



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

EFFECTO DE LAS ESTRATEGIAS DE TERMO-INDUCCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
PROTEÍNA RECOMBINANTE Y LA COMPOSICIÓN DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN EN  
*Escherichia coli*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
ELIZABETH CARRASCO CABALLERO

TUTOR PRINCIPAL

DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA AYALA ACEVES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CUERNAVACA, MORELOS, FEBRERO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La investigación reportada en esta tesis se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM bajo la dirección del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Con la asesoría técnica de la Biól. Rosa Román Miranda, la M. en C. Ana Ruth Pastor Flores y la M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez.

Se contó con una beca de posgrado otorgada por el CONACYT. Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-203212-2 e IT-201214.

**Todo el esfuerzo para la realización de esta tesis está  
dedicado a mi Madre, Padre y Hermano :)**

## AGRADECIMIENTOS

A **mis padres Tom y Saúl**, mi más profunda gratitud por todo el amor, ejemplo, cuidados, estímulo, comprensión, paciencia, apoyo y enseñanzas únicas; por ser los primeros y mis mejores maestros en la vida.

Al **Dr. Tonatiuh Ramírez** por su excelente supervisión, su valioso asesoramiento, confianza, recursos materiales e infraestructura para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Laura Palomares** por sus consejos y apoyo.

A la **Lic. Karin Levy** por su apoyo administrativo.

Al **Lic. Antonio Aguilar Guillén** y **Lic. Gloria Villa**.

Al personal técnico del grupo Palomares-Ramírez, en especial a la **Biól. Rosa Román Miranda y M.C. Martha Alicia Contreras** por su apoyo técnico.

Al personal de la planta piloto del IBT, en especial a **Mario Caro, Vero y Miriam**, por su colaboración, apoyo y amistad.

A los compañeros del grupo Palomares-Ramírez y EG, en especial a **Tonatiuh, Karim, Oriana, Gheorghe, Nahandi y Karina**, por apoyarme en el uso de material y equipos en el laboratorio, por su capacidad crítica brindada para resolver problemas experimentales y por su amistad.

A mis amigos en Cuernavaca: **Tonatiuh Cortés, Diana Artemisa, Iris Bravo, Arely Hernández y Carolina Perusquía**, porque simplemente la vida no habría sido la misma sin ellos.

Al **QFB Pedro Morales Rodríguez, QFB Tonatiuh Cortés Esquivel y Saúl Carrasco Caballero** por su invaluable ayuda durante los cultivos.

A **mi hermano Saúl**, mi comparza, mi cómplice, mi orgullo, por creer siempre en mí.

A **mi Bombón**, gracias por tanto amor, por no dejar que el ánimo decayera y por siempre impulsarme a salir adelante.

A mi queridísima **Sandra Suter** por tanto cariño y dulzura.

A **Carmen Molano, Lizbeth Rodríguez y Lizbeth Chatú**, por la amistad y apoyo brindado a través de la distancia.

A la **MC Cristina Ventura Canseco**, por guiarme hacia el camino del posgrado y por todos sus consejos.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE CUADROS .....	4
ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN.....	6
1 INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 Generalidades de sistemas de expresión de proteínas recombinantes .....	11
2.2 Inducción térmica para la producción de proteína recombinante ..	14
2.3 Moduladores de plegamiento proteico.....	18
2.4 Cuerpos de inclusión .....	21
2.5 Inestabilidad segregacional y estructural del plásmido .....	24
2.6 Cultivo continuo .....	27
2.7 Inducción escalonada y por oscilaciones de temperatura.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	35
4. HIPÓTESIS .....	37
5. OBJETIVOS .....	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
6.1 Cepa bacteriana y plásmido.....	39
6.2 Medio de cultivo .....	39
6.3 Banco celular.....	40
6.4 Inóculo .....	40
6.5 Variables del sistema de cultivo.....	41
6.5.1 Tasa de dilución.....	41
6.5.2 Tiempo de estabilización.....	41
6.5.3 Tiempos de circulación.....	41
6.5.4 Relación entre tiempo de crecimiento e inducción .....	42
6.5.5 Volúmenes en cada reactor .....	43
6.5.6 Temperaturas de crecimiento e inducción.....	43
6.6 Cultivos en biorreactor .....	44
6.6.1 Sistema de cultivo .....	45

6.7 Métodos analíticos .....	45
6.7.1 Concentración de biomasa .....	45
6.7.2 Cuenta de células que contienen y de las que no contienen el plásmido .....	46
6.7.3 Cuantificación de glucosa .....	47
6.7.4 Cuantificación de proteína .....	47
6.7.5 Purificación y cuantificación de DNA plasmídico.....	50
6.7.6 Amplificación de la secuencia codificante para la preproinsulina humana .....	50
6.7.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	52
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53
7.1 Cinéticas de crecimiento en cultivos por lote y continuos termo-inducidos .....	53
7.1.1 Cultivo por lote con recirculación celular sin inducción.....	53
7.1.2 Cultivos por lote con recirculación celular termo-inducidos.....	54
7.1.3 Cultivos continuos termo-inducidos con recirculación celular .....	56
7.1.4 Conclusiones parciales.....	62
7.2 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la producción de la proteína recombinante.....	62
7.2.1 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la producción de proteína recombinante y su agregación en cuerpos de inclusión .....	62
7.2.2 Conclusiones parciales.....	74
7.3 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la estabilidad del plásmido recombinante .....	74
7.3.1 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre las células que contienen el plásmido recombinante .....	75
7.3.2. Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la presencia del gen de la preproinsulina humana. ....	79
7.3.3 Conclusiones parciales.....	83
7.4 Comparación de cultivos continuos termo-inducidos de dos compartimentos .....	83
8. CONCLUSIONES.....	85
9. PERSPECTIVAS .....	86

10. BIBLIOGRAFÍA .....	87
11. ANEXOS .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Elementos claves en un sistema de expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	11
Figura 2. Representación de los promotores pL/pR controlados por el represor cl857. ....	15
Figura 3. Regulación de las proteínas de choque térmico por $\sigma_{32}$ . ....	18
Figura 4. Asistencia de chaperonas en el plegamiento de proteínas.....	21
Figura 5. Comportamiento teórico ideal de las variables <b>S</b> y <b>X</b> en un cultivo continuo en estado de equilibrio dinámico.....	29
Figura 6. Inducción escalonada y oscilatoria en un cultivo por lote alimentado. ..	31
Figura 7. Cultivo continuo con inducción escalonada.....	32
Figura 8. Rendimiento de proteína recombinante en cultivo continuo con inducción escalonada. ....	33
Figura 9. Cultivos continuos en quimiostato de dos compartimentos interconectados. ....	34
Figura 10. Diagrama simplificado de tuberías e instrumentos del sistema termoinducido de dos reactores con recirculación celular. ....	36
Figura 11. Correlación entre la concentración de biomasa evaluada por peso seco y la densidad óptica del cultivo a 600 nm. ....	46
Figura 12. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato en cultivos por lote usando una $F_{rec} = 60$ ml/min, a 35 °C en ambos compartimentos.....	53
Figura 13. Cinéticas de crecimiento por lote con oscilaciones de temperatura. ..	55
Figura 14. Cultivos continuos en un sistema de dos compartimentos con oscilaciones de temperatura. ....	58
Figura 15. Concentraciones de biomasa y sustrato en los estados de equilibrio dinámico. ....	61
Figura 16. Perfiles proteicos de preproinsulina humana durante un cultivo continuo. ....	63
Figura 17. Concentración (A) y rendimiento (B) de proteína recombinante.....	65
Figura 18. Máximas concentraciones y rendimientos de proteína recombinante (Preproinsulina total y preproinsulina en cuerpos de inclusión). ....	68
Figura 19. Porcentaje de preproinsulina agregada en cuerpos de inclusión. ....	73
Figura 20. Células con y sin plásmido.....	78
Figura 21. Análisis electroforético del producto de PCR.....	81
Figura 22. Fracción de células que contienen el plásmido.....	101

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo.....	39
Cuadro 2. Comparación de temperaturas y tiempos de crecimiento e inducción de trabajos previos. ....	43
Cuadro 3. Intervalo de oscilación de temperaturas y flujos de recirculación empleados en el presente trabajo.....	44
Cuadro 4. <i>Primers</i> utilizados para amplificar el gen de la preproinsulina humana (PPIH).....	51
Cuadro 5. Condiciones de reacción usadas para amplificar el gen de la PPIH por PCR.....	51
Cuadro 6. Perfil de temperaturas usadas para amplificar el gen de la PPIH por PCR.....	51
Cuadro 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos a diferentes temperaturas bajo una $F_{rec}= 60$ ml/min. ....	54
Cuadro 8. Parámetros cinéticos de cultivos en modo lote en un sistema de dos compartimentos con oscilaciones de temperatura.....	56
Cuadro 9. Concentraciones de biomasa y sustrato antes y durante el estado de equilibrio, tasa de dilución y velocidad específica de crecimiento.....	59
Cuadro 10. Tiempo de cultivo cuando decaen los valores de PPIH. ....	64

## ABREVIATURAS

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

TOD: Tensión de oxígeno disuelto

HSR: Respuesta de choque térmico

Hsp: proteínas de choque térmico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

PPIH: Preproinsulina humana

gBPS: Gramos de biomasa en peso seco

CI: Cuerpos de inclusión

D: Tasa de dilución

$\mu_{m\acute{a}x}$ : Velocidad específica de crecimiento máxima

$Y_{x/s}$ : Rendimiento de biomasa respecto al sustrato

$\tau$ : Tiempo de residencia

$t_{est}$ : Tiempo de estabilización

$t_{circ}$ : Tiempo de circulación

$F_{rec}$ : Flujo de recirculación

$t_{ind}$ : Tiempo de inducción

$Y_{P/X}$ : Rendimiento de producto respecto a biomasa

$F_{rec}$ : Flujo de recirculación

PBS: Buffer de fosfatos

TBE: Tris borato EDTA

## RESUMEN

Desde el inicio de la era de la biotecnología moderna, en los 70's *Escherichia coli* ha sido usada ampliamente para la sobre-expresión de proteínas recombinantes debido a su alta velocidad de crecimiento, fácil operación de cultivos de alta concentración celular y disponibilidad de herramientas genéticas. Los elementos que se requieren para la sobre-expresión de dichas proteínas son el organismo hospedero y un vector de expresión, éste último debe contener la secuencia codificante para la proteína recombinante, origen de replicación (el cual determina el número de copias del vector de expresión por célula), promotores y un gen que le brinde resistencia a algún antibiótico. Actualmente se emplean distintas técnicas para inducir la producción de proteínas recombinantes, algunas de ellas incluyen la adición de moléculas al medio de cultivo, agotamiento de un nutriente en específico, cambio de pH del medio, entre otros.

Una de las opciones preferidas para la inducción de proteínas recombinantes en *E. coli* ha sido el sistema de expresión termo-inducible, el cual consiste en la inserción del gen de interés en vectores que contienen los promotores del fago lambda (pL/pR), los cuales son eficientemente regulados por la proteína represora cI857. Este sistema ofrece la posibilidad de ser eficientemente regulado por temperatura ya que la inducción de la proteína de interés inicia una vez que se incrementa la temperatura del cultivo por arriba de los 37 °C, permitiendo mantener a las células en temperaturas óptimas de crecimiento antes de la inducción.

Las estrategias de cultivo comúnmente utilizadas para la producción de proteína recombinante en un sistema termo-inducido son cultivos en lote y lote alimentado. Por otro lado, el cultivo continuo es ampliamente utilizado como herramienta de estudio. El único antecedente exitoso de cultivos termo-inducidos en cultivo continuo es el reportado por Niño, 2012, quien implementó un quimiostato para producción de proteína recombinante por *E. coli*. En tal trabajo se emplearon dos compartimentos, en donde la oscilación continua de temperatura entre 35 °C y 42 °C, mantenida en cada compartimento, permitió el crecimiento celular, además

de que se pudo evaluar la concentración de proteína recombinante al estado de equilibrio dinámico en función de la tasa de dilución, mientras se mantuvieron todas las condiciones del cultivo constantes.

En esta tesis se profundizó en el estudio de los efectos de las variables de operación del sistema continuo sobre la producción de preproinsulina humana (PPIH) como proteína recombinante modelo. Tales variables fueron: la frecuencia en que las células son intermitentemente recirculadas (60 ml/min y 120 ml/min) desde una condición de crecimiento (en uno de los compartimentos) a otra de inducción (en el otro compartimento) y la relación entre las temperaturas de crecimiento (32 °C y 35 °C) e inducción (40 °C y 42 °C), en cada uno de los compartimentos.

Al evaluarse las concentraciones máximas de proteína recombinante, se encontró que al circular las células entre los dos compartimentos, cada uno mantenido a 32 °C y 42 °C, la mayor concentración de preproinsulina total se obtuvo para el flujo de recirculación de 120 ml/min. Mientras que, la mayor concentración de preproinsulina en cuerpos de inclusión y el mayor porcentaje de preproinsulina agregada en cuerpos de inclusión se obtuvo para flujos de recirculación de 60 ml/min.

Es importante señalar que en ninguna de las condiciones evaluadas en esta tesis fue posible alcanzar el estado de equilibrio respecto a las concentraciones de preproinsulina. Las posibles causas de tal comportamiento fueron la inestabilidad segregacional del plásmido (la cual fue evidente debido a la reducción de la población que contenía al plásmido recombinante), pérdida del gen de la PPIH, degradación de la PPIH por proteasas producto de la respuesta de choque térmico y mutaciones sin sentido.

## 1 INTRODUCCIÓN

La recombinación de genes humanos en el DNA de bacterias es una de las opciones que ofrece la biotecnología moderna; y que posibilita producir proteínas terapéuticas. Un ejemplo es la producción de la insulina humana en la bacteria *Escherichia coli*. El uso de sistemas de expresión que utilizan como hospedero a tal organismo ha sido preferido para la producción de proteínas recombinantes en altas cantidades y a muy bajo costo (Hannig y Makrides, 1998; Baneyx, 1999; Panda, 2003; Palomares *et al.*, 2004; Mergulhao *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2007). Un sistema de expresión consiste en un conjunto de elementos genéticos configurados de manera óptima para el control de la transcripción y traducción de las secuencias a expresar (Makrides, 1996, Sorensen y Mortensen, 2005). En procariontes se compone de la bacteria hospedera y un vector de expresión. Este último consta de la secuencia que codifica la proteína de interés, origen de replicación (que influye en el número de copias del vector de expresión por cada célula), promotores y terminadores. Además de los elementos mencionados, el vector de expresión contiene un gen que le confiere resistencia a algún antibiótico, esto con el fin de mejorar la selección del plásmido y propagación del mismo (Makrides, 1996).

Actualmente, se emplean diferentes técnicas para inducir la producción de proteínas recombinantes en bacterias. Se prefieren utilizar sistemas de expresión con promotores inducibles respecto a los constitutivos debido a que, el empleo de estos últimos trae consigo inestabilidad estructural y segregacional del plásmido (Menart *et al.*, 2003), inhibición del crecimiento debido a la carga metabólica a la que se exponen las células desde que se inicia el cultivo; además de la desventaja que exhibe cuando el producto de interés es lábil o tóxico para el organismo hospedero. Entre los métodos más comunes de inducción se encuentran la adición de componentes externos al medio de cultivo como el isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), salicilato y derivados del benzoato, (Baneyx, 1999 y Santos-Etxepare *et al.*, 2010). Éstas alternativas presentan diversos inconvenientes ya que los agentes químicos son caros, tóxicos y difíciles de retirar del producto final

(Figge *et al.*, 1988 y Su *et al.*, 1990). Por otro lado los sistemas de expresión basados en los promotores fuertes P<sub>L</sub> y/o P<sub>R</sub> del bacteriófago lambda, en combinación con el represor termo-sensible cI857, son ampliamente usados para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Makrides, 1996).

Los sistemas termo-inducibles son muy utilizados ya que poseen un promotor fuerte y eficazmente reprimido a 30 °C. Esto permite alcanzar altas concentraciones celulares antes de inducir la síntesis de la proteína recombinante mediante el incremento de la temperatura hasta 42 °C (Caulcott y Rhodes, 1986; Villaverde *et al.*, 1993). Sin embargo, el incremento de la temperatura y la producción de la proteína recombinante causan un fuerte impacto negativo en la fisiología de *E. coli*, que deja de crecer y sintetizar la proteína recombinante al poco tiempo de aumentar la temperatura (Herendeen *et al.*, 1979; Wallace y Holmes, 1986), a la vez que aumenta la síntesis de productos tóxicos de fermentación (acetato, lactato, formato y succinato) (Caspeta *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, también ocurre la agregación proteica en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (CI) (Klein y Dhurjati, 1995; Schein, 1989). En muchas ocasiones el rendimiento total de proteína bioactiva en CI es de 15-25 % respecto a la proteína total, aunque la expresión de proteína en CI es a menudo indeseable, su formación puede ser aprovechada, para aislar conveniente y efectivamente a la proteína de interés contenida en éstos a través de solubilización y re-plegamiento (Datar *et al.*, 1993).

