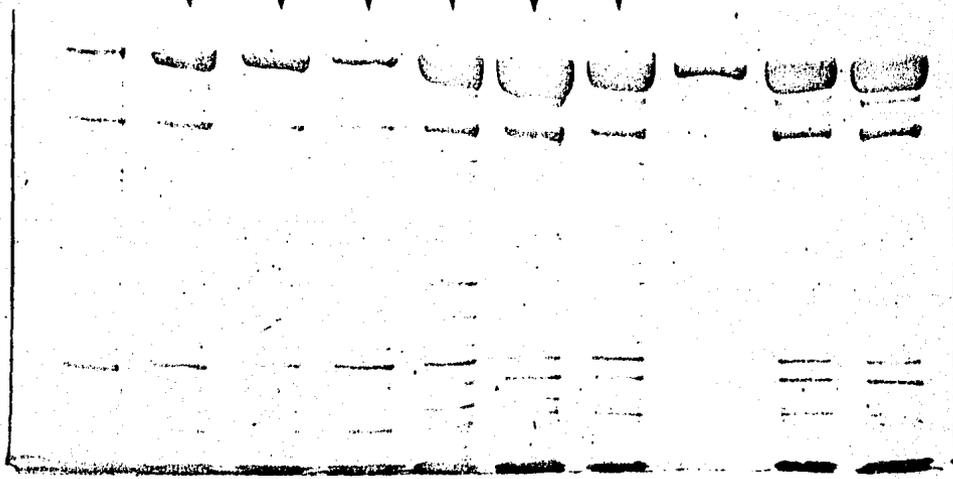
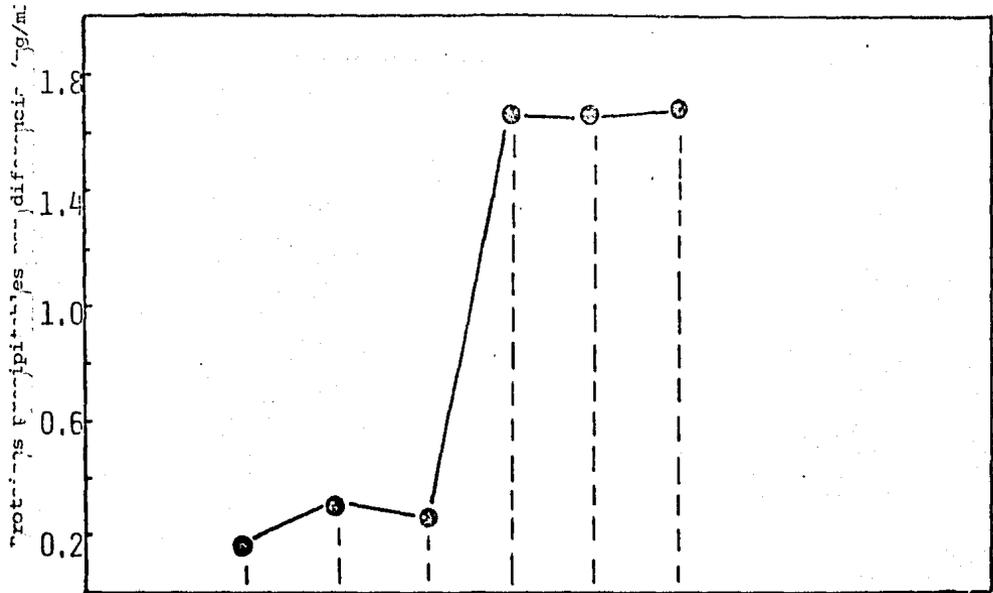


FIGURA 4.2.2.2 Perfiles de proteína de cultivos de *E. coli* MX-614 (●) y *E. coli* MX-614 pBR-213 (◇). Los cultivos se desarrollaron en medio M-9, la densidad óptica (dilución 1/10) indica el crecimiento del cultivo. Las proteínas totales corresponden a la determinación por Lowry del caldo de cultivo; las solubles constituyen el sobrenadante del cultivo sonificado; las precipitables cuantificadas corresponden el pellet resuspendido; las precipitables por diferencia - se calcularon como: proteínas totales - proteínas solubles.



Edad del cultivo (Hrs)	1	3	4	5	6	8	β -gal	13	24
D.O.	1.75	2.45	2.5	2.6	2.75	3.5		4.6	6.2

FIGURA 4.2.2.3 Relación entre la proteína precipitable por diferencia y la producción relativa de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* MX-614 pBR-275. El cultivo corresponde al descrito en la Figura 4.2.2.2. En todos los casos, en el gel se aplicaron - 30 μ g de proteínas precipitables. Se incluye un patrón de β -galactosidasa (10 μ g).

carriles donde la banda que comigra con β -galactosidasa es apreciablemente mayor y aunque seguramente existirá una variación en las proteínas includas en cada carril, el patrón del resto de proteínas sugiere que esta no es la causa de las diferencias tan notables en el grosor e intensidad de las bandas. Por lo que potencialmente en este caso la determinación de proteína precipitable puede ser una herramienta auxiliar indirecta, pero rápida, para el seguimiento de la producción de proteína híbrida (cadena A).

Para el caso de la proteína híbrida cadena B, este fenómeno no se reproduce. No parece existir relación entre las proteínas precipitables por diferencia y la cantidad de proteína híbrida.

En la optimización, la proteína híbrida se estimó mediante -- una "apreciación visual promedio" que consistió en lo siguiente: todas -- las condiciones de los métodos experimentales para la optimización se -- corrieron en un mismo gel, que una vez teñido y desteñido y con un fondo blanco, se sometió a la evaluación subjetiva de al menos 6 y a lo más 10 observadores. Para facilitar la evaluación, el experimento inducido con IPTG se le dió arbitrariamente el valor de 10 y en función de él se calificaron el resto de las bandas. Los resultados indicados en el texto son el promedio de las calificaciones individuales. Para el primer diseño -- experimental (Plakett-Burman) se llevó a cabo, paralelamente, densitome-- tría de la transparencia del gel. La integración manual (pico por pico) dió resultados totalmente erráticos y contradictorios a los patrones de -- β -galactosidasa introducidos. Esto puede ser debido a que al integrar de de esta manera, los resultados dependan en gran medida de la apreciación

personal del operador. Por ello, el área total del densitograma así como el área del pico de β -galactosidasa se evaluaron recortando el densitograma total y por triangulación el pico de β -galactosidasa, respectivamente y pesándolos. De esta manera los datos resultaron más congruentes con -- los testigos de β -galactosidasa y se encontró una desviación estandar respecto a la media del 21% en las proteínas totales. Este porcentaje de hecho representa la posibilidad media de error en una estimación que tiene como premisa que la cantidad de proteínas en los diferentes carriles del gel sea constante. En la Figura 4.2.2.4, se muestra la correlación entre los datos obtenidos por densitometría y la "apreciación visual promedio", los datos desintométricos se normalizaron tomando como base el experimento con IPTG al que se le dió arbitrariamente el valor de 10. Como se observa, existe cierta correlación lineal ($r = 0.92$) por lo que la apreciación visual refleja en cierta manera la producción específica de proteína híbrida y no por lo tanto se usó en el siguiente diseño experimental:

Cabe hacer notar que esta forma de evaluación solo es justificable como un mecanismo que permitió avanzar más rápidamente en las últimas etapas del desarrollo experimental. Sin duda, los resultados finales que arrojaron los experimentos de optimización deberán ser cuantificados de una manera más precisa. Sin embargo, aún la densitometría (lo que parece ser la alternativa más factible) presenta poca reproducibilidad en vista de que depende de una gran variedad de factores que van desde que el teñido y desteñido de los geles no es totalmente uniforme, la luz y el fondo utilizados para tomar la foto, las características del revelado que se reflejan finalmente en una calidad muy variable de los negativos sobre los que se hace la densitometría, etc.

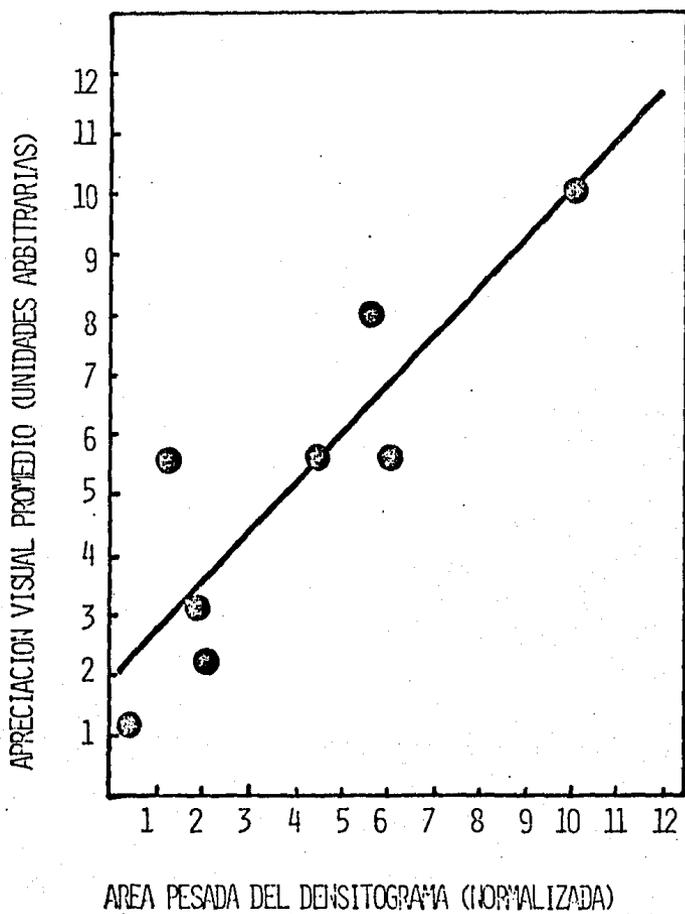


FIGURA 4.2.2.4 Correlación entre la estimación de proteína híbrida por densitometría y la determinada mediante una apreciación visual promedio. El gel que se analizó corresponde al incluido en la Figura 5.2.9.1. Los procedimientos se detallan en la sección 4.2.2.9.

Una forma alterna para cuantificar indirectamente la proteína híbrida podría ser midiendo otros productos codificados por el plásmido - pero que tengan actividad enzimática, tal como la β -lactamasa. Aunque -- sin duda los mecanismos regulatorios son diferentes para ambos genes y no se encuentran en la misma unidad de transcripción y de manera coordinada, la cuantificación de β -lactamasa (que es fácilmente medible) podría repre sentar una medida de la dosis de genes con que un cultivo se iniciara. -- (Nordstrom et al., 1972).

De cualquier forma, se midió la actividad específica de β -lac tamasa a lo largo de un cultivo para ver si existía cierta correlación en tre la producción de la enzima y la proteína híbrida (Cadena A).

La Figura 4.2.2.5 esquematizan los resultados de la actividad - de β -lactamasa versus la edad del cultivo, los cuales indican que la acti- vidad específica disminuye al aumentar el contenido celular, sin embargo, la actividad total tiene muy poco cambio, lo que apoya la idea de que la β -lactamasa solo se sintetiza en los primeros minutos del cultivo. Como es claro, no es posible establecer una relación entre la actividad especí- fica de β -lactamasa y cantidad de proteína híbrida durante el cultivo. -- Sin embargo, la actividad específica inicial (o bién la actividad total a lo largo del cultivo) puede ser un indicativo del número de copias del --- plásmido y probablemente del nivel de expresión final de la proteína híbri da. Este fenómeno ha sido reportado en la literatura (Nordstrom, et al., 1972) y en nuestro laboratorio (Bautista, 1983) trabajando con el plásmido pBR-327 se han encontrado niveles mas altos de actividad de lactamasa com- parados con los presentes en el pBR-215. Se sabe (F. Bolívar, comunicación

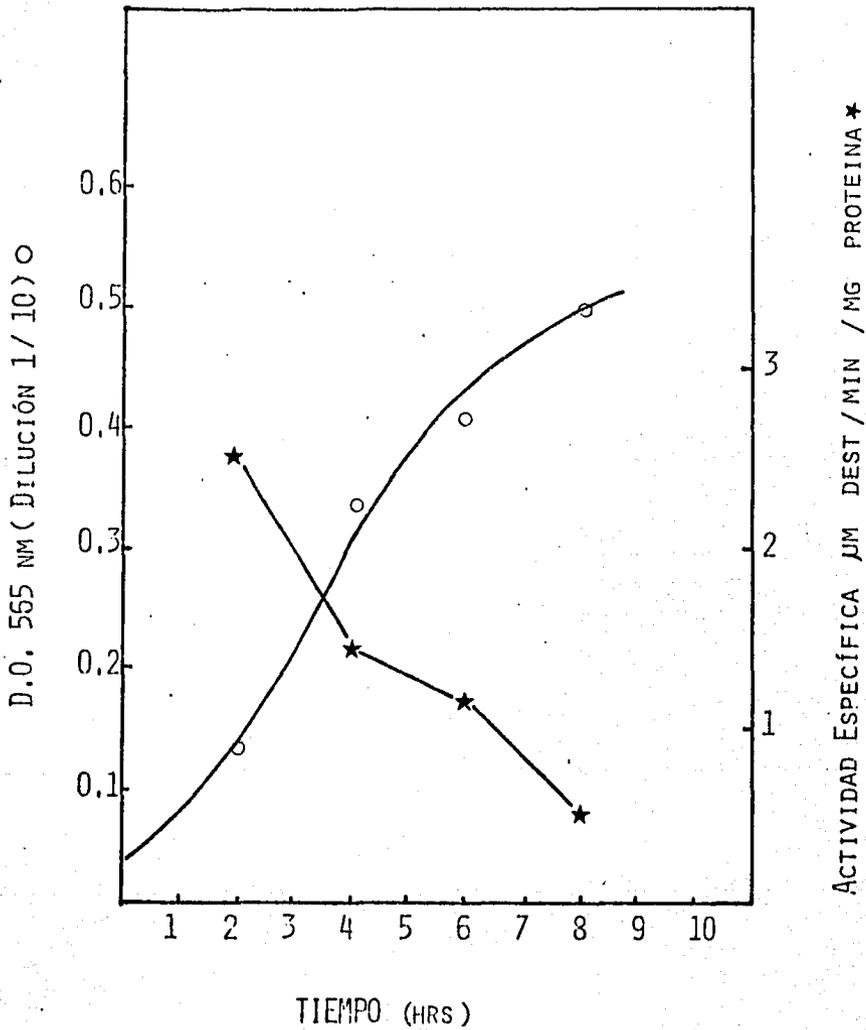


FIGURA 4.2.2.5 Actividad específica de β -lactamasa en función del tiempo de cultivo de *E. coli* MX-614 pBR-213. El medio de cultivo fué el M-9. La actividad de β -lactamasa se determinó de acuerdo a Ross & Callaham (1975), con las modificaciones descritas en la sección 4.2.2.5.

personal) que este último plásmido se encuentra en más alto número de copias que el pBR-215.

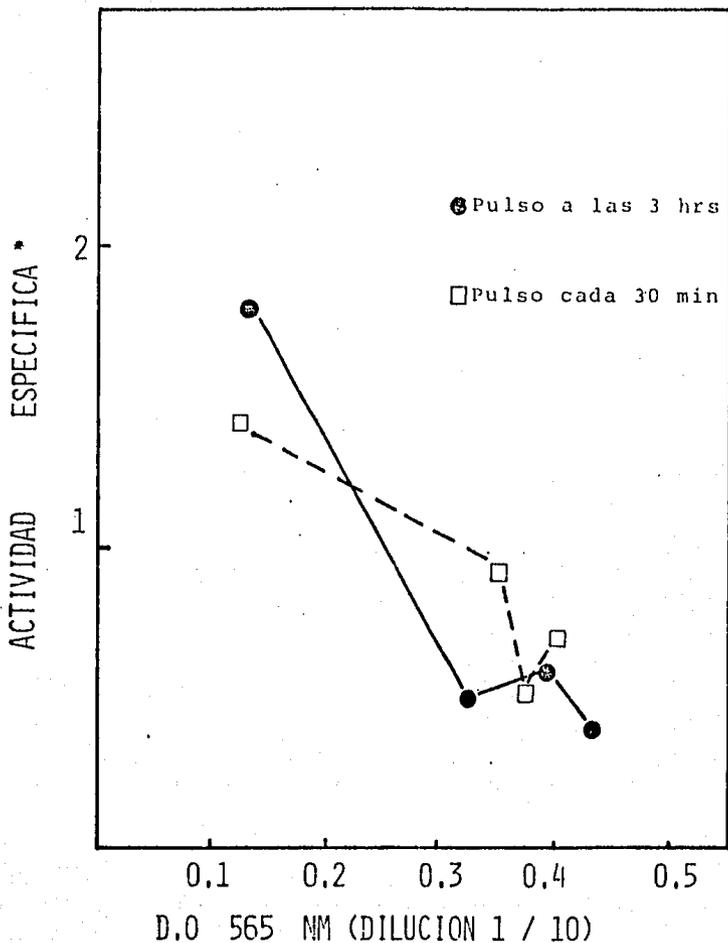
En vista de que la ampicilina solo permanece unos minutos en el cultivo, en virtud de ser degradada rápidamente por la β -lactamasa y con el fin de determinar si el patrón que presentaba la enzima ante adiciones periódicas de ampicilina era similar al presentado en la Figura 4.2.2.5., se llevó a cabo el ensayo y los resultados se muestran en la Figura 4.2.2.6. Aparentemente los patrones son similares y aunque existen pequeñas variaciones entre 0.3 y 0.4 de densidad óptica no parecen ser significativas puesto que se presentan en la misma magnitud en un experimento testigo.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir, que la actividad de β -lactamasa puede ser un indicador del número de copias del plásmido y probablemente de un nivel final de expresión. Sin embargo, si se emplea la actividad específica como criterio, se deberá señalar adecuadamente la edad del cultivo puesto que la actividad por mg de proteína depende de ello. Este método podrá ser útil cuando se desee comparar cepas con muy diferentes dosis de genes y como criterio global de "calidad" de la cepa que deba escalarse.

4.3. (A) Procedimientos experimentales (Cadena A)

4.3.1. (A) Condiciones generales de cultivo

Cuando no se indique lo contrario, las condiciones de cultivo fueron las siguientes: volumen de trabajo: 20% del volumen del matraz -



* μ moles destruidos / min / mg de proteína

FIGURA 4.2.2.6. Actividad específica de β -lactamasa en función del tiempo de cultivo de *E. coli* MX-614 pBR-213. Condiciones como en la Figura 4.2.2.5 excepto que al cultivo se le hicieron adiciones de ampicilina cada 30 minutos (\square) y cada 3 horas (\bullet) a una concentración final de 100 μ g/ml. La densidad óptica se puede referir al tiempo de cultivo de acuerdo a la Figura 4.2.2.5.

Erlenmeyer, inóculo: 10%, densidad óptica del inóculo: 0.3-0.4, pH inicial ajustado a 7.2 antes de la esterilización, temperatura 37°C, agitación rotatoria: 250-300 rpm.

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y lo que se presenta es el promedio de ellos. En el caso de geles se incluyen los más representativos y en general corresponden a proteínas precipitables.

4.3.2. (A) Conservación de la cepa

Se prepararon 3 series de gliceroles en tres medios de cultivo diferentes (Luria, M-9, mínimo), la serie A se mantuvo 2 horas fuera del congelador diariamente, la serie B cada semana y la serie C cada mes. Al conjunto se le determinó viabilidad plateando 10 μ l. de una dilución apropiada en 2 cajas Petri conteniendo medio Luria y 100 μ g/ml de ampicilina. La presencia de proteína híbrida se determinó cualitativamente por electroforesis cada mes.

4.3.3. (A) Curvas de crecimiento

En matraces de 250 ml con 50 ml de medio M-9 se cultivó la bacteria a 37°C y agitación de 200 rpm, se midió la DO cada hora durante 8 horas y en algunos casos hasta las 24 horas. El pH fué medido externamente tomando muestras. La ampicilina se estimó por bioensayo en muestras del medio de cultivo filtrado en membranas millipore (0.45 μ M) para retener las células y refrigerarlas hasta su análisis.

4.3.4. (A) Estabilidad de almacenamiento de la proteína híbrida

Un cultivo con el medio agotado se almacena sin ningún tratamiento a 4°C. Del mismo modo, de muestras del resultado de la centrifugación del cultivo se almacena a 4; -10 y 70°C. A intervalos de 1, 2, 3, 12, 24 semanas se determina la presencia de proteína híbrida por electroforesis.

4.3.5. (A) Efecto de la temperatura

En 50 ml de medio M-9 contenido en matraces de 250 ml se cultiva la cepa a diferentes temperaturas y en cada caso se midió la DO cada media hora para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ); al final de la fermentación se les determinó la presencia de proteína híbrida por electroforesis en las células centrifugadas.

4.3.6. (A) Efectos del inóculo

Se inoculan matraces de 250 ml con 50 ml de medio M-9 con diferentes proporciones de un cultivo de toda la noche en medio Luria y M-9; se midió el crecimiento y los resultados se graficaron en papel semilogarítmico para determinar la μ y la fase lag. De igual manera pero ahora manteniendo constante la cantidad de células se inoculó con cultivos de diferentes edades.

4.3.7. (A) Comportamiento de segregantes

Se tomaron cada hora alíquotas de cultivos en medio M-9 conteniendo diferentes concentraciones iniciales de ampicilina (0, 25, 50, 75,

y 100 µg/ml), se diluyen apropiadamente y se platean en cajas con medio - Luria conteniendo ampicilina. En cada caso se probaron un máximo de 184 colonias. El porcentaje de segregación está dado por la relación del número de colonias que crecen en el medio con antibiótico con respecto a -- las que se desarrollan sin él.

4.3.8. (A) Segregantes en cultivo retroalimentado.

Se realizó un cultivo en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio M-9 con casaminoácidos como fuente compleja en nitrógeno en presencia (100 µg/ml iniciales) y ausencia de ampicilina respectivamente. De estos cultivos incubados durante toda la noche se transfirieron 20 ml a -- 80 ml de medio de la misma composición. Este procedimiento se repitió por 11 veces. Al final de cada cultivo (previo a la siguiente inoculación) se tomaron muestras que se diluyeron apropiadamente y se platearon en cajas - Petri con medio Luria, cada colonia fué transferida individualmente con -- palillos estériles a cajas Petri con medio Luria pero conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. La relación entre las colonias que crecieron en el medio - con ampicilina respecto a las obtenidas en el medio sin antibiótico representa el porcentaje de segregación.

4.3.9. (A) Fuentes de Nitrógeno

Al medio M-9 se le sustituyó gradualmente la peptona por casa-
minoácidos y se midió la μ y la presencia de proteína híbrida por electro-
foresis, al final de la fermentación. En experimentos similares la pepto-
na fué sustituida en base a nitrógeno total por Urea, Sulfato de amonio y
cloruro de amonio. A las fuentes industriales de nitrógeno se les determi

nó su solubilidad y se hizo una comparación teórica de los requerimientos.

4.3.10 (A) Efecto del tipo de fuente de Nitrógeno

De manera similar que en el experimento 4.3.9 (A), el medio M-9 se le sustityó la peptona (Bioxon) por cantidades equivalentes en -- Nitrógeno de peptona industrial y sulfato de amonio.

4.3.11 (A) Fuentes de carbono

Se sustityó la glucosa del medio M-9 con sacarosa y se deter
nó la μ .

4.3.12. (A) Efectos de la adición de sacarosa

En matraces bafleados de 250 ml conteniendo 50 ml de medio - M-9 y L1 respectivamente se cultivó la cepa transformada. A dos matra-- de cada medio se les hicieron adiciones de sacarosa a determinados perio
dos siendo esta esterilizada por filtración Millipore. A tales cultivos se les determinó el crecimiento por DO. y se comparó con aque
llos a los que no se les hizo adición alguna.

4.3.13 (A) Efectos del inóculo en el medio balanceado.

Se inocularon matraces de 250 ml con 50 de medio L1 con diferentes proporciones de un cultivo de toda la noche cre
cido en el mismo medio. Se observó el crecimiento mediante -

D.O. y los resultados se graficaron en papel semilogarítmico para determinar la velocidad de crecimiento y la fase lag. De igual manera pero ahora manteniendo constante la cantidad de células se inoculó con cultivos de diferentes edades.

4.3.14. (A) Efecto del ayuno de aminoácidos en la capacidad de la cepa para sintetizar proteína híbrida

La cepa en cuestión se cultiva en medio mínimo que contiene los requerimientos de aminoácidos durante al menos - 48 horas. De allí se obtiene el inóculo (10%) para el siguiente cultivo en las mismas condiciones y el procedimiento se repite varias veces.

4.3.15 (A) Efecto de la presencia de bajas concentraciones de ampicilina en medio de cultivo durante períodos prolongados en la capacidad de la cepa para sintetizar proteína híbrida y la presencia de se gregantes.

De un glicerol reciente se inocula un matraz de 125 ml con 20 ml de medio M-9 conteniendo 10 µg/ml de ampicilina, se deja incubar durante toda la noche y de ahí se inocula al 10% un nuevo matraz con un medio de la misma composición, este procedimiento se repite por 10 períodos. Al final del último período se inocula con este cultivo en medio M-9 conteniendo casaminoácidos como fuente de nitrógeno, del cual se toma muestra

para correr electroforesis. Como testigo se crece un cultivo en M-9 inoculado directamente del glicerol del que se toma -- muestra para realizar electroforesis. Para determinar la segregación se siembra una dilución de la décima transferencia y del cultivo control en cajas con medio Luria que se transfieren a cajas con el mismo medio pero conteniendo 250, 500, 750, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina.

4.3.16. (A) Experiencia en fermentadores de 14 lts.

Se llevó a cabo en fermentadores de 14 lts. (10 l de volumen de trabajo) (New Brunswick) a 37°C , 300-400 rpm, 500 ml de un cultivo de toda la noche como inóculo, aireación 1 vvm (10 l/min) a 10 psi de presión. Se empleó el medio M-9 como base con algunas modificaciones descritas en el texto. El pH fué ajustado a 7 en algunas corridas. Se empleó antiespumante de silicón siendo suficientes 5-10 ml de una solución al 10%.

4.3.17. (A) Optimización del medio de cultivo

En este caso, la función objetivo a optimizar fué la velocidad específica de crecimiento, en vista de que la producción de proteína híbrida-Cadena A es constitutiva. De esta manera se estaría optimizando -- indirectamente la productividad de proteína híbrida.

Diseño Plackett-Burman:

En primer lugar, se llevó a cabo un "malleo de factores" esto

es, identificar las variables que tenían mayor influencia en la velocidad de crecimiento para posteriormente optimizar solo aquellas variables. El malleo de factores se llevó a cabo por el método de Plackett-Burman de -- acuerdo a lo establecido por Box et al., (1978) p. 398, Fabila (1979) -- p. 93 y Rodríguez (1983) p. 67.

El medio base de la optimización fué derivado de ajustes en el medio M-9, balanceándolo en función de rendimientos reportados para células de fuentes de Carbono y Nitrógeno. Los rangos de variación fueron un tanto arbitrarios pero dentro de lo razonable para un medio de cultivo. Estos se muestran en la sección de resultados.

Las curvas de crecimiento para las 8 corridas se llevaron a -- cabo por duplicado en matraces de 250 ml con 50 ml de medio inoculado al -- 10% en volumen de un cultivo cuya densidad óptica fué de 0.31. Se midió -- la D.O. cada hora y la velocidad específica de crecimiento se determinó -- mediante el ajuste por mínimos cuadrados de los datos del log. de la D.O. versus tiempo.

Diseño Box-Wilson

Con el malleo de factores es posible distinguir cuales parámetros tienen la mayor influencia en la función objetivo. Con el método -- Box-Wilson es posible encontrar los niveles óptimos de variación de los -- efectos considerados.

El método Box-Wilson es un diseño factorial completo que pre-- senta ortogonalidad. Para elaborar la matriz puede usarse un número ele--

vado de variables, sin embargo por razones prácticas es aconsejable no variar simultáneamente más de 4 ó 5 variables con dos niveles. De esta manera se requieren 2^n experimentos para evaluar n factores en dos niveles.

Después de la experimentación los resultados pueden ser ajustados a un modelo lineal, mediante la ecuación de regresión correspondiente, siendo posible, determinar los valores de los efectos ya sea individualmente como en interacción con otras variables. Los procedimientos utilizados fueron los descritos por Rodríguez (1983) p. 75-77. La selección de los valores alto y bajo se realizó en función de los resultados del diseño Plackett-Burman. El medio base fué el que resultó con la velocidad específica de crecimiento mayor en tal diseño. La composición de los diversos medios se describe en la sección de resultados.

Las 16 corridas se llevaron a cabo por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml inoculados al 10% (v/v) con un cultivo de densidad óptica igual a 0.44 crecido en el medio base de la optimización. Fué necesario acondicionar el inóculo para disminuir la fase lag esto se realizó transfiriendo un mínimo de 4 cultivos de al menos 24 hrs., -- cada uno en el medio base de optimización.

El cálculo del efecto de cada uno de las variables y de sus interacciones se realizó por medio del algoritmo de Yates (Fabila, 1979, p. 73, Box et al., 1978, p. 324, 342).

4.3. (B) Procedimientos experimentales (Cadena B)

4.3.1. (B) Condiciones generales de cultivo

A menos que se indique lo contrario, los experimentos se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo inoculado al 7.5% (v/v) de cultivos de toda la noche, temperatura: 37°C, agitación rotatoria: 200 rpm, pH inicial: - ajustado a 7.2 antes de esterilizar. Los azúcares fueron esterilizados -- por separado y los inductores con filtración millipore. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y lo que se presenta es el promedio de -- ellos. En el caso de geles se incluyen los mas representativos. Se utilizó IPTG 5 mM como inductor en la fase exponencial tardía (4 hrs para el -- medio M-9 y 6 hrs. para el medio M-L). Los geles presentados corresponden a proteínas precipitables.

4.3.2. (B) Cinética de fermentación

Cada hora se toman muestras de los cultivos para determinarles D.O., pH y azúcares reductores totales. La degradación de ampicilina se - midió por bioensayo y se tomaron muestras cada 30 min. durante 3 hrs. Co- mo testigo se incubó un matraz de la misma composición sin inocular.

4.3.3. (B) Inducción con IPTG

A los cultivos se les adicionaba IPTG de manera que su concen- tración final fuera 5 mM, los cultivos fueron cosechados 24 hrs., después. En el caso de la cinética de producción se cosechó en los tiempos indica- dos.

4.3.4. (B) Segregantes. Efectos del subcultivo en medio mínimo, en la producción específica de proteína híbrida.

De la manera descrita para el caso de Cadena A (experimentos 4.3.7 (A) y 4.3.15 (A) con las salvedades hechas en 4.3.1. (B).

4.3.5. (B) Inductores alternos al IPTG.

6 matraces con medio M.L. fueron inducidos de la manera siguiente: Matraz 1, se efectuó la inducción con 5 milimoles (concentración final) de lactosa a las 6 horas después de inocular. Matraz 2, la inducción fué llevada a cabo con 5 milimoles (concentración final) de Melibiosa a las 6 horas después de inocular. Para tener un testigo, se realizó una inducción con 5 milimoles (concentración final) de IPTG, añadido a las 6 horas después de inocular, Matraz 3. En el caso de los Matraces 4 y 5, la fuente de carbono fue una combinación 1:1 de Sacarosa con Lactosa y Sacarosa con Melibiosa, respectivamente. Se usó un último matraz, para llevar a cabo una fermentación sin inducir.

El tiempo de 6 horas corresponde a la fase exponencial tardía en este medio, la cual se delimitó efectuando una curva de crecimiento antes de iniciar estos experimentos.

4.3.6. (B) Alternativas en el uso de lactosa

2 matraces con medio M.B., fueron inducidos con 1 g/l de lactosa y con 5 milimoles (concentración final) de IPTG respectivamente, la inducción se hizo en la fase exponencial tardía.

En la inducción en el medio M-9 se realizaron los experimentos que a continuación se enuncian: I. Inducción con 5 milimoles de IPTG en la fase exponencial tardía, II. Sustitución de Glucosa por Lactosa como fuente de carbono. III. Una combinación de Lactosa con Sacarosa 1:1 como fuente de carbono. IV. Se crecieron las células en medio M-9 durante 24 horas, después de este tiempo se centrifugaron y se lavaron con solución salina 0.85%. Se resuspendieron después en medio M-9 en el que la única fuente de carbono era Lactosa, se incubaron nuevamente 24 horas. V. Adición de pulsos periódicos de Lactosa (5 mM concentración final), los cuales fueron añadidos cuando los azúcares estaban agotados en el medio. VI. Por último se efectuó una inducción con 1 g/l de Lactosa en la fase exponencial tardía.

El tiempo de cosecha fue a las 24 horas después de inducir, excepto en los casos II y III, en que el fue a las 24 horas después de inocular.

4.3.7. (B) Fuente de carbono en los inóculos

Se inocularon 2 matraces con 15 ml de medio M-9, uno de ellos con Sacarosa y el otro con Glucosa como fuente de carbono y se crecieron durante 24 horas. Estos cultivos fueron usados para inocular 2 matraces con 50 ml de medio de la misma composición anterior. Una vez crecidos se transfirieron a 2 matraces Fernbach conteniendo 500 ml de medio M-9, el cual tenía Lactosa como principal fuente de carbono. Los cultivos fueron cosechados 24 horas después de inocular.

4.3.8. (B) Efecto de la presencia de galactosa.

Se desarrolló el cultivo en medio M-9 sustituyendo la glucosa por 4 g/l de lactosa y 2 g/l de galactosa.

4.3.9. (B) Optimización del medio de cultivo.

Se utilizaron los métodos de Plackett-Burman y Box-Wilson que se detallan en la sección 4.3.17 (A). En este caso la función objetivo - fué la producción específica de proteína híbrida en vista de que el sistema necesitaba inducirse.

El medio base se seleccionó en función a los experimentos de inducción. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en matraces de 250 ml con 50 ml de medio y a 200 rpm de agitación rotatoria a 37°C. En cada experimento se efectuó una curva de crecimiento para calcular la velocidad específica de crecimiento. Además, se hicieron mediciones del pH inicial y final, del consumo de azúcares y de la presencia de proteína híbrida por electroforesis. Se corrió un testigo sin lactosa e inducido con IPTG en el medio base.

El inóculo para este experimento fué preparado en medio mínimo con el fin de evitar en lo posible interferencias, los matraces se inocularon al 7.5% y los cultivos se cosecharon 24 hrs. después.

Para el diseño Box-Wilson se eligieron tres parámetros que -- presentaron los mayores efectos en el Plackett-Burman. El medio base se obtuvo del mejor experimento individual del diseño Plackett-Burman.

Los ocho experimentos fueron hechos por duplicado en matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 37°C y 200 rpm de agitación rotatoria, cada medio se inoculó al 7.5% (v/v), con un cultivo crecido en medio mínimo y se cosecharon 24 hrs. después. Se midió la D.O. cada hora para calcular la velocidad específica de crecimiento. También se midieron el pH inicial y final y los azúcares consumidos. La proteína híbrida se detectó por -- electroforesis. Se incluyó un testigo, inducido con IPTG en el medio base, pero que solo contenía sacarosa como fuente de carbono.

4.3.10. (B) Cultivo en fermentador de 2 lts.

Se desarrolló en un fermentador New Brunswick de capacidad nominal de 2 ltr. con 1250 ml de medio de cultivo de la siguiente composición (g/l): Peptona 20, Sacarosa 4, Lactosa 7, Na_2HPO_4 4, KH_2PO_4 5, sales 5 ml. Este medio fué el que resultó mejor del diseño Box-Wilson. Las condiciones fueron; 37°C, aireación 1 v/v/m, O_2 disuelto, mínimo 10%, agitación mínima de 200 rpm y en función del O_2 . Se determinó cada hora pH, -- D.O. y azúcares totales. Se tomaron muestra a las 12, 24 y 30 horas para hacer gel de las proteínas precipitables. Como testigo se corrió una fermentación en matraz con medio M-9 inducido con IPTG.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Cadena A

5.1.1. Conservación de la cepa (Experimento 4.3.2. (A))

Para llevar a cabo de manera reproducible cualquier proceso microbiano, es un requisito contar con una cepa que mantenga las características de interés a lo largo del tiempo. En vista de que se había observado en experimentos preliminares, que la cepa empleada de rutina y mantenida en glicerol a -10°C , presentaba, en algunos casos, menor producción de proteína híbrida, se estudió si las condiciones de almacenamiento están relacionadas con este fenómeno. Se determinó la viabilidad de la cepa mantenida en tres medios de diferente composición y contenido glicerol. Lo anterior, a su vez, en tres modalidades: descongelamiento diario (serie A), descongelamiento semanal (serie B) y descongelamiento mensual (serie C). De esta manera se trató de simular condiciones de trabajo rutinario con la cepa y de su almacenamiento prolongado.

En las figuras 5.1.1.1., 5.1.1.2. y 5.1.1.3. se presentan los resultados respecto a la viabilidad de la cepa mantenida en los medios -- M-9, Luria y Mínimo, todos ellos conteniendo glicerol, y almacenados en el congelador, sometidos a las tres condiciones mencionadas. Como se observa, la composición de los medios con glicerol no tiene una influencia marcada en la viabilidad de la población bacteriana y no se detecta ningun

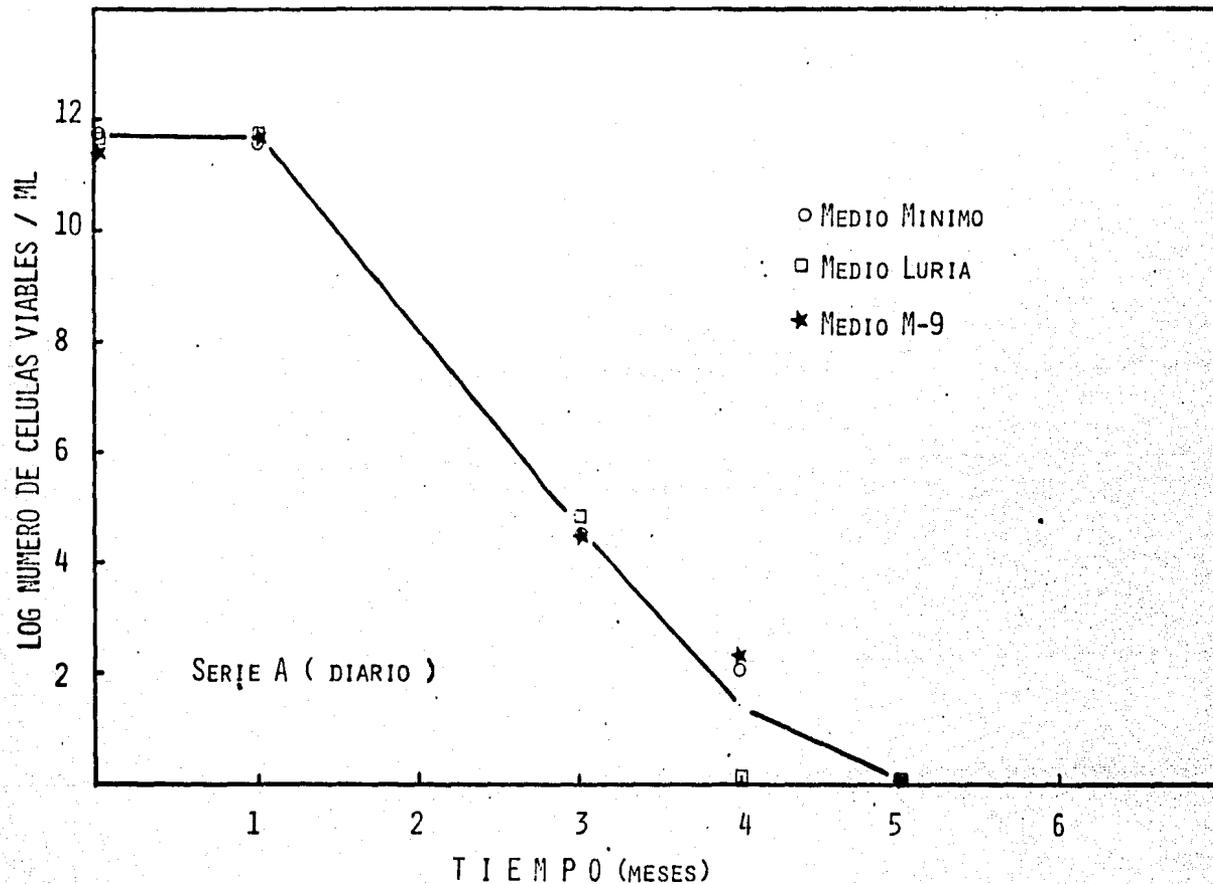


FIGURA 5.1.1.1 Viabilidad de *E.coli* MX-614 pER-213 mantenida a -15°C en tres medios de diferente composición conteniendo glicerol y sometida a descongelamiento diario (2 horas), en función del tiempo de almacenamiento. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2 (A). A este experimento se le denominó serie A.