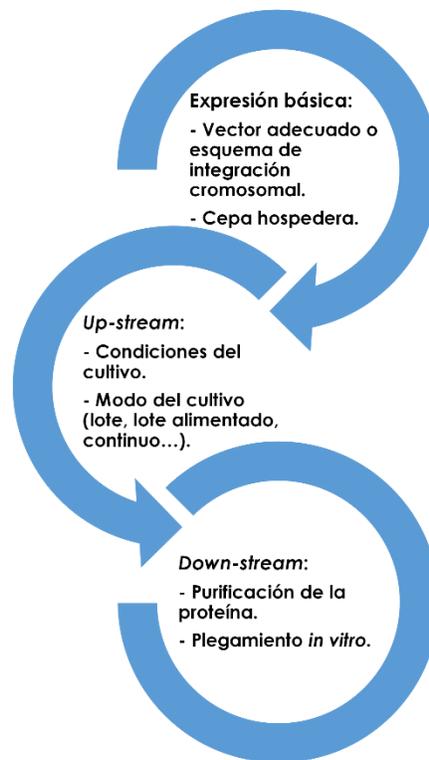
Se ha demostrado que mediante la inducción por oscilación de temperatura se obtienen altos rendimientos de proteína heteróloga (Caspeta, 2014). Recientemente se evaluó el efecto de la velocidad de crecimiento sobre la síntesis de proteína heteróloga en un sistema continuo de dos compartimentos interconectados que simulan las oscilaciones de temperatura entre 35 °C y 42 °C (Niño, 2012). Mediante tal sistema fue posible llegar a un estado de equilibrio donde el cultivo se mantenía parcialmente inducido y produciendo proteína heteróloga, a la vez que fue posible sostener el crecimiento celular. En este sistema se encontró que menores tasas de crecimiento favorecen la producción de proteína recombinante.

Tomando en cuenta los estudios de Caspeta, (2009) y Niño, (2012) se propuso en el presente trabajo utilizar un sistema de dos compartimentos interconectados. La inducción intermitente permitió evaluar el efecto de la frecuencia en que las células son recirculadas desde una condición de crecimiento a otra de inducción y de las temperaturas en los compartimentos de crecimiento e inducción, sobre la producción de la proteína recombinante, la calidad de los CI y la estabilidad del plásmido recombinante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Desde el inicio de la era de la biotecnología moderna en los 70's *E. coli* ha sido usada extensivamente para la sobre-expresión de proteínas debido a su alta velocidad de crecimiento, fácil operación de cultivos de alta concentración celular, bajo costo y la disponibilidad de herramientas genéticas (Tomohiro *et al.*, 2011; Baneyx y Mujacic, 2004). El 30 % de las proteínas de uso terapéutico se producen empleando *E. coli* (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). Sin embargo, hay que tener consideraciones de los aspectos involucrados para la producción de la proteína recombinante de interés (ver figura 1).



**Figura 1. Elementos claves en un sistema de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli***

(Modificado de Balbás, 2001).

El gen que codifica a la proteína a producir se inserta en un vector. La sobreexpresión de este gen es influenciada por muchos factores tales como estabilidad del plásmido, número de copias del plásmido, fuerza del promotor, estabilidad del ARN mensajero, disponibilidad de los ribosomas, eficiencia de la transcripción y traducción, modificaciones pos-traduccionales, estabilidad y solubilidad de la proteína recombinante, así como las condiciones de cultivo (Sawers y Jarsch, 1996). El número de copias del plásmido está en función del origen de replicación del mismo (aunque las condiciones ambientales del cultivo y el estado fisiológico de la bacteria también tienen una fuerte influencia, Sayadi *et al.*, 1989). Se asume, de manera general, que un alto número de copias del plásmido resultará en un alto número de copias del gen de interés, y por lo tanto, la cantidad de la proteína recombinante será mayor. Sin embargo, el empleo de plásmidos con elevado número de copias provoca una alta carga metabólica para la célula (reducción de velocidad específica de crecimiento y en el  $Y_{x/s}$ ). El vector, además, contiene un gen de resistencia a algún antibiótico; esto con el fin de ejercer una presión de selección y así asegurar que se cultivan únicamente células que contienen el plásmido.

En la selección de la cepa de producción, se deben considerar los aspectos cinéticos, el genotipo y fenotipo de la misma. Las cepas de *E. coli* k-12 y *E. coli* B son las más usadas. En el ámbito industrial la cepa BL21 es la más utilizada debido a que produce bajas cantidades de acetato y carece de las proteasas producto de los genes *lon* y *omp-t* (lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante dentro de la bacteria) (Phue *et al.*, 2005).

Los procesos para la producción de proteína recombinante a nivel industrial a menudo se basan en el uso de sistemas de expresión con promotores fuertes inducibles (Swartz, 1996; Vicente *et al.*, 1999). Algunos ejemplos incluyen promotores tales como  $P_{lac}$ ,  $\lambda P_L$  y  $\lambda P_R$ , o el promotor de la ARN polimerasa T7 (Remaut *et al.*, 1981; DeBoer *et al.*, 1983; Studier y Moffatt, 1986). Tales sistemas son comúnmente usados para la producción transitoria de la proteína recombinante, que es inducida después de una fase de crecimiento, durante la cual la formación del producto es baja o nula. En muchos casos, la velocidad específica de producción

incrementa hasta un máximo solo durante un corto tiempo después de la inducción, mientras que la síntesis del producto puede continuar por una o cuatro horas más. A menudo, después de un corto tiempo, la inducción de la expresión de genes recombinantes puede resultar en un colapso metabólico (afectación de algunos procesos catabólicos, por ejemplo redireccionamiento de la fuente de carbono hacia la producción de metabolitos de fermentación) (Baneyx y Mujacic, 2004). Aunque en la mayoría de los casos el tiempo de producción es suficiente para incrementar la proporción proteína recombinante/proteína total celular. Sin embargo, suelen haber consecuencias negativas como traducción ineficiente, ausencia de traducción, modificación del producto, agregación y degradación de la proteína recombinante, las cuales pueden representar un problema en los procesos de purificación que repercute en la calidad del producto.

La productividad de la proteína recombinante en *E. coli* puede ser significativamente incrementada en cultivos de alta densidad celular (de hasta 100 g/l de biomasa en peso seco) (Lee, 1996). La composición del medio de cultivo debe ser cuidadosamente formulada y monitoreada durante el proceso porque puede tener efectos sobre la biomasa (Lee, 1996 y (Yee y Blanch, 1992)) y estabilidad de la proteína (Emory y Belasco, 1990 y Enfors, 1992).

La purificación de proteína recombinante depende de la localización de la misma (citoplasma, periplasma o extracelular). La acumulación en el citoplasma frecuentemente lleva a la acumulación de CI, lo cual también depende la fuerza del promotor, la temperatura, la velocidad de crecimiento, entre otros. En ocasiones es deseable la formación de los CI (las ventajas se precisarán más adelante). Una limitación de la agregación de la proteína recombinante en CI es que la proteína debe replegarse. La eficiencia de este paso define la productividad del proceso.

## 2.2 Inducción térmica para la producción de proteína recombinante

La inducción térmica es una de las opciones preferidas porque resulta en una producción eficiente de proteína recombinante en *E. coli* (Valdez-Cruz *et al.*, 2011). El sistema de expresión termo-inducible se basa en la inserción del gen de interés en vectores que contienen el promotor fuerte “hacia la izquierda” (pL) y/o en el promotor “hacia la derecha” (pR) del fago lambda. Tales promotores son fuertes y finamente inducibles, además, son eficientemente regulados por el represor mutante termolábil cl857 que controla la expresión del gen clonado río abajo (Menart *et al.*, 2003; Ferenci, 2001; Timms *et al.*, 1999; Jana y Deb, 2005; Makrides, 1996; Caspeta *et al.*, 2009; Villaverde *et al.*, 1993)

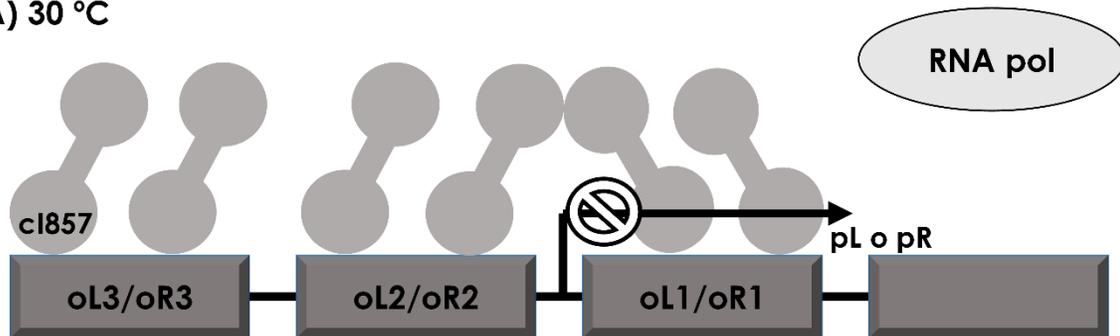
El sistema de expresión termo-inducible ha sido exitosamente usado para la producción de muchas proteínas recombinantes y péptidos ya que además de las ventajas descritas arriba se evita el uso de medios especiales, inductores químicos tóxicos o caros (Makrides, 1996). Por otra parte, el manejo del cultivo y los riesgos de contaminación son minimizados, ya que la temperatura en los fermentadores puede ser modificada externamente. Todas estas características se vuelven relevantes al momento de producir proteínas recombinantes terapéuticas. Al momento de escalar el sistema, hay que tomar en cuenta las limitaciones por transferencia de calor en reactores de gran escala, ya que la velocidad de calentamiento decrece en función del aumento del volumen del biorreactor (Caspeta *et al.*, 2009).

Para inducir la expresión de la proteína recombinante, se necesita un incremento en la temperatura por arriba de 37 °C para inactivar totalmente a la proteína represora cl857, permitiendo el inicio de la transcripción (figura 1). Previo a la inducción, los cultivos normalmente crecen en el intervalo de (28-32) °C (Villaverde *et al.*, 1993).

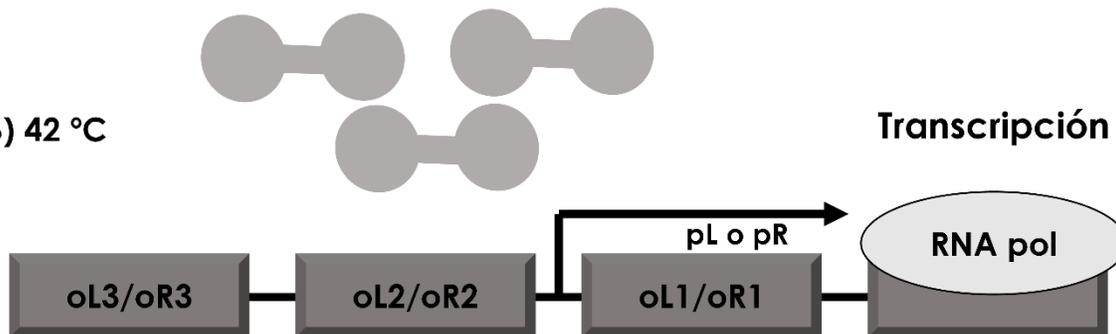
El represor cl857 es una de las mutantes de la proteína cl (involucrada en la regulación del fago lambda), sensibles al aumento de temperatura, generadas por Lieb, 1966 y Lieb, 1981. La mutación consiste en un cambio de una alanina por una

treonina ubicada en el dominio N-terminal (dicho dominio es el que tiene el sitio de unión al DNA) (Nauta et al., 1997 y Lewin, 1997). Dicha mutación hace que esta molécula sea estable a bajas temperaturas (como la nativa), sin embargo, a altas temperaturas resulta inestable (Lieb, 1966). El reemplazo de Alanina por Treonina (ésta última con mayor tamaño y polaridad), hace que se desestabilicen las interacciones hidrofóbicas locales, lo cual hace que esta proteína se desprenda de los operadores, permitiendo así el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa (Lieb, 1981 y Nauta et al., 1997).

**A) 30 °C**



**B) 42 °C**



**Figura 2. Representación de los promotores pL/pR controlados por el represor cI857.**

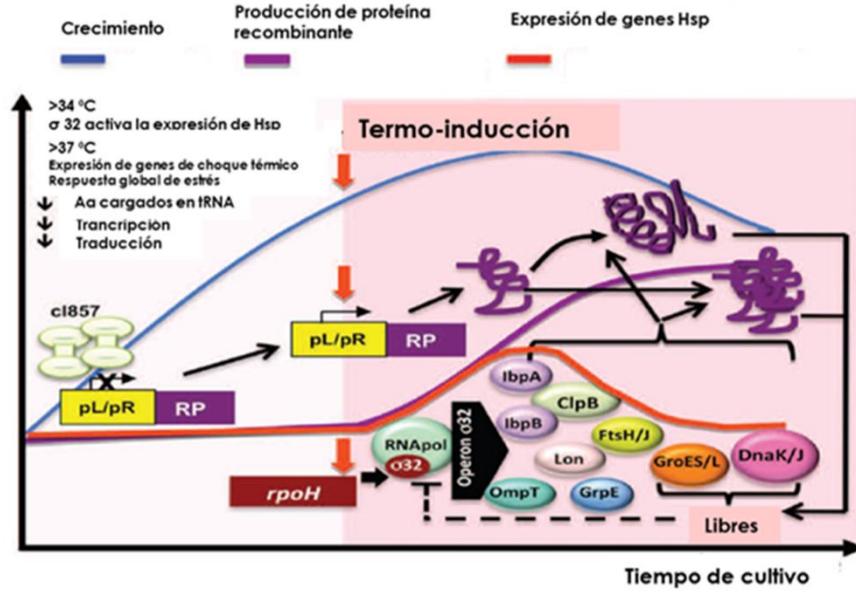
cI857 interactúa con los 3 dominios del operador (oL3/oR3, oL2/oR2 y oL1/oR1, reprimiendo la transcripción. El gen heterólogo se localiza río abajo de los promotores pL o pR. A) cI857 forma dímeros que se unen a las regiones oL u oR y bloquean la transcripción por la RNA polimerasa. B) al aumentar la temperatura por encima de los 37 °C el represor cI857 se desprende (debido a la inestabilidad que presenta a altas temperaturas) de las regiones oL u oR, permitiendo la transcripción por la RNA polimerasa. Tomado de Valdez-Cruz *et al.*, 2011.

Después de aumentar la temperatura, la producción de proteína recombinante causa estrés y desbalances metabólicos, además, se induce una variedad de

respuestas complejas, las cuales se discutirán brevemente, como la respuesta de choque térmico (la cual se presenta más adelante), la respuesta astringente (los niveles intracelulares de ppGpp durante el agotamiento de aminoácidos son regulados por la proteína SpoT. Esta proteína normalmente degrada moléculas de ppGpp, pero esta degradación es inhibida después del agotamiento de aminoácidos, dando lugar a la acumulación de ppGpp. La concentración celular de ppGpp además, está determinada por la actividad de las proteínas Rel A y SpoT (Snyder y Champness, 2007). ppGpp activa la respuesta astringente y promueve una alta transcripción de los genes de choque térmico y otros genes relacionados al estrés. Durante la respuesta astringente, la síntesis de tRNA y rRNA, así como la transcripción de los genes de la maquinaria transcripcional-traduccional de la célula son regulados a la baja y la traducción es interrumpida. Esto limita la síntesis de proteína y la capacidad de la célula durante la producción de la proteína recombinante (Dong *et al.*, 1995, Sandén *et al.*, 2003, Cashel *et al.*, 1996 y Rinas, 1996)) y la respuesta SOS (agentes tales como la radiación UV, metil metano sulfonato, pueden inducirla. La proteína RecA está implicada en la inactivación del represor LexA induciendo de ese modo la respuesta, la inducción de tal respuesta involucra más de 40 genes SOS independientes, la mayoría de ellos codifica para proteínas encargadas de la protección, reparación, replicación, mutagénesis y metabolismo de DNA (Janion, 2008)), todas ellas pueden resultar en una carga metabólica para las células (Gill *et al.*, 2000, Hoffman y Rinas, 2004). Como consecuencia puede ocurrir una disminución de la velocidad específica de crecimiento, degradación de los ribosomas (Dong *et al.*, 1995) y alteraciones en el metabolismo central del carbono (George *et al.*, 1992). Estos efectos pueden alterar la calidad y cantidad de la proteína recombinante producida (Hoffman y Rinas, 2004; Dong *et al.*, 1995; George *et al.*, 1992, Jensen y Carlsen, 1990; Hoffman y Rinas, 2000). Además, la inducción térmica activa la respuesta de choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés), la cual es controlada por el factor sigma 32 (producto del gen *rpoH*) (Tamamori, 1980; Grossman *et al.*, 1984). La molécula  $\sigma$ 32 es una holoenzima que se une a la RNA polimerasa para transcribir efectiva y específicamente la mayoría de los genes de choque térmico (figura 2).

La regulación del factor sigma dependiente de la respuesta de choque térmico es compleja y depende de un ciclo de retroalimentación negativa que involucra a la chaperona DnaK y cambios inducidos por temperatura de la estructura secundaria del mRNA (Yura y Nakahigashi, 1999). La chaperona DnaK se desprende del factor sigma 32 para unirse a proteínas recién sintetizadas, lo cual aumenta la estabilidad y actividad de sigma 32. Esto incrementa la transcripción de DnaK y de otros genes de choque térmico (Bukau, 1993). Además, el cambio ascendente de temperatura incrementa la síntesis de sigma 32, mejorando la traducción de su mRNA (Yura y Nakahigashi, 1999).

Por otro lado  $\sigma$ 32 altera la expresión de distintos genes, incluidos los factores de transcripción, regula la actividad de su aparato transcripcional y tiene un rol general en la homeostasis celular una vez que las células son expuestas a estrés térmico (Nonaka *et al.*, 2006). Por lo menos 120 genes, incluyendo casi todos los que codifican para proteínas de plegamiento y degradación forman el regulón  $\sigma$ 32 (Nonaka *et al.*, 2006, Maurizi *et al.*, 1990, Chuang y Blattner, 1993). La HSR inicia con la sobre expresión de genes que codifican para proteínas selectivas llamadas proteínas de choque térmico (Hsps por sus siglas en inglés). Las Hsps protegen a las células contra la desnaturalización térmica de las proteínas y previenen la agregación (Valdez-Cruz *et al.*, 2011).



**Figura 3. Regulación de las proteínas de choque térmico por  $\sigma 32$ .**

Durante el cambio de 30 °C a 34 °C inicia la inducción de la síntesis de Hsps regulada por el factor sigma 32 (codificado por *rpoH*), la cual dirige a la RNA polimerasa (RNAPol). Cuando la temperatura llega a 37 °C, el represor cI857 se libera (debido al aumento de temperatura) de los promotores pL y/o pR y la transcripción de proteína recombinante inicia de manera asistida por chaperonas (de plegamiento DnaK/J y GroEL/S, estabilizadoras IbpA/IbpB y proteasas ClpB). Algunas proteínas se pliegan correctamente, pero otras se despliegan hasta su agregación. Tomado de Valdez-Cruz *et al.*, 2011.

### 2.3 Moduladores de plegamiento proteico

Las células desarrollan una serie de mecanismos para evitar la exposición de proteínas propensas a la agregación. Una vez sintetizada en el ribosoma, el plegamiento *de novo* de una cadena polipeptídica es facilitada por algunas chaperonas como el factor desencadenante (trigger factor), DnaK, DnaJ, GrpE y el sistema GroEL-GroES. La velocidad de síntesis de la mayoría de las proteínas chaperonas pertenecientes al sistema Hsp70 (DnaK, DnaJ y GrpE) y del sistema Hsp60 (GroEL y GroES) incrementa rápidamente y transitoriamente como parte de la respuesta de choque térmico después del incremento de temperatura (Lemaux *et al.*, 1978). La maquinaria de plegamiento permite a la mayoría de las proteínas alcanzar el estado nativo, pero incluso, en situaciones no estresantes, algunas moléculas no lo hacen. Cuando la maquinaria de plegamiento falla, las células tratan a las proteínas no plegadas a través de mecanismos alternativos, por

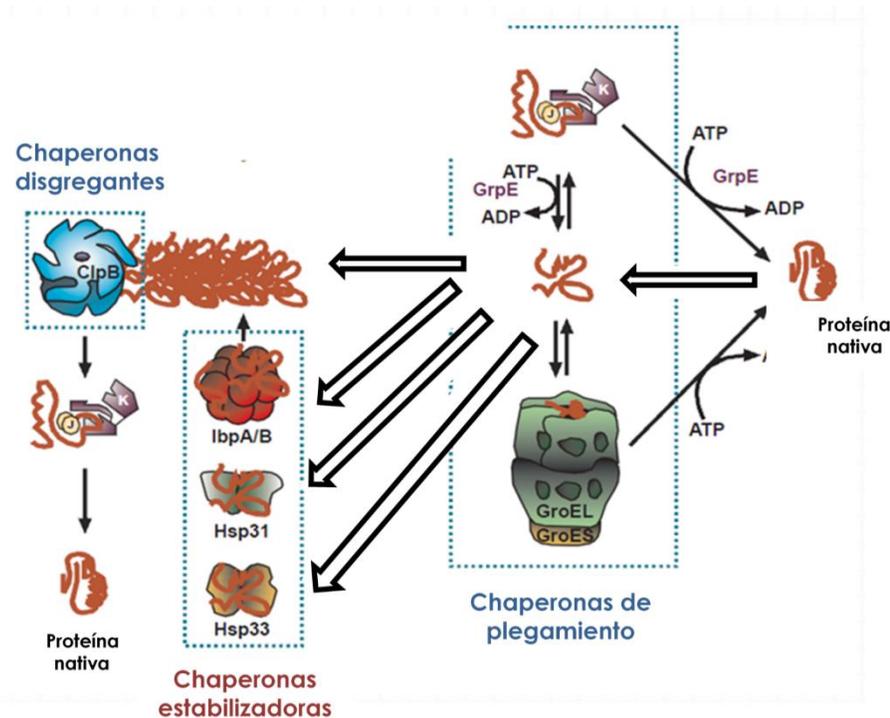
ejemplo, las chaperonas estabilizadoras (IbpA /B, Hsp31 y Hsp33) se unen temporalmente a los péptidos no plegados sobre sus superficies hidrofóbicas expuestas, en donde están disponibles para las chaperonas DnaK/J o GroEL/ES. Las AAA+ (ATPasas asociadas con varias actividades celulares) son proteasas que se encargan de provocar la degradación de proteínas mal plegadas (Gatti-Lafranconi *et al.*, 2011).

Las chaperonas moleculares, una clase ubicua de moduladores de plegamiento, desempeñan un papel central en el control de calidad conformacional del proteoma por interacción, estabilización y remodelamiento de un amplio número de polipéptidos. Aunque son expresadas constitutivamente bajo condiciones óptimas de crecimiento, muchas chaperonas son reguladas una vez que el choque térmico u otros insultos (adición de etanol, infecciones virales, exposición de las células a compuestos citotóxicos), favorecen el desplegamiento de proteínas (incluyendo la expresión de proteínas heterólogas) y por lo tanto son clasificadas como proteínas de choque térmico (Hsp). Las chaperonas moleculares pueden ser divididas en tres clases con base en su mecanismo de acción: chaperonas de plegamiento (ejemplos, DnaK y GroEL) que utilizan ATP para manejar los cambios conformacionales y mediar el plegamiento-desplegamiento de sus sustratos; chaperonas "estabilizadoras" (ejemplo, IbpB) mantienen parcialmente plegada a las proteínas en su superficie a la espera de las chaperonas de plegamiento; y finalmente la chaperona "disgregante" ClpB promueve la solubilización de proteínas que se han agregado como resultado del estrés (Baneyx y Mujacic, 2004).

En la figura 3 se ilustra el plegamiento de proteínas en el citoplasma de *E. coli*. Los péptidos nacientes requieren la asistencia de las chaperonas moleculares DnaK-DnaJ. Después, mediante la hidrólisis de ATP, la chaperona GrpE lleva a la proteína a su conformación nativa. El ciclo puede regresar a DnaK-DnaJ o la proteína ser transferida a GroEL/GroES para ser plegada. En condiciones de estrés (flechas blancas contorno negro), las proteínas termolábiles se despliegan y agregan. IbpB une proteínas parcialmente plegadas sobre su superficie para actuar como un reservorio de intermediarios desplegados hasta que las chaperonas de

plegamiento sean capaces de actuar sobre estos agregados. Las chaperonas estabilizadoras Hsp33 y Hsp31 son importantes bajo condiciones oxidativas y estrés térmico severo. ClpB libera a las proteínas dentro los cuerpos de inclusión y las redirige a la maquinaria de plegado. Durante la expresión heteróloga, no todas las proteínas pueden ser asistidas por DnaK/DnaJ, por lo tanto forman agregados entre ellas, estos agregados se denominan cuerpos de inclusión (C.I.) (Baneyx y Mujacic, 2004).

Posiblemente la aparición de intermediarios proteicos no plegados sea la causa por la cual las proteínas recombinantes son a menudo reconocidas como proteínas foráneas y consecuentemente son blanco de las proteasas, algunas de las cuales pertenecen al regulón de choque térmico (como La y Clp). En *E. coli* la proteasa La (producto del gen *lon*) es la principal responsable de la degradación de proteínas anormales y heterólogas en el citoplasma (Chung y Goldberg, 1981; Goldberg, 1992; Gross, 1996). En mutantes de *lon* (como la cepa reportada en esta tesis) la proteólisis anormal de polipéptidos puede ser reducida significativamente (Chung y Goldberg, 1981), la degradación puede ocurrir hasta 2 veces más lentamente (Bukhari y Zipser, 1973; Kowit y Goldberg, 1977; Gottesman y Zipser, 1978). Tomando en cuenta estas observaciones, se asume que el rendimiento de proteínas recombinantes se ve positivamente influenciado en este tipo de mutantes (Buell *et al.*, 1985; Surek *et al.*, 1991).



**Figura 4. Asistencia de chaperonas en el plegamiento de proteínas.**

Tomado de Baneyx y Mujacic, 2004.

## 2.4 Cuerpos de inclusión

En sistemas de expresión heterólogos la agregación de proteínas en cuerpos de inclusión es un fenómeno común (Baney y Mujacic, 2004). Los cuerpos de inclusión se localizan en el citoplasma o periplasma de las células hospederas y se ven como densos agregados refráctiles bajo el microscopio electrónico (Georgiou y Valax, 1999; Taylor *et al.*, 1986; Bowden *et al.*, 1991).

La agregación de proteínas durante altos niveles de expresión se atribuye generalmente a la alta concentración local de cadenas polipeptídicas emergentes de los ribosomas, plegado ineficiente e indisponibilidad de chaperonas (Ventura, 2005; Rinas y Bailey, 1992). Estos factores permiten la formación de proteínas parcialmente plegadas o no plegadas en el citoplasma. En general, estos intermediarios presentan superficies hidrofóbicas expuestas que se unen entre sí para formar agregados amorfos (Rudolph, 1996).

Los CI tienen una mayor tendencia a formarse en sistemas termo-inducidos. En primer lugar el aumento de la temperatura hace que las proteínas se desplieguen promoviendo la agregación. Por otro lado, el empleo de un promotor fuerte implica una alta velocidad de síntesis de la proteína heteróloga, promoviendo que la maquinaria celular para el plegamiento proteico sea insuficiente por lo que las proteínas semi-plegadas se agregan para estabilizarse (Baney y Mujacic, 2004; Goff y Goldberg, 1985; Parsell y Sauer, 1989). El grado de agregación de las proteínas es determinado por los parámetros del proceso, tales como composición del medio de cultivo, temperatura de crecimiento, velocidad de alimentación en cultivos lote alimentado y la tasa de dilución en cultivos continuos (García-Fruitos y Villaverde, 2007).

La formación de los cuerpos de inclusión es reversible (Carrio y Villaverde, 2001) y la existencia de estructuras proteicas nativas ha sido reportada (Oberg *et al.*, 1994; Carrio *et al.*, 2000; Ami *et al.*, 2005). Además de éstos, hay reportes que sugieren la presencia de proteínas biológicamente activas en los cuerpos de inclusión (García-Fruitos *et al.*, 2005; Peternal y Komer, 2011). Los cuerpos de inclusión que se forman a bajas temperaturas tienen proteínas bioactivas completamente funcionales que se denominan "cuerpos de inclusión no comunes", mientras que los agregados resistentes a proteasas se llaman "cuerpos de inclusión comunes" (Jevsevar *et al.*, 2005; Peternal *et al.*, 2008). Sin embargo, los cuerpos de inclusión que se producen a altas temperaturas de cultivo poseen proteínas funcionales dentro de ellos (Carvajal *et al.*, 2011). La formación de agregados insolubles de proteínas recombinantes durante altos niveles de expresión es llevada a cabo por la asociación de proteínas parcialmente plegadas o intermediarios proteicos no plegados. Estos agregados son resistentes a proteasas y se solubilizan en altas concentraciones molares de agentes caotrópicos (agente químico usado para desnaturalizar proteínas, ejemplos: urea, tiourea y cloruro de guanidinio). También se ha reportado que los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados usando agentes suaves, para así, no alterar las estructuras secundarias nativas en las proteínas (Patra *et al.*, 2000; Singh y Panda, 2005).

Actualmente existen dos modelos propuestos para describir la formación de los CI, como una consecuencia del autoensamblaje de monómeros no nativos a polímeros crecientes de mayor tamaño (Kopito, 2000). El primer modelo propone que la agregación de los CI se desarrolla desde uno o varios sitios de nucleación de los intermediarios proteicos no plegados. Ya que estos agregados, producto de la nucleación, son entidades termodinámicamente estables, la adición de monómeros mal plegados sobre éstos se ve favorecida. El segundo modelo sugiere que los cuerpos de inclusión son un conjunto de agregados proteicos. Así, los agregados proteicos de un tamaño pequeño se asocian a otros agregados para dar lugar a uno o a más agregados de mayor tamaño. El mecanismo de formación del cuerpo de inclusión y la naturaleza de los compuestos intermedios que intervienen en la formación de estos agregados aún no está claro (Upadhyay *et al.*, 2012)

Aunque se producen en proporciones variables, la proteína recombinante puede llegar a ocupar hasta el 90 % de los CI (Villaverde y Carrio, 2003; Carrio y Villaverde, 2002), la cual puede ser plegada *in vitro* posteriormente. El material restante embebido en los cuerpos de inclusión pueden ser fragmentos proteolíticos de la proteína recombinante (Carrio, 1999; Corchero *et al.*, 1996), trazas de proteína de membrana (Rinas y Bailey, 1992, Jurgen, 2000), fosfolípidos y ácidos nucleicos (Valax y Georgiou, 1993), las chaperonas DnaK y GroEL (Carrio y Villaverde, 2002,) además de las pequeñas proteínas de choque térmico (IbpAB) (Allen *et al.*, 1992; Lethanh *et al.*, 2005; Carrio y Villaverde, 2002; Hoffman y Rinas, 2000). Este porcentaje de proteína recombinante hallada en los CI es relevante ya que simplifica y optimiza la purificación de la misma en los pasos subsecuentes del proceso. Para este trabajo, cuanto mayor sea el porcentaje de proteína recombinante contenida en los CI, mayor será la calidad del mismo.

Algunas ventajas asociadas a la formación de CI son (Datar *et al.*, 1993; Mohan y Kumar, 2005):

- Contienen un alto nivel de proteína recombinante

- Fácil aislamiento de los CI mediante centrifugación debido a su tamaño y densidad comparada con los contaminantes celulares.
- Bajo nivel de degradación de la proteína expresada.
- Homogeneidad de la proteína de interés en el CI.

Generalmente las proteínas altamente hidrofóbicas son las más propensas a acumularse en CI. Los CI son de naturaleza amorfa o paracristalina, dependiendo de la localización. Los CI son de alta densidad (~ 1.3 mg/ml), mucho más densos que la mayoría de los componentes celulares, por esta razón pueden ser fácilmente separados por centrifugación después de romper las células (Mohan y Kumar, 2005). El rendimiento total de proteína activa en CI generalmente oscila entre 15 % y 25 % respecto a la proteína total (Mohan y Kumar, 2005).

Ejemplos de proteínas recombinantes que se agregan en cuerpos de inclusión y que son biológicamente activas incluyen a la  $\beta$ -galactosidasa (Worrall y Goss, 1989), endoglucanasa (Tokatlidis *et al.*, 1991), GFP (Vera *et al.*, 2007), lipasa bacteriana (Ami *et al.*, 2005), oxidasas (Nahalka y Nidetzky, 2007), quinasas (Nahalka y Patoprsty, 2009), fosforilasas (Nahalka, 2008), aldolasas (Nahalka *et al.*, 2008) transglutaminasas (Carvajal *et al.*, 2011) y el factor estimulante de colonias (Jevsevar *et al.*, 2005); aunque la lista es mucho más extensa.