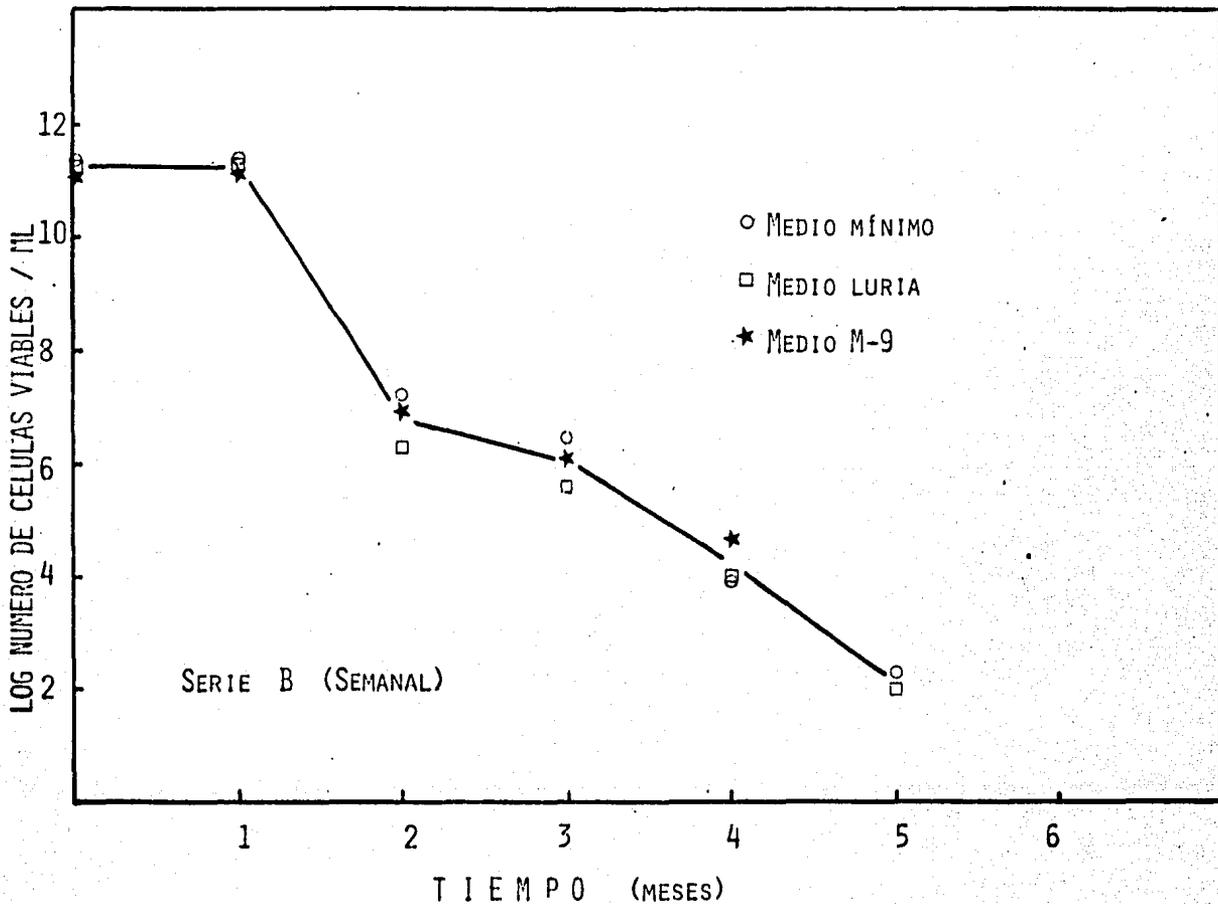


FIGURA 5.1.1.2 Viabilidad de *E. coli* MX-614 pBR-213 mantenida a -15°C en tres medios de diferente composición conteniendo glicerol y sometida a descongelamiento una vez por semana (2 horas), en función del tiempo de almacenamiento. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2 (A). A este experimento se le denominó serie B.

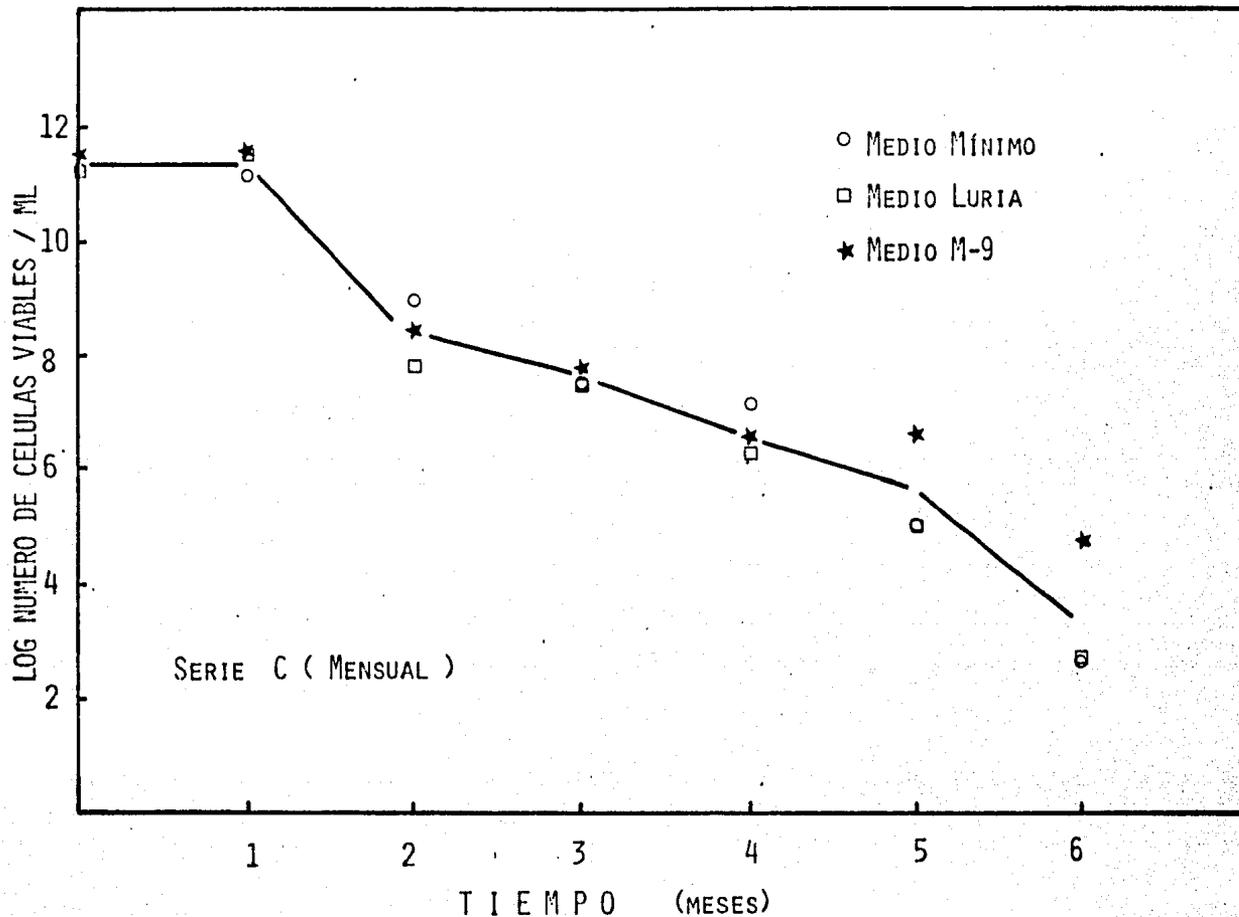


FIGURA 5.1.1.3 Viabilidad de *E.coli* MX-614 pBR-213 mantenida a -15°C en tres medios de diferente composición conteniendo glicerol y sometida a descongelamiento una vez por mes (2 horas), en función del tiempo de almacenamiento. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2 (A). A este experimento se le denominó serie C.

na ventaja al usar uno u otro medio. La excepción a lo anterior parece ser clara solo en la serie C, descongelada mensualmente, para el medio M-9. La cual presentó una mayor viabilidad con respecto a los demás medios. En ningún otro caso fué observada ventaja alguna entre los medios experimentales. Estos resultados no coinciden con lo reportado por -- Menningmann (1979), quién encontró una marcada diferencia en la conservación de la viabilidad de diversas cepas de E. coli dependiendo de la -- composición al medio en el que las bacterias se suspendieron. Un medio que contenía unicamente fosfatos y cloruro de sodio resultó mejor que un medio conteniendo triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio. Sin embargo, este fenómeno no ocurrió en 3 de las 23 cepas probadas por -- Menningmann. Esto llevó a que el autor concluyera que la sensibilidad al almacenamiento no solo es función de los componentes del medio sino -- que es una característica genética determinada. Esto último podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo.

En la Figura 5.1.1.4. se grafican los promedios de las tres condiciones. Es claro que mientras más frecuente es el descongelamiento más rápido decrece la viabilidad, en las series A y B la viabilidad es -- cercana a cero en el sexto mes, la serie C conserva en el mismo período -- un 30% de la viabilidad original. La vida media respecto al logaritmo -- del número de células viables por mililitro fue de la siguiente manera: descongelamiento diario, 80 días; descongelamiento semanal, 100 días; -- descongelamiento mensual, 150 días. Menningmann (1979) reporta disminuciones máximas de viabilidad de tres escalas logarítmicas en 150 días. En el caso de este trabajo, la menor disminución de viabilidad fue la de la serie C, con cerca de 6 escalas logarítmicas en el mismo periodo de --

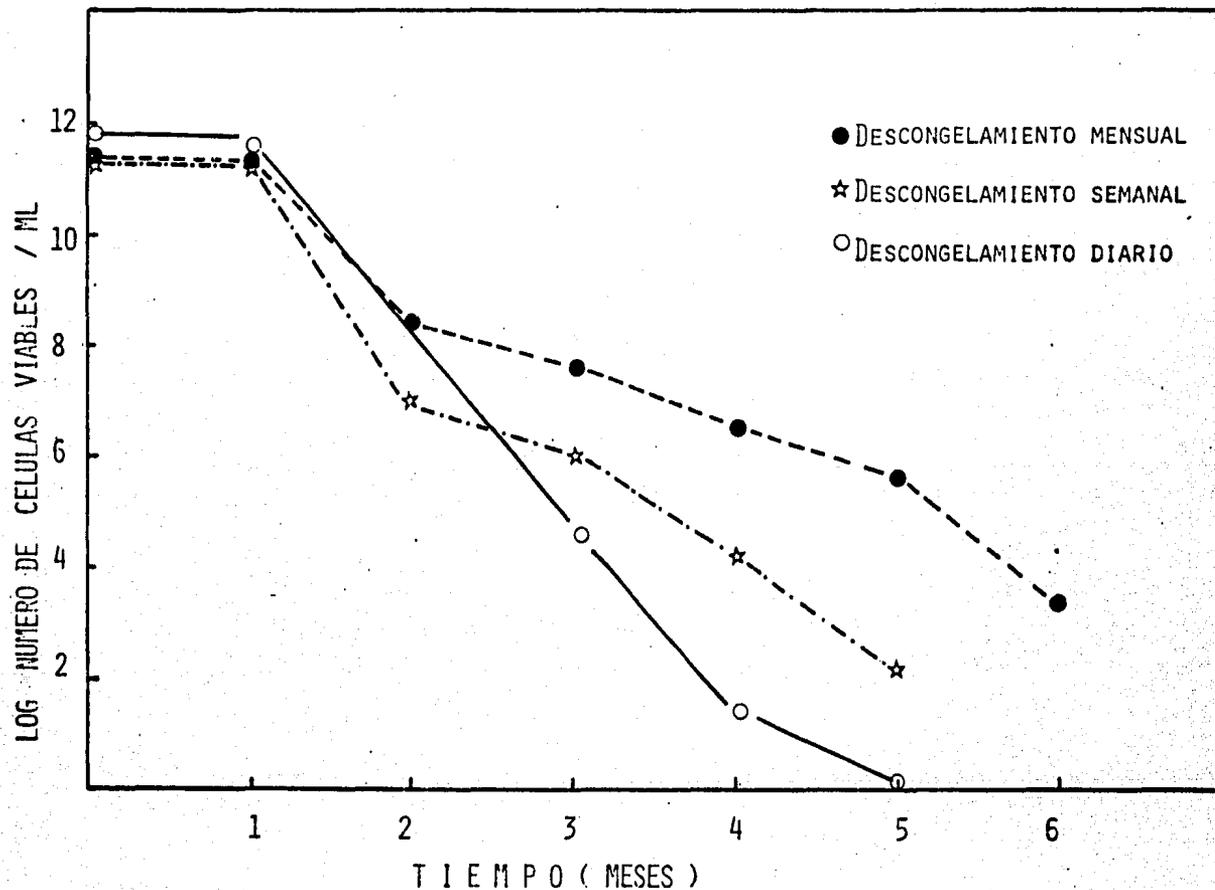


FIGURA 5.1.1.4 Viabilidad de *E.coli* MX-614 pBR-213 mantenida a -15°C en medios conteniendo glicerol y sometida a tres condiciones de descongelamiento, en función del tiempo de almacenamiento. -- Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2 (A). Los puntos de las gráficas corresponden a los promedios de triplicados almacenados en medio Luria, medio M-9 y medio mínimo que se presentan en las Figuras 5.1.1.1 , 5.1.1.2 y 5.1.1.3

tiempo. La diferencia puede radicar en el descongelamiento y en que --
Menningmann utilizó suspensiones celulares menos concentradas.

De lo anterior es claro que la concentración en glicerol no
debe prolongarse más allá de 6 meses y se debe ser muy cuidadoso con el
tiempo y las condiciones en las que se descongele para su uso rutinario.

Las electroforesis llevadas a cabo mensualmente para cada --
una de las condiciones indicaron la presencia de bandas irregulares de -
 β -galactosidasa, sin ninguna tendencia definida, ni la ventaja aparente
de algún medio o condición. Se puede decir que la constante fue la irre
gularidad. Esto indica que probablemente se esta observando un fenómeno
poblacional y que la resistencia a ampicilina no asegura que la biosínte
sis de la proteína híbrida se lleve a cabo en forma reproducible y en --
cantidades elevadas. La ampicilina se usaba como presión selectiva en -
los cultivos inoculados a partir de las cepas mantenidas en diferentes -
medios conteniendo glicerol y sin purificar la cepa en cada ocasión. Con
este experimento se pretendió delimitar la utilidad de los gliceroles en
función de la producción de proteína híbrida respecto al tiempo y sin la
necesidad de verificar y seleccionar, cada vez, colonias con elevada pro
ducción específica de proteína híbrida.

De los resultados obtenidos, se puede afirmar que es posible
que poblaciones de bacterias con idénticos marcadores, tengan diferentes
capacidades de síntesis específica de proteína híbrida. En vista de la
presión selectiva ejercida por al ampicilina, es improbable que el fenóm
eno observado sea el resultado de la segregación del plásmido. Posible
mente se trate de una variación en el número promedio de copias del plás

mido, presente en la célula. La distribución del número de plásmidos por célula puede ser muy heterogénea y las condiciones de cultivo pueden resultar en cambios en la dosis final de genes. Ello conduciría a la presencia de niveles irregulares de expresión de proteína híbrida. En la literatura (Engberg & Nordstrom, 1975, Gustafsson & Nordstrom, 1980, Jones et al., 1980) se encuentran evidencias que apoyan algunos de los hechos mencionados.

Los resultados de los experimentos descritos anteriormente, fueron la base para el diseño de experimentos tendientes a averiguar la forma en la que fuera posible incrementar la producción específica de proteína híbrida y de manera más importante, uniformizar esta producción. Estos experimentos se describirán más adelante en las secciones 5.1.13 y 5.1.14.

5.1.2. Caracterización cinética del cultivo (Experimento 4.3.3. (A))

Con el fin de precisar el momento adecuado para la cosecha de células, se determinó la curva de crecimiento y la producción de proteína híbrida a lo largo del cultivo. Lo anterior se realizó en el medio M-9. El mismo experimento se repitió en un medio de similar composición, en el cual la peptona se sustituyó por casaminoácidos. La razón por la cual se utilizó esta última fuente compleja de nitrógeno fué que en experimentos preliminares realizados por el grupo de Biología Molecular, se detectó una elevada expresión de proteína híbrida en cultivos desarrollados en casaminoácidos, como principal fuente de nitrógeno.

En la Figura 5.1.2.1. se presentan los resultados de ambos experimentos. En ambos casos, la fase exponencial ocurre durante las primeras tres horas del crecimiento, situación que coincide con un descenso en el pH hasta un valor cercano a 6.5. La velocidad de crecimiento medida en la fase exponencial es menor cuando se usan casaminoácidos respecto al caso con peptona. La fase estacionaria es más definida en el primer caso, mientras que utilizando peptona, la bacteria continúa creciendo ligeramente. En el periodo comprendido entre las 3 y las 8 horas, coincidiendo con la fase estacionaria el pH tiene una ligera tendencia a incrementarse, logrando un valor de 6.9 en la octava hora. En el caso de los casaminoácidos, la densidad óptica entre las 8 y 24 horas de cultivo se incrementó sustancialmente. Esta situación no fue tan marcada cuando el medio contenía peptona. En este periodo de tiempo, el pH ascendió hasta un valor de 7.4.

En la parte inferior de la Figura 5.1.2.1. se presentan secciones de las fotografías de los gels de electroforesis en donde se incluyeron muestras de los cultivos a diferentes tiempos. Las bandas que comigran con β -galactosidasa indican que la producción de proteína híbrida es constitutiva, ya que no se observan diferencias apreciables de las dimensiones de las bandas, en las diversas etapas del crecimiento y en función de la cantidad de células presentes en el cultivo. Estos resultados eran los esperados en vista de las características genéticas de la cepa. Por otra parte, no se detectaron diferencias sustanciales en la expresión de proteína híbrida cuando se utilizaron casaminoácidos o peptona como fuente de nitrógeno. En la sección 5.1.7. se estudió con mas

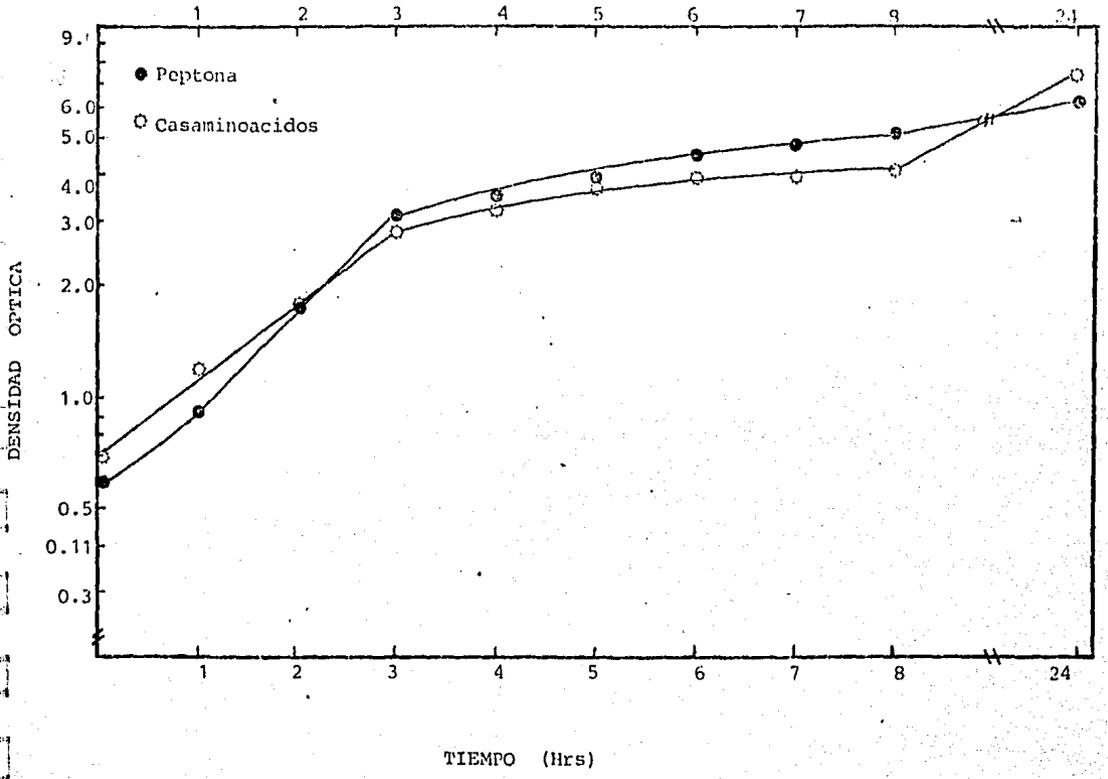


FIGURA 5.1.2.1 Curvas de crecimiento de *E.coli* MX-614 pBR-213 en el medio M-9 Peptona y casaminoácidos como fuente compleja de nitrógeno. En la parte superior se muestra una sección de la fotografía del gel correspondiente a las proteínas precipitables de las células cosechadas en los tiempos indicados, cuando se usaron casaminoácidos. En la parte inferior se incluye el gel del caso cuando la peptona fue la fuente compleja de nitrógeno. En todos los carriles la cantidad de proteína es la misma (30 µg). Se incluyen también los patrones de β-galactosidasa (10 µg) señalados como β-gal.

detalle este fenómeno.

Puesto que la biosíntesis de proteína híbrida es constitutiva, la producción de biomasa es una medida indirecta de la producción de proteína híbrida; al menos en las condiciones experimentadas. Por esta razón, y en función de la productividad, no existe ventaja en continuar la fermentación una vez que se ha alcanzado la fase estacionaria, esto es, entre 4 y 5 horas. Sin embargo, el prolongar el cultivo hasta las 24 horas, no tiene efecto adverso alguno, que no sea la disminución de la productividad.

Los resultados anteriores permitieron establecer como criterio de optimización, la productividad de biomasa. Ello requirió la suposición, no necesariamente cierta, de que la dosis de genes o número promedio de copias del plásmido, se mantuviera con poca variación. Esta es la razón por la cual, en la mayor parte de los experimentos, la concentración celular y la velocidad específica de crecimiento se utilizaron como parámetros para la toma de decisiones en el desarrollo del proyecto. La electroforesis en gel de acrilamida solo fue una herramienta auxiliar, cualitativa, para la verificación de la presencia de la proteína híbrida, en los resultados finales de los experimentos.

Un aspecto de gran importancia en el cultivo, fue el determinar hasta que punto resultaba necesaria la adición de ampicilina al medio de cultivo. Este antibiótico se emplea para asegurar que no se desarrollen bacterias que no tengan la información genética contenida en el plásmido. A estas últimas se les llama segregantes. El plásmido pBR-213 co-

difica para la proteína híbrida y además para la enzima β -lactamasa. Esto hace que las bacterias con plásmido sean resistentes al antibiótico, mientras que las que no lo tienen sean sensibles. Debido a la acción destructiva de la β -lactamasa, el antibiótico se degrada en el medio de cultivo que ha sido inoculado con una población de bacterias recombinantes. Los resultados de la degradación de ampicilina durante el cultivo se muestran en la Figura 5.1.2.2. Independientemente de la cantidad inicial, el 90% del antibiótico se degrada en los primeros 30 minutos del cultivo. La actividad de β -lactamasa contenida en el inóculo es suficiente para -- lograr esta degradación. El cultivo, en realidad, está expuesto la mayor parte del tiempo a concentraciones muy bajas de ampicilina; la cual, en todos los casos, no se detecta después de 4 horas de cultivo. La concentración inicial de ampicilina prácticamente no tiene influencia sobre la velocidad de crecimiento que desarrolla el cultivo. De esto se concluye que de no existir niveles altos de segregantes en ausencia total de ampicilina, la adición del antibiótico no es necesaria, sino solo una medida extra de precaución. Los experimentos de segregación se describen en las secciones 5.1.6. y 5.1.7.

5.1.3. Estabilidad del almacenamiento de la proteína híbrida (Experimento 4.3.4. (A))

La estabilidad de la proteína híbrida es de gran importancia, en vista de que define, en gran medida, las condiciones de los procedimientos de purificación, subsiguientes a la fermentación. Otra razón para determinar la estabilidad, radica en que en ocasiones, el manejo de -- materiales en escalas superiores a la del laboratorio no es posible reali

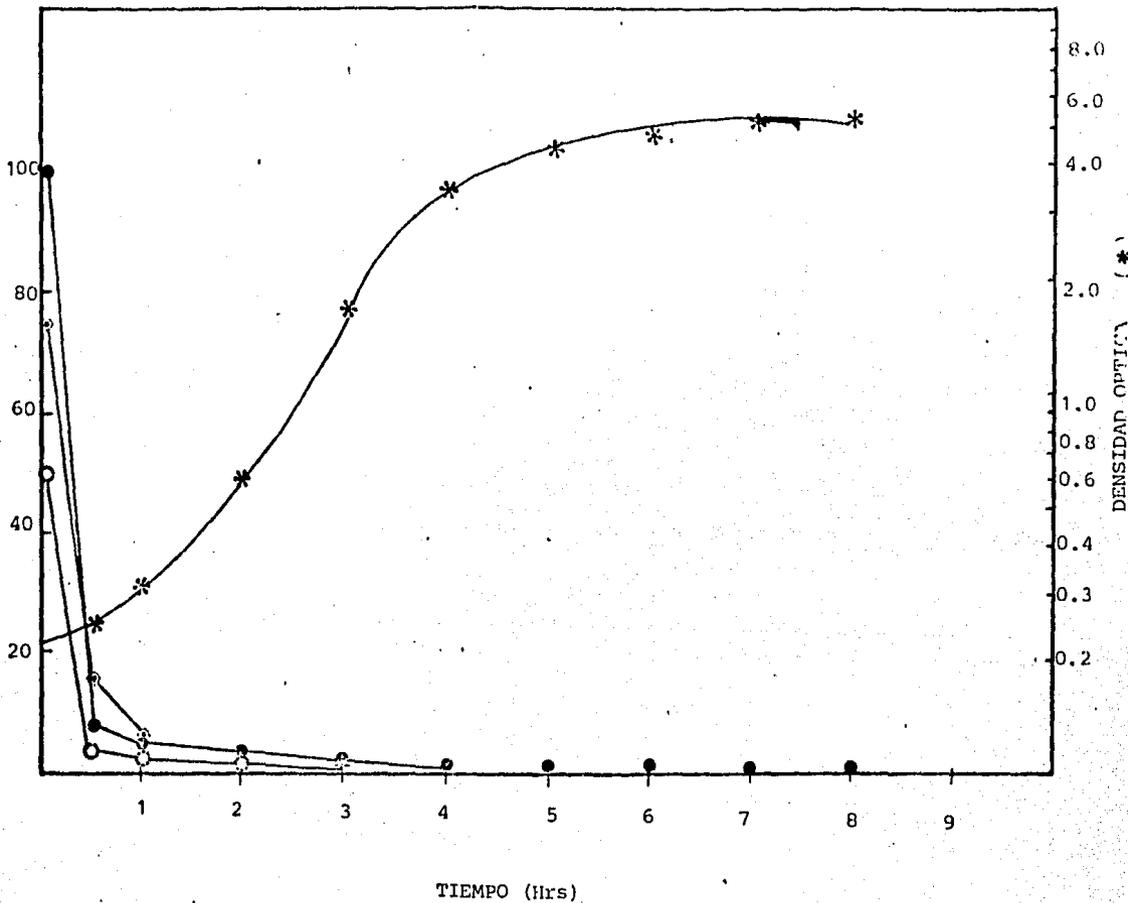


FIGURA 5.1.2.2. Degradación de ampicilina en el transcurso de un cultivo de *E. coli* IX-614 pBR-213 en medio M-9. La gráfica presenta los resultados de tres experimentos con 50, 75 y 100 μ g de ampicilina al inicio del cultivo. Los datos de crecimiento graficados corresponden al promedio de los tres experimentos, la velocidad de crecimiento tuvo una desviación estandar de % respecto a la media. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.3. (A)

zarlo en óptimas condiciones. Esto puede ser debido a limitaciones en el equipo. En función de ello, se investigó si no existía degradación de la proteína híbrida en condiciones que simulaban los probables problemas que se encontrarían en el escalamiento. Pensando que el cultivo no podría --centrifugarse inmediatamente, se almacenó a 4°C el medio de cultivo, resultado final de la fermentación. Con la idea de investigar las condiciones para almacenar el paquete de células, resultante de la centrifugación, se almacenó el centrifugado húmedo a diferentes temperaturas.

Los resultados se encuentran en la Tabla 5.1.3.1. Al parecer, en un tiempo de seis meses, no presenta ventaja apreciable el almacenamiento en refrigeración. Incluso las células suspendidas en el propio medio de cultivo, se pueden conservar al menos tres semanas. El único problema que se presenta, es el desarrollo progresivo de olores desagradables. En este caso no se trató de cuantificar la proteína híbrida. Sin embargo, la presencia y dimensiones de las bandas que comigran con β -galactosidasa no presentaron, cualitativamente, irregularidades importantes. De cualquier modo, los casos analizados constituyen un extremo de las condiciones que --pudieran prevalecer en el escalamiento. Se puede concluir que no existi--rán problemas serios debidos a degradación de proteína híbrida en los pa--sos siguientes a la fermentación.

Como se sabe, la proteína híbrida β -galactosidasa Cadena A de insulina humana, es insoluble en medios acuosos (Goeddel,et al., 1979, --Balbás, 1981) y forma cuerpos de inclusión dentro de la células (Williams et al., 1982). Estas características pueden constituir un mecanismo que

TABLA 5.1.3.1

ESTABILIDAD DE ALMACENAMIENTO DE LA PROTEINA HIBRIDA
EN CELULAS INTACTAS BAJO DIVERSAS CONDICIONES

Condición de almacenamiento	1 semana	2 semanas	3 semanas	3 meses	6 meses
Medio de cultivo (4°C)	+	+	+	ND ²	ND ²
Paquete celular (temperatura ambiente)	+	+	+	+	+
Paquete celular (4°C)	+	+	+	+	+
Paquete celular (-10°C)	+	+	+	+	+
Paquete celular (-70°C)	+	+	+	+	ND ²

+ Indica la presencia de proteína híbrida detectada cualitativamente por electroforesis

ND² No determinado

restrinja la degradación proteolítica (Paul et al., 1983). La naturaleza insoluble de la proteína híbrida es una ventaja, ya que se han sintetizado quimeras solubles, que presentan degradación intracelular de importancia (Paul et al., 1983).

5.1.4. Efecto de la temperatura

Es ampliamente conocido que la velocidad de crecimiento de E. coli, como de otros microorganismos, depende de la temperatura. También se conoce que su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Con el fin de determinar si la cepa transformada tenía el mismo comportamiento respecto a la temperatura, se llevaron a cabo los experimentos cuyos resultados se presentan en la Figura 5.1.4.1. Se encontró que la velocidad específica de crecimiento es máxima a 37°C. Coincidiendo con lo ampliamente establecido para E. coli. La velocidad de crecimiento a 37°C encontrada en este trabajo es menor a la reportada por Balbás (1981). Sin embargo, en otros experimentos reportados en este trabajo, manteniendo constantes las condiciones de cultivo, se observó cierta variabilidad en los resultados (entre 0.7 y 0.8 hr⁻¹). Esto puede ser debido a las características del lote de peptona utilizada y/o en las condiciones de esterilización que pudieron variar en cierta medida de manera no controlada. La presencia de proteína híbrida, detectada por electroforesis, no presentó variaciones importantes en los rangos de temperatura experimentados. En función de ello, todos los experimentos subsiguientes se realizaron a 37°C.

Con los datos de la Figura 5.1.4.1., en el rango 26-37°C, se construyó una gráfica de Arrhenius de la cual se calculó una energía

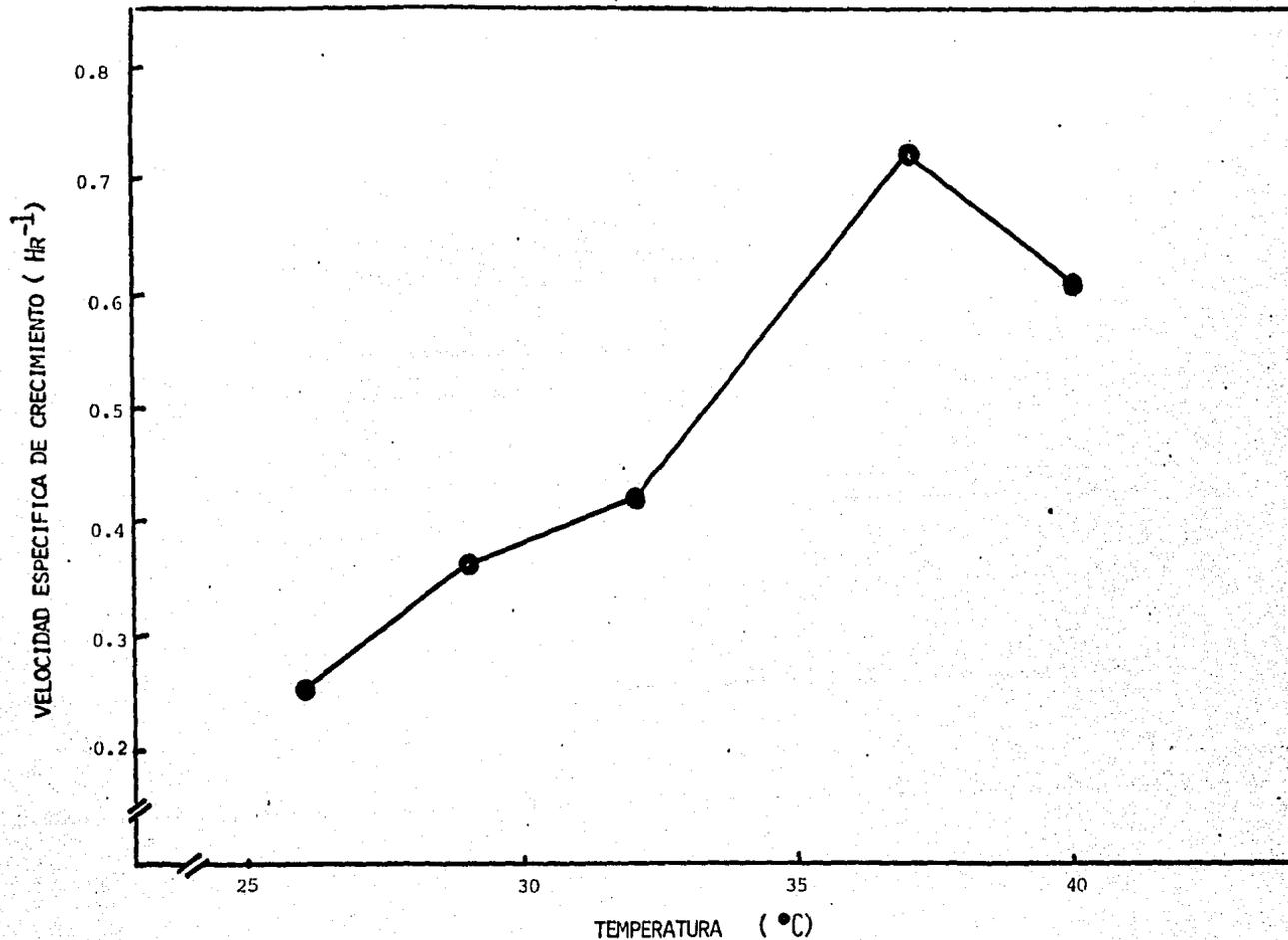


FIGURA 5.1.4.1 Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de E.coli - Mx-614 pBR-213 en el medio M-9. En todas las condiciones experimentadas se detectó proteína híbrida por electroforesis. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.5 (A)

de activación de 17,200 cal/mol. Este valor es superior al reportado -- para E. coli (Monod, 1942), lo que significa que en el caso de la cepa -- transformada, la dependencia de la velocidad de crecimiento respecto a la temperatura es más elevada. Es probable que este fenómeno sea ocasionado por la presencia del plásmido, ya que ha sido reportado (Balbás, 1981) -- que la presencia de este incrementa la velocidad de crecimiento (a 37°C), respecto a la cepa sin el plásmido. Sin embargo, para concluir definitivamente, se deberá calcular la energía de activación de la cepa sin plásmido, de experimentos que se realicen en las mismas condiciones con la -- cepa sin el plásmido.