## **2.5 Inestabilidad segregacional y estructural del plásmido**

La pérdida del plásmido recombinante es una de las principales causas de la reducción de la productividad de proteína de interés. Los cultivos industriales de microorganismos recombinantes, desde el inóculo y hasta la escala industrial, requieren que el plásmido recombinante sea estable por más de 25 generaciones (Imanaka y Aiba, 1981). La productividad de un biorreactor con cepas recombinantes es altamente afectada por el grado en el que células sin plásmido recombinante son generadas a partir de aquellas que si lo contienen y de su posterior propagación (Ensley, 1986; Nordstrom y Austin, 1989). Un defecto en la partición del plásmido entre las células hijas durante la división celular, puede resultar en la pérdida del plásmido recombinante de una de las células. A esto se

le conoce como inestabilidad segregacional del plásmido. El número de copias del plásmido depende del número de copias del plásmido al tiempo de la división celular y su distribución aleatoria entre las células hijas (Paulsson y Ehrenberg, 2001). Un factor que incrementa este tipo de inestabilidad es la multimerización del plásmido, ya que dos copias del plásmido tienen la misma secuencia, estas se pueden recombinar y formar un solo círculo dimérico con dos orígenes de replicación. Esto resulta en pocas unidades independientes para ser segregadas entre las células hijas y consecuentemente la pérdida del plásmido puede incrementar (Summers, 1998). Un gran número de estudios experimentales ha demostrado que la estabilidad del plásmido es afectada por la partición del mismo (Meacock y Cohen, 1980), medio de cultivo (Matsui *et al.*, 1990; Shoham y Demain, 1990), velocidad de crecimiento (Siegel y Ryu, 1985; Nancib y Boudrant, 1992), número de copias del plásmido (Berg *et al.*, 1989; Togna *et al.*, 1993), oligomerización del plásmido y resolución del oligómero (Summers y Sherrat, 1984; Weber, 1992), actividad de la girasa (Beaucage *et al.*, 1991), tamaño del inserto (Warnes y Stephenson, 1986) y el nivel de expresión de la proteína recombinante (Bentley y Kompala, 1990; Ryan y Parulekar, 1991).

Las velocidades de crecimiento relativas de las células con y sin plásmido recombinante son los factores más importantes en el diseño de las estrategias de cultivo en un biorreactor. Generalmente, las células que contienen el plásmido recombinante crecen más lentamente que las células que no lo contienen, debido a que están comprometidas a sintetizar más proteína. Así, las células con el plásmido recombinante tienen una menor velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) en comparación con aquellas que no lo contienen.

Existen mecanismos para asegurar la permanencia del plásmido en las poblaciones celulares (Lewin, 1997). Por ejemplo, un plásmido con bajo número de copias garantiza su permanencia por resolución de multímeros a través de sistemas de recombinación sitio-específicos (secuencia *cer*) o mecanismos de partición activa, tales como la secuencia *par* (Paulsson y Ehrenberg, 2001). Los genes responsables de ambos mecanismos han sido incorporados artificialmente a los plásmidos para incrementar su estabilidad (Ramírez *et al.*, 1995). La inestabilidad segregacional del

plásmido se previene si las células que contienen el plásmido recombinante tiene una ventaja competitiva sobre las células sin el plásmido; entonces, la presión selectiva puede ser utilizada para seleccionar a las células que si contienen el plásmido. La estrategia más utilizada es introducir en el plásmido el gen o los genes que confieran una resistencia a algún antibiótico. La presión selectiva es entonces aplicada suplementando el antibiótico al medio de cultivo. Esta opción puede ser poco exitosa si los antibióticos son degradados o inactivados (Baneyx, 1999). Por otra parte, los antibióticos son caros y su presencia es indeseable en alimentos o productos terapéuticos, así como en los efluentes de desecho del bioproceso.

La inestabilidad estructural es otra forma en la cual la expresión del gen recombinante se puede perder. En este caso ocurre una reorganización genética del plásmido recombinante, dando lugar a un vector sin gen heterólogo y por lo tanto no productivo (Corchero y Villaverde, 1998). Este tipo de inestabilidad es resultado de cambios físicos en el plásmido, tales como deleciones, inserciones y rearrreglos. La inestabilidad estructural es menos común que la inestabilidad segregacional y generalmente no se puede prevenir con la presión selectiva. Por el contrario, una fuerte presión selectiva a lo largo del tiempo, producto de la expresión de un gen recombinante, puede inducir a la inestabilidad estructural (Corchero y Villaverde, 1998). La inestabilidad estructural puede resultar en una completa eliminación de la producción de la proteína recombinante o en la acumulación de proteínas recombinantes aberrantes con cambios menores en la secuencia original de aminoácidos (deleciones, adiciones o sustituciones). La inestabilidad estructural de plásmidos involucra 3 estados: a) rearrreglos del plásmido, b) sustitución de plásmidos originales por plásmidos modificados debido a una incompatibilidad con factores ambientales y c) prevalencia de la población con células que contienen plásmidos modificados respecto a los plásmidos originales (Shoham y Demain, 1991).

## 2.6 Cultivo continuo

El cultivo continuo de microorganismos es una técnica de gran importancia en microbiología y bioingeniería. La característica esencial de esta técnica es que el crecimiento en un cultivo continuo toma lugar bajo condiciones de un estado de equilibrio dinámico, lo cual ocurre a una velocidad constante de suministro de nutrientes en un medio de composición constante. Factores como el pH, concentraciones de nutrientes, productos metabólicos y oxígeno disuelto, los cuales en general cambian durante el ciclo de crecimiento en un cultivo por lote, se mantienen constantes en un cultivo continuo y pueden ser controlados independientemente por el experimentador (Herbert *et al.*, 1956).

Un cultivo continuo en un sistema de reacción homogéneo se establece cuando se suministra continuamente medio estéril fresco al biorreactor, a la vez que se retira, a la misma velocidad el medio agotado junto con células, a una velocidad adecuada y pre-seleccionada. El crecimiento de las células en un cultivo continuo de este tipo es controlado por la capacidad del componente limitante al medio y es entonces que se describe como quimiostato. En este sistema, un estado de equilibrio es eventualmente alcanzado y la pérdida de biomasa en el efluente es reemplazada por el crecimiento celular en el biorreactor. El flujo del medio a través del sistema se describe como tasa de dilución (D), la cual es igual a la velocidad de adición del medio dividida entre el volumen de operación del cultivo (Herbert *et al.*, 1956). Si se considera insignificante la velocidad específica de muerte celular y el sistema tiene un mezclado perfecto, el balance entre el crecimiento de células y su pérdida del sistema puede ser descrita como:

$$\frac{dx}{dt} = \text{crecimiento} - \text{salida} \quad (1)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx \quad (2)$$

En estado de equilibrio dinámico:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (3)$$

$$\mu = D \quad (4)$$

En donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento,  $x$  es la concentración de biomasa y  $D$  es la tasa de dilución.

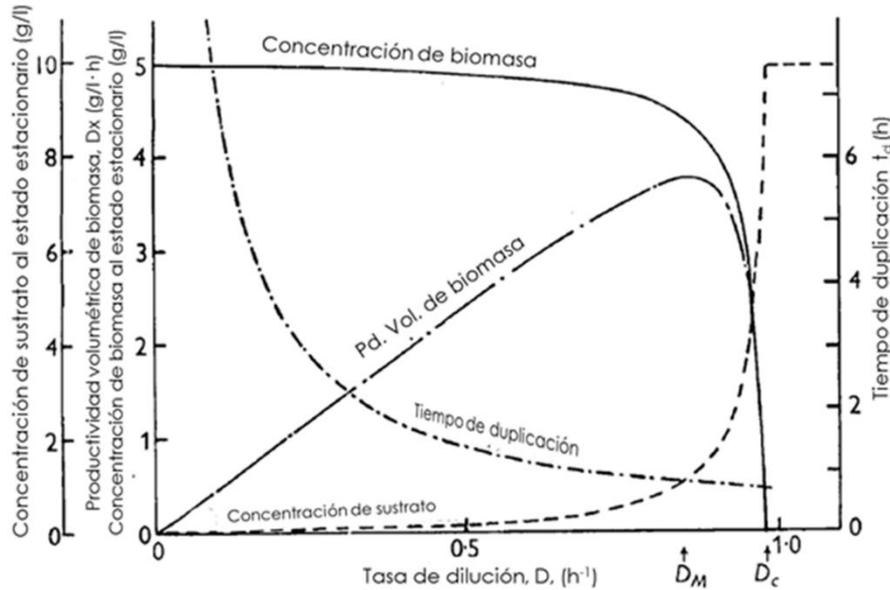
Por lo tanto, la velocidad de crecimiento de los organismos es controlada por la tasa de dilución, la cual es una variable experimental fácilmente controlable. El límite de la  $D$  estará determinado por la velocidad máxima de crecimiento; entonces, bajo ciertos límites, la tasa de dilución puede ser usada para controlar la velocidad de crecimiento en un quimiostato.

La figura 5 muestra el tiempo medio de generación y las concentraciones de biomasa y sustrato al estado de equilibrio en un cultivo continuo y lo que se espera cuando se varía la tasa de dilución. Si el sustrato que limita al crecimiento celular es la fuente de carbono y energía; y el metabolismo endógeno, representado por la denominada energía de mantenimiento celular ( $m$ ) se considera insignificante, la concentración de microorganismos tendrá un máximo valor cuando la tasa de dilución sea cercana a cero y la concentración de sustrato será también igual a cero. Conforme la tasa de dilución se incrementa, la concentración de sustrato también incrementa y la concentración de biomasa disminuye, hasta un valor crítico de  $D$  donde la concentración de biomasa está cerca de cero y la concentración de sustrato es igual  $S_0$  (sustrato en el medio de adición al quimiostato). El valor crítico para la tasa de dilución, por debajo de la cual se evita el efecto *wash out* o lavado celular se denomina  $D_c$ , la cual está dada por la ecuación:

$$D_c = \mu_m \left( \frac{S_0}{K_s + S_0} \right) \quad (5)$$

Cuando  $S_0 \gg K_s$ , lo cual es usualmente el caso, entonces  $D_c$  es aproximadamente igual a  $\mu_m$ .

En donde  $\mu_m$  es la velocidad específica de crecimiento máxima,  $S_0$  es la concentración de sustrato en el medio de adición al quimiostato y  $K_s$  la constante de afinidad del microorganismo por el sustrato.



**Figura 5. Comportamiento teórico ideal de las variables  $\bar{s}$  y  $\bar{x}$  en un cultivo continuo en estado de equilibrio dinámico.**

$D_M$  es el valor de  $D$  en donde se obtiene la máxima productividad volumétrica de biomasa (Pd. Vol. de biomasa) y  $D_c$  es el valor crítico de  $D$ . Tomado de Herbert et al., 1956.

Respecto a la figura 5, los valores de concentración de sustrato y biomasa ( $\bar{s}$  y  $\bar{x}$ , respectivamente) a diferentes tasas de dilución son calculadas con:

$$\bar{s} = K_s \left( \frac{D}{\mu_m - D} \right) \quad (6)$$

$$\bar{x} = Y_{x/s} (S_0 - \bar{s}) = Y_{x/s} \left[ S_0 - K_s \left( \frac{D}{\mu_m - D} \right) \right] \quad (7)$$

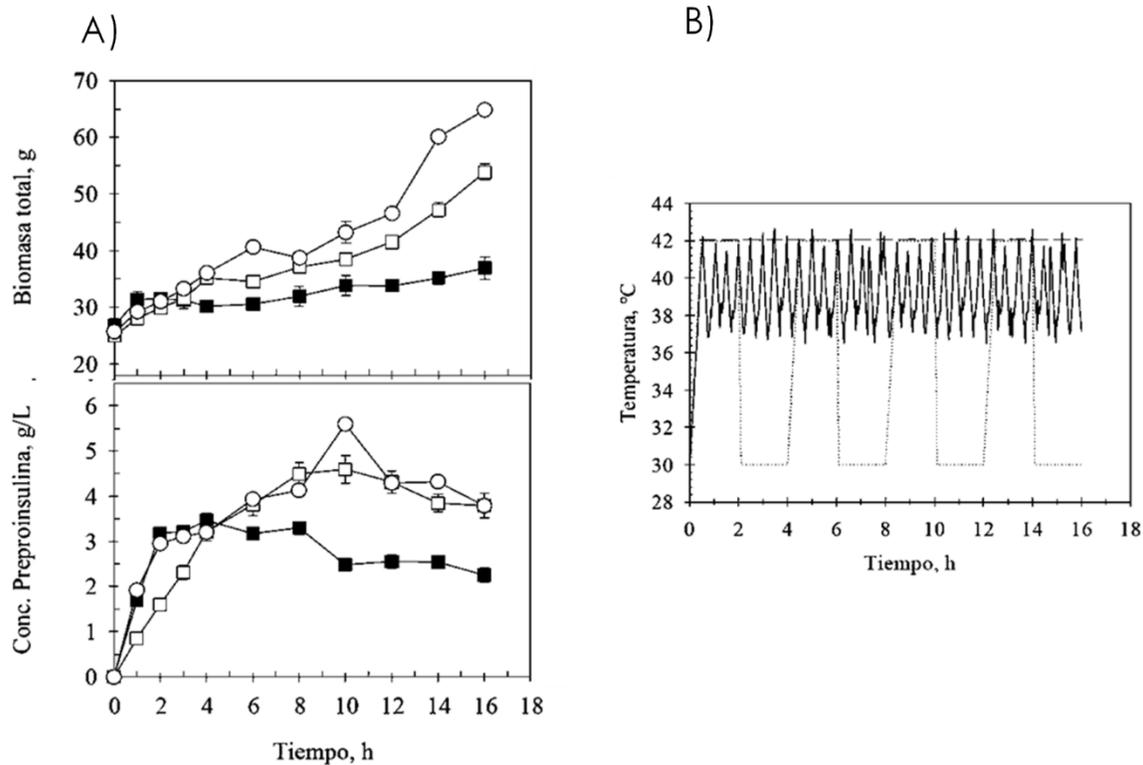
Si se considera que el valor del rendimiento de biomasa respecto al sustrato  $Y_{x/s}$  es constante, se tendrá el comportamiento teórico de los valores de  $\bar{s}$  y  $\bar{x}$  mostrado en la figura 4, cuando se emplean los siguientes valores  $\mu_m = 1 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y_{x/s} = 0.5$  y  $K_s = 0.2 \text{ g/l}$  y  $S_0 = 10 \text{ g/l}$ .  $Y_{x/s}$  es el rendimiento de biomasa respecto al sustrato.

## 2.7 Inducción escalonada y por oscilaciones de temperatura

Para efectuar la inducción por temperatura se han evaluado dos estrategias en sistemas termoinducidos, a) inducción escalonada (la cual consiste en mantener un cultivo en crecimiento a temperaturas inferiores a la de inducción, una vez alcanzada la concentración celular adecuada, la temperatura se incrementa hasta 42 °C hasta que las células dejan de crecer y eventualmente mueren, y b) inducción intermitente (consiste en oscilar el cultivo a diferentes temperaturas, una de crecimiento y otra de inducción; para así mantener a las células parcialmente inducidas) (Caspeta *et al.*, 2009 y 2013). La primera estrategia es la tradicional mientras que la segunda es una propuesta reciente y novedosa.

En un sistema de lote alimentado, en donde, también se evaluó el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la respuesta de choque térmico y proteína heteróloga, se ha encontrado que las velocidades de calentamiento altas incrementan la respuesta de choque térmico y disminuyen el rendimiento de proteína heteróloga (Caspeta *et al.*, 2009 y 2013). Esta información ha permitido diseñar una nueva estrategia de inducción por oscilaciones de temperatura con la cual se han obtenido mayores rendimientos de proteína heteróloga.

En la figura 6 se observa que la inducción oscilatoria favoreció la producción de proteína recombinante y biomasa; de esta manera, tal estrategia de inducción permitió mantener la concentración celular durante más tiempo y por lo tanto aumentar la síntesis de proteína recombinante respecto a la estrategia de inducción escalonada (o temperatura constante).