5.1.5. Efectos del inóculo (Experimento 4.3.6. (A))

Con el objeto de lograr la productividad máxima en la fermentación, se determinaron las condiciones en las que se deberá realizar la inoculación para disminuir o eliminar la fase lag. En la Figura 5.1.5.1. se presentan los resultados del experimento en el que el inóculo se desarrolló en medio Luria y fue transferido a medio M-9. En este caso y realizando la inoculación en una relación volumen/volumen del 1% se observa -- una fase lag de 2 horas. Cuando el cultivo se inoculó con un 5%, la fase de adaptación fue de 30 minutos. En el caso de que el inóculo provenga -- de un cultivo de idéntica composición (M-9), la fase lag solo es aparente en niveles de inoculación del 1% (v/v). Estos resultados se muestran en la Figura 5.1.5.2. En todos los casos, el tamaño del inóculo influyó la fase lag, pero no la velocidad de crecimiento, según lo esperado -- de acuerdo a Shida et al. (1975). De ello se concluye que utilizando al

SID OPT

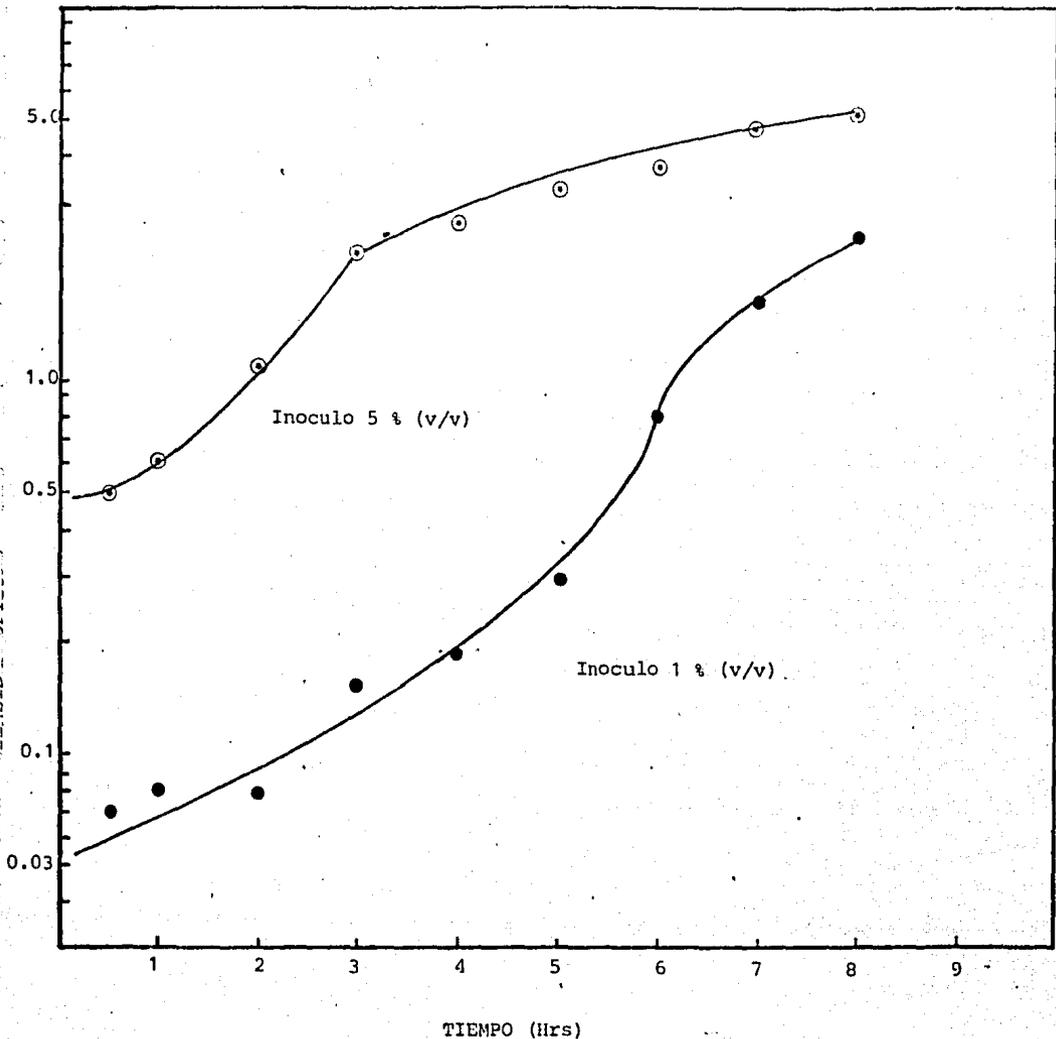


FIGURA 5.1.5.1 Efecto del tamaño del inóculo en las características de crecimiento de *E. coli* MX-614 pBR-213 . Los cultivos se desarrollaron en Medio M-9 y los inóculos en medio Luria. A la octava hora de cultivo se tomaron muestras para correr --electroforesis de las proteínas precipitables, en ambos casos se detectó proteína --híbrida. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.6 (A).

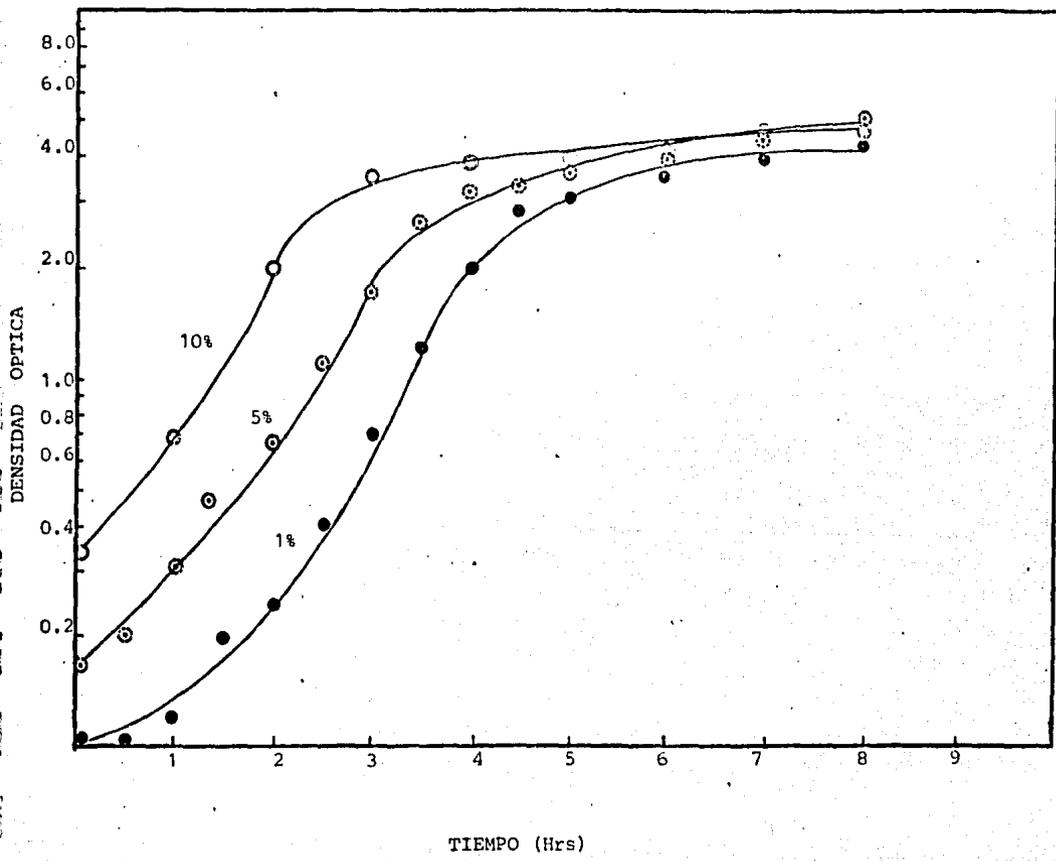


FIGURA 5.1.5.2 Efecto del tamaño del inóculo de las características de crecimiento de *E.coli* MX-614 pBR-213 desarrollada en medio M-9 . Los inóculos también se desarrollaron en el medio M-9. Los porcentajes de inoculación (volumen/volumen) se indican en la figura. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.6 (A)

menos un nivel de inoculación del 5%, es posible eliminar la fase lag. En el experimento cuyos resultados se ilustran en la Figura 5.1.5.3. se observa que en estos niveles de inóculo, la edad de este, no presenta ninguna influencia en las características de crecimiento de la población bacteriana.

Los experimentos descritos anteriormente se repitieron utilizando el medio denominado L-1 (Experimento 4.3.13. (A)). La composición de este medio resultó de un balance teórico en el que se tomó como sustrato limitante la glucosa del medio M-9 y se utilizó sacarosa como fuente de carbono. Los resultados obtenidos son fundamentalmente los mismos que para el caso del medio M-9. Esto es, la fase lag se elimina cuando la inoculación se realiza al menos con una relación del 5% (vol/vol); la edad del inóculo no tiene un efecto significativo en las características del crecimiento.

5.1.6. Comportamiento de segregantes (Experimento 4.3.7. (A))

Los resultados de los experimentos referentes a la conservación de la cepa y a la degradación de ampicilina durante el cultivo, establecieron la importancia de conocer los niveles de segregación del plásmido a lo largo de uno o varios cultivos. La irregularidad de la expresión de proteína híbrida en los experimentos de conservación de la cepa podría ser el resultado de contar, al final de la fermentación, con poblaciones bacterianas en la que una proporción de las células no tuvieran el plásmido y por lo tanto fueran incapaces de producir la proteína híbrida. Esto daría como resultado, en los geles de acrilamida, la presencia de una ban

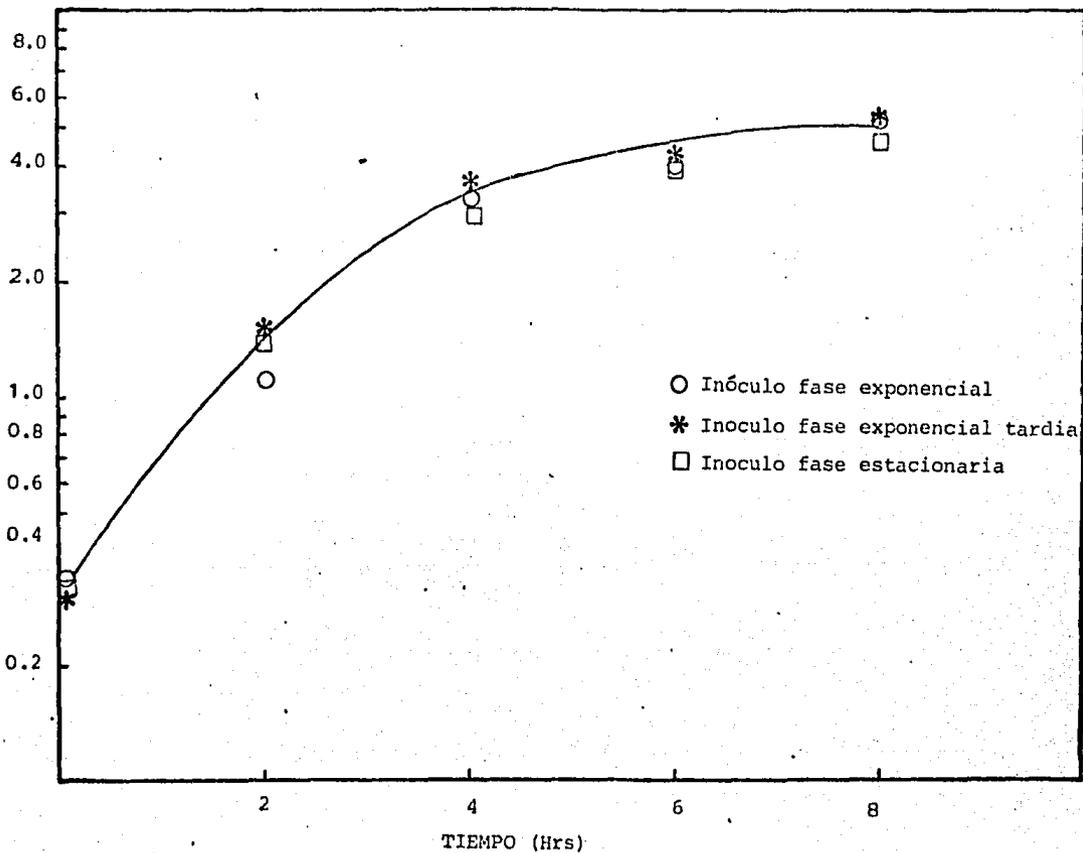


FIGURA 5.1.5.3 Efecto de la edad del inóculo en las características de crecimiento de *E. coli* MX-614 pBR-213 desarrollada en medio M-9. Los inóculos provinieron de cultivos en M-9 en fase exponencial ($DO = 3.0$), fase exponencial tardía ($DO = 3.5$), fase estacionaria ($DO = 0.4$). En los tres casos la concentración celular al inicio del cultivo fue la misma. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.6 (A).

da que comigra con β -galactosidasa, proporcionalmente menor. A pesar de que en todos los cultivos se usaba ampicilina (100 μ g/ml iniciales); debido a su rápida degradación, resultaba posible que pudieran desarrollarse bacterias sin el plásmido y por lo tanto sensibles a la ampicilina. - Lo anterior podría suceder, sobre todo, en aquel período, durante la fase exponencial de crecimiento donde la concentración de ampicilina es -- cercana a cero (ver Figura 5.1.2.2.). Por otra parte, Balbás (1981) utilizando el mismo sistema experimentado en este trabajo, esto es, la cepa de E. coli MX-614 transformada con el plásmido pBR-213; reportó que la segregación al final de un cultivo era cercana al 80%. Esto, cuando no se adicionaba ampicilina al inicio del cultivo. Este hecho resultó desconcertante, en vista de que como ya se demostró, la ampicilina ejerce presión selectiva solo en los primeros minutos del cultivo. Por otra -- parte, si este fenómeno resultaba del todo cierto, constituía una desventaja en el escalamiento ya que el uso de ampicilina representaría un componente importante del costo del proceso.

En función de lo anterior se investigó el comportamiento de la segregación del plásmido. Esta se midió como el porcentaje de células sensibles a la ampicilina, respecto al total de células en el cultivo. La medición se llevó a cabo en fermentaciones en ausencia de ampicilina y en presencia de 25, 50, 75 y 100 μ g/ml iniciales del antibiótico. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.1.6.1. Cuando se utilizó ampicilina al inicio del cultivo, independientemente de la concentración inicial, no se detectó segregación. Esta situación se esperaba, de acuerdo a los datos de Balbás (1981). Sin embargo, se demostró que no es ne-

TABLA 5.1.6.1.

COMPORTAMIENTO DE LA SEGREGACION DEL PLASMIDO pBR-213 A LO LARGO DE UN CULTIVO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE AMPICILINA

Tiempo de cultivo (hrs)	Concentración de ampicilina (µg/ml)									
	0		25		50		75		100	
	Colonias	% seg	Colonias	% seg	Colonias	% seg	Colonias	% seg	Colonias	% seg
0.5	124	0	49	0	11	0	60	0	8	0
1	129	2	23	0	57	0	6	0	42	0
2	398	2	36	0	38	0	60	0	59	0
3	115	0	ND	ND	72	0	1	0	24	0
4	110	0	136	0	64	0	59	0	32	0
5	470	0	142	0	72	0	144	0	72	0
6	377	0	18	0	40	0	153	0	14	0
7	295	1	16	0	74	0	119	0	53	0
8	294*	0.3	40	0	17	0	96	0	35	0
24	184**	0	60*	0	12*	0	40*	0	62*	0

El cultivo se desarrolló en el medio M-9 de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.7 (A). El porcentaje de segregación se calculó en función del número de colonias sensibles a ampicilina.

* Indica la presencia de proteína híbrida detectada cualitativamente por electroforesis

** La digestión del plásmido indicó que se encontraba intacto.

cesario utilizar concentraciones iniciales elevadas del antibiótico, lo que es un hecho importante para el escalamiento. Este fenómeno puede ser explicado en vista de que, en las concentraciones de ampicilina probadas, el tiempo en el que el antibiótico puede ejercer presión selectiva en el cultivo es similar (30 - 40 minutos) independientemente de la cantidad -- inicial (ver Figura 5.1.2.2.).

Cuando el cultivo se desarrolló en ausencia de ampicilina, se detectó segregación en algunas etapas de la fermentación. Sin embargo, -- la segregación promedio fue de 1.3%. Estos últimos resultados difieren -- marcadamente de los reportados por Balbás (1981). Resultaba probable -- que las diferencias se debieran a que en este trabajo, los inóculos de -- los cultivos en los cuales se midió la segregación, se desarrollaron en -- presencia de ampicilina. Aunque como ya fue demostrado, la ampicilina -- contenida en el inóculo, debido a su rápida degradación, no podría contri -- buir para ejercer presión selectiva en el cultivo. De cualquier modo, -- era posible que la presencia del antibiótico en el inóculo, hubiera con -- tribuido a la selección de una población resistente a la ampicilina.

Con el fin de despejar esa duda, fué preciso determinar cual era el comportamiento de las segregantes en una serie de cultivos retro -- alimentados. Esto significaba que un porcentaje elevado del volumen de un cultivo desarrollado durante aproximadamente 12 horas, servía como inócu -- lo para el siguiente cultivo y así sucesivamente. Por otra parte; son -- comunes en el escalamiento de inóculos, así como en su adaptación a medios industriales, las frecuentes transferencias de los últimos y era importan -- te establecer los límites en los cuales no se presentaba segregación im --

portante. Los resultados de este experimento (4,3,8 (A)) se presentan en la Tabla 5.1.6.2. La segregación es prácticamente nula en presencia y ausencia de ampicilina hasta el séptimo cultivo. A partir de ahí, es notoria la aparición de segregantes en ambas condiciones aunque en una proporción mayor en los cultivos sin ampicilina. La segregación fue de 1-3% cuando se uso ampicilina y de 5-10% cuando no se empleó. Estos datos se ven apoyados por los reportes de Jones et al., (1980), y Noack et al., (1981). Los primeros de ellos detectaron segregantes de un plásmido similar al empleado en este trabajo (el pBR-322), solo después de 30 generaciones en cultivo continuo y sin presión selectiva. El segundo grupo de autores reportaron no haber encontrado segregantes del pBR-322, hasta en 100 generaciones en cultivo continuo y en ausencia de antibióticos. Adicionalmente, Godwin & Slater (1979) no encontraron segregantes del plásmido TP120 en cultivo continuo con limitación de glucosa llevado a cabo por más de 800 hrs en ausencia de antibióticos. En limitación de fosfatos estos autores detectaron niveles apreciables de segregación después de 200 hrs de cultivo, también en ausencia de ampicilina. Aparentemente, la segregación de un plásmido depende más de sus características genéticas que de la posible presión selectiva ejercida por el antibiótico. Esta hipótesis se ve reforzada con los resultados experimentales presentados.

Resulta probable que los resultados de Balbás (1981) respecto a la segregación, se hayan debido a que en su caso se partió de una población bacteriana con un contenido relativo de plásmidos inferior. Esto provocó una disminución drástica de la concentración mínima inhibitoria de la ampicilina, y por lo tanto, se detectaron segregantes de acuerdo a lo

TABLA 5.1.6.2

SEGREGACION DEL PLASMIDO pBR-213 EN CONDICIONES DE CULTIVO
RETROALIMENTADO CON Y SIN AMPICILINA INICIAL EN EL MEDIO

Cultivo	Ampicilina inicial ($\mu\text{g/ml}$)			
	100		0	
	Colonias	% Segregantes	Colonias	% Segregantes
1	104	0	104	0
2	30	0	20	0
3	44	0	15	12*
4	112	0	84	0
5	58	0	94	0
6	120	0	84	0
7	121	0	36	0
8	93	3	100	10
9	117	3	116	5
10	98	2	105	5
11	104	1	103	10.5

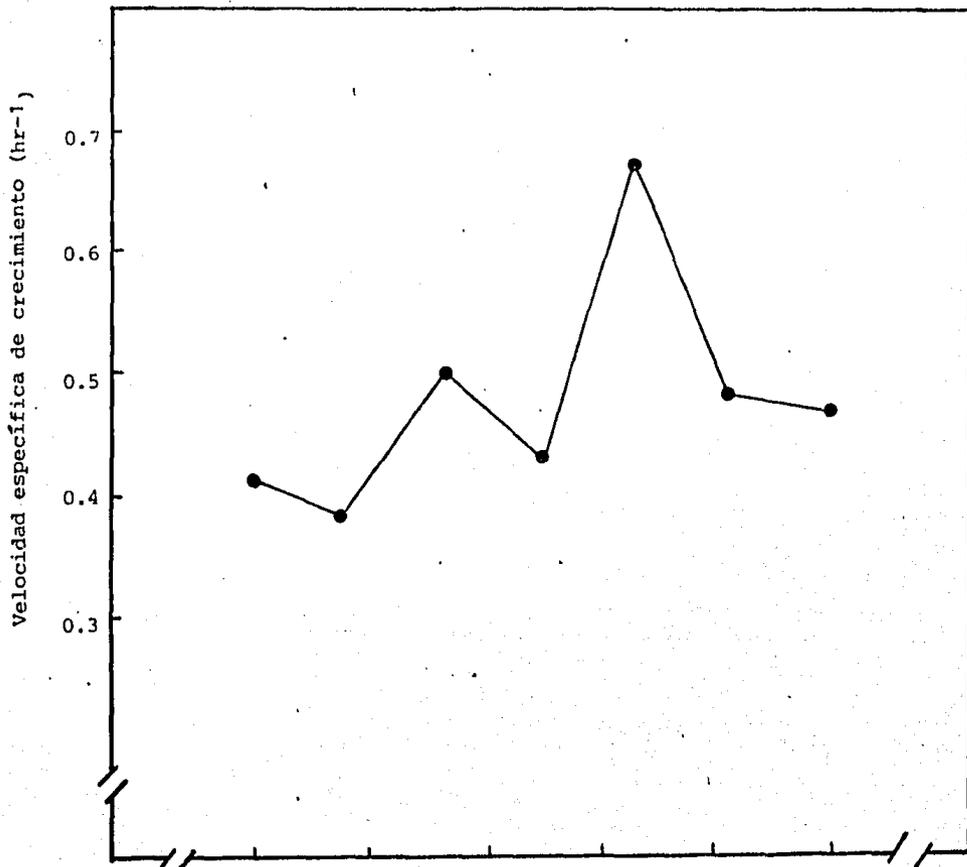
Los cultivos se desarrollaron en medio M-9 de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.8.(A). Los matraces se inocularon con 20% del volumen del cultivo anterior, el cual se incubaba durante 12 hrs. La segregación se calculó en función del número de colonias sensibles a ampicilina.

*Este valor pudo ser el resultado del bajo número de colonias probadas en ese caso.

reportado por Jones et al. (1980). Con las evidencias experimentales presentadas en este trabajo y de acuerdo a los datos de la literatura, es posible afirmar a manera de conclusión, que si se parte de un inóculo adecuado; esto es, con la mayor dosis de genes posible, no es necesaria la presión selectiva del antibiótico. Como se había concluido en la sección 5.1.2, la adición de ampicilina al medio de cultivo solo debe hacerse como medida extra de precaución, en las fases iniciales del proceso. Adicionalmente, es posible que la concentración mínima inhibitoria de ampicilina, pueda ser usada como herramienta para seleccionar poblaciones con elevado número de copias, en función de lo reportado por Jones et al. (1980).

5.1.7. Fuentes de Nitrógeno (Experimento 4.3.9. (A))

Con el fin de establecer la ventaja potencial de emplear casaminoácidos en la producción de proteína híbrida, se diseñó el experimento cuyos resultados se encuentran en la Figura 5.1.7.1. La estrategia fue sustituir gradualmente la peptona del medio M-9 por casaminoácidos, todo ello en base a nitrógeno total. Posteriormente, se determinó la velocidad de crecimiento y la producción de proteína híbrida por electroforesis. Los resultados indican que la velocidad de crecimiento es mayor al incrementarse la proporción de peptona. Y por otro lado, no existe una relación directa en la producción específica de proteína híbrida y la velocidad de crecimiento. Situación que pudiera estar relacionada con la dosis final de genes, de acuerdo a lo postulado por Engberg & Nordstrom (1975) y por Gustatsson & Nordstrom (1980). Es posible que las diferencias en las velocidades de crecimiento no fueron lo suficientemente grandes como -

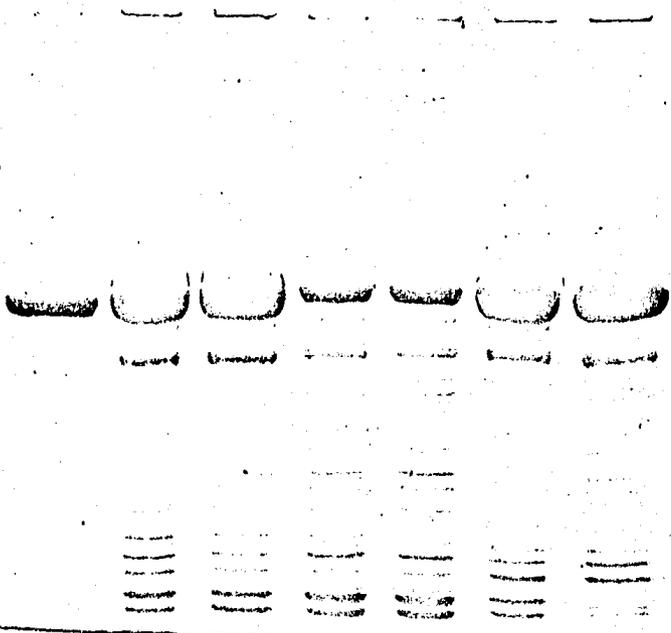


Peptona	0	20	40	60	80	100
Casaminoácidos	100	80	60	40	20	0

% de sustitución de la fuente compleja de nitrógeno



FIGURA 5.1.7.1 Efecto del tipo de fuente compleja de nitrógeno en la velocidad de crecimiento de *E. coli* MX-614 pBR-213 y en su capacidad de producción de proteína híbrida. Los cultivos se desarrollaron en el medio M9, sustituyendo progresivamente el contenido de peptona por casaminoácidos, como se indica. El gel corresponde a proteínas precipitables de un cultivo a las 12hrs. La cantidad de proteína en todos los carriles es la misma (200µg).



Carril 1 2 3 4 5 6 7

FIGURA 5.1.7.3 Efecto de la fuente de Nitrógeno y Carbono en la producción de proteína de cultivo de *E.coli* MX-614 pBR-213. El medio utilizado fue el M-9 con las siguientes modificaciones: Carriles 1 y 3 se sustituyó la peptona (Bioxon) por peptona industrial (Glucosa S.A.); Carriles 4 y 5 se sustituyó la peptona por sulfato de amonio en base a nitrógeno total; carriles 6 y 7 se sustituyó la glucosa por la misma concentración de sacarosa. Cada carril corresponde a un experimento individual. En todos los carriles la cantidad de proteína es la misma (30 µg) y corresponde a las proteínas precipitables de los cultivos a las 12 horas. En el carril 1 se incluye un patrón de β- galactosidasa (10 µg).

para observar cambios drásticos en la expresión de la proteína híbrida. Respecto a este fenómeno, se discutirá con más detalle en los experimentos descritos en las secciones 5.1.11. y 5.1.12. De cualquier manera, es posible concluir en este momento que el uso de casaminoácidos no representa una ventaja sustancial respecto a la producción de proteína híbrida y que, por otra parte, posee un costo muy superior al de la peptona y tiene problemas de disponibilidad en el país.

Con el propósito de investigar si era factible el uso de fuentes inorgánicas de nitrógeno; se sustituyó la peptona, en base a nitrógeno total, por sulfato de amonio, cloruro de amonio y urea. La razón de ello fue que estos compuestos tienen, por gramo de nitrógeno, un costo apreciablemente menor al de la peptona. Como puede observarse en la Figura 5.1.7.2., el empleo de fuentes inorgánicas de nitrógeno decremente importante la velocidad de crecimiento; como era lo esperado. La producción específica de proteína híbrida también sufre un decremento como se observa en los carriles 4 y 5 del gel de la Figura 5.1.7.3. (Experimento 4.3.10 (A)). Los valores de la velocidad de crecimiento y de la producción específica de proteína híbrida con este tipo de fuente de nitrógeno, establece como requisito el uso de fuentes orgánicas complejas de este nutriente, para elevar la productividad.

Un análisis preliminar de fuentes industriales de nitrógeno complejo se presenta en la Tabla 5.1.7.1 Como se puede ver, el medio M-9 contiene un exceso de nitrógeno. Esto como resultado de un balance de materia tomando como base la composición de la biomasa de E. coli (Bailey & Ollis, 1977 , p. 27). Por otra parte, la mayoría de las fuentes contienen

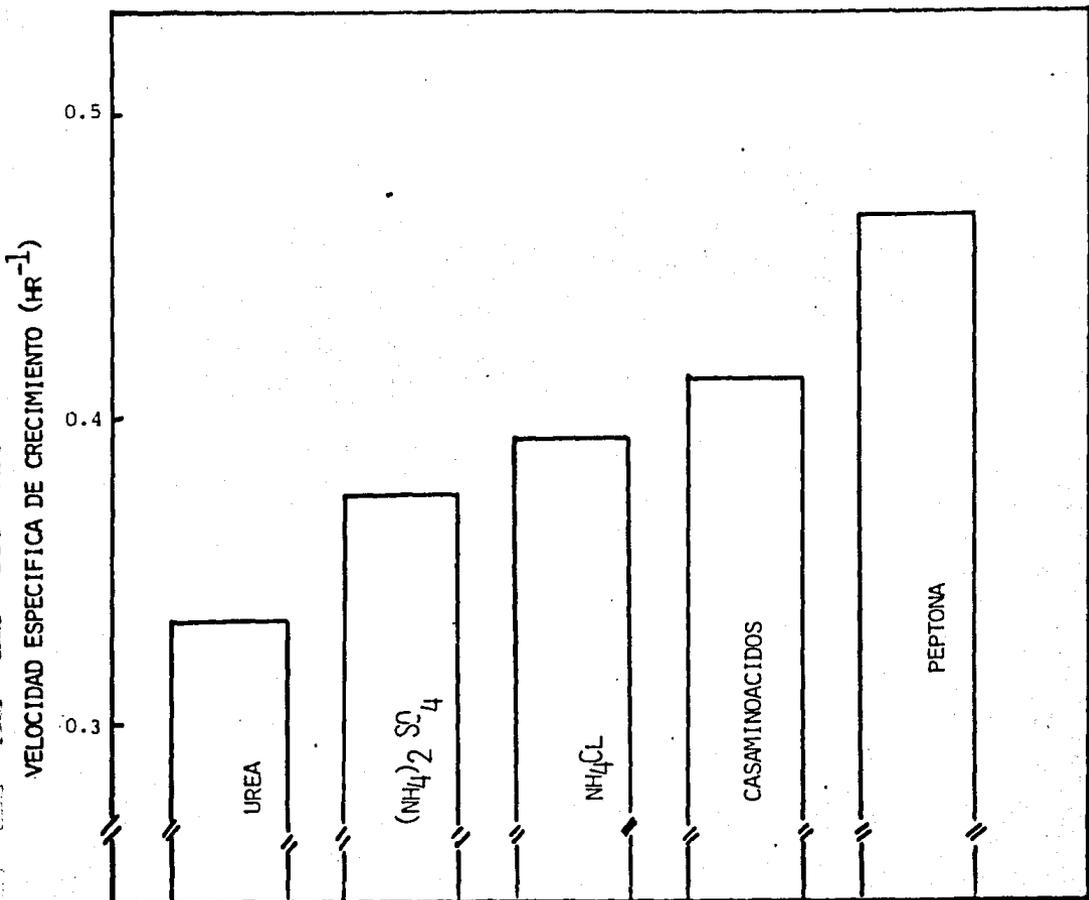


FIGURA 5.1.7.2 Efecto de la fuente de nitrógeno en la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* MX-614 pBR-213. Los cultivos se desarrollaron en el medio M9 al que se le substituyó la peptona por las sustancias indicadas, en base al mismo contenido de nitrógeno total. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.9 (A).

TABLA 5.1.8.1

CARACTERISTICAS DE FUENTES COMPLEJAS DE NITROGENO DISPONIBLES COMERCIALMENTE

Producto	Nitrógeno ¹⁾ (%)	Concentración ²⁾ equivalente al M-9 (g/l)	Concentración ³⁾ teórica requerida (g/l)	Solubilidad ⁴⁾ (g/l)
Licor de maíz	4	48	11.2	7.87
Extracto de levadura industrial	6	32	7.46	-
Harina de soya	6	27.4	6.4	1.48
Peptona de caseína	12.8	15	3.5	-
Pharmamedia ⁵⁾	59.2	3.24	0.756	1.78

1) Datos del fabricante

2) En función del contenido de nitrógeno en la peptona del medio M-9

3) Considerando una concentración de glucosa de 4 g/l como limitante del cultivo y en base a Quintero (1981) p. 223 - 231

4) Determinada experimentalmente

5) Pasta de semilla de algodón

materiales insolubles que complicarían los procesos de purificación posteriores a la fermentación. Además su fracción soluble no satisface los requerimientos teóricos del medio de cultivo. Las peptonas y extractos de levaduras industriales no presentan estos problemas y fueron los que se seleccionaron para continuar el trabajo experimental. En el gel presentado en la Figura 5.1.7.3. (Carriles 2 y 3) se observa que la peptona grado industrial puede sustituir a la peptona Bioxon, (Carriles 6 y 7) sin detrimento en los niveles de producción de proteína híbrida.

5.1.8. Fuente de carbono (Experimento 4.3.11. (A))

La glucosa es una fuente de carbono y energía que microorganismos tales como E. coli asimilan fácilmente. Tradicionalmente, este carbohidrato ha sido utilizado como fuente preferencial de carbono para el desarrollo de la bacteria en experimentos de laboratorio. Sin embargo, con fines de escalamiento, la glucosa no resulta conveniente en vista de su elevado costo y baja disponibilidad a nivel comercial. En nuestro país, el azúcar de caña o subproductos de su elaboración tales como la melaza; constituyen las alternativas viables para ser usadas como fuentes de carbono en procesos microbianos. En función de ello, se evaluó el uso de sacarosa industrial como materia prima para la producción de proteína híbrida.

De acuerdo a Heller y Wilson (1979) en general la bacteria Escherichia coli es impermeable a la sacarosa e incapáz de metabolizarla. Sin embargo, ha sido demostrado, que este microorganismo puede adquirir la capacidad para utilizar sacarosa como fuente de carbono y energía. --

Algunos autores indican que la información genética de esta característica se encuentra en plásmidos (Smith & Parsell, 1975; Palchaudhuri et al., 1977). Otros autores (Alaeddinoglu & Charles, 1979), demostraron que la capacidad para simular sacarosa se encuentra codificada en el cromosoma, y establecieron la posición relativa de los genes responsables. Por otra parte se ha observado (Alaeddinoglu & Charles, 1979) que para la expresión de la característica denominada sac⁺ (capacidad por crecer en sacarosa), se requiere de expresión de al menos un gene del sistema de la fosfo---transferasa utilizado para el transporte de carbohidratos (Roseman, 1969, 1972; Epstein et al., 1979). También se ha demostrado (Heller & Wilson, 1979) que la sacarosa puede ser transportada al interior de la célula por la permeasa del operón de la lactosa.

En función de los datos de la literatura, se investigó si la cepa utilizada en esta etapa del trabajo era capaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono y energía. Los resultados indicaron que la E. coli MX-614 era sac⁺, aunque no se realizaron intentos por caracterizar el --origen genético de esta capacidad metabólica. Sin embargo, puesto que la cepa utilizada es incapaz de transcribir los genes del operón de la lactosa, en vista de tener una deleción en el promotor lac, es improbable --que el transporte de sacarosa se lleve a cabo mediante la permeasa del --operón de la lactosa, según lo propuesto por Heller & Wilson (1979). En la Figura 5.1.8.1 se comparan las velocidades específicas de crecimiento desarrolladas por la bacteria que fue crecida en glucosa y en sacarosa. En el caso de la sacarosa, la velocidad de crecimiento tuvo un valor 2.5 veces menor que cuando se utilizó glucosa. Estas diferencias pueden estar

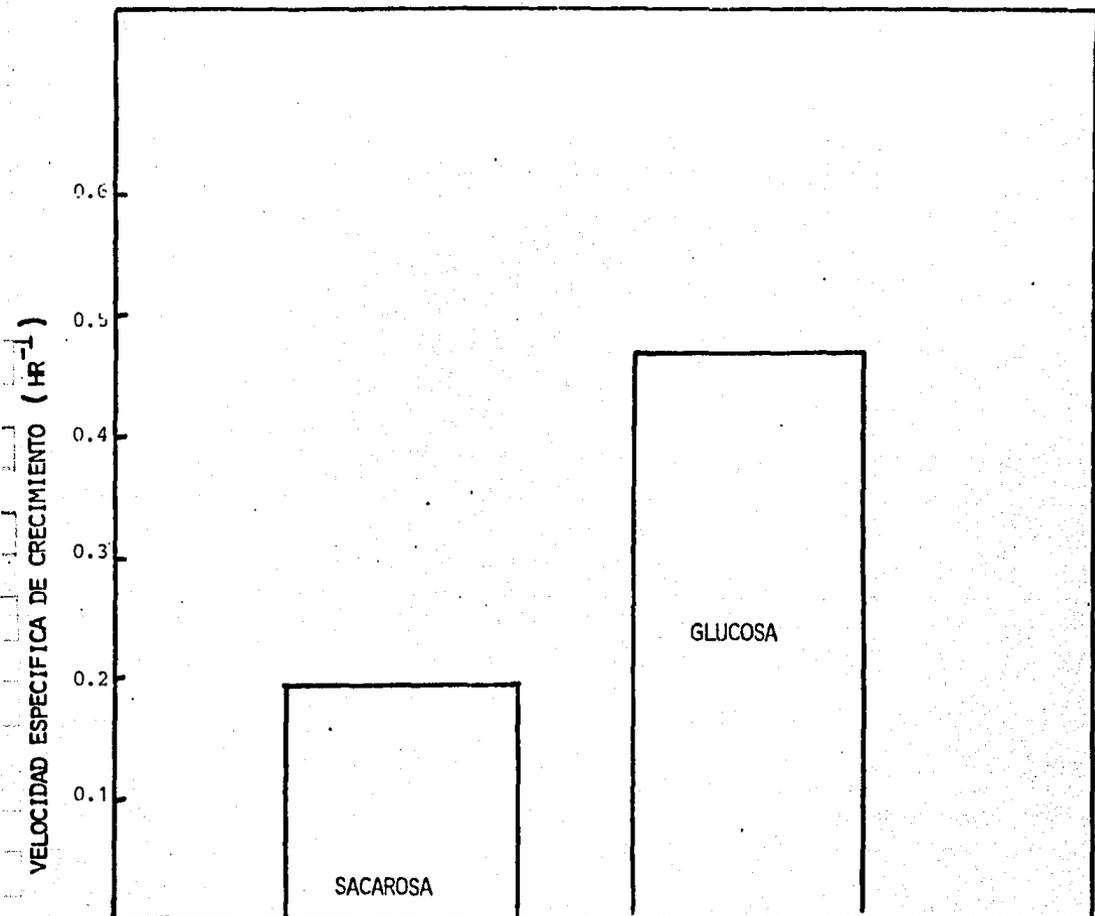


FIGURA 5.1.8.1 Velocidad específica de crecimiento de *E.coli* MX-614 pBR-213 - en función de la fuente de carbono utilizada en el cultivo. El medio fue el M-9 conteniendo glucosa y sacarosa, respectivamente, como única fuente de carbono.

indicando las eficiencias relativas de los sistemas de transporte y/o --
metabolismo de ambos azúcares. En los experimentos iniciales con sacaro--
sa, se obtuvo una fase lag de 8 - 10 hrs. Este periodo se redujo a cerca
de dos horas después de someter el inóculo o varios subcultivos en un me--
dio de la misma composición. El rendimiento de biomasa respecto a la --
fuente de carbono fue cercano a 0.25 g de células/g sacarosa en ausencia
de limitación del oxígeno. Este valor resulta ser la mitad del logrado -
con glucosa (ver sección 5.1.12.).