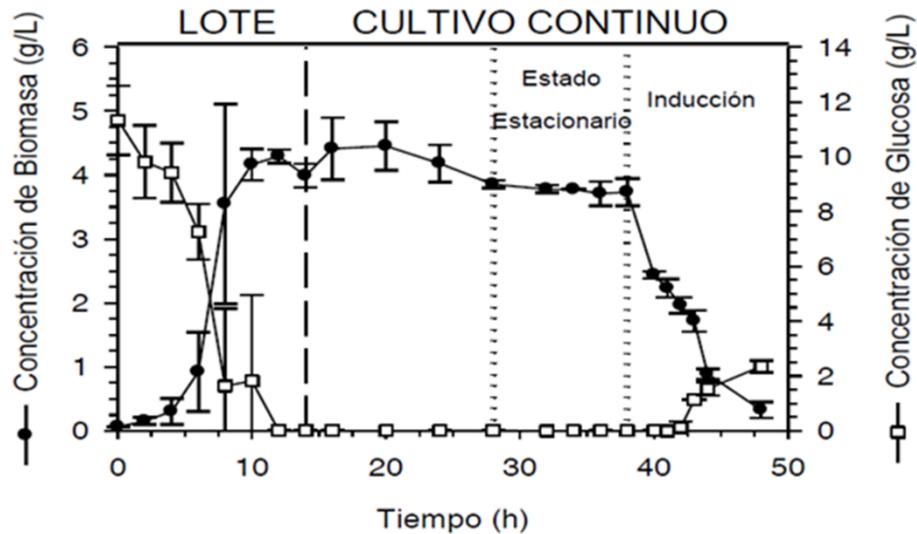


**Figura 6. Inducción escalonada y oscilatoria en un cultivo por lote alimentado.**

A) Concentración de biomasa y proteína recombinante utilizando distintas estrategias: cultivos a temperatura de inducción constante a 42 °C (cuadrados negros); temperatura oscilante entre 42 °C y 37 °C (cuadrados blancos) y temperatura oscilante entre 42 °C y 30 °C (círculos blancos). B) Inducción oscilatoria y escalonada; línea continua: 42 °C -37 °C, línea punteada: 42 °C -30 °C, línea interrumpida: 42 °C. Cabe señalar que en ambas estrategias, la inducción inició después de haber alcanzado una alta densidad celular. Tomado de Caspeta, 2009.

Para evidenciar el efecto de la estrategia de inducción escalonada en cultivos continuos de *E. coli*, Niño en el 2012 realizó experimentos en un quimiostato (Figura 7). Tales cultivos se realizaron en biorreactores, empleando una  $D= 0.2 \text{ h}^{-1}$ , la temperatura antes de iniciar la inducción por temperatura fue de 35 °C y después de 10 h de haber alcanzado el estado de equilibrio se indujo a la población en el biorreactor con un aumento de temperatura a 42 °C. Estos experimentos demostraron que efectivamente en quimiostatos con una estrategia de inducción tradicional (escalonada) las células son incapaces de mantener la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) cuando estuvieron inducidas, ya que después de realizar la inducción, ocurrió una disminución en la concentración de biomasa,

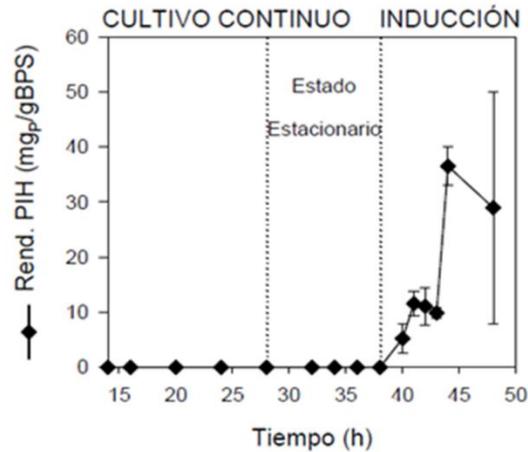
reflejando que el valor de  $\mu$  fue menor a la tasa de dilución. Además, se observó el aumento de la concentración de glucosa, esto indica que no fue consumida a la misma velocidad a la cual se adicionó al biorreactor, debido a que la concentración celular estaba descendiendo, consecuentemente la velocidad de consumo de sustrato también. En la etapa de inducción, es claro el efecto wash out descrito en la sección anterior.



**Figura 7. Cultivo continuo con inducción escalonada.**

Las líneas discontinuas indican el inicio del cultivo continuo, las líneas punteadas enmarcan el estado de equilibrio antes de realizar la inducción escalonada. Los datos representan el promedio de tres cultivos continuos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Tomado de Niño, 2012.

Por otro lado, en la figura 8 se observa que el tiempo antes de inducción, no se presentó expresión de la proteína recombinante, una vez que se aumentó la temperatura a 42 °C inició la síntesis de la preproinsulina humana, alcanzando un valor máximo a las 44 h.

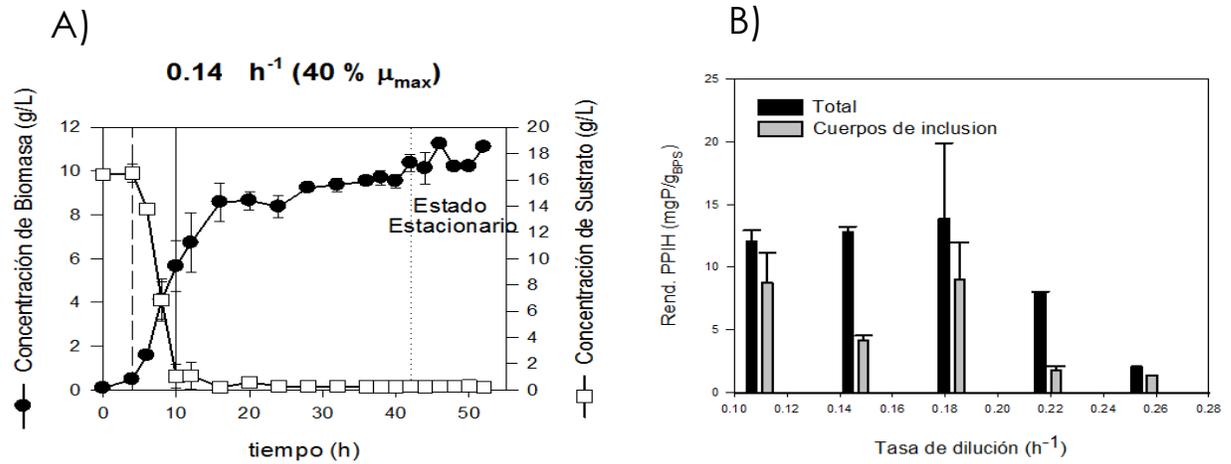


**Figura 8. Rendimiento de proteína recombinante en cultivo continuo con inducción escalonada.**

Las líneas punteadas enmarcan el estado de equilibrio antes de iniciar la inducción escalonada. Los datos representan el promedio de tres cultivos continuos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. El dato observado en el último punto debe tomarse con precaución ya que es producto de un error en la técnica de cuantificación. Tomado de Niño, 2012.

Estos datos demuestran el impacto fisiológico que trae consigo el aumento de temperatura sobre el crecimiento, la concentración de sustrato y el rendimiento de proteína recombinante, en donde este último se ve limitado por la estrategia de inducción escalonada.

Niño, 2012, con base en estos resultados y considerando la inducción oscilatoria propuesta por Caspeta, 2009 implementó una nueva estrategia de inducción oscilatoria en quimiostato. El sistema que diseñó consta de un quimiostato compuesto por dos reactores interconectados que están a diferentes temperaturas: uno a 35 °C que es la temperatura de crecimiento y el otro a 42 °C que es la temperatura de inducción. Con esta estrategia se alcanzó el estado de equilibrio respecto a biomasa, concentración de sustrato y proteína recombinante, además se evaluaron diferentes tasas de dilución. En general, la tendencia fue que a menores tasas de dilución, mayor producción de proteína recombinante contenida en cuerpos de inclusión (figura 8).



**Figura 9. Cultivos continuos en quimiostato de dos compartimentos interconectados.**

A) Cinética de consumo de sustrato y crecimiento celular de un cultivo continuo termo-inducido de dos compartimentos interconectados,  $T_{\text{crec}} = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{ind}} = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_{\text{crec}} = 700\text{ ml}$ ,  $V_{\text{ind}} = 500\text{ ml}$  y  $D = 0.146\text{ h}^{-1}$ , B) Rendimiento de proteína total y en cuerpos de inclusión respecto a la biomasa en peso seco a distintas tasas de dilución cuando  $T_{\text{crec}} = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{ind}} = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_{\text{crec}} = 700\text{ ml}$ ,  $V_{\text{ind}} = 500\text{ ml}$ . En el experimento donde se manejó la velocidad específica de crecimiento de  $0.25\text{ h}^{-1}$  no hubo duplicado. Tomado de Niño, 2012.

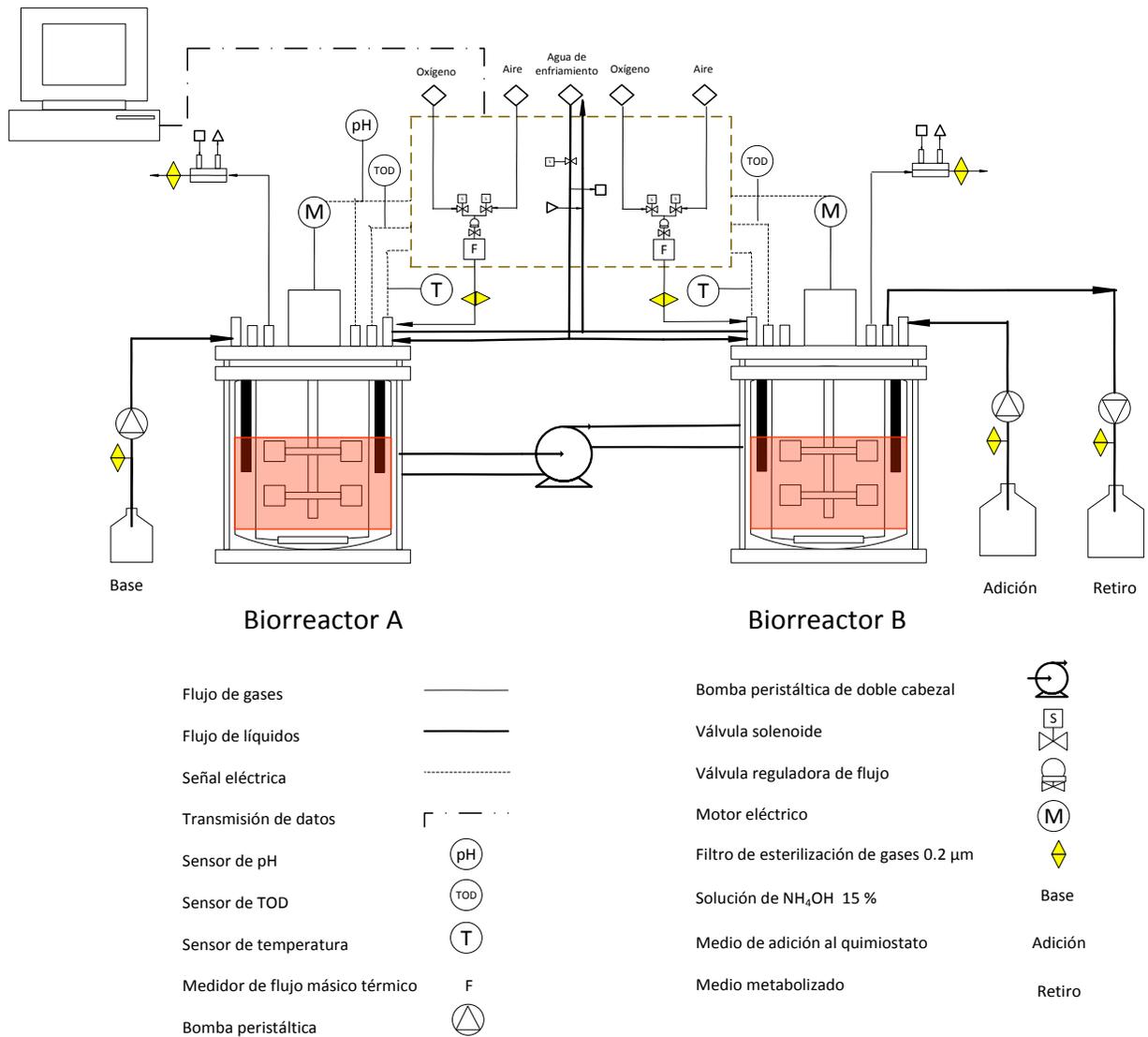
### 3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha demostrado en sistemas de termo-inducción de dos compartimentos (figura 9) que la oscilación continua de temperatura entre 35 °C y 42 °C permite mantener el crecimiento celular a lo largo del tiempo a la vez que se mantiene la producción de proteína recombinante en el estado de equilibrio (Niño, 2012). Sin embargo, no se ha profundizado en el estudio de los efectos de las variables de operación sobre la producción y calidad de proteína recombinante. Dos variables operacionales relevantes de esta estrategia son:

- Frecuencia en que las células son intermitentemente expuestas a una condición de crecimiento y otra de inducción (velocidad con la cual las células son recirculadas desde una condición de crecimiento a otra de inducción).
- La relación entre las temperaturas de crecimiento e inducción (temperatura en cada reactor).

Variar la frecuencia con que las células son recirculadas, es decir cambiar los tiempos en los que las células permanecen en cada reactor. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron tiempos de residencia menores y mayores a los tiempos de máxima expresión de genes de choque térmico (lo cual se discutirá más adelante).

La relación entre temperaturas de crecimiento e inducción es relevante, por lo que se evaluarán temperaturas de crecimiento por arriba y por debajo de la temperatura crítica para la sobre-expresión de los genes de choque térmico. Además se evaluará una temperatura de inducción relativamente baja (comparada con 42 °C) con el fin de evitar la posible inestabilidad segregacional del plásmido.



**Figura 10. Diagrama simplificado de tuberías e instrumentos del sistema termo-inducido de dos reactores con recirculación celular.**

Los elementos delimitados por las líneas punteadas indican que están integrados en el módulo de control Bioflo 115/110. El biorreactor A fue en donde se mantuvo la temperatura de inducción y en el B la temperatura de crecimiento.

#### **4. HIPÓTESIS**

La calidad y cantidad de cuerpos de inclusión dependerán del flujo de recirculación y de las temperaturas de crecimiento e inducción en un sistema de dos compartimentos termo-inducido y basado en el promotor  $P_L$  del fago lambda.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto de las estrategias de termo-inducción en cultivos continuos sobre la producción de proteína recombinante y la composición de los cuerpos de inclusión.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Diseñar sistemas de inducción intermitente de dos compartimentos, variando el flujo de recirculación y las temperaturas de crecimiento e inducción.
- Evaluar el efecto del flujo de recirculación y de las temperaturas entre los compartimentos de crecimiento e inducción sobre la producción de proteína recombinante y la composición de los cuerpos de inclusión.
- Evaluar el efecto del flujo de recirculación y de las temperaturas entre los compartimentos de crecimiento e inducción sobre la estabilidad del plásmido recombinante.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepa bacteriana y plásmido

Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* BL21 (Stratagene, CA, cat: 200133) transformada con el plásmido multicopia pV1rep1/PIH. El plásmido contiene la secuencia nucleotídica que codifica para la preproinsulina humana (PPIH) colocada río abajo de la secuencia promotora pL del bacteriófago lambda. En el mismo plásmido se localiza la secuencia que codifica para el represor termo-sensible cl857 (Caspeta, 2009, Caspeta et al., 2013).

### 6.2 Medio de cultivo

En el cuadro 1 se muestra la composición de los medios de cultivo empleados para crecimiento en matraces, reactor en la etapa lote y el medio de adición al reactor una vez que inició el cultivo continuo.

**Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo.**

Componente	Matraz (g/L)	Reactor cultivo en lote (g/L)	Medio de adición al reactor (cultivo continuo) (g/L)
Glucosa	12.0	17.0	40.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.3	13.3	30.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0	4.0	9.2
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.6	0.6	0.5
Ácido cítrico	2.2	2.2	5.0
<b>Elementos traza (mg/L)</b>			
EDTA-sodio	1.41	1.41	3.22
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.57
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.5	1.5	3.42
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.15	0.15	0.34
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.30	0.30	0.68
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.21	0.21	0.48
Zn (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.38	3.38	7.71
Citrato de hierro III	10.08	10.08	22.98
Tiamina-HCl	4.5	4.5	10.3
Ampicilina	50.0	50.0	114
NH <sub>4</sub> OH 15 %	-	Lo necesario para mantener el pH	
Antiespumante base silicón	Según fuese requerido		

El medio se preparó disolviendo las sales de fosfato y ácido cítrico en agua destilada, en las cantidades requeridas para cierto volumen, ajustando el pH a 7.0 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  15 % (p/p). Esta disolución (ya sea para cultivo en matraz o reactor) se esterilizó a 121 °C por 30 min con calor húmedo. Por separado se prepararon soluciones concentradas de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (500 g/L), elementos traza (250 X) y glucosa (650 g/L) con agua destilada. Estas soluciones se esterizaron a 121 °C durante 30 min mediante calor húmedo.