Una vez demostrada la viabilidad de usar sacarosa para el --
desarrollo del cultivo, se determinó su posible influencia en la produc--
ción de proteína híbrida. Los resultados se presentan en los carriles --
6 y 7 del gel cuya foto se incluye en la Figura 5.1.7.3. Es posible
afirmar que el empleo de sacarosa en el medio de cultivo no altera la bio--
síntesis de proteína híbrida, respecto a los testigos en los que la gluco--
sa fue la fuente de carbono (carriles 1 y 2 del gel de la misma Figura).

5.1.9. Efectos de la adición de sacarosa (Experimento 4.3.12. (A))

Como se demostró en el experimento anterior, es posible usar
sacarosa como fuente de carbono, sin menoscabo de la producción de protef--
na híbrida. Con el fin de elevar la densidad celular en el cultivo; y -
de esta manera incrementar la productividad; se experimento el efecto de
añadir sacarosa durante la fermentación. El cultivo se caracterizó ciné--
ticamente y los resultados se muestran en la Figura 5.1.9.1. El experi--
mento se realizó, con dos medios diferentes: el M-9 y el L-1, de los --
cuales ya se ha detallado su composición (ver Materiales y Métodos, sec-

D₅₆₅ NM (DILUCIÓN 1/10)

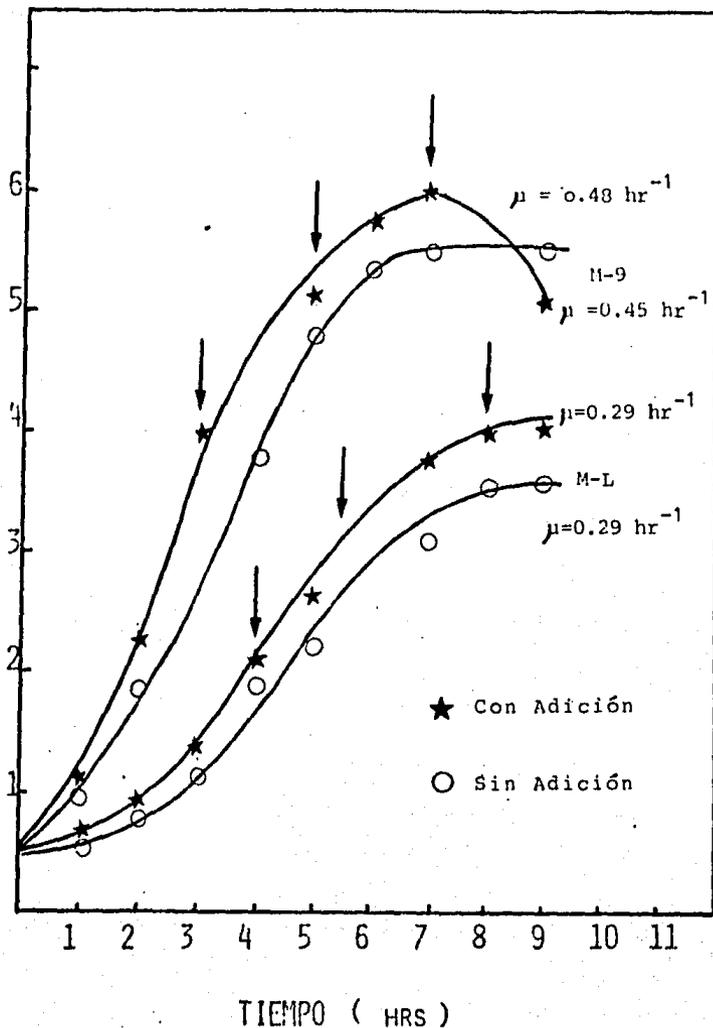


FIGURA 5.1.9.1 Efecto de la adición de sacarosa a un cultivo de *E.coli* MX-614. Los medios utilizados fueron el M-9 conteniendo sacarosa como fuente de carbono y el medio balanceado M-L de acuerdo a lo indicado. Las flechas corresponden al momento en el que se realizó la adición. Se presentan experimentos testigo a los que no se les hizo adición alguna. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) son las indicadas. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.13 (a).

ción 4.2.1.). Las adiciones al medio L-1 incrementan la concentración celular final pero no la velocidad de crecimiento. Esto puede ser el reflejo de que tal medio se encuentra balanceado en cuanto a requerimientos de carbono y nitrógeno de E. coli. En este caso, el crecimiento parece estar limitado por un componente diferente a la fuente de carbono. Por el contrario, las adiciones de sacarosa al medio M-9, indican que el cultivo se encuentra limitado por la fuente de carbono. Esto es claro ya que al disponer con mayor cantidad de sacarosa la velocidad de crecimiento se incrementa. En ambos casos, la concentración celular se logra incrementar entre 9 y 14%. Si estos experimentos fueran reproducibles en tanques de fermentación, se recomienda realizar adiciones de sacarosa con el fin de elevar la productividad y por otra parte incrementar la eficiencia de la centrifugación de células. En la literatura (Bauer & Shiloach, 1974; Shiloach & Bauer, 1975; Bauer & Ziv, 1976) se han reportado procedimientos que logran concentraciones celulares de hasta 55 g/l; mediante adiciones controladas de la fuente de carbono, regulación de la temperatura y suministro de oxígeno puro.

5.1.10. Efecto del cultivo de la cepa transformada durante períodos prolongados y en presencia de bajas concentraciones de ampicilina - sobre la producción específica de proteína híbrida y segregantes. (Experimento 4.3.1.14. (A)).

En vista de los resultados que se obtuvieron en los experimentos de conservación de la cepa, relacionados con la producción específica de proteína híbrida; se trató de identificar algunas de las posibles causas que podrían disminuir la capacidad de síntesis de esta proteína en un cultivo. Para ello se diseñó un experimento en el que se partía de una -

población bacteriana, almacenada en glicerol, que presentaba elevada capacidad de síntesis, de acuerdo a las dimensiones relativas de la banda que comigra con β -galactosidasa en el gel resultado de la electroforesis. A este cultivo se le sometió a varios subcultivos, un total de diez, en el medio M-9, con la única diferencia de que al principio de cada fermentación, se adicionaba ampicilina en niveles bajos (10 $\mu\text{g/ml}$). El inóculo inicial se obtuvo directamente del glicerol, sin ninguna purificación y selección de la cepa. Cabe hacer notar que para la manufactura de los gliceroles esta purificación y selección si se llevó a cabo. Los resultados de este experimento se encuentran ilustrados en la Figura 5.1.10.1. La banda correspondiente a la proteína híbrida, del décimo subcultivo (carriles 3 y 9) se vió disminuída apreciablemente respecto al primer cultivo (carriles 1 y 6). Con el fin de determinar si se trataba de un fenómeno de segregación, como se había observado en experimentos anteriores, se probó la resistencia a ampicilina de un total de 35 colonias aisladas, en medio sólido en caja Petri conteniendo 100, 250, 500, 750, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico. En todos los casos se observó crecimiento de las 35 colonias.

Los resultados anteriores indican claramente que la capacidad de síntesis de proteína híbrida de una población puede ser disminuída sin pérdida de la resistencia a altas concentraciones de ampicilina. Esto hace pensar que el fenómeno de segregación observado como la resistencia/no-resistencia a ampicilina, constituye un caso extremo. Ello en vista de que es posible perder gradualmente la capacidad de síntesis de proteína híbrida. A este fenómeno le hemos llamado "segregación diferencial".

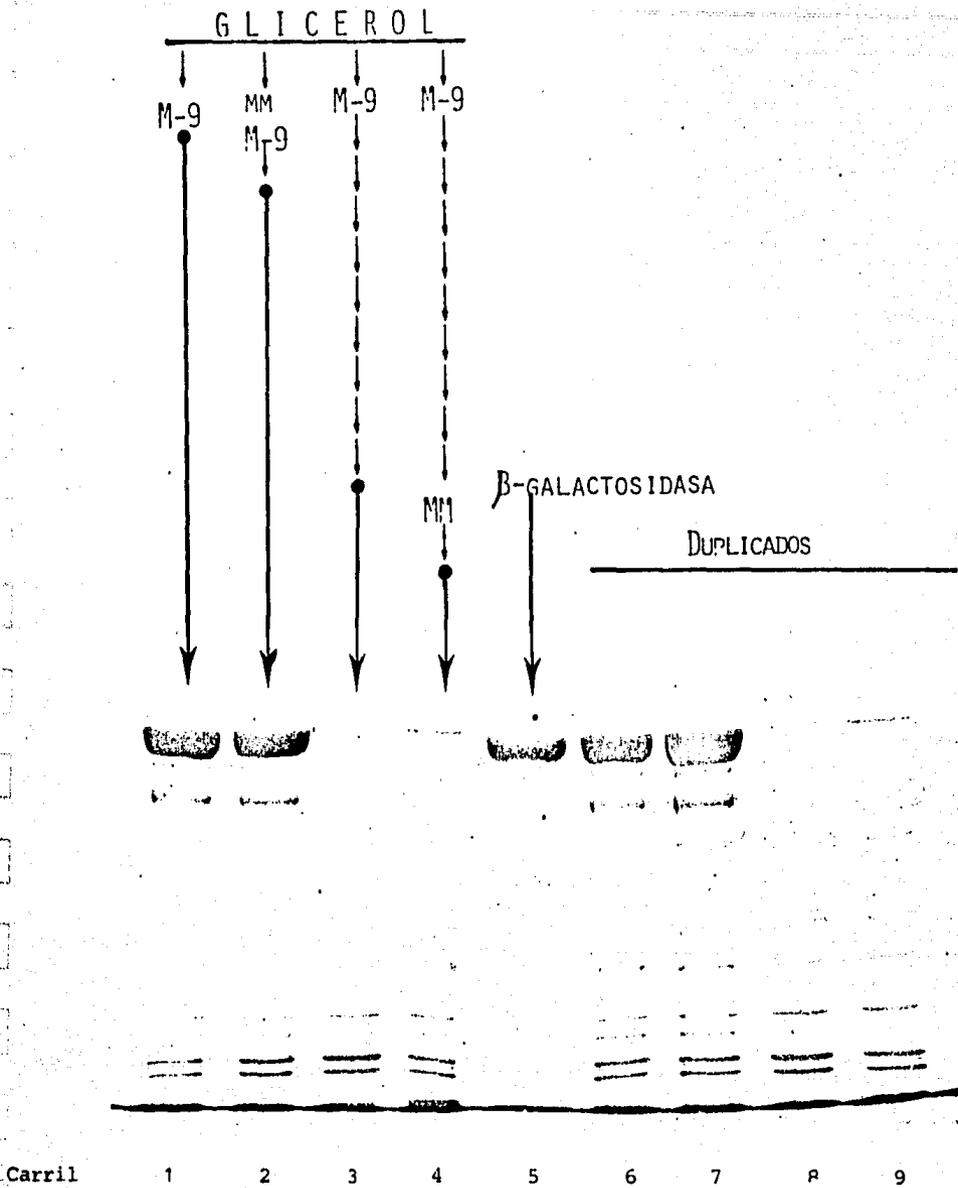


Figura 5.1.10.1 Efecto del cultivo repetido de *E. coli* MX-614 pBR-213 -, en el medio M-9 conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina al inicio de la fermentación. El cultivo se inició de un glicerol y desarrollando la bacteria en los medios señalados, M-9: M-9, MM: medio mínimo. Cada flecha indica un cultivo. El gel muestra las proteínas precipitables de células desarrolladas en medio M-9, de cada una de las condiciones, en todos los casos la proteína aplicada a cada carril fue la misma (30 μg). Se incluye un patrón de β -galactosidasa (10 μg) en el carril 5. Los carriles 6,7,8 y 9 son el resultado de experimentos por duplicado de los incluidos en los carriles 1,2,3, y 4 respectivamente. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.16 (A).

Hasta donde se conoce, no existen reportes en la literatura respecto a este fenómeno. Sin embargo, es muy posible que su causa sea la disminución del número promedio de copias del plásmido existentes en la población bacteriana. Ello es congruente con la conservación de la resistencia a ampicilina puesto que basta un bajo número de copias para mantener tal característica. Jones et al (1980) reportaron un fenómeno similar con el plásmido pDS-1109 en donde se observa una disminución progresiva del número de copias cuando la bacteria se somete a cultivo continuo y sin presión selectiva. Estos autores indican que la segregación final (sensibilidad a ampicilina) es la consecuencia de la disminución progresiva del número de copias. Adicionalmente, Wouters et al (1980) encontraron que la actividad de β -lactamasa del cultivo decrece significativamente antes de encontrar células sensibles al antibiótico, lo que refuerza la idea de que la segregación es la consecuencia final de la disminución del número de copias. Lo anterior, en vista de que se ha reportado que la actividad de β -lactamasa es un indicativo del número de copias del plásmido que codifica a la enzima (Nordstrom, et al., 1972). Por otra parte, O'Farrel et al. (1978) han reportado específicamente para proteínas híbridas de β -galactosidasa codificadas por plásmidos, que el nivel de expresión es proporcional al número de copias del gene, presente en la célula. Sin embargo, en la literatura no existen reportes que hablen de la estabilidad en la expresión de proteínas codificadas por plásmidos recombinantes. Los trabajos publicados, como se discutirá en la sección 5.1.11., se refieren a la estabilidad de los plasmidos per se y no respecto a los niveles finales de expresión de productos codificados en el ADN del plásmido recombinante.

Para concluir definitivamente si la responsabilidad de este fenómeno radica en el número de copias, es necesario medir directamente el ADN extracromosomal. Sin embargo, si fuera el caso, podría explicarse indirectamente con evidencias reportadas en la literatura: de manera general las bacterias conteniendo plásmidos crecen más lento que sus respectivas silvestres (Zund & Lebek, 1980), lo que hace pensar que las poblaciones con menos plásmidos crecerán más rápidamente respecto a aquellas que contengan más plásmidos.

Puesto que la ampicilina se degrada muy rápidamente, siendo suficiente con la β -lactamsa contenida en el inóculo, la presión selectiva realmente existe por muy poco tiempo y es posible que durante los subcultivos se seleccionen poblaciones con un contenido promedio menor de plásmidos en vista de que tienen ventajas en la velocidad de crecimiento.

Alternativamente, este fenómeno puede ser explicado en función de lo reportado por Engberg & Norstrom (1975), quienes demostraron que el número promedio de copias por genoma desciende al incrementar la velocidad de crecimiento. En vista de que la bacteria fue crecida varias veces en un medio rico, donde podía desarrollar una velocidad de crecimiento elevada, la población pudo haber disminuído su número promedio de copias y por lo tanto su capacidad de sintetizar proteína híbrida. Esta hipótesis no descarta el hecho reportado por Balbas (1981) respecto a -- que la bacteria conteniendo el plásmido crece más rápidamente que la que no lo tiene, en el medio M-9 y a 37°C. Lo anterior se reafirma con el hecho de que no se encontraron segregantes al final de los subcultivos, indicando que la competencia en el cultivo pudo haberse realizado entre

poblaciones con diferentes números de copias y no entre bacterias con y -
sin plásmidos.

De cualquier modo, el estudio detallado de este fenómeno en -
particular, cae fuera de los alcances de este trabajo. Sin embargo, tie-
ne tres implicaciones prácticas de gran importancia:

- a) Es posible contar con poblaciones de bacterias con diferentes --
capacidades de síntesis de proteína híbrida.
- b) La resistencia a ampicilina no es una garantía de síntesis espe-
cífica elevada de proteína híbrida.
- c) Las cepas almacenadas pueden disminuir su capacidad de síntesis
de proteína híbrida si se le somete a numerosos subcultivos, como
en el caso del desarrollo de inóculos para el escalamiento, la --
adaptación a nuevos medios de cultivo o el cultivo retroalimenta
do.

5.1.11. Efecto del ayuno de aminoácidos en la capacidad de la cepa para
sintetizar proteína híbrida (Experimento 4.4.14. (A))

Ante el problema descrito en el experimento mencionado ante--
riormente la pregunta que surge es: ¿cómo incrementar la capacidad de --
síntesis de proteína híbrida de una población que la ha disminuído?. Con
este objetivo se cultivó repetidamente la población bacteriana resultado
del décimo subcultivo del experimento anterior en un medio mínimo conte--
niendo los requerimientos de aminoácidos. Se empleó NH_4Cl como única --
fuente de nitrógeno y 100 $\mu\text{g/ml}$ iniciales de ampicilina. Los resultados
se encuentran ilustrados en las Figuras 5.1.10.1, 5.1.11.1. y 5.1.11.2. -

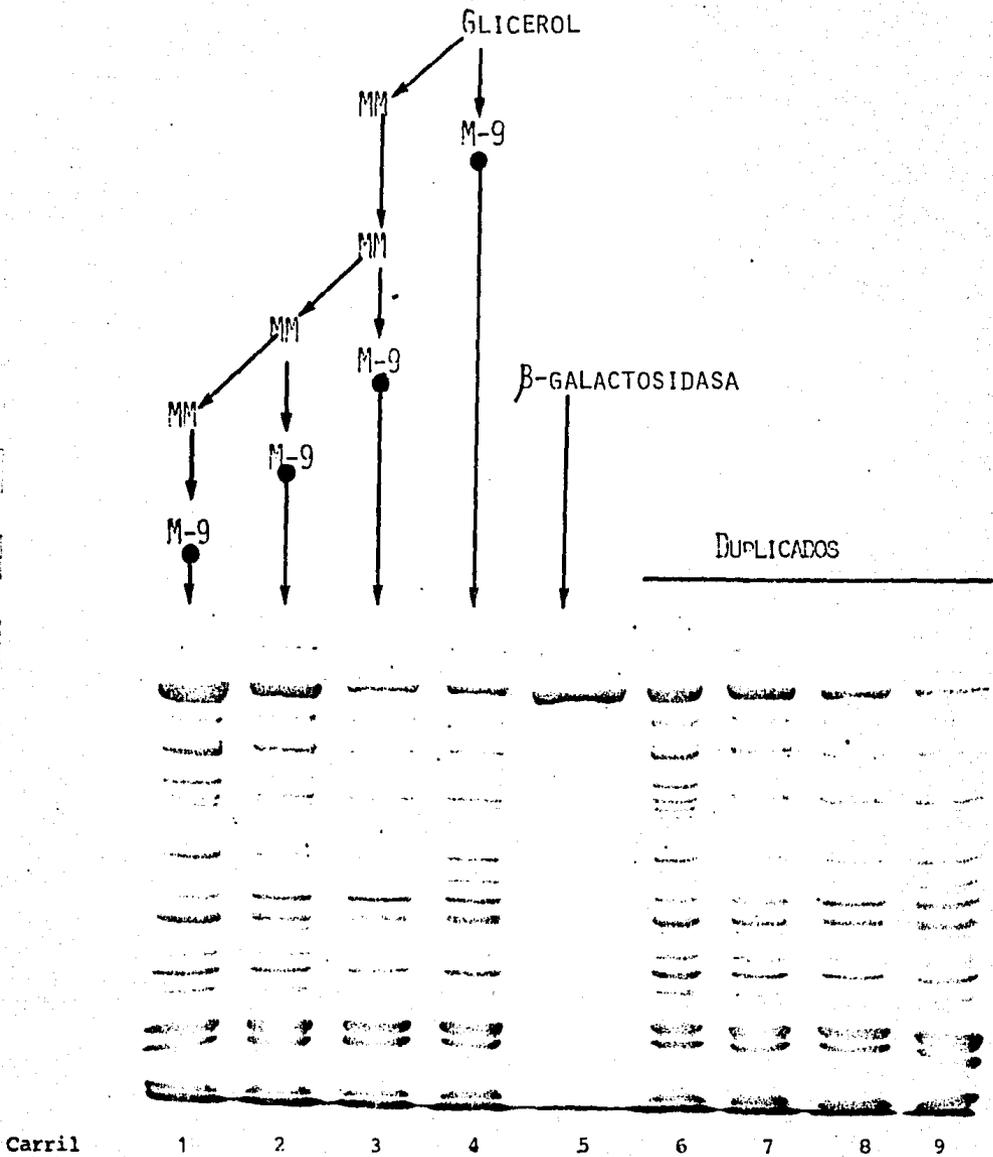


FIGURA 5.1.11.1 Efecto del subcultivo de *E. coli* MX-614 pBR-213 en ayuno de aminoácidos sobre la capacidad de producción de proteína híbrida. Los cultivos se iniciaron de un glicerol y se transfirieron a medio mínimo (MM) las veces indicadas. Los cultivos finales se crecieron en medio M-9. El gel corresponde a proteínas precipitables; en cada uno de los carriles la cantidad de proteína es la misma (30 μ g). Se incluye un patrón de β -galactosidasa (10 μ g) en el carril 5. Los carriles 6,7,8 y 9 corresponden al duplicado de los experimentos incluidos en los carriles 1,2,3 y 4. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.15 (A).

Como puede observarse en los carriles 4 y 9 del gel incluido en la Figura 5.1.10.1, con tan solo un pase en medio mínimo se logra un incremento -- apreciable de las dimensiones relativas de la banda que comigra con β -galactosidasa, respecto al medio fue cultivado en ayuno de aminoácidos -- (carriles 3 y 8). En la Figura 5.1.11.1. es posible observar el fenómeno con más detalle. En ella se demuestra que la síntesis específica de proteína híbrida se incrementa gradualmente, de acuerdo al número de pases a que fue sometido el cultivo a medio mínimo. En la Figura 5.1.11.2. se -- encuentra en el mismo gel el resultado de incubar la cepa durante siete - cultivos en ayuno de aminoácidos, y el cultivo original. Es claro que -- las dimensiones relativas de la banda correspondiente a proteína híbrida es apreciablemente mayor en el séptimo subcultivo respecto al cultivo original. Hasta donde se conoce, no existen reportes en la literatura que - se refieran específicamente a la influencia en los niveles de expresión - del producto de un gene recombinante, en función al ayuno de aminoácidos.

Sin embargo, estos experimentos refuerzan la hipótesis de la "segregación diferencial" y de que su probable causa sea el número de copias del plásmido contenido en la bacteria. Se ha reportado (Bazarał & Helinski, 1970) para plásmidos del tipo Col E₁, que durante el ayuno de aminoácidos la velocidad de replicación del ADN del plásmido es entre 2 y 2.5 veces - mas elevada que en condiciones de no ayuno, mientras que la velocidad de síntesis de ADN cromosomal disminuye progresivamente. De esta manera se logra un enriquecimiento en el número promedio de copias de la población bacteriana.

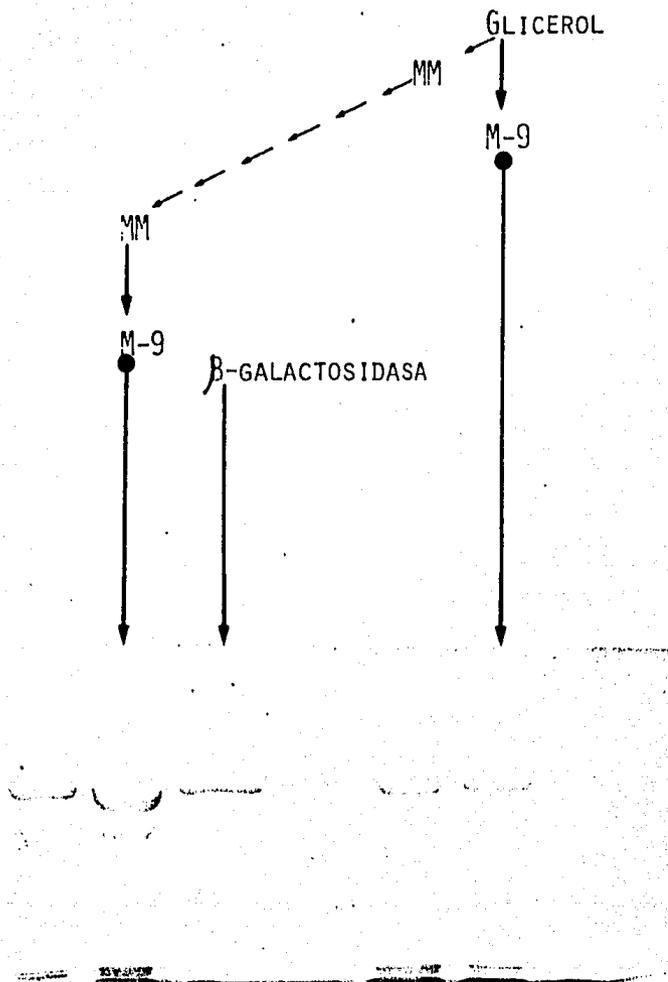


FIGURA 5.1.11.2 Efecto del subcultivo de *E. coli* MX-614 pBR-213 en ayuno de aminoácidos sobre la capacidad de producción de proteína híbrida. Los cultivos se iniciaron a partir de un glicerol y se subcultivaron en medio mínimo (MM) durante las veces que indican las flechas, al final se desarrolló la bacteria en medio M-9. La cantidad de proteína en los carriles indicados fue constante (30 µg). Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.15 (A).

Por otra parte Collins & Pritchard (1973) han reportado que la relación entre el número de copias de un plásmido $P' lac$ y el ADN cromosomal decrece al incrementarse la velocidad de crecimiento, esto es, a velocidades de crecimiento bajas, como en un medio mínimo, se propicia un incremento en el número de copias del plásmido. Engberg & Nordstrom (1975) reportaron también que la dosis de genes (copias de factores R por genoma) decrece al aumentar la velocidad de crecimiento pero que la eficiencia de expresión (α) de la proteína codificada por el plásmido, se incrementa con la velocidad de crecimiento. Los resultados de este último reporte son congruentes con las evidencias experimentales presentadas en este trabajo (Figura 5.1.10.1., 5.1.11.1. y 5.1.11.2.). El ayuno de aminoácidos limitó la velocidad de crecimiento y en consecuencia se pudo haber incrementado la dosis del plásmido en la población bacteriana. Puesto que el último cultivo se desarrolló en un medio rico (el M-9), se elevó la velocidad de crecimiento y por lo tanto la eficiencia de expresión (α). De acuerdo a la literatura (Gustrafsson & Nordstrom, 1980), al cambiar un cultivo a un medio en el que desarrolle una velocidad de crecimiento diferente a la inicial, se efectúan gradualmente ajustes en el número de copias hasta llegar a los niveles en "equilibrio" con la velocidad de crecimiento desarrollada en el último cultivo. Esto significa que muy probablemente, al final del cultivo en el medio M-9, el número promedio de copias del plásmido por genoma, sea muy similar independientemente del tratamiento que se le haya dado previamente al inóculo. Es muy posible que los altos niveles de expresión de la proteína híbrida encontrados en este trabajo se deban a un incremento en el número de copias del plásmido en la población que constituye el inóculo. El hecho de observar mayor ex

presión específica puede ser el resultado global del ajuste gradual en el número de copias en el cultivo de producción. Este hecho sugeriría utilizar inóculos proporcionalmente mayores y que hayan sido desarrollados en condiciones de ayuno de aminoácidos, con el fin de incrementar la producción específica de proteína híbrida.

Desde el punto de vista práctico, los resultados de este experimento permiten contar con una metodología sencilla para incrementar o uniformizar la capacidad de biosíntesis de proteína híbrida. Por otra parte, existen ventajas adicionales en el desarrollo de los inóculos. -- Entre ellas se cuenta una mayor selectividad del medio de cultivo, lo -- que disminuiría el riesgo de contaminaciones y también se eliminaría la fase lag en el cultivo de producción, al provenir el inóculo de un medio menos rico. Adicionalmente, es posible indicar, a raíz de estas hipótesis, que no se esperaría que el cultivo continuo fuera del todo adecuado para elevar la productividad de proteína híbrida. La inestabilidad de un plásmido recombinante (Dwivedi et al., 1982) ha sido la causa por la que no se ha podido usar el cultivo continuo en la producción de triptófano.

Cabe hacer la aclaración que el subcultivo por más de 7 pases en un medio mínimo provoca inestabilidad en la expresión de proteína híbrida. A estos cultivos se les verificó la presencia del plásmido (experimento realizado por el grupo de Biología Molecular) y se encontró que su patrón de restricción era el adecuado. Aparentemente, el plásmido sufrió una mutación que no pudo ser detectada por los patrones de restricción. Esta técnica solo permite identificar lesiones de un tamaño con-

siderable y no es capaz de discernir aspectos regulatorios en la expresión del gene. El fenómeno de inestabilidad puede deberse a que la elevada síntesis de proteína híbrida, por otra parte insoluble, y de manera constitutiva, constituya una desventaja selectiva de las bacterias que tienen esta información genética y que por lo tanto se seleccionen aquellas bacterias que no producen proteína híbrida. En la literatura, se ha reportado la desventaja selectiva que ejerce la biosíntesis de proteínas no funcionales en E. coli (Andrews & Hegeman, 1976) y existe evidencia para plásmidos recombinantes que sufren de lesiones y segregación -- cuanto más elevada es la expresión de las enzimas codificadas por el -- plásmido (Imanaka et al., 1980, Imanaka et al., 1981). También se ha reportado que pueden existir mutaciones tanto en el cromosoma como en el plásmido, que originen una ventaja selectiva a la población bacteriana -- conteniendo los plásmidos "modificados" (Helling et al., 1981). Como conclusión de todo lo mencionado anteriormente, puede decirse que el incremento en la producción de proteína híbrida, mediante el subcultivo en medio mínimo parece tener un límite probablemente establecido por la capacidad de mutación y adaptabilidad del sistema bacteria-plásmido.

5.1.12. Experiencia semi-piloto (Experimento 4.3.16. (A))

Con el fin de iniciar el escalamiento del proceso de fermentación y detectar las posibles limitantes en la producción de proteína híbrida; se llevaron a cabo corridas en fermentadores de 14 lts de capacidad. Como objetivo adicional, estos lotes de cultivo servirían para producir células y contar con materia prima suficiente para los estudios

de los pasos posteriores del proceso dentro del proyecto global. La ciné tica de una fermentación típica se encuentra en la Figura 5.1.12.1. Los patrones de pH, crecimiento celular y degradación de ampicilina son muy - similares a los obtenidos en matraces. En todos los casos, antes de cen- trifugar el cultivo, se corrieron electroforesis y se detectó la presencia de proteína híbrida en cantidades elevadas y sin aparente variación entre los lotes, como puede observarse en las fotos de los geles incluidos en - la Figura 5.1.12.2. En uno de los cultivos se realizó la prueba para de- tectar segregantes; de un total de 100 colonias no se detecto ninguna sen sible a ampicilina.

Algo muy importante para el escalamiento será la calidad del agua que se emplee para preparar el medio de cultivo. Hasta este momento, en el desarrollo del trabajo experimental se ha usado agua destilada en el medio de cultivo. Sin duda, al escalar el proceso, no será factible el -- uso de agua con pureza similar a la destilada. En función de ello, algu-- nos de los lotes de fermentación en equipos de 14 lts se realizaron usando agua de la llave sin ningun tratamiento, con el fin de evaluar su influen- cia en el cultivo. En la Figura 5.1.12.3. se presentan los resultados, - en función de la velocidad específica de crecimiento. Prácticamente no - existe diferencia alguna entre el empleo de agua de una u otra calidad. - En ambos casos se observó en los resultados, una desviación estandar respecto a la media del 4-5. Estas diferencias pueden estar ocasionadas por la compo- sición de los lotes de peptona que se utilizaron, o bien por las condicio- nes de esterilización. Estas diferencias también se observaron en los ex perimentos en matraces (ver sección 5.1.4.). Como conclusión respecto al

agua empleada para preparar el medio de cultivo es posible afirmar que no existe ninguna ventaja significativa cuando se usa agua destilada y es -- posible el empleo del agua de la llave sin problema alguno.

El oxígeno disuelto fue otro parámetro que se midió en el trans curso de la fermentación. Los resultados de dos corridas típicas se ilus tran en la Figura 5.1.12.4. En aquellos cultivos en los que la agitación fue mantenida entre 300 y 350 rpm a lo largo de la determinación, se obser vó que el oxígeno disuelto es cero entre la segunda y cuarta hora del cul- tivo, coincidiendo con la fase logarítmica de crecimiento. Cuando los ni- veles de oxígeno disuelto se controlaron por arriba del 10% de saturación variando la agitación (hasta un máximo de 450 rpm en las fases críticas) - se observó un incremento en la velocidad específica de crecimiento. Esto - indica que el cultivo desarrollado a 350 rpm se encuentra limitado por oxí geno en la fase exponencial de crecimiento. En ausencia de esta limitación, es posible elevar la velocidad de crecimiento hasta en un 28% respecto a - los lotes que se corrieron a una agitación constante de 350 rpm.

En la Tabla 5.1.12.1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en equipos de 14 lts. Uno de los aspectos que debe resaltarse, - es que no son necesarios los aminoácidos que se agregaban normalmente al - medio M-9. Ello se hacia como medida de seguridad en vista de que la cepa es auxótrofa de prolina, valina e isoleucina. La peptona puede satisfacer adecuadamente estos requerimientos. Esto tiene implicaciones importantes en el escalamiento, ya que no será necesario adicionar los aminoácidos libres, que elevarían sustancialmente el costo de las materias primas en la fermentación.

En los casos en que se aseguró que no existiera limitación de oxígeno, se logró la velocidad de crecimiento más alta (cercana a $0.9, \text{hr}^{-1}$) y también, la concentración células más elevada. En estas condiciones, - el rendimiento de biomasa respecto a la fuente de carbono fue cercano a -

Ampicilina (ug/ml)

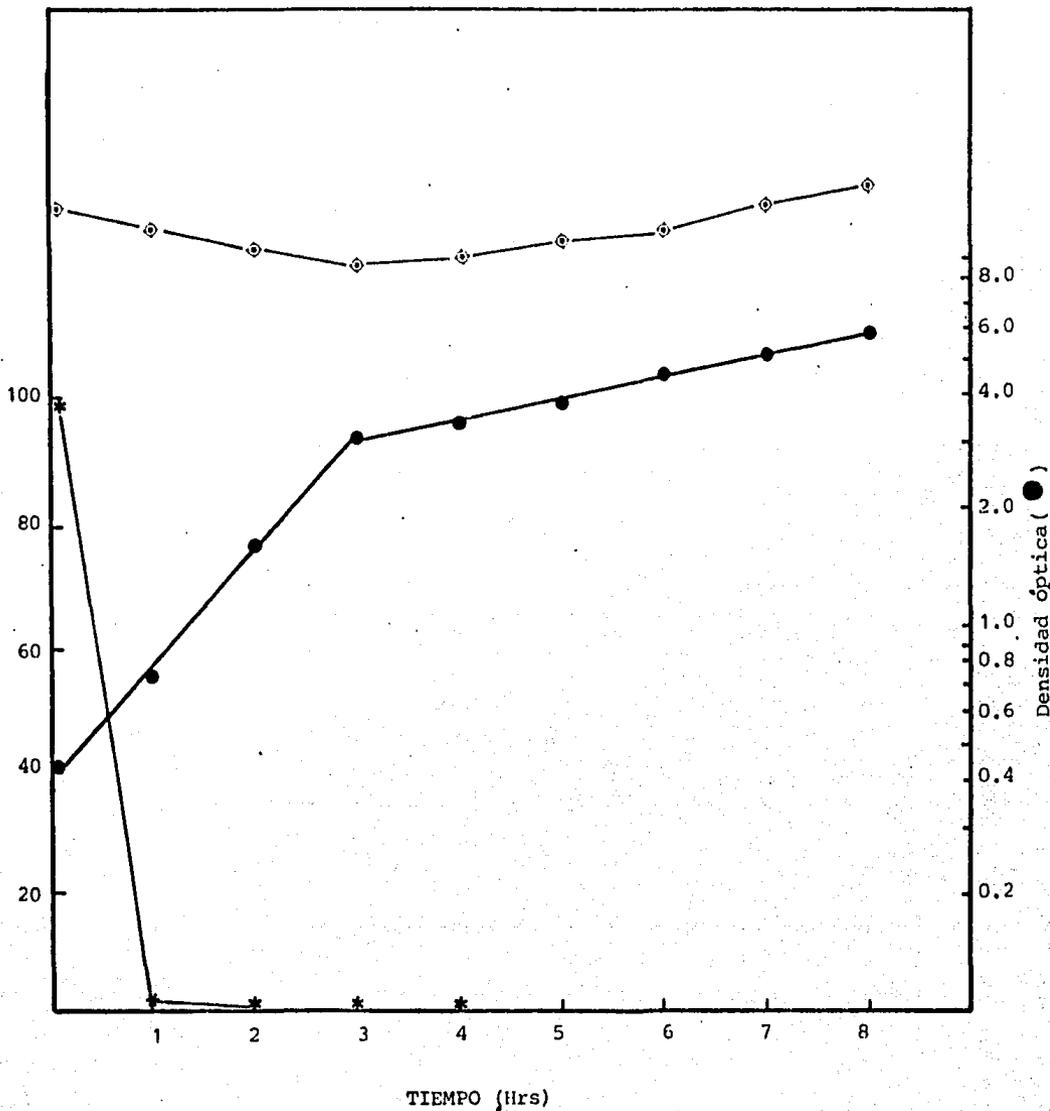


FIGURA 5.1.12.1 Comportamiento cinético típico de un cultivo de *E.coli* MX-614 pBR-213 en fermentador de 14 lts. El medio utilizado fué el M-9. Agitación 300-350 rpm, aireación 1v/v/m. Otras condiciones se especifican en la sección 4.3.17 (A). A la séptima hora del cultivo se analizaron 300 colonias de una dilución apropiada y no se observó segregación del plásmido. La electroforesis realizada a las proteínas precipitables de una muestra de la octava hora indicó la presencia de proteína híbrida.

Lote

1

β - gal

2

3

4



Lote

5

6

β - gal

7

8

9



FIGURA 5.1.12.2 Resultado de la electroforesis realizada a las proteínas precipitables de muestras de los cultivos producidos en fermentadores de 4 lts. que se detallan en la Tabla 5.1.12.1. En todos los casos la proteína total aplicada a cada carril fue de 30 μ g. Se incluyen patrones de β -galactosidasa (10 μ g) (β - gal). Los números corresponden a los lotes de la tabla 5.1.12.1.

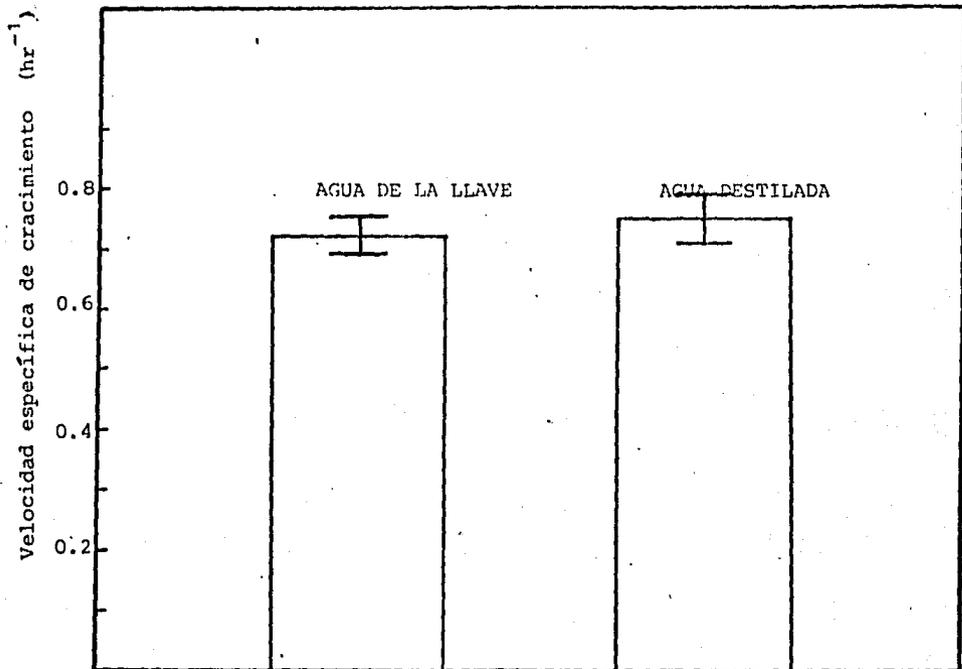


FIGURA 5.1.12.3 Efecto de la calidad de agua utilizada para preparar el medio de cultivo (M-9) en la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* MX-614 BR-213 en fermentadores de 14 lts. Volumen de trabajo: 10 lts, aireación: 1 v/v/m, ampicilina 100 µg/ml (inicial), agitación: 300-400 rpm. Los resultados son el promedio de tres lotes.

TAELA 5.1.12.1

CARACTERISTICAS DE LOS LOTES DE FERMENTACION DE E. coli MX-614 pBR-213
 PRODUCIDOS EN EQUIPOS DE 14 LTS.

Lote	μ_{-1} (hr ⁻¹)	Densidad optica final	pH		Observaciones
			inicial	final	
1	ND	0.63	ND	6.69	Medio M-9 conteniendo además 1 g/l de casa-aminoácidos. 350 rpm, 12 hrs.
2	ND	0.77	7.04	6.81	Idem anterior
3	ND	1.0	6.99	7.15	Idem anterior
4	ND	0.94	7.19	7.31	Idem anterior, solo -- que a 450 rpm.
5	0.65	0.82	6.75	6.67	Medio M-9. 300-400 rpm 9 horas.
6	0.458	0.42	7.0	7.01	Medio M-9, solo que - con 0.01 g/l de amino-ácidos. 350 rpm. 9 horas.
7	0.592	0.54	7.01	6.53	Medio M-9 sin aminoáci dos. 200 rpm. 9 horas.
8	0.88	1.04	7.17	7.24	Medio M-9 sin aminoáci dos. 350-450 rpm. Oxíge no disuelto mayor a 10% saturación. 9 hrs.
9	0.918	0.95	7.01	6.93	Idem anterior

Los cultivos se llevaron a cabo en fermentadores New Brunswick con 10 lts. de medio. Inóculo: 500 ml de un cultivo de toda la noche en medio M-9. Aireación: 1 v/v/m a 10 psi de presión. La μ fué calculada con los datos de densidad óptica de las primeras horas de crecimiento. En este caso la densidad óptica se midió a diluciones 1/20 y los valores indicados estan - multiplicados por dos para referirlos a la dilución 1/10 que se emplea en la mayor parte de los resultados de este trabajo. Al final de cada cultivo se llevó a cabo electroforesis para detectar la presencia de proteína - híbrida, las fotos de los geles correspondientes se presentan en la Figura 5.1.12.2.

ND = no determinada

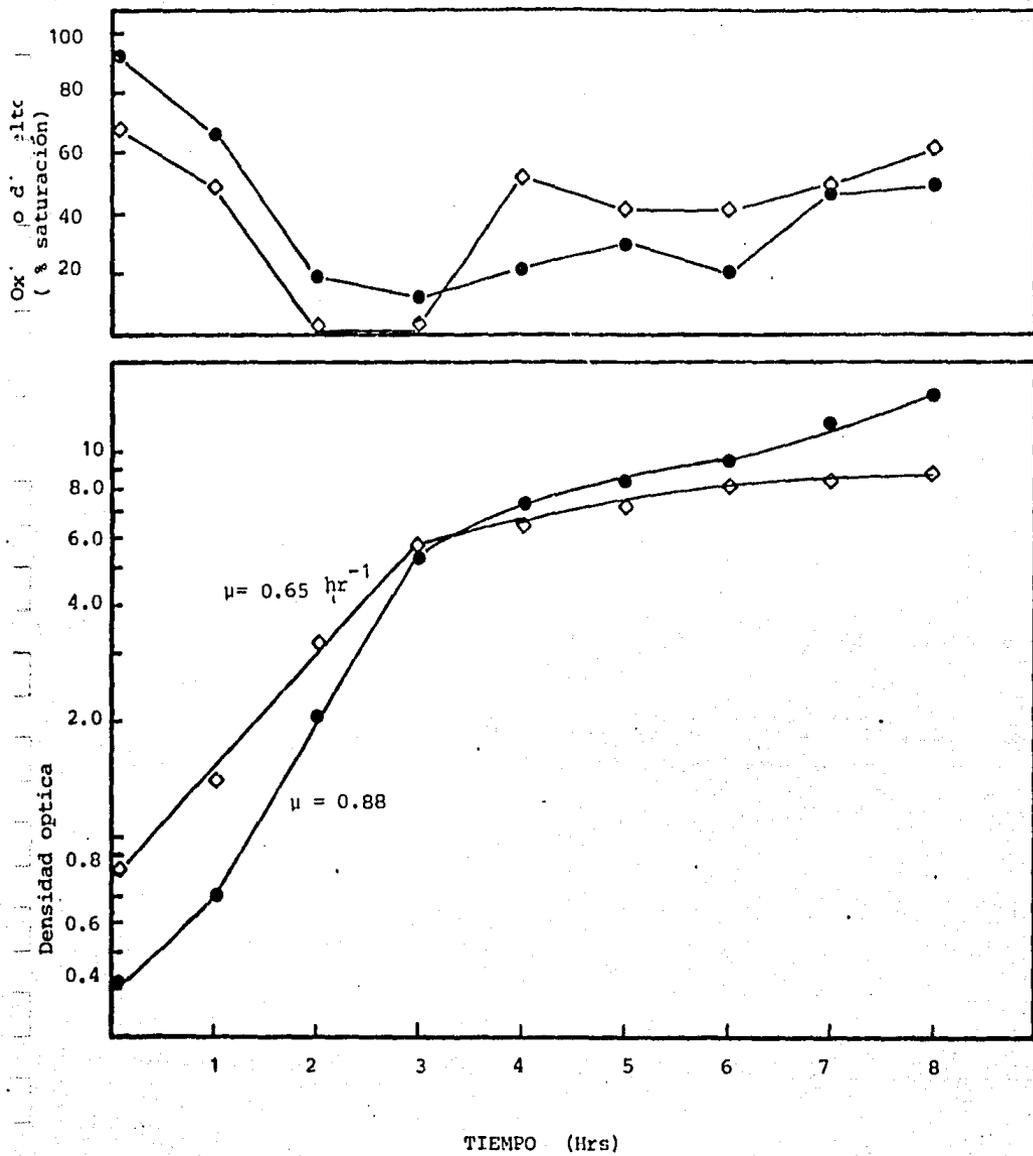


FIGURA 5.1.12.4 Efecto del control del oxígeno disuelto en el cultivo de *E.coli* MX-614 pBR-213 en sus características de crecimiento. En el primer caso (◇) el medio de cultivo fué el M-9 y con agitación promedio de 300 rpm; en el otro caso (●) no se incluyeron los aminoácidos en la composición del medio M-9 y el oxígeno se mantuvo por arriba de 10% de saturación variando la agitación entre 350 y 520 rpm. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron las indicadas. Otras condiciones se detallan en la sección 4.3. 17 (A).

0.5 g células /g de glucosa. Situación que indica que la fuente de carbono no esta siendo eficientemente utilizada, de acuerdo a lo esperado para -- una bacteria (Quintero, 1981 p. 224).

De manera general se puede concluir que para el escalamiento será factible utilizar agua de la llave, no se requerirán los aminoácidos libres y deberá asegurarse que el cultivo no se encuentre limitado por -- oxígeno. De esta manera será posible la producción de proteína híbrida - con los rendimientos máximos sobre la fuente de carbono.

5.1.13. Optimización del medio de cultivo (Experimento 4.3.15. (A))

El objetivo principal en esta etapa del trabajo fue el establecer la composición de un medio de cultivo para células de E. coli que sintetizan proteína híbrida; el cual presente una elevada velocidad de crecimiento y utilice eficientemente fuentes comerciales de carbono y nitrógeno. En experimentos que se han descrito previamente se demostró que la bacteria es capaz de utilizar sacarosa industrial como fuente de carbono y peptona grado industrial como fuente de nitrógeno. Ello sin menoscabo de la producción específica de proteína híbrida. Sin embargo, las velocidades de crecimiento y los rendimientos que se presentan en tales condiciones son aun bajas. Por otra parte, haciendo un balance teórico del medio M-9, utilizado en la mayoría de los experimentos previos, es claro que la fuente de nitrógeno se encuentra en exceso respecto a los requerimientos para producir biomasa, tomando en cuenta la cantidad utilizada de fuente de carbono. Por lo tanto, utilizar un medio de esa composición para -

la producción de biomasa, resultaría en un desperdicio innecesario de la peptona. Los requerimientos teóricos de peptona son 3.5 g/l considerando 4 g/l de glucosa. Utilizando esta cantidad de peptona (Bioxon), se demostró que la velocidad de crecimiento era similar a la obtenida cuando se utilizaban 15 g/l. En el caso de la peptona industrial (Glucosa S. A.) esto no sucedió y fue necesario incrementar la concentración de esta fuente de nitrógeno a 5 g/l para obtener velocidades de crecimiento similares a la obtenida al utilizar 15 g/l de peptona (Bioxon). Es probable que esto se deba a que el contenido de nitrógeno de esta peptona sea menor o bien a otras especificaciones de su composición que afectan al crecimiento del microorganismo. En ambos casos no se incluyó el cloruro de amonio en el medio de cultivo, en función de que la peptona satisface totalmente los requerimientos de nitrógeno.

Quando se utilizó sacarosa como fuente de carbono (4 g/l), fue necesaria la adición de 5 g/l de peptona industrial para balancear el medio. En este caso, como ya se ha comentado en la sección 5.1.8., se requirió someter el inóculo a varios subcultivos en un medio de la misma composición, para disminuir la fase lag. Los rendimientos de biomasa, medidos en matraces bafleados para que el oxígeno no fuera limitante, resultaron ser del 50% respecto a glucosa en las mismas condiciones.

Finalmente, en vista de que el medio M-9 contiene fosfato de sodio en cantidades elevadas, se consideró que no era necesaria la adición de cloruro de sodio. Para confirmarlo, se llevaron a cabo experimentos en los que se eliminó esta sal del medio de cultivo. No se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento respecto a los testigos.

Con las anteriores modificaciones, el medio de cultivo a partir del cual se inició la optimización tenía la siguiente composición: en (g/l), sacarosa 4, Peptona Industrial 5, KH_2PO_4 3, Na_2HPO_4 7, este medio también contenía los requerimientos de aminoácidos (isoleucina, valina y prolina, 0.1g/l) y la vitamina B_1 (0.02 g/l), y los elementos minerales MgSO_4 (0.246 g/l) y CaCl_2 (0.011 g/l).

El primer diseño experimental utilizado, el Plackett-Burman, tuvo como objetivo el definir cuales de las variables tenían un efecto mayor en la velocidad de crecimiento. Se probaron un total de 6 variables, en los niveles indicados en la Tabla 5.1.13.1.; la temperatura se mantuvo constante para usarla como "dummy".

El diseño de la matriz de combinaciones de las 7 variables - así como el resultado de cada uno de los experimentos se presenta también en la Tabla 5.1.13.1. El efecto de cada variable se obtiene realizando la suma algebraica de los resultados (μ) de acuerdo a los signos presentes en la columna de cada variable. Los resultados se presentan en la parte inferior de la misma tabla. Las variables con menor efecto resultaron ser el fosfato de sodio y los aminoácidos. Esto puede ser explicado en función de que probablemente el fosfato se encuentra en exceso y su disminución no altera fundamentalmente su capacidad de amortiguamiento. El efecto de los aminoácidos era esperado, en función de que el microorganismo los requiere en bajísimas concentraciones y la peptona puede suministrarlos. Lo innecesario de los aminoácidos ya había sido demostrado en la sección 5.1.12. cuando se utilizaban 15 g/l de peptona.

TABLA 5.1.13.1

DISEÑO EXPERIMENTAL LACKETT-BURMAN PARA LA DETERMINACION DE LAS VARIABLES DE MAYOR INFLUENCIA EN LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DE E. coli. MATRIZ DE COMBINACIONES, NIVELES DE LAS VARIABLES EXPERIMENTADAS, RESULTADO DE LOS EXPERIMENTOS Y EFECTOS CALCULADOS DE LAS VARIABLES

Matriz de Combinaciones

Exp. No.	Variables							Resultados experimentales (hr ⁻¹)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	+	+	-	+	-	-	0.240
2	-	+	-	+	-	-	+	0.244
3	+	-	+	-	-	+	+	0.200
4	-	+	-	-	+	+	+	0.218
5	+	-	-	+	+	+	-	0.265
6	-	-	+	+	+	-	+	0.242
7	-	+	+	+	-	+	-	0.219
8	-	-	-	-	-	-	-	0.185
Efecto	0.056	0.046	0.010	0.124	0.140	0.001		

Niveles de experimentación

Variable	Nivel (g/l)	
	Bajo (-)	Alto (+)
A Sacarosa	2	6
B Peptona	3.5	6.5
C Na ₂ HPO ₄	5	9
D KH ₂ PO ₄	1	5
E Vitamina B ₁	0	0.02
F Aminoácidos	0	1
G Temperatura °C)	37	37

El procedimiento de cálculo y las condiciones experimentales se detallan en la sección 4.3.17 (A).

En base a los resultados del diseño Plackett-Burman se eligieron como variables a optimizar; la peptona, sacarosa, fosfato de potasio y la vitamina B₁. La optimización se llevó a cabo mediante el diseño Box-Wilson. Las unidades de variación se determinaron en base a los resultados del diseño Plackett-Burman y el centro experimental fué la composición del medio que resultó con la mayor velocidad de crecimiento (experimento No. 5 de la Tabla 5.1.13.1.). El diseño experimental para el método de Box-Wilson, así como los resultados de los 16 experimentos se muestran en la Tabla 5.1.13.2. Para calcular el efecto de cada una de las variables y las interacciones de estas entre si, se sigue el procedimiento de Yates, de acuerdo a lo establecido en la literatura descrita en la sección 4.3.18. (A). El resultado de este cálculo se presenta en la Tabla 5.1.13.3. Los números que aparecen como efectos individuales, constituyen los coeficientes de las interacciones indicadas a su derecha, en la elaboración de la ecuación codificada de predicción. Esta última se presenta en la Tabla 5.1.13.4. Para obtener la ecuación real, se procede a sustituir los valores de las variables codificadas por los de las variables reales, empleando las ecuaciones de sustitución. Estas últimas, así como el resultado de la manipulación algebraica se presentan en la misma tabla.

Con el fin de determinar el grado de fidelidad con que esta ecuación final describe al sistema, se sustituyen ciertos valores experimentales en la ecuación y se calcula el efecto que la ecuación predice. Un ensayo de este tipo para algunas composiciones de los medios experimentados se ilustra a continuación:

Valor de la variable (g/l)				Velocidad de crecimiento (hr^{-1})		Residuo ^{a)}	Desviación (%) ^{b)}
A	B	C	D	Experimental	Teórico		
3	5.7	0.7	4	0.327	0.330	-0.003	- 0.9
4	5.7	0.7	4	0.415	0.506	-0.0091	-21.9
3	6.3	0.7	4	0.275	0.226	0.049	17.8
4	6.3	0.7	4	0.268	0.212	0.056	20.8
3	5.7	0.7	6	0.439	0.467	-0.028	6.3
3	5.7	1.3	6	0.396	0.391	0.005	1.2

a) Valor experimental - valor teórico

b) Residuo/valor experimental

TABLA 5.1.13.2

DISEÑO EXPERIMENTAL BOX-WILSON PARA LA OPTIMIZACION DEL CULTIVO, EN FUNCION DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (μ) DE E. coli. MATRIZ DE COMBINACIONES, NIVELES DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES, RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS E INTERACCIONES CALCULADAS ENTRE LAS VARIABLES

Matriz de Combinaciones

Exp. No.	Variables				Interacciones	Resultados experimentales μ (hr ⁻¹)
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-		0.327
2	+	-	-	-	A	0.4155
3	-	+	-	-	B	0.275
4	+	+	-	-	AB	0.268
5	-	-	+	-	C	0.21
6	+	-	+	-	AC	0.22
7	-	+	+	-	BC	0.3
8	+	+	+	-	ABC	0.254
9	-	-	-	+	D	0.4398
10	+	-	-	+	AD	0.362
11	-	+	-	+	BD	0.38
12	+	+	-	+	ABD	0.4227
13	-	-	+	+	CD	0.3966
14	+	-	+	+	ACD	0.293
15	-	+	+	+	CDB	0.316
16	+	+	+	+	ABCD	0.288

Niveles de Experimentación

Variable	Nivel (g/l)	
	Bajo (-)	Alto (+)
A Peptona	3	4
B Sacarosa	5.7	6.3
C Vitamina B ₁	0.007	0.013
D KH ₂ PO ₄	4.0	6.0

Las condiciones experimentales se detallan en la sección 4.3.17(A)

TABLA 5.1.13.3

ESQUEMA DE CALCULO DE LOS EFECTOS ENTRE LAS VARIABLES SELECCIONADAS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL
BOX-WILSON, DE ACUERDO AL ALGORITMO DE YATES

Velocidad específica de crecimiento (μ) (hr^{-1})	I	II	III	IV	Divisor	Efectos	Interacciones
0.327	0.7425	1.2855	2.2695	5.1676	16	0.32297	
0.4155	0.543	0.984	2.8981	0.2122	8	0.02652	A
0.275	0.43	1.6045	0.0455	-0.1602	8	-0.02002	B
0.268	0.554	1.2936	0.1667	0.0446	8	0.07655	AB
0.21	0.8018	0.0815	-0.0755	-0.6124	8	-0.07655	C
0.22	0.8027	-0.036	0.0847	-0.214	8	-0.02675	AC
0.3	0.6896	-0.0351	-0.1515	0.237	8	0.02962	BC
0.254	0.604	-0.1316	0.1961	-0.0054	8	-0.00067	ABC
0.4398	0.0885	-0.1995	-0.3015	0.6286	8	0.07857	D
0.362	-0.007	0.124	-0.3109	0.1212	8	0.01515	AD
0.38	-0.01	0.0009	-0.1175	-0.0092	8	-0.00115	BD
0.4227	-0.046	-0.0856	-0.0965	0.3476	8	0.04345	ABD
0.3966	-0.0778	-0.0955	0.3235	-0.0094	8	-0.00117	CD
0.293	0.0427	-0.056	-0.0865	0.021	8	0.00262	ACD
0.316	-0.1036	0.1205	0.0395	-0.41	8	-0.050125	CDB
0.288	-0.028	0.0756	-0.0449	-0.0844	8	-0.01055	ABCD

Los datos de velocidad específica de crecimiento (μ) provienen de los resultados reportados en la Tabla 5.1.13.2. Los efectos constituyen los coeficientes de la ecuación codificada - de producción que se presenta en la Tabla 5.1.13.4. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo a Box et al (1978), Fabila (1979) y Rodríguez (1983).

TABLA 5.1.13.4

MODELO DE PREDICCIÓN LINEAL DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE *E. coli*, EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PEPTONA, SACAROSA, VITAMINA B₁ Y KH₂PO₄. ECUACION CODIFICADA, ECUACIONES DE SUSTITUCIÓN Y ECUACION REAL

Ecuación Codificada:

$$Y = 0.3229 + 0.02652A - 0.02B - 0.0765C \\ + 0.07857D + 0.0055AB - 0.0267AC + 0.0296BC \\ + 0.01515AD - 0.0011BD - 0.0011CD - 0.00067ABC \\ + 0.0434ABD + 0.0026 ACD - 0.5125CDB - 0.01055ABCD$$

Ecuaciones de Sustitución:

Variable codificada = (A,B,C,D)	Variable real (a,b,c,d)	Centro - experimental	Variable	Centro experimental (g/l)	Unidad de variaciones (g/l)
	Unidad de variación		A Peptona	3.5	0.5
			B Sacarosa	6	0.3
			C Vitamina B ₁	0.01	0.003
			D KH ₂ PO ₄	5	1

Ecuación Real:

$$Y' = -34.9747 + 15.5623a + 5.75741b + 5.92971c \\ + 7.63951d - 2.56315ab - 7.2011ac - 0.8752bc \\ - 3.12826ad - 1.266403bd - 1.5688cd + 1.545abc \\ + 0.5228 abd + 1.42256acd + 0.25109cb + 0.2338 abcd$$

Donde: Y = Velocidad específica de crecimiento en unidades codificadas
 Y' = Velocidad específica de crecimiento en unidades reales
 A,B,C,D. = Variables codificadas
 a,b,c,d + Variables reales (g/l)

La ecuación codificada se obtiene a partir de los efectos calculados en la Tabla 5.1.13.3. La ecuación real se obtiene introduciendo las ecuaciones de sustitución en la ecuación codificada y procediendo algebraicamente. Para detalles de cálculo ver Rodríguez (1983).

Como se puede observar, los residuos son relativamente pequeños, lo cual implica que la ecuación describe razonablemente fiel el sistema, con desviaciones no mayores a $\pm 20\%$, respecto a los valores experimentales.

En la Tabla 5.1.13.5. se presenta un resumen de la evolución de la optimización del medio de cultivo. El mejor experimento del diseño Box-Wilson dió como resultado una velocidad de crecimiento de 0.44 hr^{-1} - lo que significa un 27% menor que la desarrollada en el medio M-9, pero - utilizando 5 veces menos peptona, y sacarosa como fuente de carbono. En - el desarrollo de la optimización la relación existente entre la fuente de carbono y el nitrógeno complejo fue aumentando. La relación glucosa/peptona en el medio M-9 es igual a 0.26; en el medio optimizado la relación sacarosa/peptona fue de 1.9. Resultaba probable que la disminución proporcional de la presencia de péptidos en el medio de cultivo pudiera disminuir la producción de proteína híbrida, para investigar esto, se llevaron a cabo electroforesis de los cultivos desarrollados en los medios descritos en la Tabla 5.1.13.5. Los resultados se presentan en la foto del gel incluida - en la Figura 5.1.13.1. No existen diferencias apreciables en las bandas de proteína híbrida en todos los casos. Esto permite concluir que se cuenta con un medio optimizado, a base de materias primas industriales, susceptible de escalarse para la producción de la proteína híbrida para la cadena A de insulina humana.

TABLA 5.1.13.5

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS DURANTE EL PROCESO DE OPTIMIZACION DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DE E. coli

Componente	Medio de cultivo (g/l)			
	M-9	Base ^{a)} Plackett Burman	Base ^{b)} Box-Wilson	Optimizado ^{c)} Box-Wilson
Peptona de Caseína	15.0	-	-	-
Glucosa	4.0	-	-	-
Peptona Industrial	-	5.0	3.5	3.0
Sacarosa	-	4.0	6.0	5.7
KH ₂ PO ₄	3.0	3.0	5.0	6.0
Na ₂ HPO ₄	7.0	7.0	5.0	5.0
NaCl	0.5	-	-	-
Aminoácidos ^{d)}	0.02	-	-	-
Vitamina B ₁	0.01	0.01	0.01	0.007
NH ₄ Cl	1.0	-	-	-
Ampicilina ^{e)}	0.1	0.1	0.1	0.1
CaCl ₂	0.011	0.011	0.011	0.011
MgSO ₄	0.246	0.246	0.246	0.246
Velocidad específica de crecimiento (μ) (hr ⁻¹)	0.6	0.25	0.268	0.44
Azúcar (g/l)				
Peptona (g/l)	0.26	0.8	1.71	1.9

Notas: a) Corresponde al medio balanceado d) Isoleucina, valina y prolina
 b) El mejor experimento individual de Diseño Plackett-Burman e) Cantidad inicial
 c) El mejor experimento individual del Diseño Box-Wilson

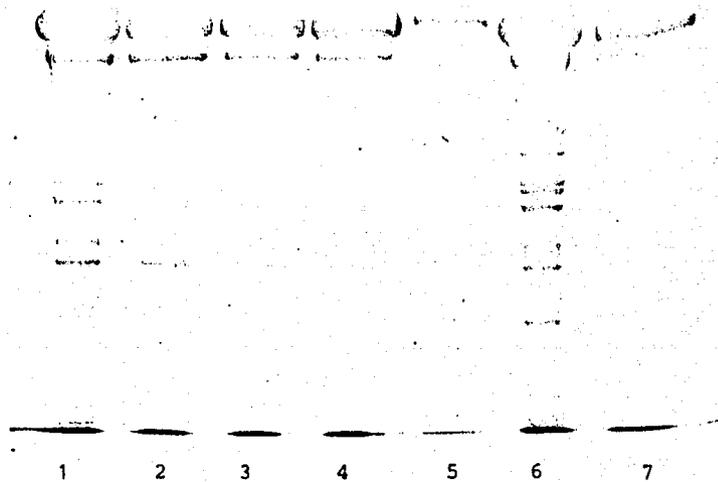


FIGURA 5.1.13.1 Electroforesis de extractos celulares precipitables de cultivos desarrollados en los medios descritos en la Tabla 5.1.13.1 Carriles 1 y 2: medio balanceado (M-B); Carriles 3 y 4: medio base del diseño Plackett-Burman; Carril 5: patrón de β -galactosidasa (10 μ g); - Carriles 6 y 7: medio optimizado resultado del diseño Box-Wilson. En todos los casos la proteína aplicada a cada Carril fué de 30 μ g. Cada Carril corresponde a un experimento independiente.

5.2 Cadena B

5.2.1 Caracterización cinética del cultivo (Experimento 4.3.2.(B))

Los experimentos iniciales en el caso de la Cadena B fueron aquellos con el objetivo de caracterizar cinéticamente la fermentación. Los medios de cultivo utilizados fueron el M-9 y aquel obtenido de la optimización para el caso de Cadena A que llamaremos medio M-L. En las Figuras 5.2.1.1 y 5.2.1.2 se ilustran los resultados obtenidos en el medio M-9 y M-L respectivamente. En el primero de ellos se logra una velocidad específica de crecimiento de 0.46 hr^{-1} ; los azúcares se agotan totalmente a las 5 horas de cultivo; coincidiendo con el fin de la fase exponencial, lo que indica muy probablemente que el cultivo se encuentre limitado por la fuente de carbono. Sin embargo, el crecimiento continúa después del agotamiento de los azúcares. Esto puede deberse a la presencia de otras sustancias en la peptona que puedan ser utilizadas como fuente de carbono y que no detecte la técnica de antrona utilizada para medir los azúcares. La población celular, medida como densidad óptica, alcanza un valor máximo de 0.52 a las 12 horas. Este valor coincide con el encontrado para el sistema de la Cadena A. El patrón de pH tiene poca variación y presenta tendencia a la alza durante todo el cultivo.

En el caso del medio M-L se observa un crecimiento mas lento del microorganismo ($\mu=0.20 \text{ hr}^{-1}$) y los azúcares no se agotan, alcanzando un estado basal a partir de las 6 horas. Esto indica muy probablemente que la sacarosa es un azúcar que asimila la E.coli más lentamente que la glucosa o bien la existencia de limitación por nitrógeno o de algún micronutriente mineral. La población microbiana a las 12 horas de cultivo, alcanza una densidad óptica de 0.23 representando el 43.8% de la alcanzada en el M-9. De manera similar a lo que ocurre con la cepa de la Cadena A.

La cinética de la degradación de ampicilina se muestra en la Figura 5.2.1.3, como se observa, el antibiótico desaparece casi totalmente a los 30 minutos del cultivo. El testigo indica que no existe degradación no-enzimática de la ampicilina. Esto significa que la presión selectiva ejer-

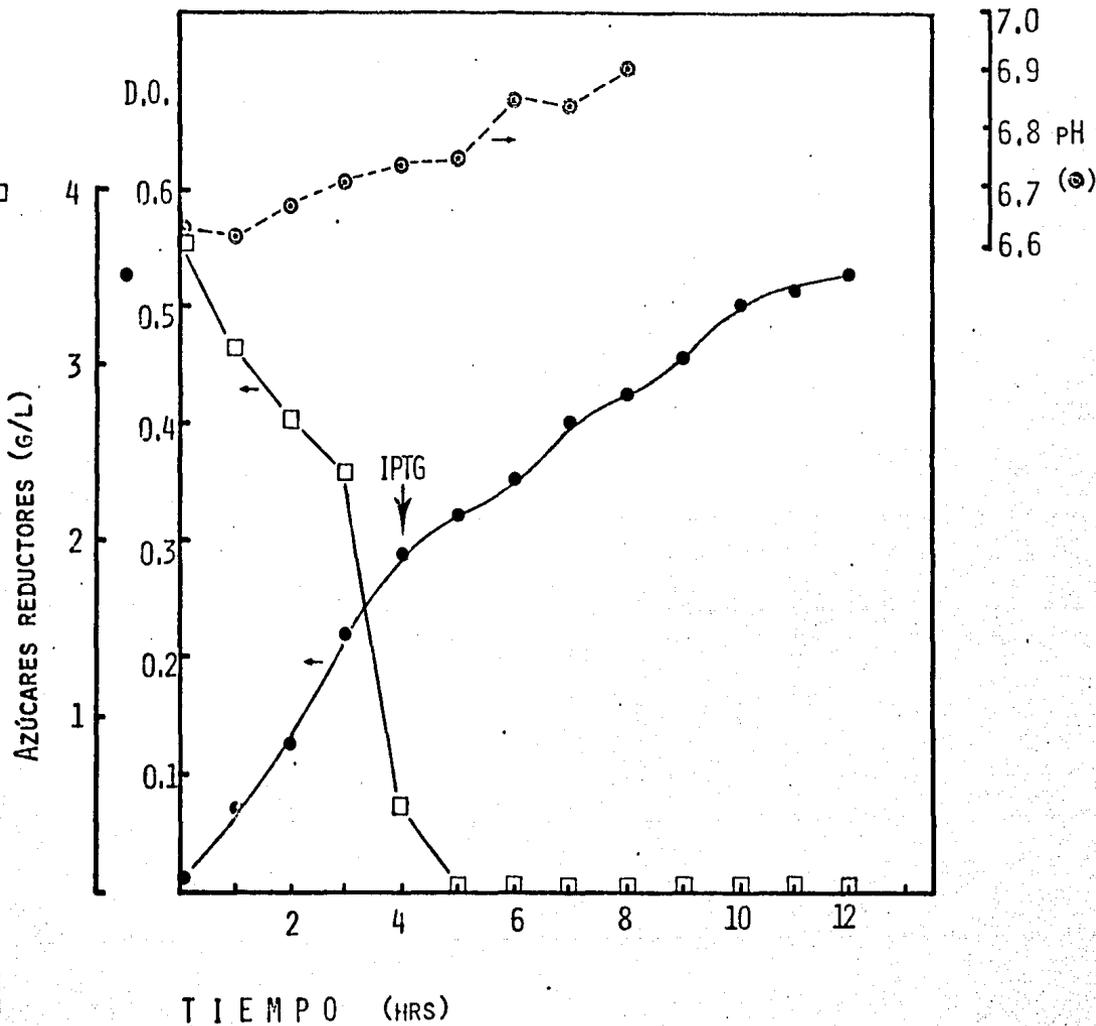


FIGURA 5.2.1.1. Comportamiento cinético de un cultivo de *E.coli* D-1210 - pBR-275 en el medio M-9. El cultivo se indujo con IPTG 5mM donde se indica con la flecha, los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2 (B).

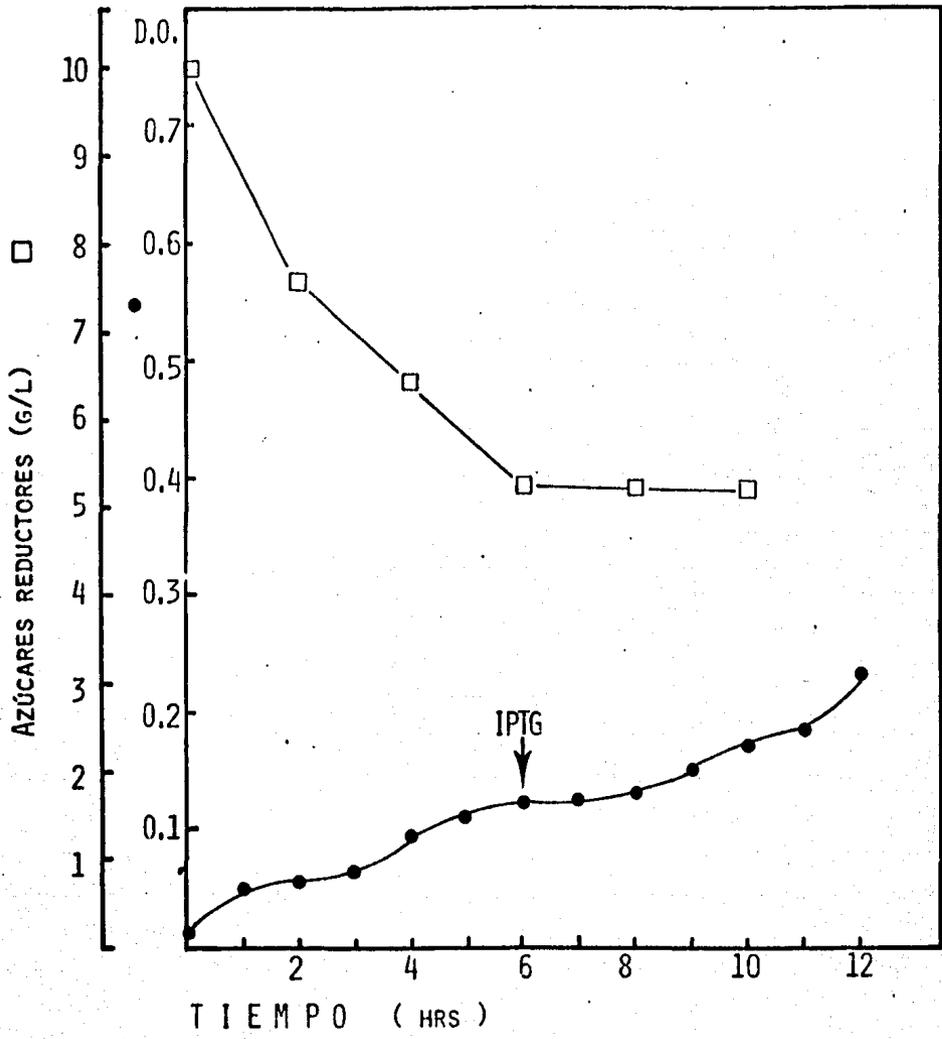


FIGURA 5.2.1.2 Comportamiento cinético de un cultivo de *E.coli* D-1210 pBR-275 en el medio M-L. El cultivo se indujo con IPTG donde lo indica la flecha. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2. (B)

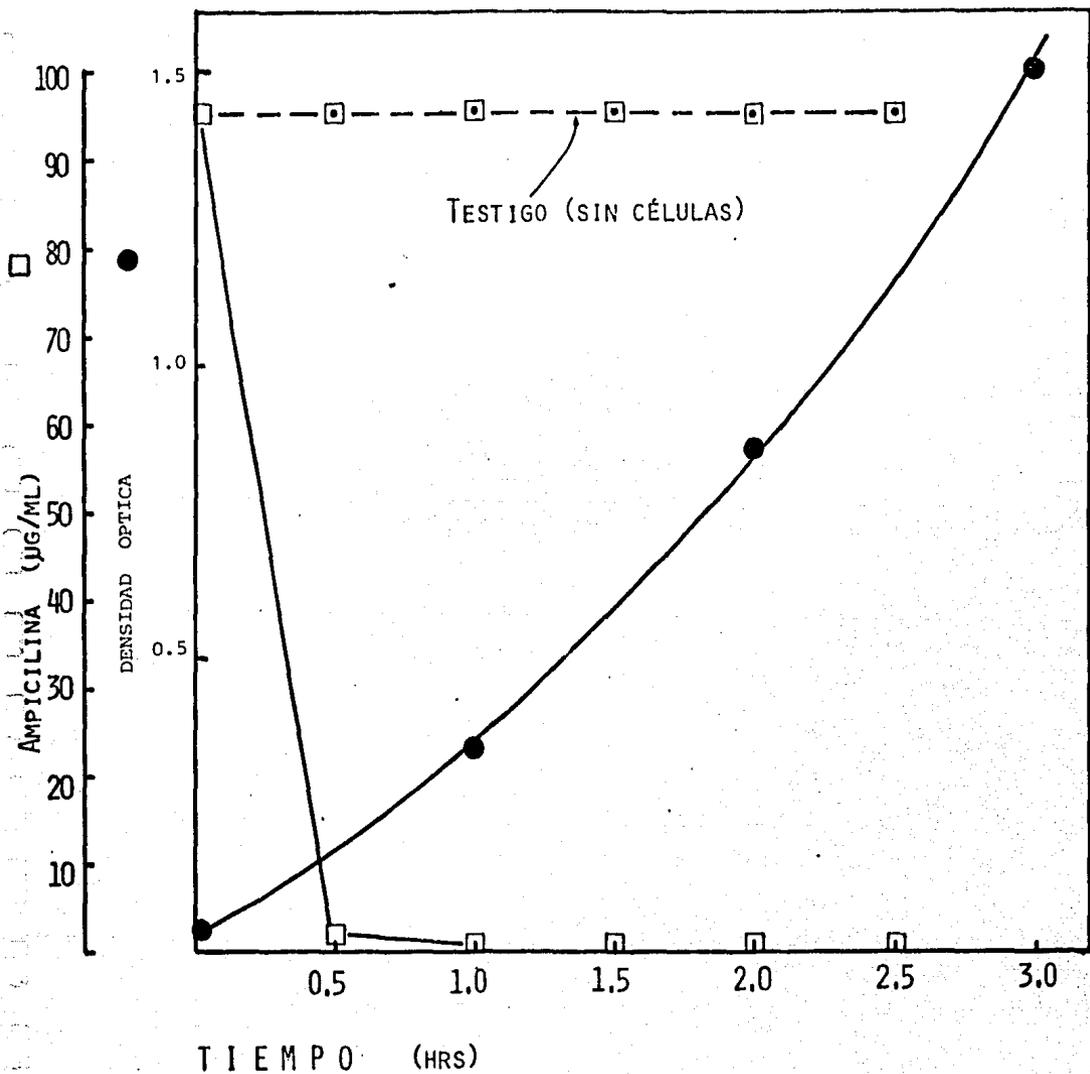


FIGURA 5.2.1.3 Cinética de la degradación de ampicilina en un cultivo de *E.coli* D-1210 pBR-275 en el medio M-9. Densidad Óptica (●), ampicilina de bioensayo (□). paralela mente se incubó un medio en las mismas condiciones pero que no fue inoculado con el fin de establecer si la ampicilina se degradaba por causas ajenas a la bacteria (■). Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.2. (B).

cida por este antibiótico solo se ejerce en un período muy corto al inicio del cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos en el sistema de la Cadena A.