Además, se prepararon soluciones concentradas de hidrocloreuro de tiamina (10 g/l) y ampicilina disódica (100 g/l) con agua destilada, se esterizaron por filtración con un filtro con un diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  y se mantuvieron en congelación a -20 °C.

### **6.3 Banco celular**

El banco celular fue almacenado a -70 °C. Para la realización del mismo se utilizó un cultivo con medio mineral crecido a 33 °C, 200 rpm y con 200 mg/l de ampicilina, se alcanzó una densidad óptica de 4 a 600 nm, que corresponde a 1.52 g/ en biomasa, luego fue mezclado con glicerol al 80 % en una relación 1:1.

### **6.4 Inóculo**

El inóculo fue preparado en matraces con un volumen total de 500 ml y un volumen de operación de 125 ml, por duplicado, bajo las siguientes condiciones: a 33 °C y 200 rpm durante aproximadamente 12 h o hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 8 a 600 nm, que corresponde a 3.04 g/l en biomasa. Una vez alcanzada esta densidad óptica se centrifugó el medio de cultivo a 7000 x g a 10 °C durante 10 min, el sobrenadante se desechó y el pellet de biomasa se re-suspendió en 20 ml de medio mineral y en condiciones de esterilidad fue inoculado al reactor.

## 6.5 Variables del sistema de cultivo

### 6.5.1 Tasa de dilución

Definida como la relación entre el volumen del sistema (V) y el flujo de adición (o salida) del sistema (F):

$$D=F/V \quad (8)$$

El tiempo de residencia hidráulico ( $\tau$ ) en un cultivo continuo se define como el inverso de la tasa de dilución:

$$\tau = 1/D \quad (9)$$

En este trabajo la tasa de dilución para todos los experimentos en quimiostato fue definida como 70 % de la  $\mu$  del cultivo en lote para cada condición (Herbert *et al.*, 1956).

### 6.5.2 Tiempo de estabilización

El tiempo de estabilización ( $t_{est}$ ) se refiere al tiempo que se requiere para que el sistema llegue al estado de equilibrio a partir de la última perturbación física. Este tiempo está en función de la tasa de dilución y para los cultivos continuos en este trabajo se definió como 4 veces el tiempo de residencia hidráulico, como se observa en la siguiente ecuación:

$$t_{est} = 4*(1/D) \quad (10)$$

### 6.5.3 Tiempos de circulación

El tiempo de circulación ( $t_{circ}$ ) se define como el tiempo promedio transcurrido durante el recorrido de una célula desde un punto arbitrario hasta su regreso a ese mismo punto (Palomares y Ramírez, 2000). Este valor se determina con el volumen total del sistema ( $V_T$ ) y el flujo de recirculación ( $F_{rec}$ ), como se presenta en la siguiente ecuación:

$$t_{circ} = V_T/F_{rec} \quad (11)$$

#### 6.5.4 Relación entre tiempo de crecimiento e inducción

Este parámetro se define como el tiempo que las células se mantienen en promedio en condiciones de crecimiento entre el tiempo que las células se mantienen en promedio en condiciones de inducción en cada oscilación (tiempo de circulación). Estos tiempos se definen tomando en cuenta los volúmenes de los reactores y el tiempo de circulación ( $t_{circ}$ ), tal como se observa en las siguientes ecuaciones:

$$\tau_{crec} = t_{circ} * (V_{crec}/V_T) \quad (12)$$

$$\tau_{ind} = t_{circ} * (V_{ind}/V_T) \quad (13)$$

$$\tau_{crec} / \tau_{ind} = V_{crec} / V_{ind} \quad (44)$$

dónde:

$\tau_{crec}$ : tiempo de residencia en el reactor con temperatura de crecimiento.

$\tau_{ind}$ : tiempo de residencia en el reactor con temperatura de inducción.

$V_{crec}$ : volumen de operación en el reactor con temperatura de crecimiento.

$V_{ind}$ : volumen de operación en el reactor con temperatura de inducción.

Los tiempos de circulación para este trabajo se propusieron tomando en cuenta el tiempo que tardan las proteínas de choque térmico en alcanzar el máximo nivel de expresión, que es aproximadamente entre 5 y 40 min (Valdez-Cruz *et al.*, 2011); además de que hay información que confirma que el tiempo en el que se observa la máxima síntesis y acumulación de estas proteínas es de 6 min (Straus *et al.*, 1987). Por lo tanto, los dos tiempos de circulación propuestos para este trabajo fueron 10 min y 20 min, lo cual implica un tiempo relativo de permanencia en cada reactor (de crecimiento e inducción) de 5 min y 10 min, respectivamente. Así, 5 min que es el tiempo menor para el máximo de la expresión de proteínas de choque térmico y 10 min para evaluar el efecto de la acumulación de estas proteínas sobre la producción de proteína recombinante. Por lo tanto, los dos flujos de recirculación que se emplearon en este trabajo fueron 60 ml/min y 120 ml/min.

### 6.5.5 Volúmenes en cada reactor

Para la elección de los volúmenes de trabajo se tomaron en cuenta los datos reportados de Niño, 2012 y Caspeta, 2009, los cuales se resumen en el cuadro 2. El volumen total se definió como 1.2 L (Niño, 2012). Respecto a los volúmenes en cada compartimento se consideró el tiempo en que las células estuvieron en condiciones de crecimiento (120 min) y el tiempo en que las células estuvieron expuestas a temperaturas diferentes a la establecida como de crecimiento (en este caso el tiempo en el cual estuvieron a una temperatura de inducción y el tiempo en el cual estuvieron en el aumento/disminución de temperatura, que fue 120 min). El tiempo que las células se encuentran en una condición particular está definido por el volumen en cada uno de los compartimentos, por lo tanto, la relación de volúmenes entre los reactores determina el tiempo relativo que pasarán las células en una u otra condición (Niño, 2012). Se definieron los volúmenes como 600 ml en el reactor con temperatura de crecimiento y 600 ml en el reactor con temperatura de inducción, en este caso la relación  $V_{\text{crecimiento}}/V_{\text{inducción}}$  fue de 1.

**Cuadro 2. Comparación de temperaturas y tiempos de crecimiento e inducción de trabajos previos.**

<b>Autor</b>	Caspeta	Niño
<b>Oscilaciones</b>	(30-42) °C	(35-42) °C
<b><math>\Delta T</math> (°C)</b>	12	7
<b>t inducción (min)</b>	60	2.5
<b>t crecimiento (min)</b>	120	3.5
<b>t rampa (min)</b>	60	No aplica

### 6.5.6 Temperaturas de crecimiento e inducción

Las temperaturas de crecimiento evaluadas fueron 32 °C y 35 °C, las de inducción fueron 42 °C y 40 °C. En el cuadro 3 se presentan las condiciones evaluadas, en

función de la temperatura en cada compartimento y los flujos de recirculación, que a su vez definen los tiempos de circulación.

**Cuadro 3. Intervalo de oscilación de temperaturas y flujos de recirculación empleados en el presente trabajo**

Condiciones	$t_{\text{circ}}$ (min)
(35-42) °C, $F_{\text{rec}}= 60$ ml/min	20
(35-42) °C, $F_{\text{rec}}= 120$ ml/min	10
(32-42) °C, $F_{\text{rec}}= 60$ ml/min	20
(32-42) °C, $F_{\text{rec}}= 120$ ml/min	10
(32-40) °C, $F_{\text{rec}}= 60$ ml/min	20

## 6.6 Cultivos en biorreactor

Se realizaron cultivos por lote y continuos, ambos modos de cultivo termo-inducidos. Cabe señalar que para cada relación de temperaturas y flujos de recirculación (presentada en el cuadro 3) en el cultivo continuo, se caracterizó previamente en lote para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y para fijar el valor de D (70 % del valor de  $\mu$  obtenido en cada cultivo por lote). En tales cultivos se caracterizó además, el consumo de sustrato.

Los cultivos se realizaron en un sistema de fermentación BioFlo 110 y 115 (New Brunswick Scientific Edison, NJ) con dos reactores de capacidad de 1 L y con dos impulsores tipo Rushton cada uno. Los reactores se instrumentaron con sensores de pH (Mettler-Toledo GmbH, Suiza), de oxígeno disuelto tipo polarográfico (Mettler-Toledo GmbH, Suiza) y de temperatura. Para la adquisición de los parámetros de operación se utilizó el software AFS-Biocomand Bioprocessing Software (New Brunswick Scientific Edison, NJ).

La tensión de oxígeno disuelto fue controlada al 30 % de saturación respecto al aire con una cascada de agitación entre 200 y 1200 rpm y la adición de oxígeno puro

en la corriente de entrada. Se trabajó a 1 vvm. La temperatura en el primer compartimento se mantuvo a 35 °C o a 32 °C (según la condición) y en el segundo a 42 °C o 40 °C (según la condición). El pH se mantuvo constante a 6.8 +/- 0.2 por medio de la adición de hidróxido de amonio al 15 %. El control de espuma se realizó con una solución antiespumante a base de silicón y agua en una relación 1:1 (Niño, 2012). Las adiciones de hidróxido de amonio y antiespumante se realizaron en el reactor a la temperatura de crecimiento.

El criterio que se utilizó para iniciar la adición de medio al quimiostato fue el final del cultivo por lote, el cual se verificó con un incremento drástico de la tensión de oxígeno disuelto, ligero incremento de pH y valores de glucosa cercanos 0 g/l.

### **6.6.1 Sistema de cultivo**

El sistema que se empleó se muestra en la figura 9 y consistió en dos reactores interconectados con un flujo de recirculación regulado por una bomba peristáltica.

La adición de medio fresco (cuadro 1) al sistema se efectuó en el reactor de crecimiento, el retiro del medio agotado se realizó también en el mismo reactor, manteniendo el volumen (1200 ml) entre los dos reactores.

## **6.7 Métodos analíticos**

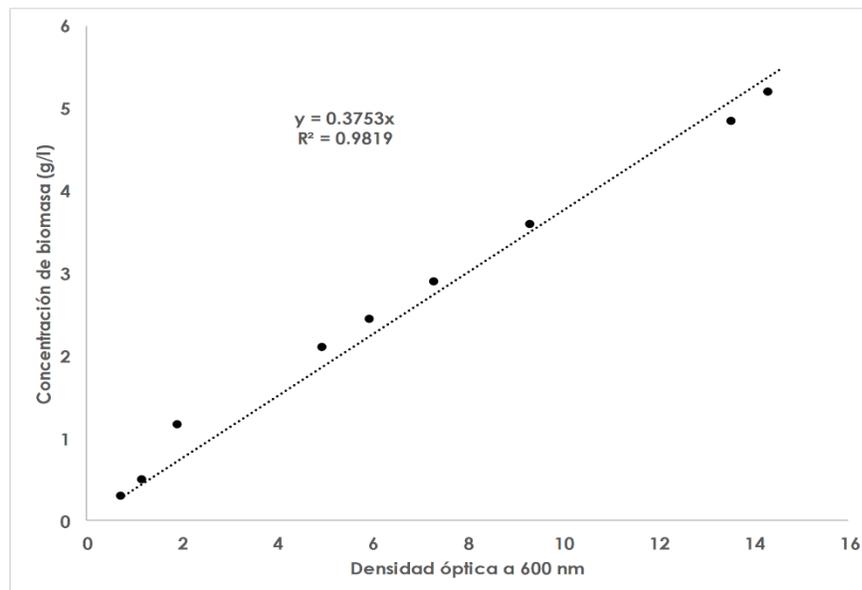
### **6.7.1 Concentración de biomasa**

#### 1. Medición de la absorbancia del cultivo

La biomasa se determinó con base en la densidad óptica a una longitud de onda a 600 nm; ésto se realizó con las muestras provenientes del cultivo y se hicieron las diluciones correspondientes para que la absorbancia medida estuviera dentro del intervalo confiable de medición (absorbancia: 0.1-0.8) del equipo Spectronic® Genesys 5. Las diluciones se realizaron con medio mineral y como blanco se usó de igual manera el medio mineral.

#### 2. Determinación del peso seco celular

Para cuantificar la concentración de biomasa, tubos Eppendorf de 1.5 ml fueron secados en un horno a 80 °C durante 24 h, después se pesaron en una balanza analítica y durante el cultivo distintos volúmenes de medio con biomasa proveniente del sistema fueron colocados en dichos tubos. Cuando la absorbancia fue de 0 a 3, de 3 a 6 y mayor de 6 unidades el volumen añadido fue de 6 ml, 3 ml y 1.5 ml, respectivamente. Después se centrifugaron los tubos a 12,000 x g (centrífuga Eppendorf 5810 R) durante 6 min, se retiró el sobrenadante y los pellets contenidos en los tubos fueron secados en un horno a 80 °C durante aproximadamente 48 h. Se pesaron los tubos después de este tiempo y considerando los volúmenes y pesos en cada tiempo fue posible realizar la correlación entre absorbancia y biomasa en peso seco (g/l), ver figura 11.



**Figura 11. Correlación entre la concentración de biomasa evaluada por peso seco y la densidad óptica del cultivo a 600 nm.**

### **6.7.2 Cuenta de células que contienen y de las que no contienen el plásmido**

Se llenaron placas Petri con medio LB-agar (20 ml) y se adicionó ampicilina según fuera el caso para obtener concentraciones finales de 50 mg/l y 114 mg/l y otras más sin ampicilina. Se dejaron incubando las placas a 35 °C durante 12 h (prueba

de esterilidad) y después fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso, no pasando más de 2 semanas para dicho fin.

Durante el cultivo se obtuvo una muestra del sistema bajo condiciones de esterilidad y se mantuvo así cuando se realizaron las respectivas diluciones antes de inocular en la placa. Las diluciones se hicieron con medio mineral, se vació en placa un volumen conocido y se extendió con perlas de vidrio estériles, después se colocaron a 32 °C durante 14 h y posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonias.

### **6.7.3 Cuantificación de glucosa**

Las muestras provenientes del sistema termo-inducido fueron colectadas en condiciones de esterilidad. Se tomó 1 ml de muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 12,000 x g (centrífuga Eppendorf 5810 R) durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.22 µm. La concentración de glucosa se cuantificó con el analizador bioquímico YSI utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada y considerando el intervalo lineal y confiable de 0-25 g/l de glucosa del equipo de medición.

### **6.7.4 Cuantificación de proteína**

#### a) Proteína total

*Lisado celular, sonicación y centrifugación a baja temperatura (Seeger et al, 1995).*

Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g (centrífuga Eppendorf 5810 R) a 4 °C durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en buffer Tris-HCl pH 7, después se ajustó a una densidad óptica de 4 a 600 nm utilizando el mismo buffer tris-HCl. Posteriormente se sonicó durante 3 periodos de 10 s, una vez obtenida esta suspensión bacteriana se centrifugó a 12,000 x g (centrífuga eppendorf 5810 R) a 4 °C durante 45 min. El sobrenadante se separó del pellet, considerando al sobrenadante como la parte que contiene a la fracción soluble y al pellet la fracción insoluble.

b) Proteína en cuerpos de inclusión

*Aislamiento y purificación (De Bernardez, 1999).*

Se partió de una muestra ajustada a 3 mg de biomasa en peso seco, que se centrifugó a 12,000 x g (centrífuga eppendorf 5810 R) a 4 °C durante 10 min. Se separó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en una solución 50 mM Tris-HCl pH 7; este paso de centrifugación se repitió 3 veces más. Después el pellet fue resuspendido en 300 µl de buffer de lisis (0.1 M tris-HCl: 0.1 mM EDTA pH 7). Se adicionó 0.9 mg de lisozima, posteriormente se incubó durante 30 min a 37 °C, luego se sonicó el pellet por tres periodos de 10 s a una amplitud del 50 % e inmediatamente se adicionaron 10 µg/ml de DNasa y 3 mM de MgCl<sub>2</sub> para después incubar la mezcla a 25 °C durante 30 min. Una vez pasado tal tiempo se agregó 1 ml de solución de EDTA 20mM: Tritón X-100 (2%): NaCl 0.5 M y se incubó a 4 °C durante 30 min. Enseguida se centrifugó a 14,000 x g (centrífuga eppendorf 5810 R) a 4 °C durante 45 min, se separó el pellet y se resuspendió en 1 ml de solución 0.1 M tris-HCl: 20 mM EDTA pH 7, se centrifugó a 14,000 x g (centrífuga eppendorf 5810 R) a 4 °C durante 35 min; este último paso se repitió 3 veces más.