5.2.2 Inducción con IPTG (Experimento 4.3.3 (B))

Tiempo de inducción en M-9

En experimentos iniciales realizados por el grupo de Biología Molecular (Bolívar, 1983), se encontró que si el sistema se inducía en las fases iniciales de crecimiento, se presentaba cierta inestabilidad del plásmido resultando en nula producción de híbrido. Con el fin de corroborar estos resultados, así como para conocer el comportamiento de la β -galactosidasa soluble, que por otra parte tiene actividad enzimática, se llevaron a cabo experimentos cuyos resultados se ilustran en la Figura 5.2.2.1. Cualitativamente se observa en el gel que se logra producción de híbrido en todas las situaciones de inducción probadas. Sin embargo se logra una mayor expresión cuando se induce en la fase exponencial tardía (4 hrs.) y una menor cuando sucede en la fase estacionaria (6 hrs.) Estos resultados coinciden con lo reportado (Bolívar, 1983). Sin embargo en este trabajo se logró expresión aún cuando se induce en la fase exponencial temprana (1 hr.) En los experimentos que siguieron y cuando se utilizó IPTG como inductor, este se adicionó a las 4 horas del cultivo (fase exponencial tardía).

Respecto a la expresión de la proteína que comigra con β -galactosidasa en las proteínas solubles no se observaron diferencias apreciables. Es posible afirmar que las bandas más intensas de proteína que comigran con β -galactosidasa en las proteínas precipitables, no presentan bandas más intensas relativamente, entre las presentes en las proteínas solubles. Ello apoya la idea de que existe poca o ninguna contribución a la β -galactosidasa nativa y activa en las proteínas precipitables. En consecuencia, la

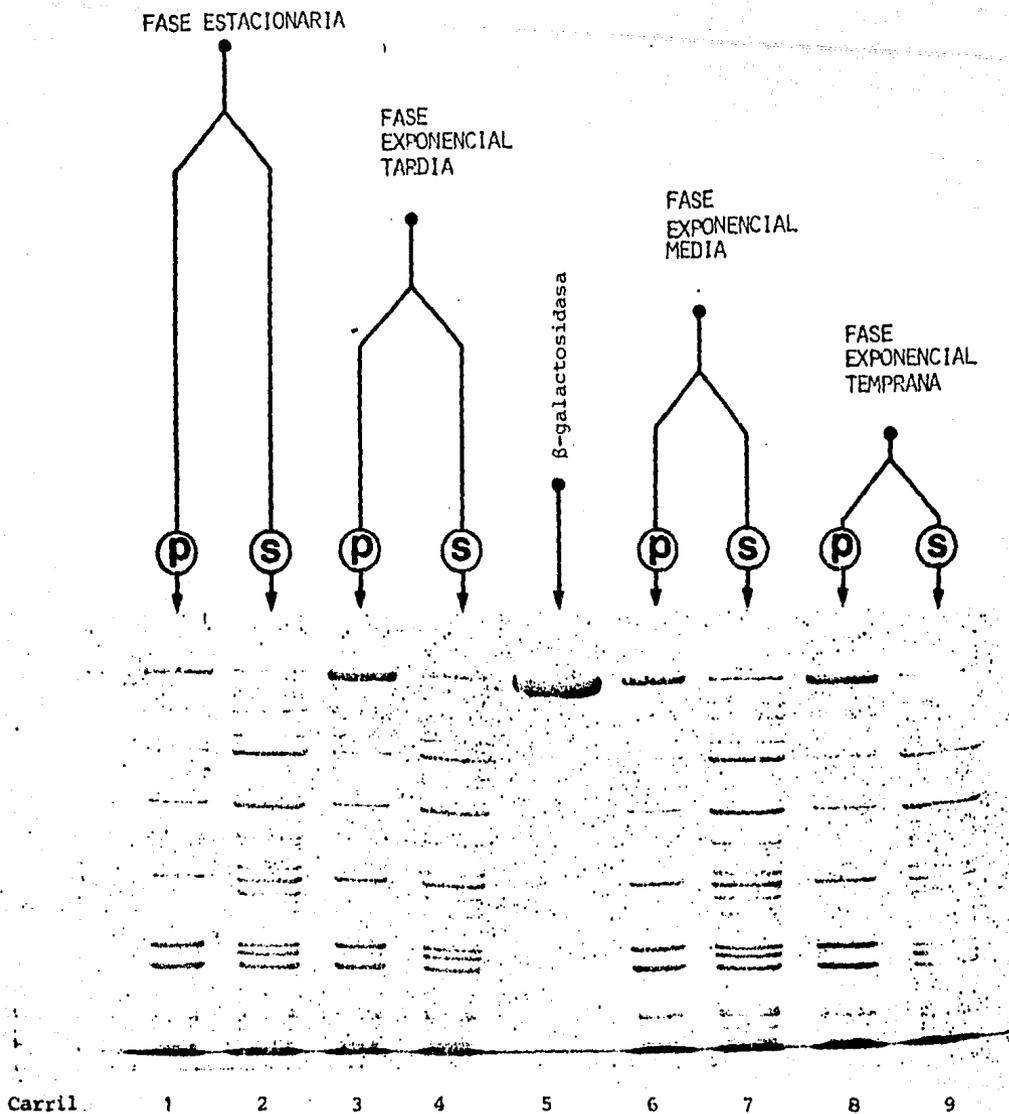


FIGURA 5.2.2.1. Influencia del tiempo de inducción con IPTG en la expresión de proteína híbrida por *E. coli* D-1210 pBR-275 desarrollada en el medio M-9. El IPTG se adicionó a una concentración final de 5mM en la fase exponencial media (2.5 hrs) carriles 6 y 7; en la fase exponencial tardía (4 hrs) carriles 3 y 4; y en la fase estacionaria (6 hrs) carriles 1 y 2. (P) corresponde a las proteínas precipitables a las 24 horas después de inducir; (S) a las proteínas solubles del cultivo. En ambos casos y en todos los carriles la proteína aplicada fué la misma (30 μ g). Se incluyó un patrón de β -galactosidasa (10 μ g) en el carril 5.

visualización de la banda que comigra con β -galactosidasa en las proteínas insolubles es un reflejo de la producción de proteína híbrida.

Cinética de inducción en M-9

Con el fin de determinar el momento de suspender la fermentación, en función de que la síntesis de proteína híbrida prosigue aún cuando la bacteria deje de crecer, se realizó la cinética de producción de híbrido. Los resultados se ilustran en la Figura 5.2.2.2

Los geles indican que el máximo de producción se encuentra entre las 24 y 30 hrs después de inducir y aparentemente después de ese tiempo no existe un incremento significativo en la producción de híbrido. En lo sucesivo se estableció como parámetro el cosechar los cultivos a las 24 horas después de inducir, esto es, entre 28 y 30 hrs de cultivo total.

Tiempo de inducción en M-L

El M-L es un medio que fué optimizado para la producción de biomasa en el sistema de Cadena A y era importante conocer su comportamiento respecto al fenómeno de inducción, así como establecer posibles diferencias con lo encontrado en el medio M-9. Los resultados del experimento para evaluar la influencia del tiempo de inducción se presentan en la Figura 5.2.2.3. Es claro que el máximo de producción se logra cuando el cultivo se induce en la fase exponencial tardía, lo que concuerda con el caso cuando el cultivo es crecido en un medio más rico, como el M-9.

Cinética de inducción en M-L

En la Figura 5.2.2.4, se presenta el gel con los resultados de la producción de híbrido a las 12, 24 y 36 hrs. después de inducir. En este caso, a diferencia de lo que ocurre en el medio M-9, no parece existir

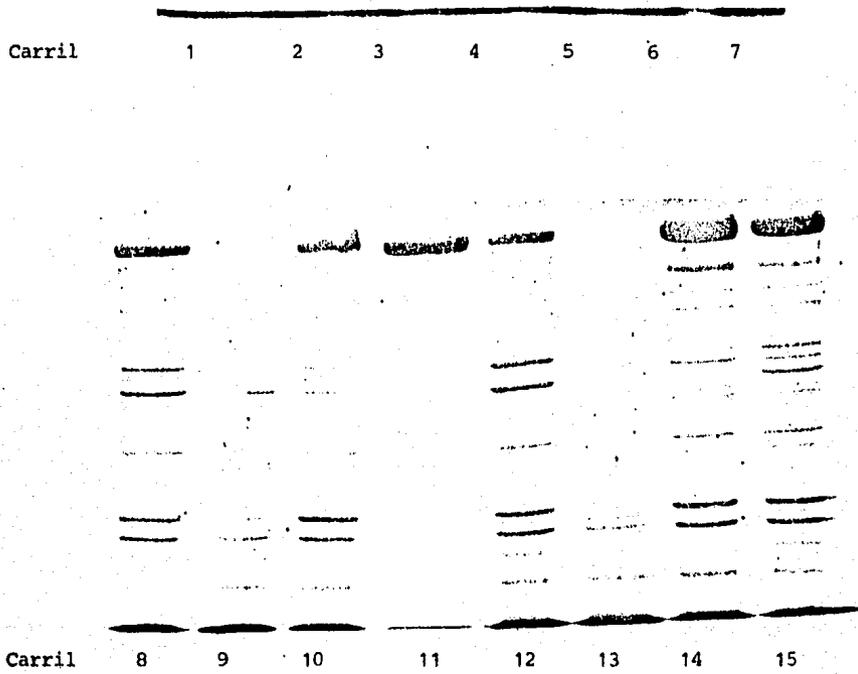


FIGURA 5.2.2.2 Cinética de producción de proteína híbrida en un cultivo de *E.coli* D-1210 pBR-275 desarrollado en el medio M-9. El sistema se indujo con IPTG (5mM) en la fase exponencial tardía (4 hrs). El gel corresponde a las proteínas precipitables de células cosechadas en los tiempos indicados y en todos los casos la cantidad de proteína aplicada fue la misma (30 µg). Carril 1, en el momento de inducir; carril 2, 8 horas después; carriles 4 y 7, 12 horas; carril 9, 18 horas; carriles 5 y 11, 24 horas; carriles 13 y 14, 30 horas; carril 6, 36 horas. En los carriles 3 y 4 se incluyen patrones de β-galactosidosa (10µg).

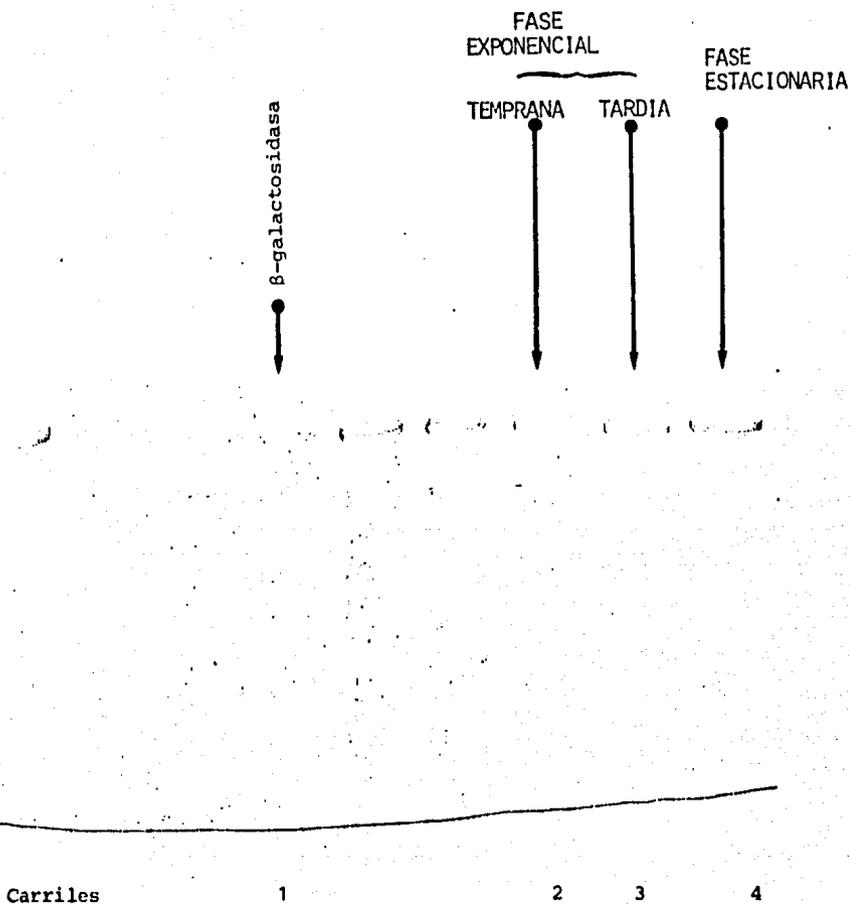


FIGURA 5.2.2.3 Influencia del tiempo de inducción con IPTG en la expresión de proteína híbrida por *E.coli* D-1210 pBR-275 desarrollada en el medio M-L . El resto de las condiciones como en la Figura 5.2.2.2. Carril 1, patrón de β-galactosidasa (10 µg), carril,2 cultivo inducido en la fase exponencial temprana (1 Hrs) carril 3, inducción en la fase exponencial tardía (4 Hrs) carril 4, inducción en la fase estacionaria (6 Hrs). En todos los casos corresponden a proteínas precipitables en la misma cantidad (30 µg).

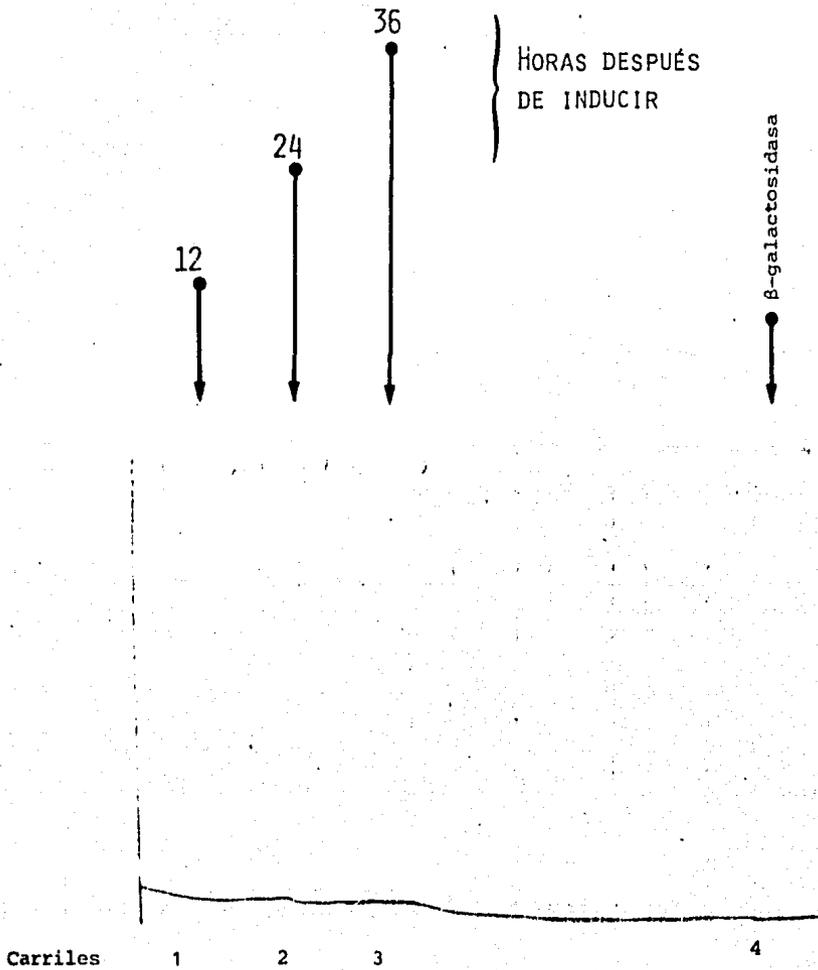


FIGURA 5.2.2.4. Cinética de producción de proteína híbrida en un cultivo de *E. coli* D-1210 pBR-275 desarrollado en el medio M-L. El sistema se indujo con IPTG (5mM) en la fase exponencial tardía (6 Hrs). El gel corresponde a proteínas precipitables (30 µg) de células cosechadas en los tiempos indicados (después de inducir). Carril 1 : 12 horas; carril 2: 24 horas; carril 3: 36 horas; carril 4: patrón de β-galactosidasa (10 µg).

una diferencia apreciable entre las 12 y 36 hrs. Esto puede ser debido a un agotamiento más temprano de la fuente de nitrógeno (como es aparente de acuerdo al panorama cinético reportado en la Figura 5.2.1.2) que limite la síntesis proteica. Situación que muy probablemente no suceda en el medio M-9 puesto que en tal caso se trata de una limitación de carbono (ver cinética en la Figura 5.2.1.1).

5.2.3 Comportamiento de segregantes (Experimento 4.3.4 (B))

La segregación del plásmido es un fenómeno de suma importancia, sobre todo en el escalamiento, en donde es necesario desarrollar la bacteria por varias generaciones y por lo tanto se incrementa la probabilidad de mutaciones y/o segregación del plásmido. Por otra parte, el mantenimiento de condiciones selectivas con la presencia de ampicilina resulta muy costoso en los fermentadores medianos y grandes. Por otra parte ya fué demostrado que la ampicilina ejerce su efecto de presión selectiva tan solo por unos minutos y no aseguraría la pureza del cultivo. Con el fin de establecer la necesidad de la ampicilina, se cuantificaron los porcentajes de segregación en cultivos con y sin ampicilina. Los resultados se resumen en la Tabla 5.2.3.1. El cultivo con 100µg/ml iniciales de ampicilina presenta una segregación global promedio del 0.89% mientras que cultivo en ausencia de ampicilina tiene un valor ligeramente mayor (del 1.16%). Esto concuerda parcialmente con lo encontrado en el sistema de la Cadena A. Sin embargo, en tal caso, los porcentajes son menores (de 0 y 0.58% en promedio respectivamente). Es posible que las diferencias no sean estadísticamente significativas, pero debe recalcar que en el caso de Cadena A, en presencia de mínimas concentraciones de ampicilina, no se detectó ni una sola colonia sensible al antibiótico. De acuerdo a estos datos, la ampicilina solo debe usarse como medida de seguridad en los inóculos. Cabe hacer notar que la resistencia a ampicilina no es un indicador que asegure la elevada biosíntesis del híbrido como ya se demostró en el sistema de Cadena A. El plásmido puede sufrir lesiones en la región

TABLA 5.2.3.1.

SEGREGACION DEL PLASMIDO pBR-275 DURANTE UN CULTIVO EN PRESENCIA
Y AUSENCIA DE AMPICILINA AL INICIO DE ESTE

Tiempo de cultivo (hr)	Ampicilina inicial ($\mu\text{g/ml}$)			
	0		100	
	Colonias	% Segregantes	Colonias	% Segregantes
3	229	9.87	228	0
6	301	1.33	234	2.14
9	222	2.25	235	0.42
12	282	0.35	311	0.96
15	298	1.00	218	0.91

El cultivo se desarrolló en el medio M-9 y se indujo con IPTG 5 mM a las 4 horas. La segregación se calculó en función del número de colonias sensibles a ampicilina. Los detalles se describen en la sección 4.3.4 (B).

de control del operón lac o bien en los mismos genes estructurales, conservando la resistencia al antibiótico. La disminución del número de copias del plásmido intacto también puede llevar a un decremento en la síntesis de híbrido, conservando la resistencia a antibióticos β -lactámicos, como presumiblemente sucede en el fenómeno llamado "segregación diferencial" descrito para el sistema de Cadena A. (ver sección 5.1.10).

5.2.4 Incremento en la síntesis específica de proteína híbrida (Experimento 4.3.4 (B))

En el caso del sistema de la Cadena A, se demostró en la sección 5.1.11, que al someter la bacteria a varios subcultivos en medio mínimo, ésta incrementaba su producción específica de proteína híbrida. Los resultados de experimentos similares con el sistema para Cadena B se presentan en la Figura 5.2.4.1. En este caso se sometió a la bacteria a 5 subcultivos en ayuno de aminoácidos. Como puede observarse en la foto del gel, las condiciones de ayuno también resultan en una elevación proporcional de los niveles de expresión de proteína híbrida. El mismo fenómeno ya fue descrito para el caso del sistema de la Cadena A. Como se ha comentado previamente (sección 5.1.11), es probable que éste fenómeno se daba al incremento en el número promedio de plásmidos presentes en la célula.

Debe resaltarse que con el sistema de cadena B, el cual requiere de inducción para expresar la proteína híbrida, no se encontró la variabilidad en los niveles de expresión como la presentada en el sistema de Cadena A (ver sección 5.1.1). Ello a pesar de que la cepa de E.coli D-1210

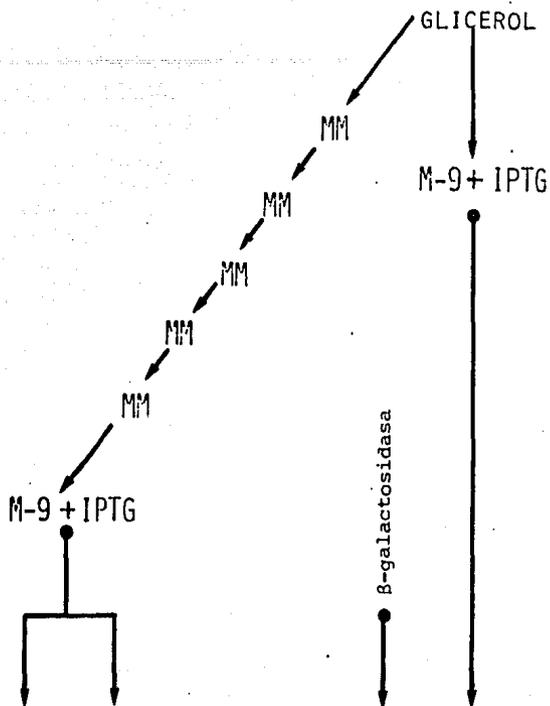


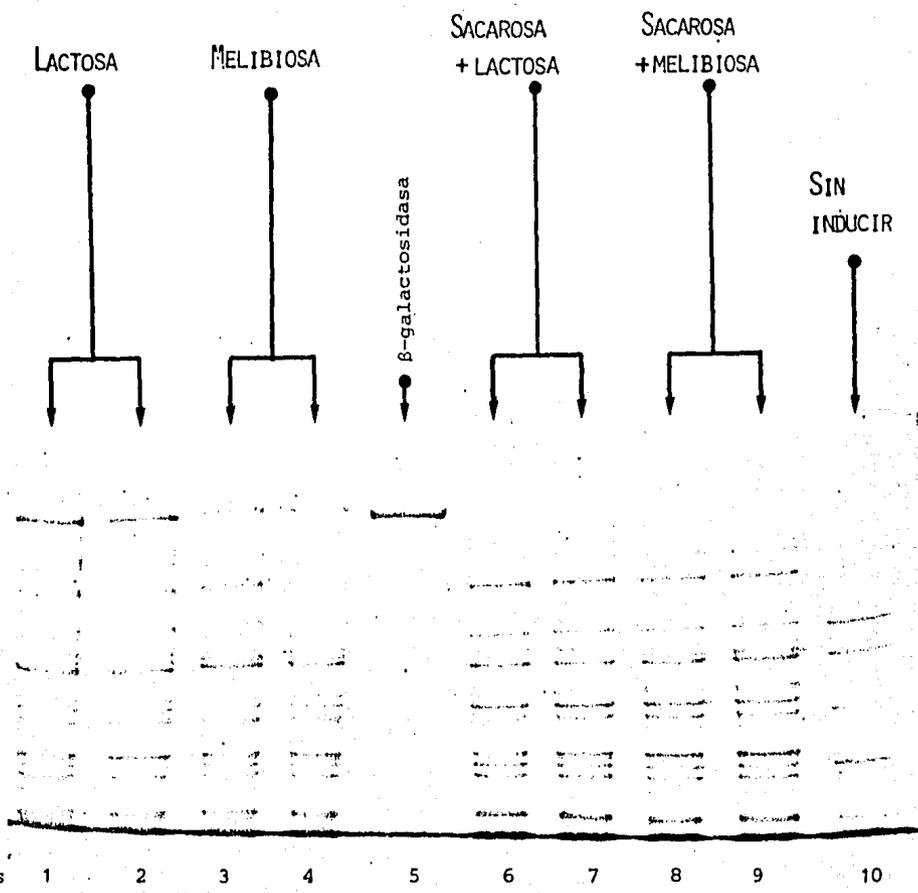
FIGURA 5.2.4.1 Efecto del subcultivo de *E. coli* D-1210 pBR-275 en ayuno de aminoácidos sobre la capacidad de producción de proteína híbrida. Los cultivos se iniciaron de un glicerol y se transfirieron a medio mínimo (MM) las veces indicadas. El cultivo final se desarrolló en el medio M-9 induciendo con IPTG. El gel corresponde a proteínas precipitables. En todos los carriles la cantidad de proteína aplicada al gel es la misma (30 μ g). Se incluye un patrón de β -galactosidasa (10 μ g). Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.8 (A).

con el plásmido pBR-275 (Cadena B) se conservó en glicerol en condiciones similares. Es probable que esta aparente estabilidad se deba a que la bacteria no sintetiza siempre una proteína extraña y no funcional. La cual, puede constituir una desventaja metabólica que promueva lesiones o mutaciones en el plásmido, que eliminen o disminuyan la producción de proteína híbrida. Este fenómeno ha sido observado en el caso de plásmidos recombinantes utilizados para la producción microbiana de triptofano (Imanaka et. al., 1980; Imanaka et. al. 1981)

5.2.5 Lactosa y melibiosa como inductores. (Experimento 4.3.5 (B))

Con el fin de sustituir el IPTG como inductor, se probaron inicialmente dos azúcares metabolizables: la lactosa y la melibiosa. La primera es el sustrato natural de la β -galactosidasa sin embargo in vitro y también en vivo actúa como antiinductor (Jobe & Burgeois, 1973). El inductor verdadero del sistema es la alolactosa (Jobe & Burgeois, 1972), la cual es sintetizada a partir de la lactosa por la β -galactosidasa en una reacción de transgalactosilación. El otro β -galactosido, la melibiosa, es el isómero α de la alolactosa y tiene una afinidad alta por el represor lac; solo superada por el IPTG y la alolactosa (Miller & Reznikoff, 1978).

En un primer intento, se añadieron lactosa y melibiosa a una concentración final de 5mM en la fase exponencial taría (6 horas) de un cultivo en medio M-L. Los resultados se presentan en la Figura 5.2.5.1; como se observa, fué posible la expresión de la proteína precipitable que comigra con β -galactosidasa en ambos casos, siendo más intensa cuando se utilizó lactosa.



carriles 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FIGURA 5.2.5.1 Efecto de la melibiosa y lactosa como inductores para la producción de proteína híbrida en *E.coli* D-1210 pBR-275. El medio utilizado fue el M-L. Carriles 1 y 2: lactosa (5mM) carriles 3 y 4 melibiosa (5 mM) en ambos adicionando en la fase exponencial tardía; carril 5: patrón de β- galactosidasa (10 µg); carriles 6 y 7: sacarosa (3g/l) y lactosa (3g/l); carriles 8 y 9: sacarosa (3g/l) y melibiosa (3g/l) en ambos casos desde el inicio del cultivo; carril 10: fermentación sin inducir. En todos los carriles se aplicaron 30µg de proteína. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.5 (B).

Muy probablemente la existencia de azúcares residuales en el medio M-L en el momento de inducir (ver cinética en la Figura 5.2.1.2) haya permitido una considerable actividad de transgalactosilasa de la enzima (productora de inductor) en vista de que la célula en tales condiciones disponía de otros azúcares para ser utilizados como fuente de carbono y por lo tanto no requería de manera predominante de la actividad hidrolítica de la β -galactosidasa.

En otro experimento, con el fin de simular la inducción tardía del cultivo, se sustituyó la mitad de la sacarosa presente en el medio M-L, por lactosa y melibiosa respectivamente. Estos azúcares fueron incluidos en el medio de cultivo desde el inicio de la fermentación. Los resultados se muestran también en la Figura 5.2.5.1 e indican que en este experimento se logró la expresión de la proteína híbrida en niveles mínimos. Sin embargo, en un segundo experimento, cuyos resultados se presentan en la Figura 5.2.5.2, es aparente la presencia de una banda de proteína híbrida en tales condiciones. En el mismo gel se muestra el caso de la inducción con lactosa, cuando se utilizó una concentración final de 10mM, adicionada a las 6 horas de iniciado el cultivo. Con fines comparativos, también se incluye el resultado de un cultivo inducido con IPTG. Como se puede observar, la inducción con lactosa, representó en este caso, un porcentaje cercano a la obtenida con el inductor gratuito IPTG.

5.2.6 Alternativas en el uso de lactosa (Experimento 4.3.6 (B))

En vista de los resultados anteriores con el medio M-L se probaron diversas alternativas para lograr la inducción con lactosa en los

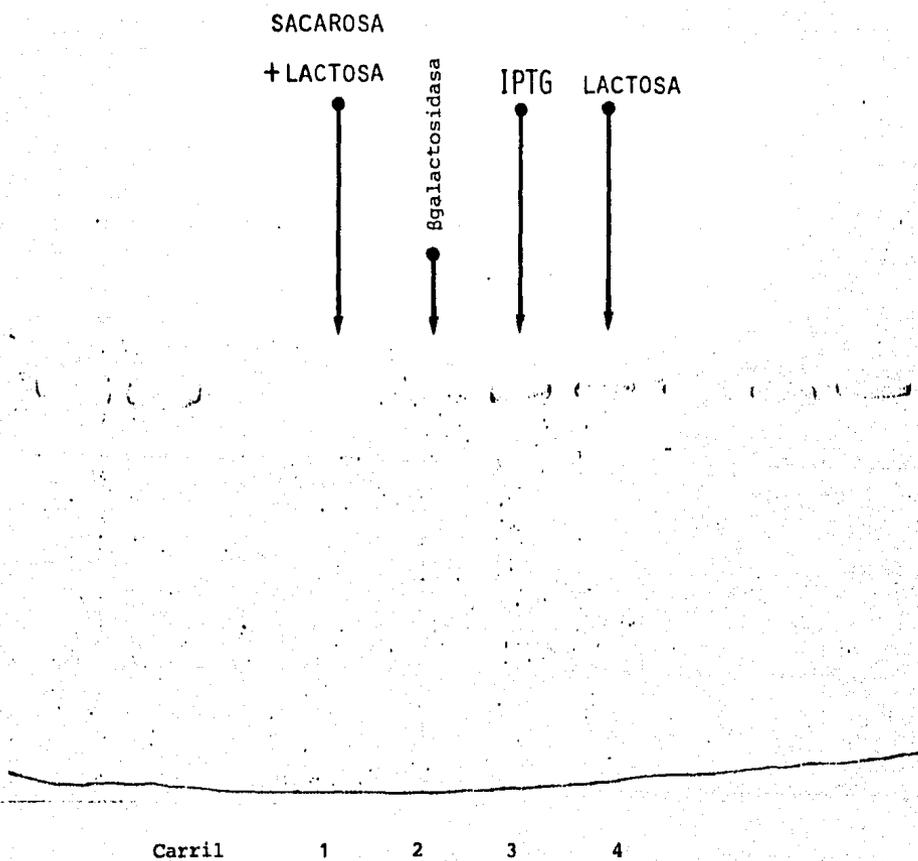


FIGURA 5.2.5.2 Efecto de la lactosa como inductor en la producción de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275 desarrollados en el medio M-L. Carril 1: la fuente de carbono en el medio M-L fue 2 g/l de lactosa; carril 2; patrón de β-galactosidasa (10 μg); carril 3: medio M-L induciendo con lactosa (5mM) en la fase exponencial tardía. En todos los casos la cosecha se efectuó a las 24 horas después de inducir. El gel corresponde a proteínas precipitables (30 μg). Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.5 (B).

medios M-9 y MB. Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 5.2.6.1. En primer lugar se debe resaltar la diferencia en la expresión de híbrido cuando se induce con IPTG en ambos medios. En el caso del M-9 la biosíntesis de híbrido es elevada mientras que en el medio M-B la biosíntesis de híbrido es considerablemente menor. La diferencia fundamental de ambos medios es su relación Carbono/Nitrógeno, expresada en este caso por la concentración de azúcar referida a la concentración de peptona. En el medio M-9 esta relación tiene un valor de 0.26, mientras que en el medio M-B es de 0.8. Aparentemente las relaciones carbono/nitrógeno bajas en el medio de cultivo producen mayor cantidad de híbrido. En consecuencia un medio de producción adecuado deberá estar "desbalanceado" de acuerdo al criterio de formulación de medios de cultivo para la producción de biomasa, como fue el caso, en el sistema de la Cadena A.

Quando la inducción se realizó con 1 g/l de lactosa la expresión de híbrido en el medio M-B es apenas perceptible en el gel, mientras que en el M-9 se presenta una banda reducida aunque mayor que en el M-B (ver Figura 5.2.6.1)

Las otras alternativas de inducción consistieron en lo siguiente:

- a) Sustituir la mitad de la glucosa del M-9 por lactosa desde el inicio del cultivo; esto con el fin de generar un crecimiento diaúxico y evitar los posibles problemas de la inducción temprana.
- b) Sustituir la glucosa del M-9 por lactosa desde el inicio

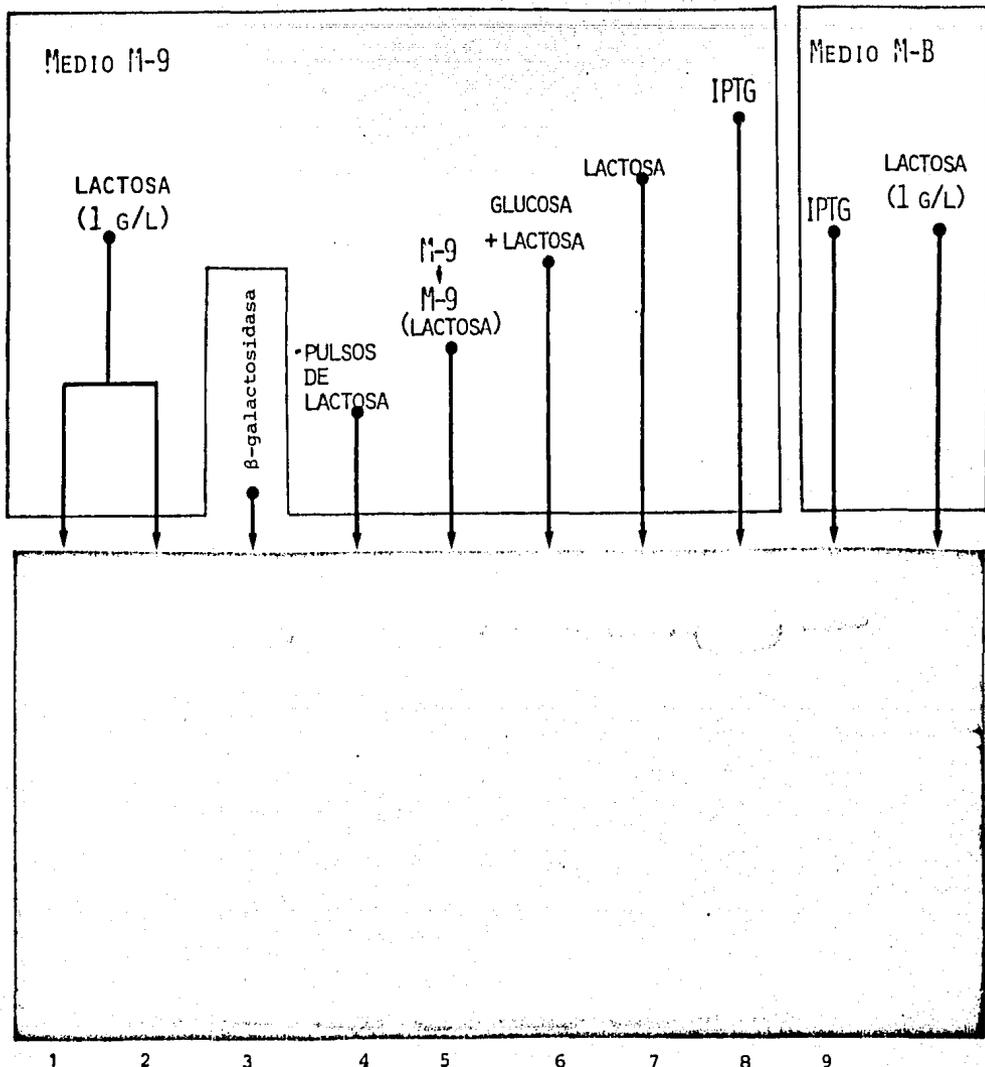


FIGURA 5.2.6.1 Alternativas de inducción para la producción de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275 desarrollados en los medios M-9 y M-B. Carril 1 y 2: Medio M-9, inducción con lactosa (1g/l) en la fase exponencial tardía, carril 3: patrón de β -galactosidasa (10 μ g); carril 4: medio M-9, pulsos periódicos de lactosa (5mM) al agotarse los azúcares en el medio; carril 5: medio M-9, el cultivo se centrifuga, lava y resuspende en medio M-9 con lactosa como fuente de carbono; carril 6: medio M-9, glucosa 2g/l, lactosa 2g/l; carril 7: medio M-9, lactosa como fuente de carbono; carril 8: medio M-9, inducido con IPTG (5mM) en la fase exponencial tardía, carril 9: medio M-B, inducido con IPTG (5mM) en la fase exponencial tardía; carril 10: medio M-B, inducción con lactosa (1 g/l) en la fase exponencial tardía. En todos los casos la cosecha se realizó a las 24 horas después de inducir. El gel corresponde a proteínas precipitables y en todos los carriles excepto en el carril 3 se aplicaron 30 μ g de proteína. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.6 (B).

del cultivo. Si se lograba la inducción, simplificaría la formulación del medio de cultivo.

- c) Crecer en el medio M-9 y adicionar pulsos de lactosa cuando los azúcares se hubieran agotado. La razón de ello fué que la lactosa es un sustrato que puede inducir el sistema, pero es metabolizable. En consecuencia al agotarse los azúcares la inducción se suspende. Adicionando pulsos de lactosa se pretendía mantener inducido el sistema durante un tiempo mayor, respecto a cuando solo se hacía una adición, alcanzando una concentración final de 1 g/l.
- d) Crecer en M-9, centrifugar las células, lavarlas e inocularlas en medio M-9 fresco, pero conteniendo lactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono. Esto equivale a iniciar el cultivo con un inóculo mayor en el que no se adicionan los probables metabolitos tóxicos que interrumpen el crecimiento. De hecho, este procedimiento equivale a la alternativa b), pero donde la relación lactosa/célula al iniciar el cultivo es menor y por lo tanto el inductor estará presente durante menos tiempo en el cultivo. Ello debido a que la velocidad de desaparición de lactosa es mayor en este caso. Con este experimento se pretendía investigar la influencia del tiempo al que el sistema estuviera sometido a la inducción respecto a la expresión de proteína híbrida. Adicionalmente se evaluaría el efecto del tamaño del inóculo en el mismo fenómeno.