*Desnaturalización de las muestras para el ensayo de Bradford y geles SDS-PAGE (Caspeta et al., 2009)*

Para los análisis posteriores fue necesario disolver las fracciones insolubles y los cuerpos de inclusión, esto se realizó resuspendiendo dichas muestras en una relación 1:4 de 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 y buffer desnaturalizante (6 M Urea, 4.6 % (v/v) SDS, (5 %) (v/v) β-mercaptoetanol, 20 % (v/v) glicerol, 10 % (v/v) Tris-base, 0,25 M (pH 6.8)), respectivamente. Las mezclas se incubaron a 98 °C durante 30 min (Caspeta, 2009).

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida (Niño, 2012)

Las muestras tratadas que corresponden a la fracción insoluble y cuerpos de inclusión fueron cargadas en geles SDS-PAGE al 16 %, se corrieron a 100 V durante 60 min y posteriormente a 80 V. Los geles fueron teñidos con solución azul Coomassie, posteriormente se utilizó una solución de desteñido para retirar

el exceso de colorante del gel con una solución de ácido acético: metanol: agua (10:5:85 % volumen/volumen). Los geles fueron escaneados y la intensidad de las bandas se determinó mediante densitometría utilizando un fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

d) Ensayos de Bradford (Niño, 2012)

La concentración de proteína contenida en la fracción insoluble, soluble y la parte correspondiente a los cuerpos de inclusión se determinó con el ensayo de Bradford empleando el protocolo estándar para microplacas, utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

e) Western Blot

La proteína recombinante contiene el “tag” de histidinas, por lo que se aprovechó para su detección cualitativa mediante western blot.

Se realizó el gel de electroforesis SDS-PAGE con la técnica anteriormente descrita. Se extrajo el gel de la cámara y se colocó en 20 ml de buffer de transferencia durante 1 min. Después el gel se colocó en un sistema de transferencia semi-seca, Trans Blot Turbo (Bio-Rad, USA), utilizándose 25 V para llevar a cabo la transferencia durante 30 min, en una membrana PVDF. La membrana se colocó en solución de bloqueo (leche descremada al 5 %) durante 60 min a temperatura ambiente con agitación utilizando un agitador orbital. Después del bloqueo la membrana se lavó 3 veces con 30 ml de buffer PBS Tween para eliminar los restos de la solución de bloqueo y se colocó el anticuerpo primario anti His (Histidine Tag antibody [AD1.1.10] Gene Tex) en una dilución 1/1000 con buffer PBS Tween. Se incubó durante 2 h aproximadamente con agitación suave a temperatura ambiente. Para retirar el anticuerpo primario se lavó la membrana con buffer PBS Tween 3 veces durante 10 min. Inmediatamente se agregó el anticuerpo secundario (anti ratón acoplado a peroxidasa) a una dilución 1:5000 en PBS Tween y se incubó durante 1 h. Se lavó la membrana 3 veces con buffer PBS Tween y para revelarla se trató con luminol e inmediatamente se analizó en un fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, USA).

### **6.7.5 Purificación y cuantificación de DNA plasmídico**

El DNA plasmídico fue extraído y purificado a partir de 2 mg de biomasa en peso seco, para esto se empleó el kit QIAprep Spin Miniprep (250), el cual está basado en la lisis alcalina, adsorción y elución del plásmido purificado.

*Lisis alcalina:* El pellet celular se sometió a un tratamiento que constó de una solución con NaOH y SDS con RNasa. Bajo estas condiciones la membrana celular fue lisada y permitió la liberación de los componentes intracelulares. Tanto el DNA cromosomal como el DNA plasmídico se desnaturalizaron. Enseguida se neutralizó el lisado con una solución de acetato de potasio y cloruro de guanidina. Así, el DNA cromosomal pasó a una forma insoluble de manera que precipitó junto con los lípidos y proteínas, mientras que el DNA plasmídico se renaturalizó y permaneció en la fracción soluble. El tiempo transcurrido entre lisis y neutralización no fue mayor a 5 min (Birnboim, 1983).

*Adsorción y elución:* Posterior a la lisis alcalina, las fracciones soluble e insoluble del lisado se separaron por centrifugación. La fracción soluble se recuperó y se transfirió a tubos con una membrana de gel de sílice que separa selectivamente el DNA plasmídico en condiciones de alta salinidad. Después de aplicarse lavados en donde se removieron las sales y proteínas unidas al DNA plasmídico, éste se recuperó de la columna mediante elución con una solución de baja salinidad. El plásmido purificado se cuantificó a partir de la absorbancia medida a 260 nm de 2 µl de muestra en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La pureza del plásmido se determinó a partir de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm (Jaén, 2013).

### **6.7.6 Amplificación de la secuencia codificante para la preproinsulina humana**

Para corroborar la existencia de la secuencia que codifica para la proteína de interés se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La secuencia del gen se obtuvo del Gen Bank con el número de acceso KC192765 (Caspeta *et al.*, 2013). Los *primers* se diseñaron en el programa Oligo 7 (<http://www.oligo.net/>).

Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en el cuadro 4. La  $T_m$  (temperatura de fusión de los oligonucleótidos) empleada en los ciclos de PCR se obtuvo con el calculador de  $T_m$  de New England BioLabs (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>), en el cuadro 5 se presentan las condiciones de reacción para la PCR con un volumen total de 50  $\mu\text{l}$  y en el cuadro 6 el perfil de temperaturas en el termociclador.

**Cuadro 4. *Primers* utilizados para amplificar el gen de la preproinsulina humana (PPIH).**

Nombre	Secuencia	Longitud (nucleótidos)	$T_m$ (°C)
PPIH-Forward	TCTAGAAATAATTTGTTAACTT	24	56.7
PPIH-Reverse	AAAAAAGGCTCCAAAAGG	18	58.7

**Cuadro 5. Condiciones de reacción usadas para amplificar el gen de la PPIH por PCR**

Componente	50 $\mu\text{l}$ de reacción
10X thermoPol Reaction Buffer	5 $\mu\text{l}$
10 mM dNTPs	1 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Forward <i>Primer</i>	1 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{M}$ Reverse <i>Primer</i>	1 $\mu\text{l}$
Taq DNA Polymerase	0.25 $\mu\text{l}$
DNA templado	200 ng
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 $\mu\text{l}$ como volumen final

**Cuadro 6. Perfil de temperaturas usadas para amplificar el gen de la PPIH por PCR.**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2	1
Alineamiento	95	0.5	35
	45	1	
	68	1	
Extensión final	68	5	1

### **6.7.7 Electroforesis en gel de agarosa**

El producto de PCR fue cargado en geles de agarosa al 1 % con 2 mg/l de bromuro de etidio, 10  $\mu$ l en cada carril más 2  $\mu$ l de buffer de carga. El buffer de corrida fue TBE y se corrió cada gel a 90 V durante 30 min. Los geles se revelaron exponiéndolos a 260 nm en un fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad, USA).

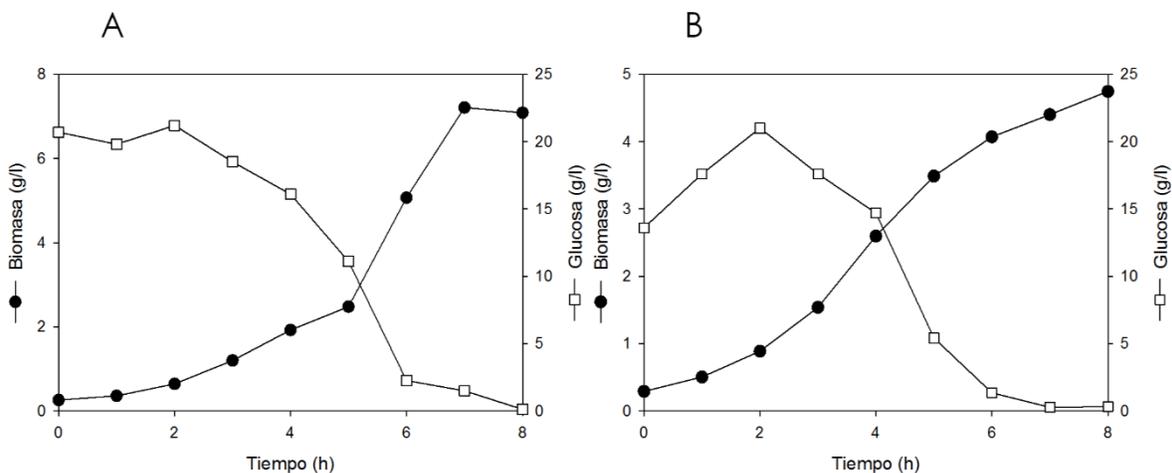
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cinéticas de crecimiento en cultivos por lote y continuos termo-inducidos

#### 7.1.1 Cultivo por lote con recirculación celular sin inducción

Se caracterizó el comportamiento cinético a una temperatura de 35 °C, en un sistema de dos compartimentos recirculado a una velocidad de 60 ml/min, lo cual involucra un tiempo de recirculación de 20 min tal como se aprecia en la figura 12.

La velocidad específica de crecimiento bajo estas condiciones fue de  $0.45 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y un rendimiento de biomasa sobre sustrato o  $Y_{x/s} = 0.35 \pm 0.04 \text{ g biomasa/g sustrato}$ . Estos datos, al compararse con los de Niño, 2012, quien realizó una cinética tipo lote con la misma cepa en un reactor (un compartimento) a 35 °C resultaron ser similares ( $\mu: 0.47 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y  $Y_{x/s}: 0.42 \pm 0.03 \text{ g biomasa/g sustrato}$ ), lo cual indica que la recirculación desde un compartimento a otro no afectó los parámetros cinéticos de la cepa.



**Figura 12. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato en cultivos por lote usando una  $F_{rec} = 60 \text{ ml/min}$ , a 35 °C en ambos compartimentos.**

Se muestran los dos experimentos independientes en los paneles A y B.

El cuadro 7 muestra los parámetros cinéticos encontrados en los cultivos por lote con un  $F_{rec} = 60 \text{ ml/min}$ , con y sin oscilaciones de temperatura. Los parámetros del cultivo en lote con oscilaciones de temperatura permitieron definir la tasa de crecimiento para el cultivo continuo de esta condición en particular. Cuando el

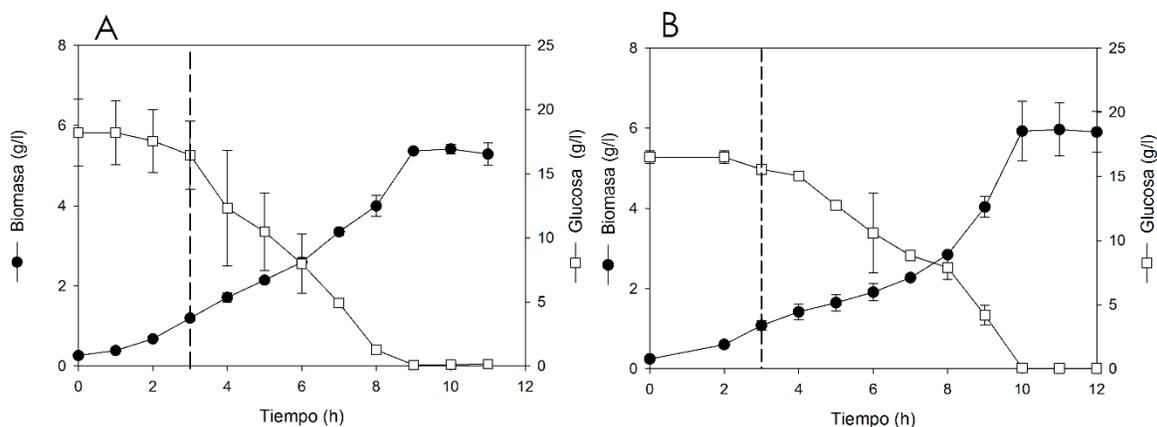
cultivo se sometió a condiciones de inducción, la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa respecto al sustrato disminuyeron notablemente, lo cual refleja un fuerte impacto negativo sobre el metabolismo celular (ver figura 13 A). En sistemas termo-inducibles el aumento de temperatura tiene un efecto negativo sobre la velocidad de crecimiento. Por ejemplo, en 1999 Mason y colaboradores estudiaron los niveles de HtpG (una proteína de choque térmico) en cultivos de *E. coli* JB23 sometidos a condiciones de estrés térmico ligero y severo, observando que la velocidad de crecimiento, con respecto a la condición a 37 °C disminuía en un 23 % y 50 % al incrementar la temperatura a 42 °C por 15 min o hasta el final del cultivo, respectivamente.

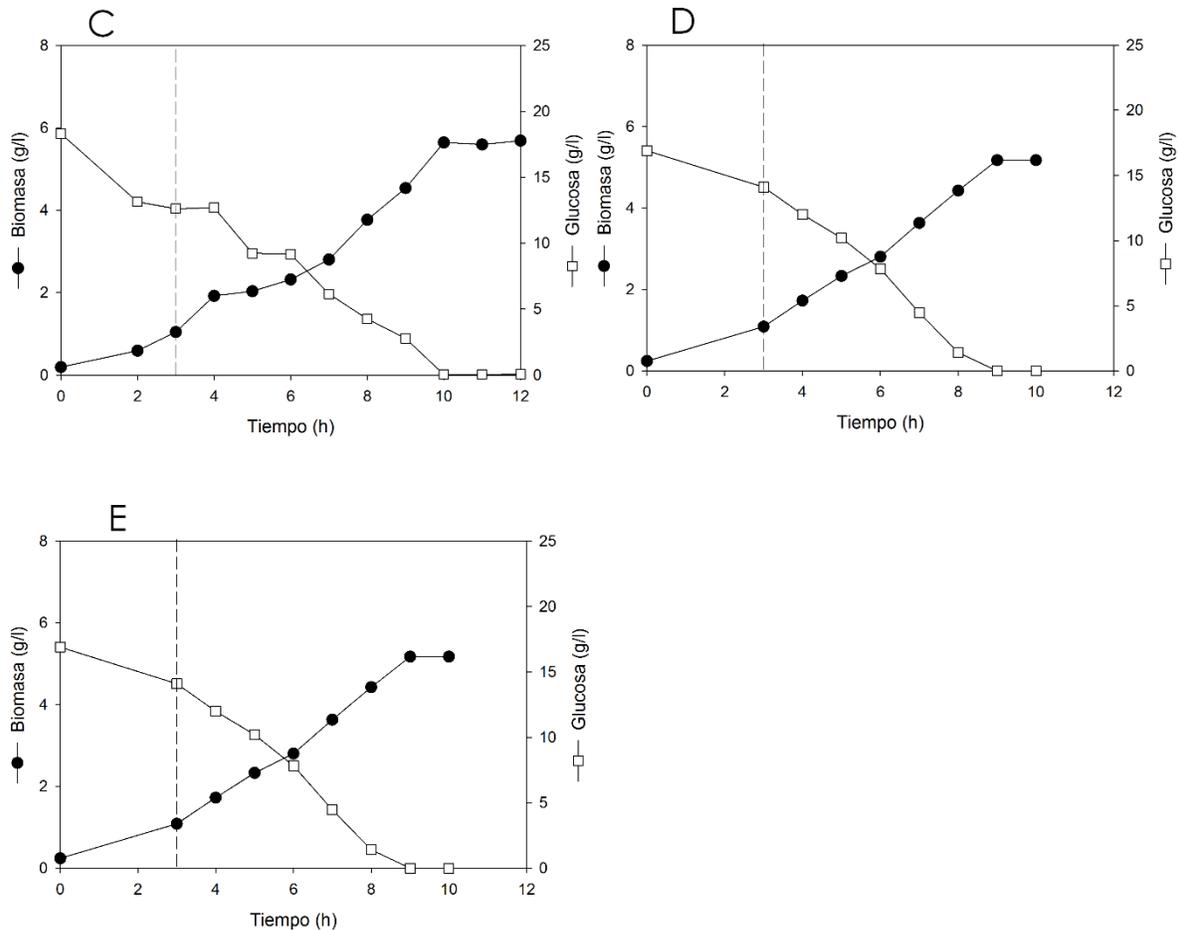
**Cuadro 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos a diferentes temperaturas bajo una  $F_{rec}= 60$  ml/min.**

	Cultivo sin inducción 35 °C	Cultivo inducido 35 °C - 42 °C
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.45 +/- 0.01	0.23 +/- 0.001
$Y_{x/s}$ (g biomasa/g sustrato)	0.35 +/- 0.04	0.25 +/- 0.02

### 7.1.2 Cultivos por lote con recirculación celular termo-inducidos

Con la finalidad de calcular la velocidad específica de crecimiento para cada una de las condiciones, se realizaron cultivos por lote (figura 11), con recirculación celular y con oscilaciones entre dos compartimentos a diferentes temperaturas.