Como se puede observar en el gel, el mejor caso resultó cuando en el medio M-9 se sustituía el total de la glucosa por lactosa, desde el inicio del cultivo. Este resultado indicó que en este medio de cultivo es posible inducir desde el inicio del cultivo sin pérdida aparente de biosíntesis de híbrido. Esto probablemente se deba a que la inducción con lactosa no es tan severa como lo es con IPTG y puesto que la lactosa es metabolizable, la generación de alolactosa estará regulada dinámicamente por los requerimientos celulares. Puesto que el cultivo se inició con un inóculo pequeño, la inducción fué posible en un número elevado de generaciones. La inducción con lactosa en este medio es comparable a la inducción con IPTG en el medio M-B.

En orden decreciente de expresión de la proteína híbrida le siguió el caso cuando se desarrolló en el medio M-9 y se transfirió a otro M-9 conteniendo lactosa. Este resultado se puede explicar en función de que, como se había especulado, la relación lactosa/célula al inicio del cultivo es menor y el fenómeno de inducción se presenta durante menos tiempo.

El siguiente caso en orden de importancia de síntesis de proteína híbrida resultó ser cuando se añaden pulsos de lactosa. Esto puede ser el resultado de al menos tres situaciones: la relación lactosa/células es baja; las células se encuentran en fase estacionaria en el momento de inducir y en determinadas condiciones fisicoquímicas, por ejemplo, se sabe que el pH tiene una influencia marcada en el transporte de lactosa hacia el interior de la célula (West, 1970; West & Mitchell, 1973; Ramos & Kaback, 1977); y finalmente es posible que exista represión catabólica en vista de utilizar glucosa en el medio de cultivo.

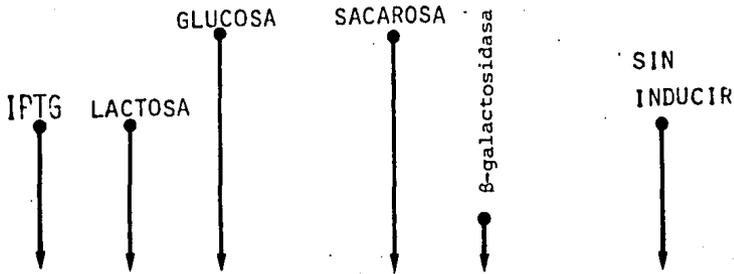
Los niveles de expresión mas bajos se obtuvieron cuando se empleó una mezcla de azúcares (glucosa y lactosa). Este hecho no puede explicarse exclusivamente en función de que en el momento de iniciar la inducción, cuando la glucosa se hubiera agotado, la relación lactosa/células fuera baja; debido a que cuando se usó una relación aún más baja (alternativa c) los niveles de expresión fueron mayores. Aparentemente, el estado fisiológico de la célula y las condiciones fisicoquímicas presentes en el momento de iniciar la inducción, al menos, juegan un papel importante en el fenómeno de inducción. Contrariamente a lo que sucede induciendo con IPTG, la inducción tardía con lactosa representa una desventaja en la producción de proteína híbrida.

Sin duda, la conclusión mas importante de esta área de experimentos radica en que es posible utilizar lactosa como única fuente de carbono, ya que este procedimiento es el que logra los niveles de expresión de proteína híbrida más altos de las alternativas probadas. Sin embargo la inducción todavía es inferior comparada con la que lleva a efecto el IPTG. Como conclusión adicional se debe decir que el empleo de medios de cultivo "desbalanceados", respecto a la producción de biomasa, resultan en niveles más altos de producción específica de proteína híbrida.

5.2.7 Fuente de carbono en los inóculos. (Experimento 4.3.7 (B))

Con el fin de establecer si existía algún efecto de la fuente de carbono en la que se crecerían los inóculos respecto a la inducción, se llevaron a cabo los experimentos cuyos resultados se ilustran en la Figura 5.2.7.1. Se observa que cuando el inóculo proviene de un cultivo

INÓCULOS CECIDOS EN M-9 CON:



Carril

1

2

3

4

5

6

7

8

LACTOSA (4 g/L)
GALACTOSA (2 g/L)

FIGURA 5.2.7.1 Efecto de la fuente de carbono presente en el desarrollo de inóculos de *E. coli* D-1210 pBR-275 sobre la producción de proteína híbrida. Efecto de la presencia de galactosa en la producción de proteína híbrida. Se utilizó el medio M-9 y la cosecha se realizó a las 24 horas. Carril 1: inducción con IPTG; carril 2: medio M-9 con sacarosa como fuente de carbono; Carril 3: inóculo crecido con medio M-9 (glucosa); carril 4; inóculo crecido en medio M-9 con sacarosa como fuente de carbono; Carril 5: patrón de β-galactosidasa (10 μg); Carril 6: medio M-9 conteniendo 4g/l de lactosa y 2g/l de galactosa; carril 7: cultivo sin inducir. El gel corresponde a proteínas precipitables. Proteína total aplicada: 30 μg. Los procedimientos se detallan en las secciones 4.3.7 (B) y 4.3.8 (B).

con sacarosa como fuente de carbono es cualitativamente mejor que cuando proviene de glucosa. En este caso los niveles de expresión alcanzados son muy similares al testigo con IPTG. Es probable que este fenómeno se deba a un potencial enriquecimiento del número de copias del plásmido, como resultado del crecimiento del cultivo a una velocidad de crecimiento menor a la desarrollada al cultivarse en lactosa. Estos resultados podrían explicarse de acuerdo a lo reportado por Engberg and Nordstrom (1979) y están en concordancia con el artículo de Gustafsson & Nordstrom (1980) quienes indican que el número de copias del plásmido presentes en un determinado estado metabólico de la célula se ajusta gradualmente al cambiar tal estado metabólico. Este cambio gradual en las primeras horas del cultivo produciría una síntesis específica mayor de proteína híbrida codificada por el plásmido. Este fenómeno fué ampliamente discutido para el sistema de la Cadena A en las secciones 5,1,10 y 5.1.11 y puede ser aplicable en el caso de la Cadena B.

5.2.8 Efecto de la presencia de galactosa (Experimento 4.3.8 (B))

La β -galactosidasa tiene al menos dos actividades importantes: una transgalactosilítica y otra hidrolítica. (Huber et. al. 1976) El equilibrio entre una u otra reacción pudiera ser desplazado por las concentraciones relativas de sustratos y productos. En función de ello, era importante establecer la relación de azúcares en el medio de cultivo que pudiera desplazar el equilibrio intracelular de la actividad de β -galactosidasa a uno u otro lado y de preferencia, con fines de inducción, hacia la transgalactosilación que genera el inductor verdadero, la alolactosa. Como in-

tento meramente exploratorio se realizó el experimento cuyo resultado se presenta en la parte inferior de la Figura 5.2.7.1. Al crecer el microorganismo en una combinación de lactosa y galactosa, la producción de híbrido no se induce, aunque presumiblemente debiera inducirse la β -galactosidasa nativa puesto que el microorganismo fué capaz de crecer en lactosa, indicando que predominó la actividad hidrolítica respecto a la transgalactosilítica. De cualquier modo, el fenómeno de inducción con lactosa es muy complejo, como se discutirá más adelante (ver Figura 5.2.9.3 por ejemplo) y resulta muy aventurado, con los resultados experimentales que se tienen, el concluir definitivamente al respecto. En vista de que la adición de tales azúcares al medio de cultivo será impráctico en el escalamiento (quizá tanto como el IPTG) no se profundizó más al respecto y se continuó con los estudios exclusivamente con lactosa y sacarosa.

5.2.9 Optimización del medio de cultivo (Experimento 4.3.9 (B))

Diseño Plackett-Burman. Los resultados de los experimentos de inducción indicaron que el medio de cultivo debería tener las siguientes características:

- a) De composición parecida al M-9 (relación C/N baja)
- b) Con lactosa como principal fuente de carbono
- c) Que tuviera también sacarosa

De acuerdo a estas premisas, el medio base para la optimización fué fundamentalmente el M-9 al que se le sustituyó la glucosa por

lactosa y se le adicionó 2 g/l de sacarosa. En vista de que la cepa D-1210 no presentó auxotrofías, no fueron necesarios los aminoácidos en el medio de cultivo. El diseño Plackett-Burman tiene como objeto el establecer cuales son los componentes que tienen mayor influencia en el proceso. Se agruparon las sales como un solo parámetro con el fin de que las variables a evaluar fueran 7. En consecuencia los experimentos desarrollados serían 8, de manera que pudieran correrse en un mismo gel, incluyendo un patrón de β -galactosidasa y un testigo inducido con IPTG. Esto se hizo con el objeto de minimizar los errores atribuibles al corrimiento, fijación, tñido, desteñido y fotografía del gel.

En la Figura 5.2.9.1 se presenta el diseño experimental así como los resultados del gel y los efectos calculados de cada una de las variables, en base exclusivamente a la producción específica de proteína híbrida.

Los efectos en orden de importancia fueron: lactosa (+), NH_4Cl (-), KH_2PO_4 (+), Na_2HPO_4 (+), peptona (+), sacarosa (-) y sales (-). Los signos positivos indican que el nivel de la variable debe incrementarse y los negativos que deben disminuirse, para mejorar la producción. Sin duda, la inducción por la lactosa juega el papel más importante, la siguen los fosfatos indicando muy probablemente una influencia marcada en los patrones de pH en la expresión de híbrido. La fuente inorgánica de nitrógeno tiene una influencia negativa, así como las sales y la sacarosa aunque en niveles muy bajos.

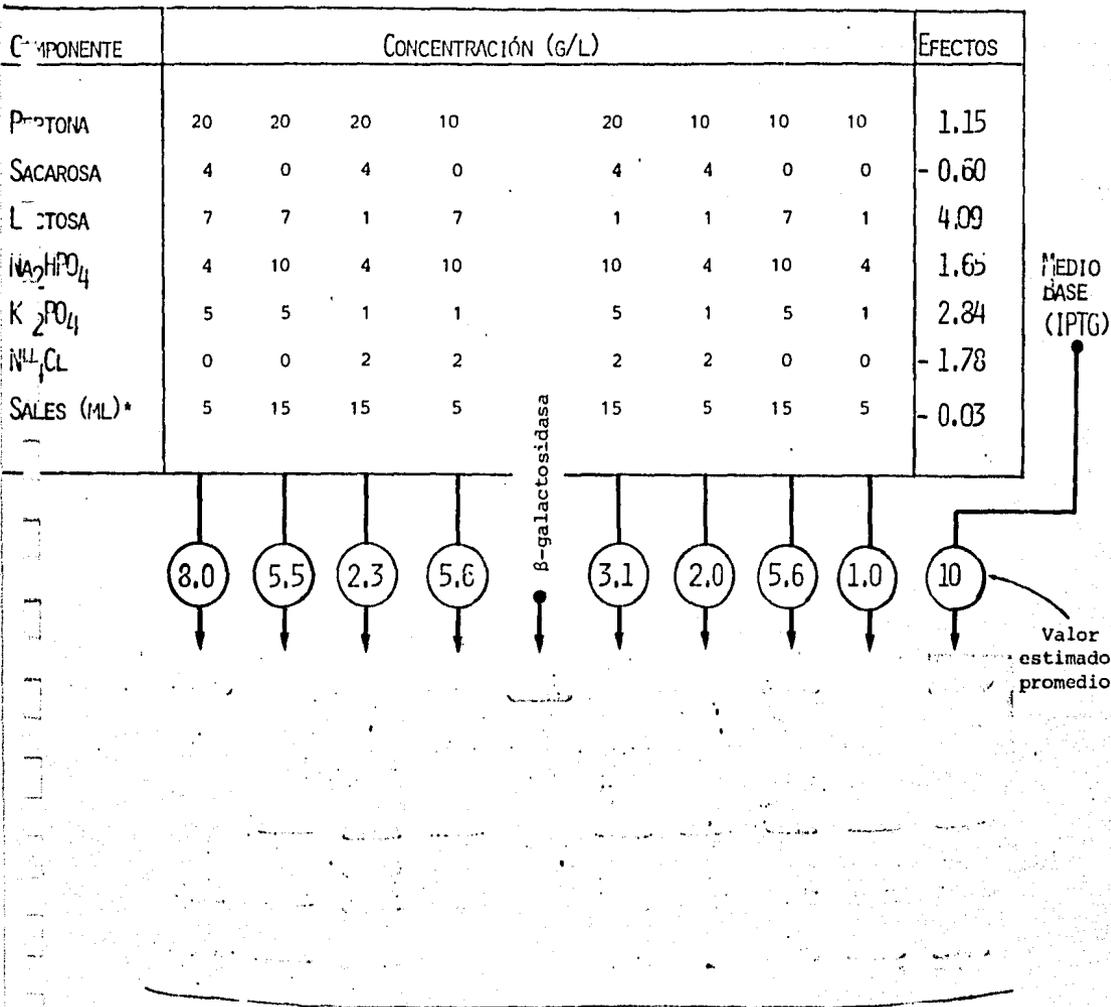


FIGURA 5.2.9.1 Diseño experimental Plackett-Burman para la determinación de las variables de mayor influencia en la producción de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275. La composición de cada medio de cultivo es la indicada. La solución denominada "sales" estaba compuesta por MgSO₄ 0.0246 g/ml, CaCl₂ 0.001 g/ml y NaCl 0.05 g/ml. Los números indicados en los círculos corresponden a la estimación de proteína híbrida; en todos los carriles la cantidad de proteína es la misma (30 µg), se incluye un patrón de β-galactosidasa (10µg). Los efectos se calcularon de acuerdo a la literatura citada en la sección 4.3.9 (B) Se incluyó un testigo inducido con IPTG al que se le dió un valor arbitrario de 10 con fines comparativos. En cada caso se calculó la µ, azúcares residuales y pH final. Al negativo de esta foto se le analizó por densitometría. Otras condiciones se detallan en la sección 4.3.9 (B).

En la Figura 5.2.9.2 se ilustran las relaciones encontradas entre otras variables que se cuantificaron pero que no se incluyeron en el cálculo de los efectos llevados a cabo solo con la producción de híbrido. Se observa una cierta correlación entre la velocidad de crecimiento y la producción de híbrido. Aparentemente, mientras más baja es la velocidad de crecimiento, mayor es la producción relativa de híbrido. Esto podría ser explicado en vista de que una actividad transgalactosilítica predominante sobre una hidrolítica de la β -galactosidasa, implicaría que la disponibilidad intracelular de monosacáridos estaría limitada y en consecuencia la bacteria crecería más lentamente. Por otra parte, estos resultados, de acuerdo a lo postulado por Engberg & Norstrom (1975) podrían ser causados por un incremento en el número de copias del plásmido al crecer a velocidades específicas menores.

La relación entre el cambio global del pH en el transcurso de la fermentación y la producción relativa de proteína híbrida, se ilustra en la parte inferior de la Figura 5.2.9.2. Esta relación indica que aparentemente la producción de híbrido se favorece cuando el cambio global en el pH tiende hacia valores positivos, esto es, una tendencia a la baja en el pH.

Aunque estos valores deben tomarse con reserva puesto que involucran un periodo relativamente grande de tiempo donde el patrón de pH puede tener variaciones importantes. Sin embargo es claro que el pH (o más bien el patrón de pH) tiene una influencia decisiva en la producción de híbrido. Lo anterior se ve reforzado por los elevados efectos que pre-

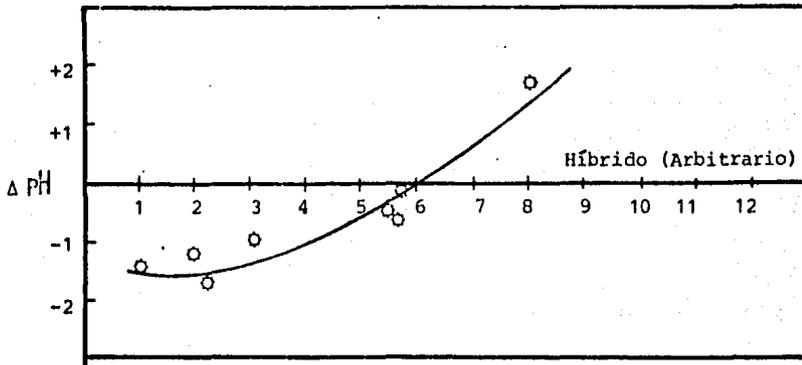
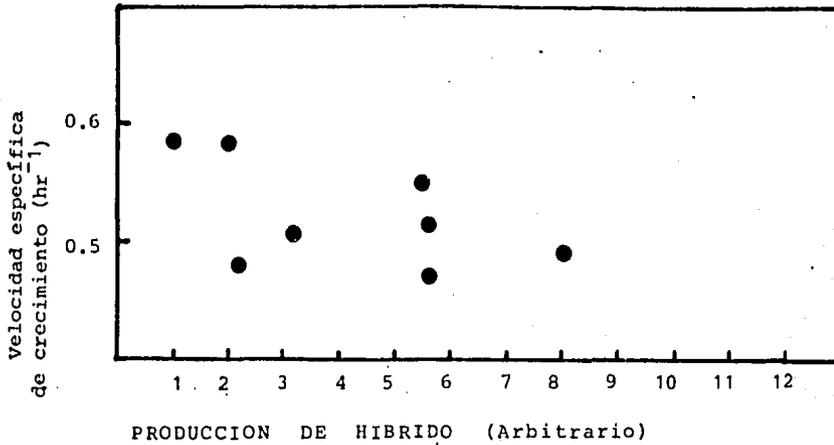


FIGURA 5.2.9.2 Relación entre la velocidad específica de crecimiento y el cambio global de pH en la producción relativa de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275. Los datos corresponden a los obtenidos en el diseño experimental Plackett-Burman. El cambio global de pH (ΔpH) se define como pH inicial-pH final. Las condiciones se detallan en la sección 4.3.9. (B).

sentan los fosfatos en el diseño Plackett-Burman, indicando que el incremento de la capacidad de amortiguamiento llevaría a mejores resultados. Huber et. al. (1976) han reportado que in vitro el pH tiene una influencia decisiva en la actividad de transgalactosidasa respecto a la actividad hidrolítica de la β -galactosidasa. Esta relación se incrementa a pH superior a 8 (llegando hasta 1.4 a pH = 11) y disminuyendo a pH inferior a 6 (por ejemplo 0.55 a pH 4.5). Esta relación se mantiene estable (= 0.8) en el rango entre pH 6 y 8. Sin embargo, resulta difícil especular sobre el significado de estos resultados in vivo debido a que no se conocen los niveles de pH en el microambiente de la β -galactosidasa en el interior de la célula, y seguramente están regulados dinámicamente de manera compleja por el metabolismo celular.

Por otra parte Maloney & Wilson (1978), han demostrado que el transporte de lactosa puede ser estimulado por el metabolismo oxidativo y que a su vez la relación de contranporte H^+ /lactosa depende del pH (Ramos & Kaback, 1977). De esta manera, el pH puede influir el transporte de lactosa y en consecuencia sus perfiles de concentración intracelulares a su vez pueden alterar el equilibrio de la producción de inductor (alolactosa) por la β -galactosidasa. En la Figura 5.2.9.3 se resumen los postulados establecidos por Jube & Bourgeois (1973), Huber et. al (1976) y Maloney & Wilson (1978) con el fin de ilustrar muy esquemáticamente, las complejas interrelaciones existentes en el fenómeno de inducción con lactosa.

Resulta también muy probable que la disminución en la velocidad de crecimiento sea causada por limitaciones del metabolismo oxidativo,

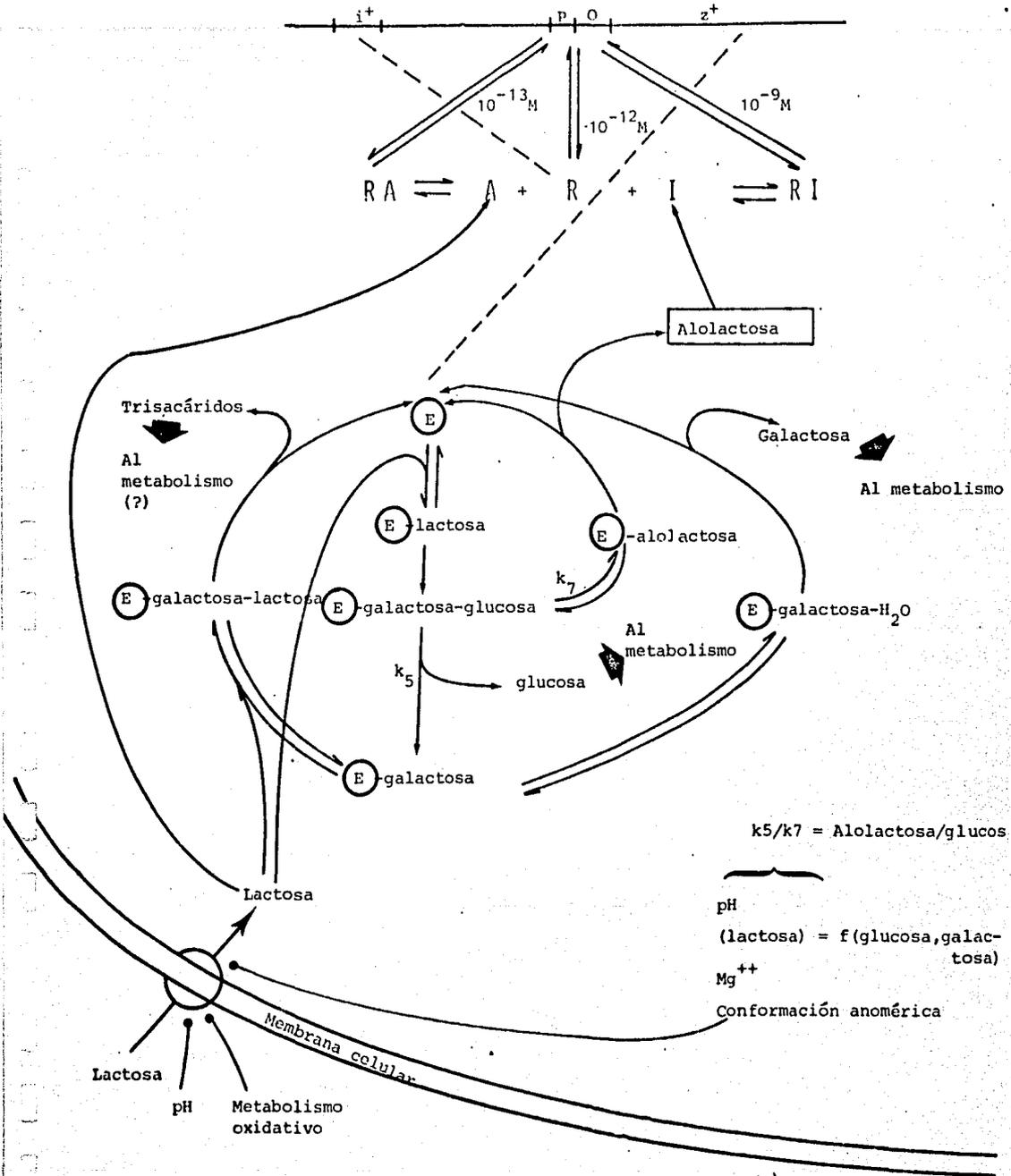


FIGURA 5.2.9.3 Interrelaciones existentes en el fenómeno de inducción con lactosa. En base a Jube & Bourgeois (1973), Huber *et al* (1976) y Maloney & Wilson (1978).

situación que conduce a la producción de metabolitos ácidos que disminuyen el pH. Estas limitantes al metabolismo oxidativo pueden estar causadas por las condiciones de transferencia de oxígeno en los cultivos. Lo anterior puede deducirse en parte de los bajos rendimientos de biomasa obtenidos en los cultivos respecto a la fuente de carbono, lo que podría estar indicando una limitación de oxígeno.

Las variables elegidas para el siguiente paso de optimización fueron lactosa, KH_2PO_4 y peptona. Se considera que el efecto del fosfato de sodio se ejerce como influencia del pH y al evaluar al KH_2PO_4 se está considerando indirectamente. La peptona, aunque ocupa el quinto lugar en importancia relativa en los efectos, se eligió como parámetro a optimizar en vista de que como se vió en los experimentos de inducción, juega un papel decisivo en la expresión del híbrido, quizá debido a que disminuye la relación C/N y proporciona aminoácidos disponibles para la síntesis de proteína. El medio base para el siguiente paso de optimización fué aquel que proporcionó los mejores resultados en el diseño Plackett-Burman y su composición se indica en el primer carril del gel incluido en la Figura 5.2.9.1.

Diseño Box-Wilson. Una vez seleccionadas las variables, se procedió al diseño del experimento para la optimización por el método Box-Wilson. Puesto que este es un método que requiere 2^n experimentos para evaluar n variables, se seleccionaron tres de ellas para que los resultados se pudieran visualizar en un solo gel. Las unidades de variación se calcularon en función de los efectos obtenidos en el diseño Plackett-Burman y se muestran junto con los resultados en la Figura 5.2.9.4. En este di-

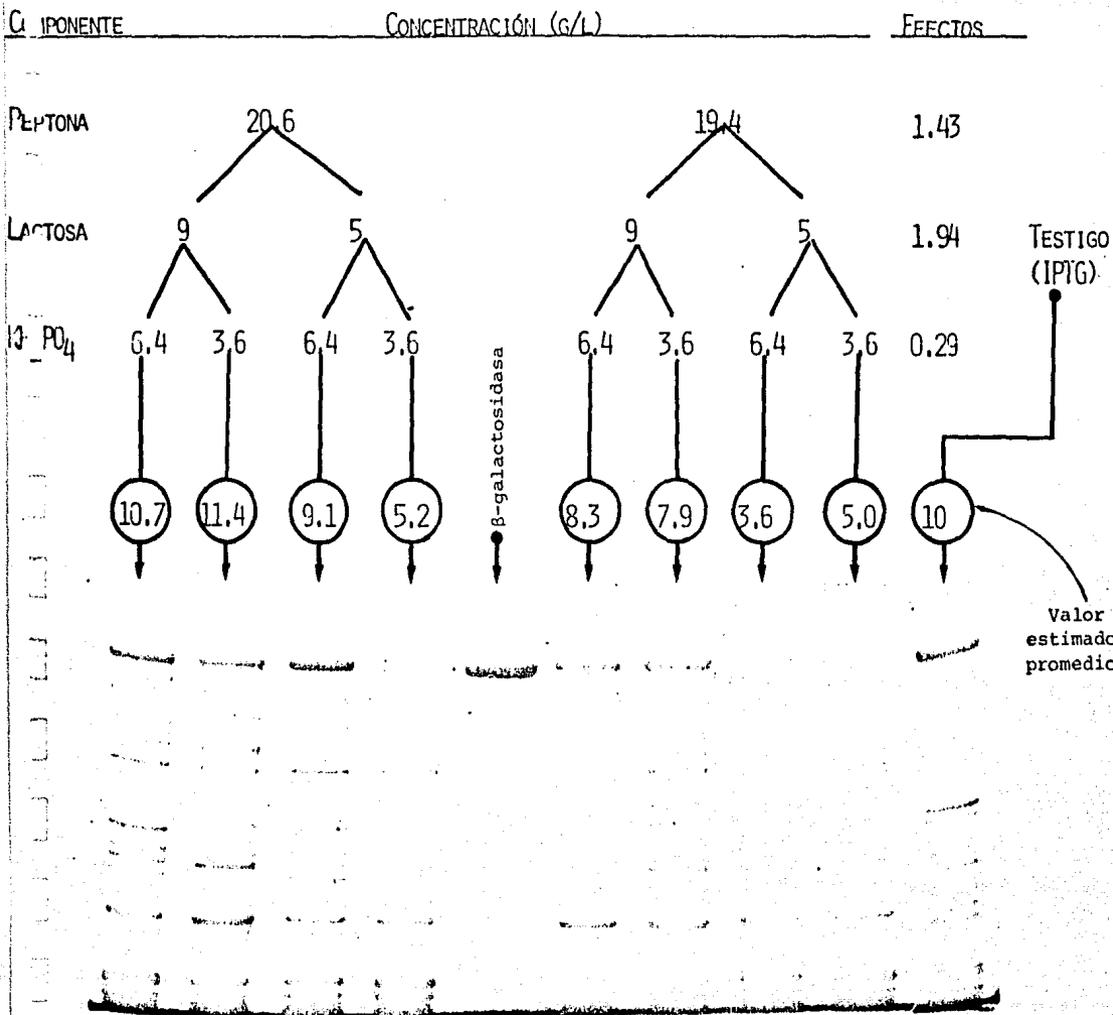


FIGURA 5.2.9.4 Diseño experimental Box-Wilson para la optimización de la producción de proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275. La concentración de lactosa, peptona y KH_2PO_4 en cada medio de cultivo es la indicada, otros componentes del medio que no se alteraron en este diseño son los indicados en el mejor experimento del diseño Plackett-Burman. Los círculos indican la producción relativa de proteína híbrida respecto a un testigo inducido con IPTG. En todos los carriles la cantidad de proteína es la misma (30 μ g). Se incluye un patrón de β -galactosidasa (10 μ g). Los efectos se calcularon de acuerdo a lo descrito en la sección 4.3.9(B). En todos los casos se midió la μ , azúcares residuales y el pH final.

seño, hubo experimentos individuales que superaron al testigo inducido con IPTG. El mayor efecto sigue siendo el de la lactosa, seguido de la peptona y finalmente de menor magnitud se encuentran los fosfatos. En la Figura 5.2.9.5, se presentan las relaciones entre producción de híbrido y las velocidades específicas de crecimiento y el cambio de pH durante la fermentación. En general se puede decir que el comportamiento de las correlaciones es muy similar a los presentados en el caso del diseño Plackett-Burman. Esto es, tendencia a producir más híbrido a menores velocidades de crecimiento y a disminuciones respecto al pH inicial. Como se había mencionado en el diseño anterior, es posible que las limitaciones al metabolismo oxidativo fueran la causa de ambos fenómenos. En la Figura 5.2.9.6, se grafican los rendimientos de biomasa respecto a la fuente de carbono (Y_s) en función de la producción relativa de proteína híbrida. Las gráficas se construyeron a partir de los resultados obtenidos en el diseño Plackett-Burman y Box-Wilson. Es clara una tendencia a producir más proteína híbrida cuanto más bajo es el rendimiento de carbono. Adicionalmente, en ambos diseños experimentales, la máxima producción de híbrido coincidió con los valores mínimos de la productividad de biomasa (μ_X). Estos resultados apoyan fuertemente que el metabolismo oxidativo juega un papel preponderante en la inducción con lactosa.

A manera de resumen en la Figura 5.2.9.7, se presentan los rangos de variación de los azúcares residuales, la velocidad específica de crecimiento, la concentración celular final y la producción relativa de híbrido, en los tres diseños experimentales. En la misma Figura se grafican los valores de "productividad de híbrido" (μ_{XP}). La producción de híbrido alcanzó su máximo en el diseño Box-Wilson, en un medio de la siguiente

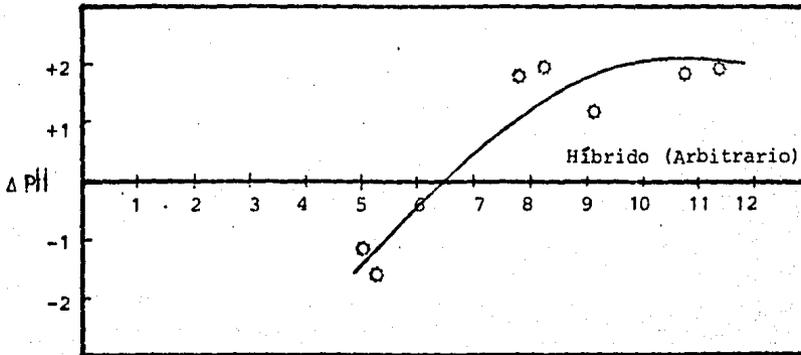
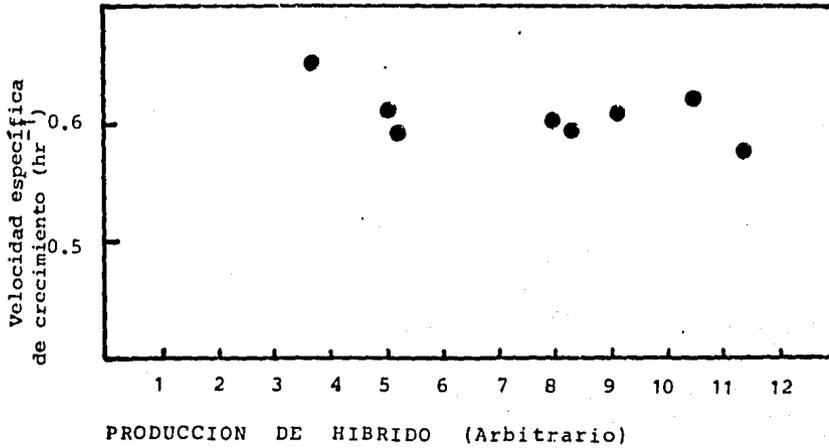


FIGURA 5.2.9.5 Relación entre la velocidad específica de crecimiento y el cambio global de pH en la producción relativa de la proteína híbrida en cultivos de *E. coli* D-1210 pBR-275. Los datos corresponden a los obtenidos en el diseño experimental Box-Wilson. El cambio global de pH (Δ pH) se define como: pH inicial - pH final. Las condiciones se detallan en la sección 4.3.9(B).

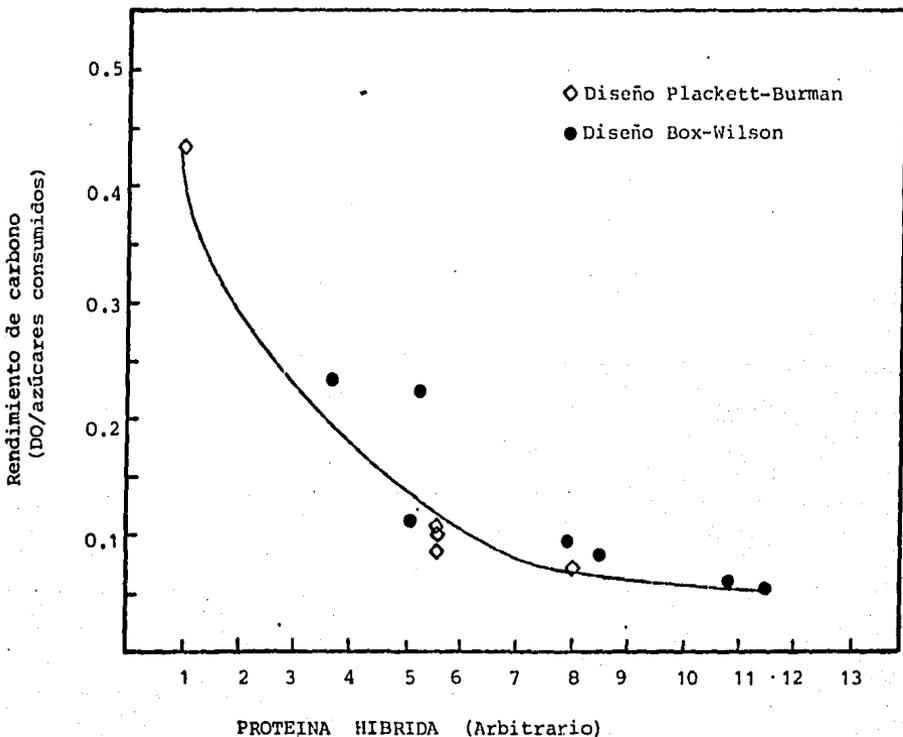
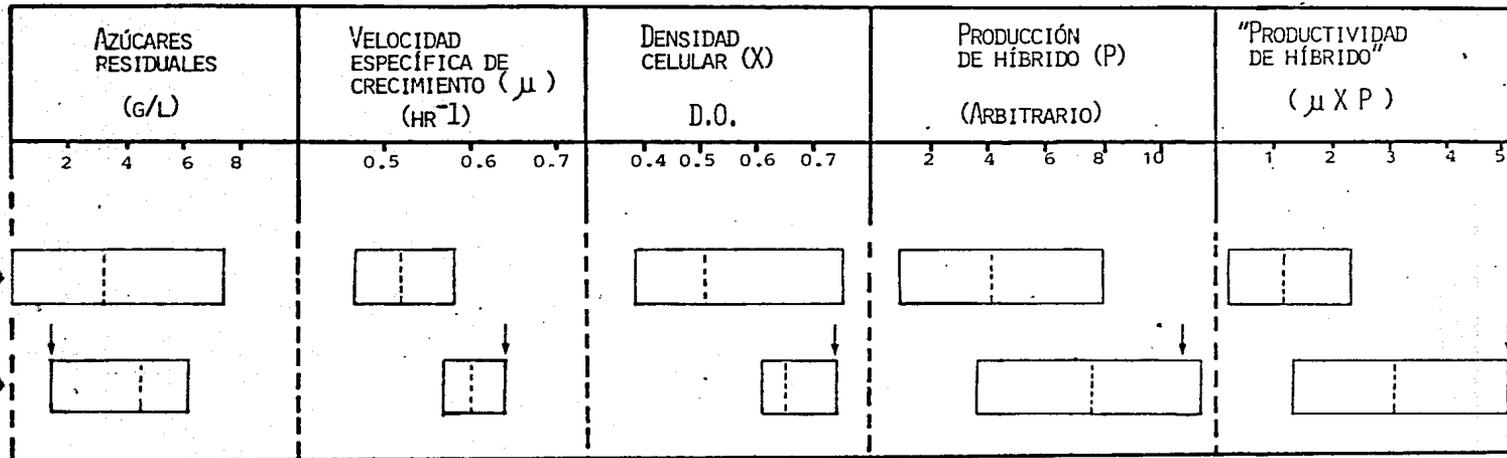


FIGURA 5.2.9.6 Relación entre el rendimiento de biomasa respecto a la fuente de carbono en la producción relativa de proteína híbrida en cultivos de *E.coli* D-1210 pBR-275. El rendimiento de carbono (Y) se calcula como la densidad óptica final dividida por los azúcares consumidos. Los puntos experimentales corresponden a los obtenidos en el diseño --- Plackett-Burman (◇) y Box Wilson (●). Las condiciones fueron las mismas que las descritas en las Figuras 5.2.9.1 y 5.2.9.4. Ver sección --- 4.3.9(B) para mayor detalle.

FIGURA 5.2.9.7

RANGOS DE VARIACION Y PROMEDIOS DE LOS PARAMETROS EVALUADOS EN LOS DISEÑOS DE OPTIMIZACION



(A) DISEÑO PLACKETT-BURMAN

(B) DISEÑO BOX-WILSON

Indica el promedio de los experimentos

Indica el mejor experimento individual

composición:

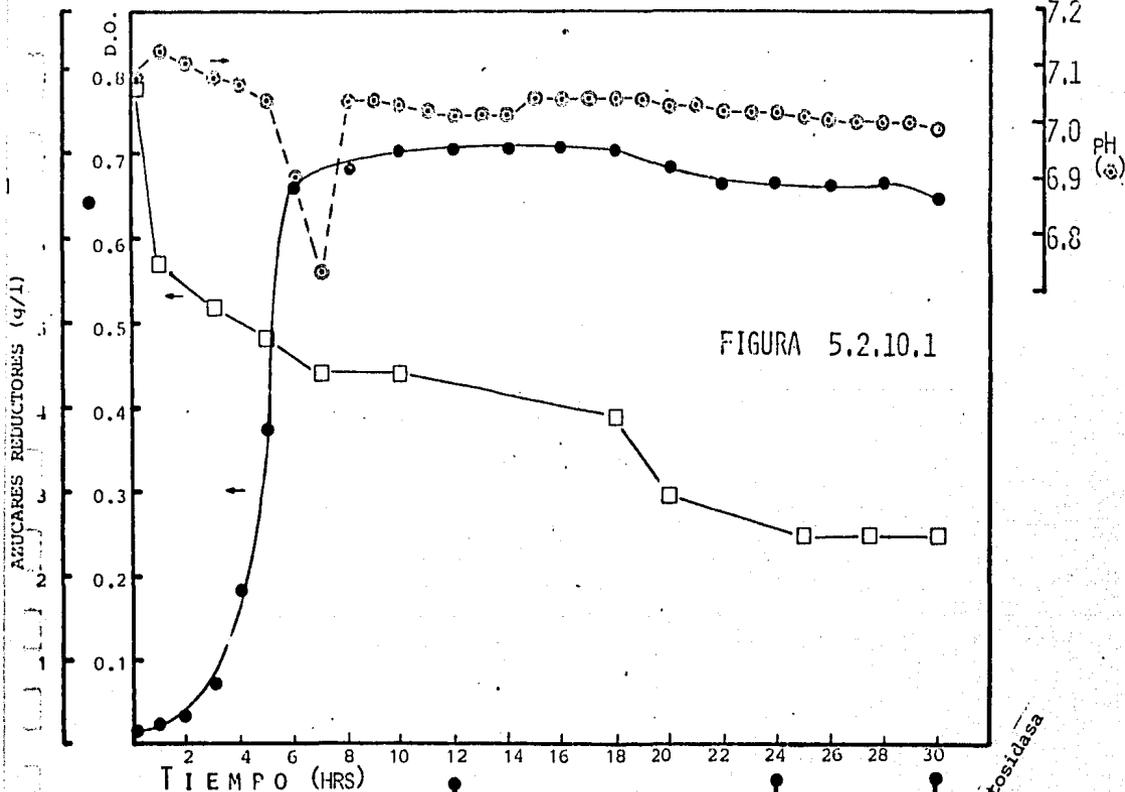
	<u>g/l</u>
Peptona	20.6
Sacarosa	4
Lactosa	9
Na ₂ HPO ₄	4
KH ₂ PO ₄	4
Sales	5 ml

Debe recalcar que es muy probable que la sacarosa en este medio de cultivo sea utilizada en proporción mínima y con muy poca ventaja, si no es que ninguna, en la producción de híbrido. Esto se infiere, por un lado, de su bajo efecto (y además negativo) presentado en el diseño Plackett-Burman, y por otro, de que el promedio global de los valores de azúcares residuales sea cercano a 4 g/l en los experimentos de los dos diseños experimentales. La sacarosa no se eliminó en el diseño Box-Wilson con el fin de no variar las condiciones del experimento base, obtenido del diseño Plackett-Burman.

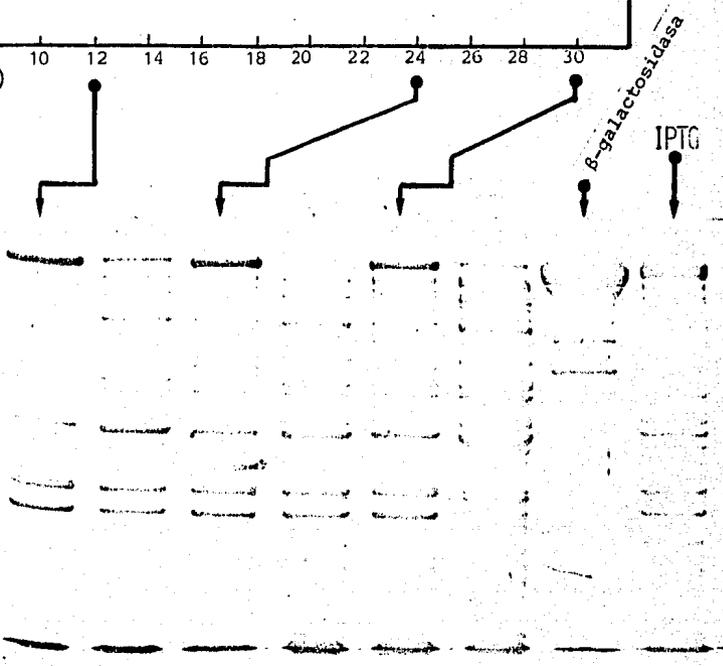
5.2.10 Cultivo en fermentador de 2 lts. (Experimento 4.3.10 (B))

Todos los experimentos descritos hasta el momento se realizaron en matraces. El medio de cultivo optimizado que logró la mayor producción de híbrido se probó en un fermentador de 2 lts. y se caracterizó su cinética, la cual se muestra en la Figura 5.2.10.1. La velocidad específica de crecimiento desarrollada por el cultivo fué de 0.75 hr^{-1} , apre-

CINETICA DE FERMENTACION Y DE PRODUCCION DE HIBRIDO EN EQUIPO DE 2 LITROS



La agitación y la aireación se variaron con el fin de mantener el oxígeno disuelto superior al 10 % de saturación. El medio de cultivo fue aquel que resultó mejor del diseño Box-Wilson. El gel corresponde a las proteínas precipitadas de las células cosechadas en los tiempos indicados. Se incluye un testigo inducido con IPTG utilizando el medio M9 y en matrâz. En todos los casos la proteína en cada carril fué de 30 µg. La velocidad específica de crecimiento fué de 0.75 hr⁻¹. Los procedimientos se detallan en la sección 4.3.10(B).



ciablemente mayor a las obtenidas en los experimentos en matraces. La concentración celular máxima y los niveles de azúcares residuales son similares a los obtenidos en matraces. El patrón de pH solo tuvo cambios drásticos en las primeras 8 horas, pero nunca alcanzó los niveles que se presentaron en matraz (de dos unidades a la baja). La producción de proteína híbrida detectada a las 12, 24 y 30 horas de cultivo, no mostró diferencias apreciables y fué menor en todos los casos al testigo que se indujo con IPTG. Estos datos fundamentan el papel que juega el metabolismo oxidativo en la inducción con lactosa. En este experimento el oxígeno se mantuvo a un nivel superior al 10% de saturación, manipulando la agitación,^x La productividad de biomasa fué mas alta que cualquiera de las observadas en los experimentos en matraz. Sin embargo, el rendimiento de carbono (Ys) fué bajo, y no compatible, al menos directamente, con lo establecido en la Figura 5.2.9.6. Esto indica que el crecimiento en el fermentador se detiene por causas diferentes a las que suceden en el matraz, probablemente la aparición de algún metabolito tóxico.

Es claro que aún en un escalamiento de baja magnitud (de matraz de 250 ml a fermentador de 2 lts), en el caso del sistema de cadena B, se presentaron todavía ciertos problemas que deberán ser estudiados más a fondo y resueltos, antes de iniciar un escalamiento mayor con el medio de cultivo experimentado.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El contar con dos sistemas bacterianos diferentes para la ex presión de proteínas híbridas β -galactosidasa-Cadena A y β -galactosidasa-Cadena B, permitió evaluar desde varios puntos de vista las ventajas y -- desventajas de un sistema constitutivo respecto a uno inducible con el -- objeto de producir proteínas codificadas por plásmidos recombinantes.

En el caso de la Cadena A, la expresión de la proteína híbri- aa codificada por el plásmido pBR-213 es constitutiva. Por otra parte -- esta proteína es insoluble y no funcional para la célula. Es probable -- que el hecho de producir permanentemente una proteína no funcional genere desventajas metabólicas que promuevan mutaciones en el plásmido y/o el -- cromosoma que a su vez conduzcan a eliminar la capacidad de biosíntesis - de la proteína quimérica; sin que ello signifique la pérdida total del -- plásmido.

Las ventajas de una producción constitutiva se reflejan en -- una elevada productividad de la proteína híbrida, relacionada directamente con la productividad de biomasa. Sin embargo, para ello, es un requisito indispensable conservar la integridad física y funcional del plásmido -- en la población bacteriana. Esto requiere de una cuidadosa selección de poblaciones con elevada capacidad de síntesis de proteína híbrida y pre-- cauciones especiales para el almacenamiento de la cepa y en el desarrollo de los cultivos.

El sistema de la cadena B se encuentra en una bacteria que requiere inducirse para lograr la expresión de la proteína híbrida codificada por el plásmido pBR-213. En este caso, el sistema solo produce la proteína química insoluble y no funcional, en los cultivos finales de producción; lo que puede contribuir a una mayor estabilidad de la integridad física y funcional del plásmido a lo largo del proceso. El sistema puede inducirse fácilmente utilizando lactosa como fuente de carbono, sin embargo, a diferencia del sistema de la cadena A, la productividad de biomasa es inversamente proporcional a la producción específica de proteína híbrida. Esto es debido a que en general los niveles de inducción son mayores cuando el metabolismo oxidativo se encuentra limitado. En estas condiciones el rendimiento de biomasa sobre la fuente de carbono es entre 2 y 5 veces más bajo respecto a los cultivos en los que el oxígeno no es limitante. El hecho de reproducir las condiciones de la limitación de oxígeno, constituye un problema, todavía por resolver, en el escalamiento del proceso. Si esto se lograra, los bajos rendimientos (en biomasa) podrían ser justificados en vista de la elevada estabilidad genética de este sistema.

La elección definitiva de un sistema constitutivo o uno inducible para la producción de intermediarios de insulina humana, tendrá -- que ponderar, por un lado, en el sistema constitutivo, los bajos rendimientos y los problemas de escalamiento, combinados con la elevada estabilidad de la expresión del plásmido. Por el otro lado, en el caso constitutivo, los altos rendimientos con los riesgos elevados respecto a la estabilidad de la expresión del plásmido. La decisión muy probablemente tenga que ser tomada en términos económicos.

Una conclusión importante de este trabajo fue que para ambos sistemas (Cadena A y Cadena B), los niveles de expresión de las proteínas híbridas dependen en gran parte de la dosis de genes que las codifican, presentes en la población bacteriana. Es muy probable que el número de copias del plásmido en la bacteria tenga variaciones importantes, en función de las condiciones de cultivo. Los niveles de expresión pueden ser elevados de manera muy sencilla subcultivando poblaciones bacterianas en ayuno de aminoácidos. Esto representa ventajas en el desarrollo de inóculos y en la expresión final de la proteína híbrida. Sin embargo, en el caso de la Cadena A, este enriquecimiento, a partir de ciertos valores, aparenta incrementar la inestabilidad funcional del plásmido.

El escalamiento requiere, entre otras cosas, el desarrollo de medios de cultivo que utilicen materias primas industriales, que maximicen el rendimiento y en los cuales los cultivos aprovechen eficientemente la fuente de carbono y nitrógeno, principalmente. Mediante técnicas estadísticas de optimización se logró un medio de cultivo, para el sistema de cadena A, cuyos componentes principales son la sacarosa industrial como fuente de carbono y la peptona industrial como fuente de nitrógeno. Este medio es aprovechado eficientemente por los cultivos de E. coli MX-614 y pBR-213 sin menoscabo de la producción específica de proteína híbrida, sin embargo los rendimientos de biomasa utilizando sacarosa como fuente de carbono constituyen cerca del 50% de los obtenidos cuando se usa glucosa. La decisión final entre una u otra fuente de carbono tendrá que incorporar criterios económicos. De cualquier modo, se demostró la viabilidad técnica del uso de ambos azúcares. En el caso de la cadena B se desarrolló un medio de cultivo que utiliza lactosa como -

fuelle de carbono y peptona como fuente de nitrógeno. Con este medio se logró, en matraces, igualar y superar los niveles de inducción logrados con el inductor gratuito IPTG. Como ya se comentó, los rendimientos de biomasa disminuyen al elevar la expresión del sistema inducible y es necesario todavía, establecer los criterios para el escalamiento del proceso. En este caso se deberá evaluar el uso de un reactivo de baja disponibilidad como lo es el IPTG con el fin de elevar la productividad. Por otro lado, usando lactosa, la cual es una materia prima industrial disponible en nuestro medio, la productividad es baja. Los criterios finales sin duda resultarán de un minucioso estudio de costos. En este trabajo se demostró la viabilidad técnica de ambas alternativas.

Otro aspecto importante en la formulación del medio de cultivo fué el establecimiento de la necesidad de la presión selectiva del antibiótico, el uso de los aminoácidos libres, en vista de las auxotrofías de la cepa y la calidad del agua empleada para preparar el medio de cultivo. Se demostró que no es necesario el empleo de ampicilina ya que ésta no altera fundamentalmente los patrones de segregación del plásmido y solo debe usarse como medida extra de precaución en los pasos iniciales del proceso. Por otra parte los requerimientos de aminoácidos son satisfechos por la peptona y es posible el uso de agua de la llave para la producción de las proteínas híbridas. Estos hechos tienen importancia ya que disminuirán el componente de costos de las materias primas en la fermentación.

En la optimización del medio de cultivo, especialmente en el caso de la cadena B, se resaltó la limitación que constituyó el no con--

tar con métodos confiables, reproducibles y expeditos para la cuantificación directa o indirecta de proteína híbrida. Estos métodos se deberán desarrollar con el fin de continuar los estudios y establecer los balances de materia del proceso de manera definitiva. Esto también será necesario para llevar a cabo, en el escalamiento, el control de calidad del proceso así como su seguimiento. Lo anterior es fundamental para el éxito de un programa de escalamiento.

Los estudios realizados en este trabajo, dejaron interrogantes de aspectos básicos del proceso. Entre ellos se cuentan: la regulación del número de copias del plásmido en función de las condiciones de cultivo; el origen genético de la capacidad de las cepas para asimilar - sacarosa como fuente de carbono; la inestabilidad genética de plásmidos que producen constitutivamente una proteína no funcional respecto a aquellos cuya expresión es inducida; la influencia del metabolismo oxidativo en el fenómeno de inducción con lactosa, entre otros.

Es necesario el desarrollo de criterios de calidad adicionales a los establecidos en el presente trabajo. Entre ellos se pueden -- mencionar; la correlación entre actividad de β -lactamasa y/o concentración mínima inhibitoria de ampicilina respecto a la dosis de genes y - sus niveles de expresión de proteína híbrida.

A continuación se listan algunas de las conclusiones particulares del trabajo experimental desarrollado:

Cadena A

- El descongelamiento continuo de gliceroles tiene un efecto muy negativo en la viabilidad de la cepa. El uso de gliceroles no se recomienda para un período mayor de 6 meses.
- La proteína híbrida es estable por períodos mayores a tres meses - meses en células intactas sin necesidad de refrigeración.
- La cinética de la fermentación en el medio M-9 indica que no existe crecimiento diaúxico apreciable y el cultivo alcanza la fase es tacionaria en 8 horas. El pH no presenta variaciones drásticas, - disminuyendo en la fase exponencial y aumentando nuevamente en la estacionaria. La ampicilina se degrada rápidamente y desaparece - en menos de 3 horas. La velocidad de crecimiento no esta influenciada apreciablemente por la cantidad inicial del antibiótico. La cinética a nivel de fermentadores de 14 lts es muy similar a la ob servada en matraces y se ha detectado que el cultivo esta limitado por oxígeno en las primeras horas de crecimiento. No existe venta ja en usar agua destilada y los requerimientos de aminoácidos adicionales. En más de 16 lotes producidos se ha detectado la presen cia de proteína híbrida.
- Es posible eliminar la fase lag empleando inóculos al 5% (v/v) cul tivados en el mismo medio.
- En 24 horas de cultivo sin presión selectiva, el nivel de segre gan tes no es mayor al 1%, adicionando un nivel mínimo de antibiótico no se detectan segregantes.

- En cultivo retroalimentado la segregación del plásmido se detectó hasta el octavo sub-cultivo, siendo mayor el porcentaje en ausencia de ampicilina en el medio, pero nunca fue superior al 10% en esos períodos.
- El tipo de fuente compleja de nitrógeno no tiene influencia apreciable en la producción de proteína híbrida. Sin embargo, es determinante que la fuente de nitrógeno sea compleja para lograr síntesis elevada de proteína híbrida.
- El empleo de sacarosa como fuente de carbono así como de compuestos inorgánicos como fuente de nitrógeno disminuyen apreciablemente la velocidad de crecimiento.
- Es posible el uso de peptona industrial y sacarosa en el medio de cultivo sin menoscabo de la producción de proteína híbrida.
- Existe un fenómeno denominado "segregación diferencial" que consiste en la disminución de la capacidad de producción específica de proteína híbrida manteniendo la resistencia a ampicilina, cuando el cultivo se somete a numerosos sub-cultivos y con bajas concentraciones iniciales de ampicilina, posiblemente debido a una disminución en el número de copias del plásmido en la célula.
- El cultivo repetido en ayuno de aminoácidos de cepas que han disminuido su capacidad de sintetizar proteína híbrida permite recuperar la elevada biosíntesis del híbrido, probablemente incrementando el número de copias del plásmido en la célula.

- Las adiciones de sacarosa durante el cultivo permiten elevar la población bacteriana, sin embargo el crecimiento se detiene por una causa ajena al agotamiento de la fuente de carbono.
- Se cuenta con un medio optimizado a base de componentes industriales que permite crecer el cultivo a una velocidad cercana a la desarrollada en el medio M-9 y se ha detectado la presencia de proteína híbrida en esos cultivos en niveles equivalentes.
- Se cuenta con una ecuación que describe razonablemente fiel las interacciones de los componentes del medio de cultivo en cuanto a su velocidad de crecimiento y que permitirá simular matemáticamente al sistema.

Cadena B

- La ampicilina usada como presión selectiva en los cultivos es degradada rápidamente, al igual que en el sistema de cadena A. Se recomienda, para el escalamiento, solo emplear el antibiótico como medida de seguridad en las fases iniciales del desarrollo de los cultivos.
- Se caracterizó la cinética de dos medios de cultivo, uno de ellos con relación C/N baja y el otro con esta relación balanceada para crecimiento. Las velocidades de crecimiento así como la producción de híbrido fueron mayores en el medio con la relación C/N baja.

- Se logró expresión de proteína híbrida en ambos medios cuando se indujo con IPTG en cualquier fase del crecimiento, aunque aparentemente es mayor cuando se realiza en la fase exponencial tardía.
- El tiempo de cosecha debe ser de 12 y 30 hrs después de inducir, respectivamente en los medios M-1 y M-9, en vista de que el prolongar más el cultivo no representa ventajas en la producción de híbrido.
- La presencia de segregantes en cultivos sin ampicilina es ligeramente mayor que cuando se usa el antibiótico, sin embargo en ningún caso es mayor al 1.2%. Comparando estos valores con los obtenidos en el sistema de cadena A, son ligeramente mayores.
- Es posible incrementar la síntesis específica de proteína híbrida mediante el cultivo repetido de la bacteria en medio mínimo. Esta situación también se observó en el caso de la cadena A.
- Es posible inducir el sistema con lactosa y melibiosa en concentraciones similares a la del IPTG, sin embargo la expresión naturalmente es menor. La adición de pulsos de estos galactósidos incrementa los niveles de expresión.
- La mejor alternativa de inducción con lactosa, resultó ser su uso como principal fuente de carbono.
- Aparentemente el desarrollo de los inóculos es un medio de sacarosa como única fuente de carbono representa ventajas en la expresión de híbrido respecto a los crecidos en glucosa.

- En la optimización del medio de cultivo, las influencias más apreciables las presentaron la lactosa y los fosfatos, resaltando la importancia de la inducción y control de pH en la fermentación.
- En el diseño Box-Wilson se obtuvieron resultados que superaron al testigo con IPTG en cuanto a expresión de híbrido.
- La producción de proteína híbrida, se favorece cuando existen restricciones al metabolismo oxidativo, resultando en velocidades específicas de crecimiento bajas, decrementos en el pH y bajos rendimientos de biomasa respecto a la fuente de carbono.
- Los experimentos en equipo de 2 lts no reprodujeron los resultados obtenidos en matraz. La ausencia de limitación de oxígeno puede explicar estos resultados.
- Se cuenta con un medio optimizado con materias primas industriales que permite la inducción del sistema en niveles comparables a los obtenidos con IPTG, sin embargo se requieren mayores datos para reproducir este fenómeno al cambiar la escala.

REFERENCIAS

- Alaeddinoglu, N.G., Charles, H.P., (1979), "Transfer of a gene for sucrose utilization into Escherichia coli K-12; and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization", Journal of General Microbiology, 110: 47-59.
- Albisser, A.M., Spencer, W.J., (1982), "Electronic and the diabetic" IEE Transaction on Biomedical Engineering, BME-19 (4): 239-248
- Andrews, K.J., Hegeman, G.D., (1976), "Selective disadvantage of non-functional protein synthesis in Escherichia coli", J. Mol. Evol. 8: 317-328
- Anónimo, (1975), "Report of the National Commission on Diabetes to the Congress on the United States", U.S. Dep. Health, Educ., Welfare, Public Health Service, Nat. Ints. of Health, citado por Solano, (1979) y por Albisser & Spencer (1982).
- Anónimo, (1977), "Diabetología", M.D. en español, 15 (10): 21-26
- Anónimo, (1978), "A study of insulin supply and demand", A report of the National Diabetes Advisory Board, April 1978, DHEW Publication No. (NIH) 78-1588. Washington, D.C. U.S. Department of Health, Education and Welfare, citado por Chance, et. al., (1981 a)
- Anónimo (1979), National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucosa intolerance, Diabetes 28: 1039 - 1057.
- Anónimo, (1980 a): "Proyecto de producción de insulina humana por ingeniería genética, IMSS-UNAM", Instituto Mexicano del Seguro Social, Subdirección General Médica, México, D.F., Julio.
- Anónimo, (1980 b), Who Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second Report. Technical Report Series No. 646, Geneva, World Health Organization, citado por Chance et. al., (1981 b)

- Anónimo, (1981 a), "3 millones de diabéticos hay en México: SSA", nota periodística Uno más Uno, México, 1° de Septiembre de 1981, p. 21
- Anónimo, (1981 b), "Convenio UNAM-IMSS para producir insulina humana", Gaceta UNAM, 5 (8), Febrero 29, p.3.
- Anónimo, (1981 c). "Las guerras de la Insulina", SABADO suplemento de Uno más Uno, Marzo.
- Anónimo (1982), "Quick FDA insulins approval cheers industry", Genetic Technology 2 (12): 1 (december).
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1977), "Biochemical Engineering Fundamentals", Mc.Graw Hill, New York.
- Baker, R.S., Ross, J.W., Schmidtke, J.R., Smith, W.C., (1981), "Preliminary studies on the immunogenicity and amount of Escherichia coli polypeptides in biosynthetic human insulin produced by recombinant DNA technology", The Lancet 1981 (11): 1139 - 1142
- Balbás, P., (1981), "Producción de proteínas en bacterias mediante recombinación in vitro de ácidos nucleicos", TESIS para obtener el grado de licenciado en Ciencias de la Nutrición y de los Alimentos, Universidad Iberoamericana, México.
- Bautista, E.D., (1983), "Diseño, construcción y aplicación de un electrodo microbiológico para la detección de penicilinas", TESIS para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla.
- Bauer, S., Shiloach, J., (1974), "Maximal exponential growth rate and yield of E.coli obtainable in bench scale fermentor", Biotechnol. Bioeng. 16: 933 - 941.
- Bauer, S., Ziv, E. (1976), "Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor", Biotechnol. Bioeng. 18: 81-94.

- Bazara, M. Helsinki, D.R., (1970), "Replication of a bacterial plasmid and episome in Escherichia coli", Biochemistry 9 (2): 399 - 406.
- Bell, G.I., Pictet, R.L., Rutter, W.J., Cordell, B., Tischer, E., Goodman, H., (1980) "Sequence of the human insulin gene", Nature 284: 26-32, March 6.
- Bolívar, F., (1983), "Desarrollo de la Ingeniería Genética en la UNAM (Producción de insulina humana), Reporte final del Proyecto IMSS, Agosto.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.T., (1978), "Statistics for experimenters", John Wiley & Sons.
- Cahill, G.F., (1981) "The future of diabetes", en "Diabetes mellitus", Rifkin H. & Raskin, H. (ed), American Diabetes Association, Maryland, U.S.A. p. 375-378.
- Cole, M. (1978), " β -lactamases and their inhibition", J. Appl. Chem. Biotech. 28: 222 - 223.
- Collins, J., Pritchard, R.H., (1973), "Relationship between chromosome replication and F⁺lac episome replication in Escherichia coli" J. Mol. Biol. 78: 143-155.
- Crea, R. Kraszewski, A. Hirose, T. Itakura, K., (1978), "Chemical synthesis of genes for human insulin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 5764-5769.
- Chance, R.E., Enzmann, F.H., Galloway, J.A., Glynn, A., Marsen, J.H., (1981 a) "Introduction", Symposium on Biosynthetic Human Insulin, Diabetes Care 4 (2): 139.
- Chance, R.E., Kroeff, E.P., Hoffman, J.A., Frank, B.H. (1981 b), "Chemical, physical, and biologic properties of biosynthetic human insulin", Diabetes Care 4 (2): 147 - 154.

- Dwivedi, C.P., Imanaka, T., Aiba, S., (1982), "Inestability of plasmid-harboring strain of E.coli in continuous culture", Biotechnol. Bioeng. 24: 1465 - 1468.
- Engberg, B., Nordstrom, K., (1975), "Replication of R-factors in Escherichia coli K-12, at different growth rates", J. Bacteriol. 123 (1): 179-186.
- Epstein, W., Jewett, S. Fox, C.F., (1970), "Isolation and mapping of phosphotransferase mutants in Escherichia coli", J. Bacteriol. 104: 793-797.
- Etzwiler, D.D., (1983), "International Symposium on human insulin: a summary" Diabetes Care 6 (Sup. 1): 66-68
- Fabila, C.G., (1979), "Planeación y análisis de experimentos industriales". Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial, México.
- Fajans, S.S., 1981, "Clasificación of Diabetes Mellitus", en "Diabetes Mellitus", Rifkin, H., & Raskin, R., (ed), American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 95-102.
- Galloway, J.A., Davidson, J.K., (1981), "Clinical use of insulin" en "Diabetes Mellitus", Rifkin H. & Raskin, P. (ed), American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 117-127.
- Godwin, D., Slater, H., (1979), "The influence of the growth environment on the stability of a drug resistance plasmid in Escherichia coli K-12", Journal of General Microbiology, 11: 201-210.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolívar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R. Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A.D., (1979), "Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 106-110
- Goldfine, I.D., (1978), "Minireview: insulin receptors and the site of action of insulin", Life Sciences 23: 2639-2648

Gorden, P., Carpenter, J.L., Freychet, P., Orci, L. (1980), "Internalization of polypeptide hormones", Diabetologia 18: 6529-31.

Grodsky, G.M. (1970), "Insulin and the pancreas",

Gustafsson, P. Nordstrom, K., (1980), "Control of plasmid R1 replication: kinetics of replication in shifts between different copy number levels", J. Bacteriol. 141 (1): 106-110.

Halter, J.B., Porte, D. (1981), "Current concepts of insulin secretion in Diabetes Mellitus", en "Diabetes Mellitus", H. Rifkin & P. Raskin (ed), American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 33-42.

Heller, K.B., Wilson, T.H., (1979), "Sucrose transport by the Escherichia coli lactose carrier", J. Bacteriol. 149 (2): 395-399.

Helling, R.B., Kinney, T., Adams, J., (1981), "The maintenance of plasmid-containing, organisms in populations of Escherichia coli", Journal of General Microbiology, 123: 129 - 141.

Huber, R.E., Kurz, G., Wallenfels, K., (1976), "A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (E.coli) on lactose", Biochemistry 15 (9): 1994-2001.

Imanaka, T., Tsunekawa, J., Aiba, S. (1980), "Phenotypic stability of trp operon recombinant plasmids in Escherichia coli", J. Gen. Microbiol. 118: 253-261.

Imanaka, T., Tsunekawa, H., Aiba, S., (1981), "Stability of trp operon recombinant plasmid in E.coli", Advances in Biotechnology (Proceedings of the 6th International Fermentation Symposium, London, Canada, 1980), Moo-Young M. (ed), Vol. I, Pergamon Press.

- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, A.L., Bolívar, F., Bayer, H.W., (1977), "Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin", Science 198: 1056 - 1063.
- Jobe, A., Bourgeois, S., (1972), "Lac repressor-operator interaction, VI. The natural inducer of the lac operon", J. Mol. Biol. 69: 397-408.
- Jobe, A., Bourgeois, A., (1973), "Lac repressor-operator interaction, VIII. Lactose is an anti-inducer of the lac operon", J. Mol. Biol. 75: 303 - 313.
- Johnson, I.S., (1982), "Authenticity and purity of human insulin (recombinant DNA)" Diabetes Care 5 (Sup. 2): 4 -12
- Johnson, I.S. (1983), "Human insulin from recombinant DNA technology", Science 219 (4585): 632 - 637.
- Jones, I.M., Primrose, S.B., Robinson, A., Ellwood, D.C., (1980), "Maintenance of some Cole E1-type plasmids in chemostat culture", Molec. Gen. Genet. 180: 579 - 584.
- Karam, J.H., (1983), "Introduction: Evolution of human insulin in the therapy of "Diabetes Mellitus", Diabetes Care 6 (Sup. 1): 1- 2
- Karam, J.H., Etwiler, D.D., (ed), (1983), "International Symposium of human insulin", Diabetes Care 6 (Sup. 1): 1 -68.
- Keen, H., Pickup, J.C., Bilous, R.W., Glynne, A., Viberti, G.C., Jarret, R.J., (1980), "Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycemic potency in healthy men", The Lancet 2: 398-401
- Keleti, G., Leaderer, W.H., (1974), "Handbook of micromethods for the biological sciences", Van Nostrand Reinhold, Toronto, p. 73.

- Klostermeyer, H., Humbel, R.E., (1966), "The chemistry and biochemistry of insulin", Angew. Chem. Int. Ed. 5: 802 - 822.
- Levine, R., (1981), "Insulin Action: 1948 - 80", Diabetes Care 4 (1): 38-44.
- Lowry, O., Rosebrough, J., Farr, A., Rondall, R., (1951), "Protein measurement with the Foliphenol reagent", J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- Lozano-Castañeda, O., (1976), "Introducción", Medicina de Postgrado, 4 (10): 1, citado por Solano, 1979.
- Maloney, P.C., Wilson, H.T., (1978), "Metabolic control of lactose entry in Escherichia coli", Biochem. Biophys. Acta 511: 487 - 498
- Marble, A., (1981), "The clinical application of insulin: a perspective", Diabetes Care 4 (1): 45 - 46
- Markussen, J., Damgaard, U., Pingel, M., Snel, L., Sorensen, A.S., Sorensen, E. (1983), "Human insulin (Novo): Chemistry and Characteristics", Diabetes Care 6 (Sup. 1): 4 - 8.
- Matas, A.J., Sutherland, D.E.R., Najarian, J.S., (1976), "Current status of islet and pancreas transplantation in diabetes", Diabetes 25: 785 - 799.
- Mennigmann, H.-D., (1979), "Storage death at low temperature (-18°C) of strains of Escherichia coli with different repair capacities", Journal of General Microbiology, 112: 207 - 210.
- Miller, W.L., Baxter, J.D., (1980), "Recombinant DNA-A new source of insulin", Diabetologia 18: 431 - 436
- Miller, Reznikoff W.S., (ed) (1978). "The operon", Cold Spring Harbor Lab., New York.

- Monod, J., (1942), "Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes", 2^oed. Hermann, Paris, citado por Quintero, (1981).
- Noack, D., Roth, M., Geuther, R., Muller, G., Undisz, K., Hoffmeier, C., Gaspar, S. (1981), "Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR-322 and pBR-325 in Escherichia coli K-12 strains grown in a chemostat", Mol. Gen. Genet. 184: 121 - 124
- Nordstrom, K., Ingram, L.C., Lundback, (1972), "Mutations in R factors of Escherichia coli causing an increased number of R-factor copies per-chromosome", J. Bacteriol. 110 (2): 562 - 569
- Oakley, W.G., Pyke, D.A., Taylor, K.W., (1987), "Diabetes and its management" 3a ed. Oxford, Blackweel Scientific Pub.
- O'Farrel, P.H., Polisky, B., Gelfand, D.H., (1978), "Regulated expression by readthrough translation from a plasmid encoded β -galactosidase", J. Bacteriol. 134 (2): 645 - 654.
- Palchaudhuri, S., Rahn, S., Santos, D.S., Maas, W.K., (1977), "Characterization of plasmids in a sucrose-fermenting strain of Escherichia coli", J. Bacteriol. 130 (3): 1402 - 1403
- Paul, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L., Ross, J.W., Williams, D.C., (1983), "Immunocytochemical demonstration of human proinsulin chimeric polypeptide within cytoplasmic inclusion bodies of Escherichia coli", European Journal of Cell Biology, en prensa.
- Petrides, P., Weiss, L., (1978), "Diabetes Mellitus: theory & management", Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
- Quintero, R.R., (1981), "Ingeniería Bioquímica: teoría y aplicaciones", Alhambra Mexicana, México.
- Ramos, C., Kaback, R., (1977), "pH-Dependent changes in proton: substrate stoichiometries during active transport in Escherichia coli membrane vesicles", Biochemistry 16 (19): 4271 - 4275

- Raskin, P., (1981), "Transplants, Artificial Pancreas, and new pharmacological advances", en "Diabetes Mellitus", Rifkin, H. & Raskin, H., (ed). American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 367 - 373.
- Riggs, A.D., (1981), "Bacterial production of human insulin", Diabetes Care 4 (1): 64 - 68.
- Rodríguez, R., (1979) "Diabetes Mellitus", Temas para el exámen profesional de médico cirujano, citado por Solano, 1979.
- Rodríguez, G., M.L., (1983), "Sistemas de optimización de condiciones de cultivo en fermentaciones", TESIS para obtener el grado de Q.F.B., Facultad de Química, UNAM.
- Roseman, S. (1969), "The transport of carbohydrates by a bacterial phosphotransferase system", Journal of General Physiology, 54: 1385-1845.
- Roseman, S. (1972), "Carbohydrate transport in bacterial cells", Metabolic Transport VI: 42 - 67
- Ross, W., O'Callaghan, H., (1975), " β -lactamase assays" Methods in Enzimol. 43: 69 - 85.
- Roth, J., 1981, "Insulin Binding to its receptor: is the receptor more important than the hormone?", Diabetes care 4: (1): 27 - 32
- Roth, J., Muggeo, M., 1981 "Insulin receptors and hyperglycemia", en "Diabetes Mellitus", H. Rifkin & P. Raskin, (ed). American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 63 - 77.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R., (1977), "DNA secuencing with chain-terminating inhibitors", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5467
- Shida, T., Komagata, K., Mitsugi, K., (1975), "Reduction of lag time in bacterial growth, 1, Effect of inoculum size and nutrients", J. Gen. Appl. Microbiol. 21: 75 - 86.

- Shiloach, J., Bauer, S., (1975), "High-yield growth of E.coli at different temperatures in a bench scale fermentor", Biotechnol. Bioeng. 17: 227 - 239.
- Skyler, J.S., Raptis, S., (ed), (1981), "Symposium of Biosynthetic human insulin", Diabetes Care 4 (2): 139-264.
- Skyler, J.S., (ed), (1982 a), "Symposium on human insulin of recombinant DNA origin", Diabetes Care 5 (Sup. 2): 1 - 186
- Skyler, J.S., (1982 b), "Human insulin of recombinant DNA origin: clinical potential", Diabetes Care 5 (Sup. 2): 181 - 186
- Smith, H.W., Parsell, Z., (1975), "Transmissible substrate-utilizing ability in enterobacteria", Journal of General Microbiol. 87: 129 - 140
- Soeldner, J.S., (ed), (1982), "Symposium on potentially implantable glucose sensors", Diabetes Care 5 (3): 147 - 282
- Solano, Sánchez Alberto, (1979), "Diabetes: educación básica para diabéticos y público en general", Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Steiner, D.F., (1977), "Insulin today", Diabetes 26 (4): 322 - 340.
- Talmadge, K., Kaufman, J., Gilbert, W., (1980 a), "Bacteria mature preproinsulin to proinsulin", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3988 - 3992
- Talmadge, K., Stahl, S., Gilbert, W., (1980b), "Eukariotic signal sequence transports a insulin antigen in Escherichia coli", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3369 - 73
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J., Goodman, H.M. (1977), "Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. Science 196: 1313 - 1319

- Unger, R.H., (1981), "Insulin-glucagon-somatostatin interactions", en "Diabetes Mellitus", H. Rifkin & P. Raskin, (ed), American Diabetes Association, Maryland, U.S.A., p. 43 - 53.
- Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A., Brome, S., Lomédico, R., Tizard, R., Naber, S.P., Chick, W.L., Gilbert, W., (1978), "A bacterial clone synthesizing proinsulin", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731
- West, I.C., (1970), "Lactose transport coupled to proton movements in Escherichia coli", Biochem. Biophys. Res. Comm. 41 (3): 655-661
- West, K.M., (1979), "Standardization of definition, classification, and reporting in diabetes-related epidemiologic studies", Diabetes Care 2: 65 - 76.
- West, I.C., Mitchell, P., (1973), "Stoichiometry of lactose protein symport across the plasma membrane of Escherichia coli", Biochem. J. 132: 587 - 592.
- Williams, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L., Burnett, J.P., (1982), "Cytoplasmic inclusion bodies in Escherichia coli producing biosynthetic human insulin proteins", Science 215: 687 - 689
- Williams, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L., Paul, D.C., Burnett, J.P., (1981), "Structural and immunocytochemical evaluation of the production of insulin chimeric proteins in E.coli", Journal of Cell Biology 91: 217.
- Wood, S.P., Blundell, T.L., Wollmer, A., Lazarus, N.R., Neville, W.J., (1975), "The relation of conformation and association of insulin to receptor binding; X-ray and circular-dichroism studies in bovine and hystricomorph insulins", Eur. J. Biochem. 55: 531 - 542
- Wouters, J.T.M., Driehuis, F.L., Polaczek, P.J., Oppenraay M. LHA van, Andel J.G. van (1980), "Persistence of the pBR-322 plasmid in Escherichia coli K-12 grown in chemostat cultures", Antonie van Leeuwenhock 46: 353 - 362

Yue, D.K., Turtle, J.R., 1977, "New forms of insulin and their use in the treatment of Diabetes", Diabetes 26 (4): 341 - 347.

Zonana, J., Rimoin, D.L., 1976, "Inheritance of diabetes mellitus", The New England Journal of Medicine 295 (11): 603 - 605.

Zund, P., Lebek, G., (1980): "Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increase in the generation time of Escherichia coli caused by R plasmids and their molecular size", Plasmids 3: 65 - 69.