**Figura 13. Cinéticas de crecimiento por lote con oscilaciones de temperatura.**

A) (35-42) °C,  $F_{rec} = 60$  ml/min, B) (35-42) °C,  $F_{rec} = 120$  ml/min, C) (32-42) °C,  $F_{rec} = 60$  ml/min, D) (32-42) °C,  $F_{rec} = 120$  ml/min, E) (32-40) °C,  $F_{rec} = 60$  ml/min. Línea vertical discontinua: inicio de las oscilaciones de temperatura. En A y B los símbolos representan el promedio de los dos experimentos independientes y las barras de error, el error estándar entre estos experimentos. Como se observa en el cuadro 8, el error estándar de los experimentos A y B fue pequeño, por lo tanto, se consideró que un experimento era suficiente para definir los parámetros cinéticos y estequiométricos de los experimentos C, D y E.

La velocidad específica de crecimiento se calculó considerando los datos de biomasa después de iniciar las oscilaciones de temperatura hasta el valor máximo alcanzado. El rendimiento de biomasa respecto a sustrato se calculó considerando los intervalos mencionados anteriormente y los valores de glucosa en esos mismos puntos.

Con los datos así obtenidos de  $\mu$  se propusieron las tasas de dilución para los quimiostatos. En todos los casos la  $D$  se definió como el 70 % de los valores de  $\mu$  obtenidos en cultivo por lote para cada una de las condiciones especificadas anteriormente. En el cuadro 8 se resumen las  $\mu$  de cada cultivo en lote y las  $D$  utilizadas para el quimiostato respectivo.

**Cuadro 8. Parámetros cinéticos de cultivos en modo lote en un sistema de dos compartimentos con oscilaciones de temperatura.**

+/- es el error estándar entre dos experimentos independientes.

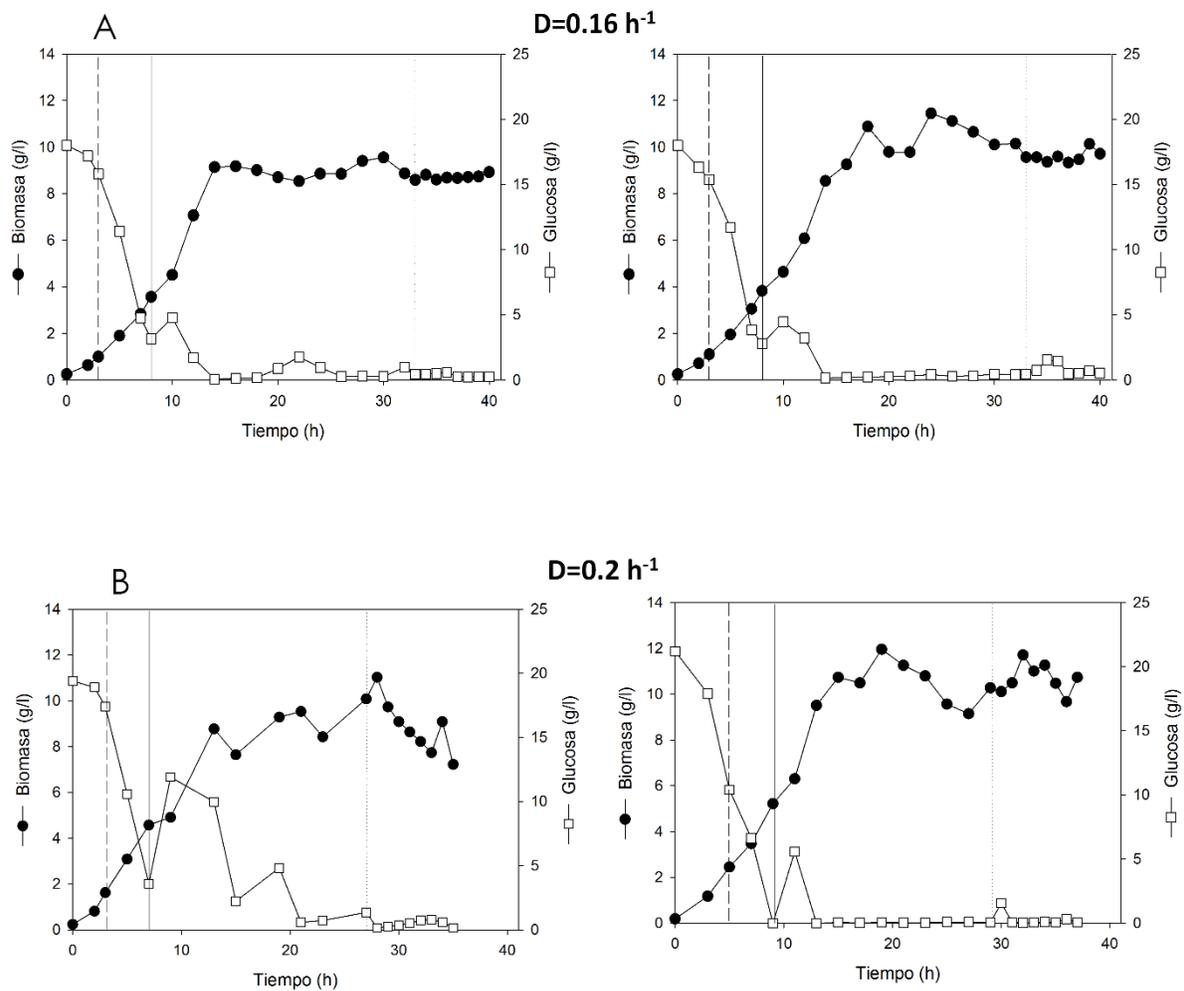
Condición	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g biomasa/g sustrato)	D (h <sup>-1</sup> )
(35-42) °C, $F_{rec}$ = 60 ml/min	0.23 +/- 0.001	0.25 +/- 0.02	0.16
(35-42) °C, $F_{rec}$ = 120 ml/min	0.29 +/- 0.01	0.32 +/- 0.02	0.2
(32-42) °C, $F_{rec}$ = 60 ml/min	0.22	0.35	0.16
(32-42) °C, $F_{rec}$ = 120 ml/min	0.23	0.22	0.16
(32-40) °C, $F_{rec}$ = 60 ml/min	0.31	0.37	0.21

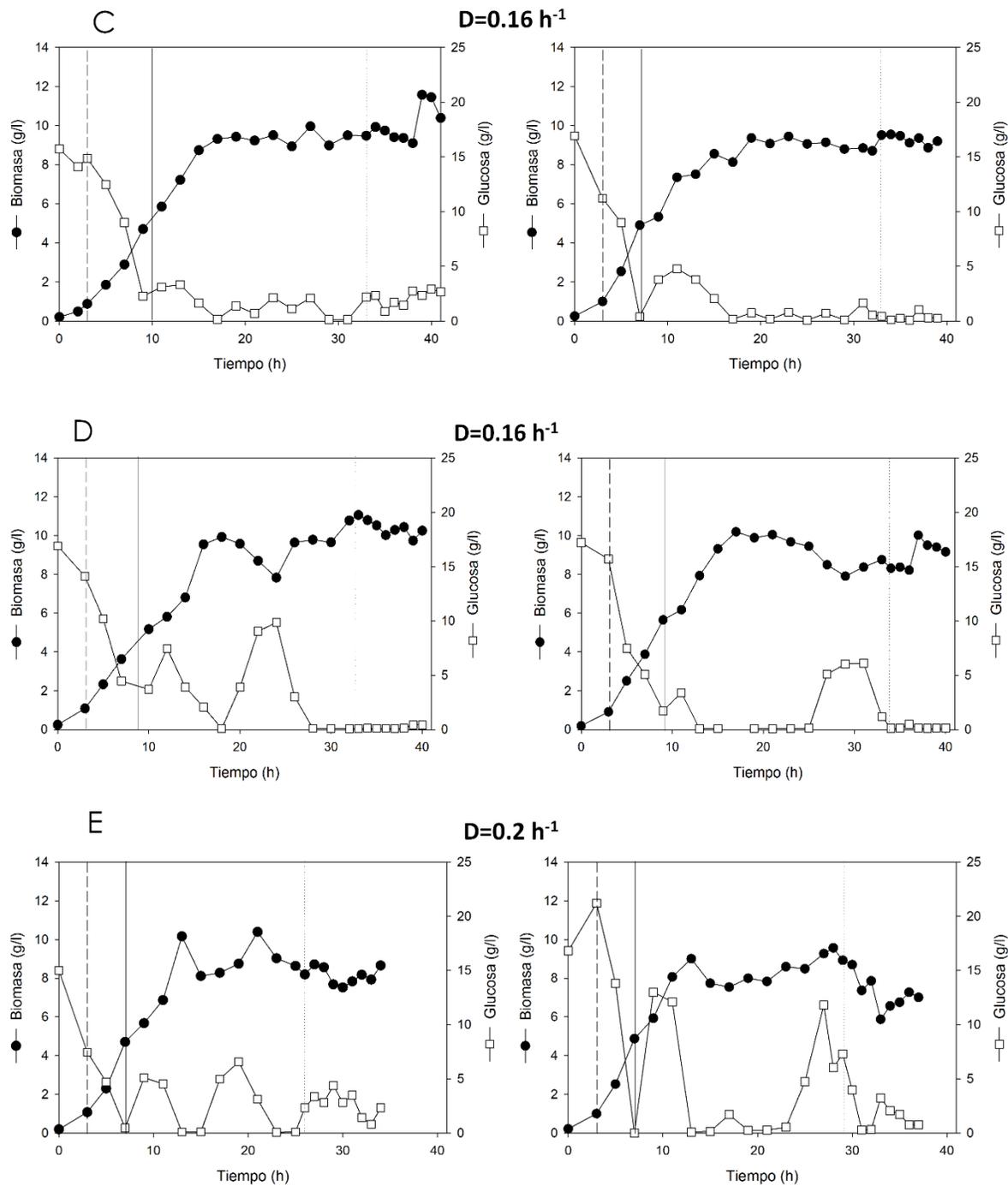
La mayor  $\mu$  se encontró bajo las condiciones (32-40) °C,  $F_{rec}$ = 60 ml/min. Este comportamiento se atribuyó a la menor temperatura de inducción (40 °C), la cual atenúa la fuerza del promotor, permitiendo a las células recuperarse más rápidamente del aumento súbito de temperatura al regresar al reactor con temperatura de 32 °C. Por otro lado, la menor  $\mu$  se encontró bajo las condiciones (32-42) °C,  $F_{rec}$ = 60 ml/min. Este comportamiento se atribuyó a la alta temperatura de inducción, al mayor tiempo de permanencia de las células en cada uno de los reactores (de 10 min en cada uno) y al mayor  $\Delta T$  (10 °C) entre los dos reactores, lo cual pudo haber aumentado la respuesta de estrés por parte de la célula.

### 7.1.3 Cultivos continuos termo-inducidos con recirculación celular

Se realizaron cultivos continuos por duplicado para cada una de las condiciones mostradas en la figura 14. A las 3 h de cultivo se iniciaron las oscilaciones del cultivo en tanques a distinta temperatura y el criterio para dar comienzo al cultivo continuo fue el final de la etapa lote. El tiempo de estabilización fue calculado como se detalla en la sección de Materiales y Métodos y fue variable para cada una de las condiciones evaluadas.

Se evaluaron las tasas de dilución de  $0.16 \text{ h}^{-1}$  y  $0.2 \text{ h}^{-1}$ . En todas las cinéticas reportadas se realizaron cultivos independientes (duplicados). La inducción de los cultivos se realizó a las 3 h en todos los casos, con el fin de mantener a las células bajo condiciones de inducción antes de iniciar el cultivo continuo. El criterio utilizado en este trabajo para definir al estado de equilibrio fue la ecuación número 10, la cual indica que el mismo inicia después de cuatro veces el inverso de la D. Cuando se alcanzó el estado de equilibrio se continuó el cultivo continuo durante 8 h más.





**Figura 14. Cultivos continuos en un sistema de dos compartimentos con oscilaciones de temperatura.**

A) (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. B) (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min. C) (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. D) (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min. E) (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. Se presenta cada condición con su respectivo duplicado. Línea vertical discontinua: inicio de las oscilaciones de temperatura, línea vertical continua: inicio del cultivo continuo, línea vertical punteada: inicio del estado de equilibrio.

La concentración inicial de glucosa de los cultivos en la etapa lote fue de 18 g/l, 16.3 +/- 0.9 g/l, 16.3 +/- 0.59 g/l, 17.05 +/- 0.15 g/l y 15.9 +/- 0.9 g/l ordenadas como se presentan las cinéticas en la figura 14; la cual tardó entre 7 h y 9 h para consumirse totalmente antes de iniciar la adición de medio fresco al sistema (según cada condición). En el cuadro 9 se presenta un resumen de las concentraciones de biomasa y sustrato al iniciar el cultivo continuo y al alcanzar el estado de equilibrio para cada una de las condiciones. En las cinéticas A, B y C la concentración de glucosa alcanzó valores cercanos a cero después de iniciar el cultivo continuo; para el caso de la cinética D y antes de alcanzar el estado de equilibrio (en donde las concentraciones de glucosa fueron casi cero), hubo fluctuaciones desde 0.094 g/l hasta 9.86 g/l; y en la cinética E las fluctuaciones de la concentración de glucosa estuvieron presentes desde el inicio del cultivo continuo. La acumulación de sustrato del último caso se atribuyó al hecho de que para esa condición en particular se utilizó una tasa de dilución alta (0.21 h<sup>-1</sup>) comparada con el resto de las condiciones (0.16 h<sup>-1</sup>) y como señalan Herbert *et al.*, (1956) conforme se incrementa la D en un quimiostato la concentración de sustrato tiende a aumentar hasta cierto punto y la concentración de biomasa a disminuir. Si la D se incrementa por arriba de la D<sub>crítica</sub> la concentración de sustrato aumenta dramáticamente y la de biomasa decrece. Este fenómeno es conocido como “wash out” o lavado celular.

**Cuadro 9. Concentraciones de biomasa y sustrato antes y durante el estado de equilibrio, tasa de dilución y velocidad específica de crecimiento.**

Condición	Al iniciar CC		Al estado de equilibrio			
	Biomasa (g/l)	Sustrato (g/l)	Biomasa (g/l)	Sustrato (g/l)	D (h <sup>-1</sup> )	μ (h <sup>-1</sup> )
(35-42) C, 60 ml/min	3.57	3.15	8.73 +/- 0.11	0.43 +/- 0.24	0.16	0.15 +/- 0.03
	3.83	2.79	9.65 +/- 0.3	0.75 +/- 0.43		
(35-42) C, 120 ml/min	4.57	3.60	8.98 +/- 1.19	0.87 +/- 0.61	0.2	0.19 +/- 0.08
	5.22	0.00	10.63 +/- 0.62	0.25 +/- 0.5		
(32-42) C, 60 ml/min	4.70	2.28	10.04 +/- 0.91	2.14 +/- 0.67	0.16	0.16 +/- 0.06
	4.91	0.41	9.18 +/- 0.32	0.53 +/- 0.51		
(32-42) C, 120 ml/min	5.17	0.80	10.43 +/- 0.41	0.17 +/- 0.15	0.16	0.15 +/- 0.05
	5.66	0.81	8.96 +/- 0.66	0.29 +/- 0.38		
(32-40) C, 60 ml/min	4.70	0.47	8.13 +/- 0.43	2.64 +/- 1.08	0.21	0.2 +/- 0.07
	4.87	0.00	7.17 +/- 0.85	1.64 +/- 1.38		

\* CC = cultivo continuo.

Se alcanzó el estado de equilibrio respecto a concentraciones de biomasa y sustrato en todas las condiciones, lo cual indica que la inducción intermitente de las células favoreció el crecimiento al igual que el metabolismo de las mismas respecto a un esquema de inducción típico en donde se emplea el cambio escalonado de temperatura y no es posible mantener creciendo a las células durante largos períodos de tiempo (ver figura 7 en la sección de antecedentes).

Es relevante señalar que la tasa de dilución coincide bastante bien con la velocidad específica de crecimiento, lo cual indica que el comportamiento del quimiostato se pudo predecir exitosamente. En la figura 15 se muestran las concentraciones de biomasa y sustrato en el estado de equilibrio para las condiciones evaluadas. Dado que se manipularon tres variables, se presentan tres gráficos; cada condición se señala con un color diferente.



#### **7.1.4 Conclusiones parciales**

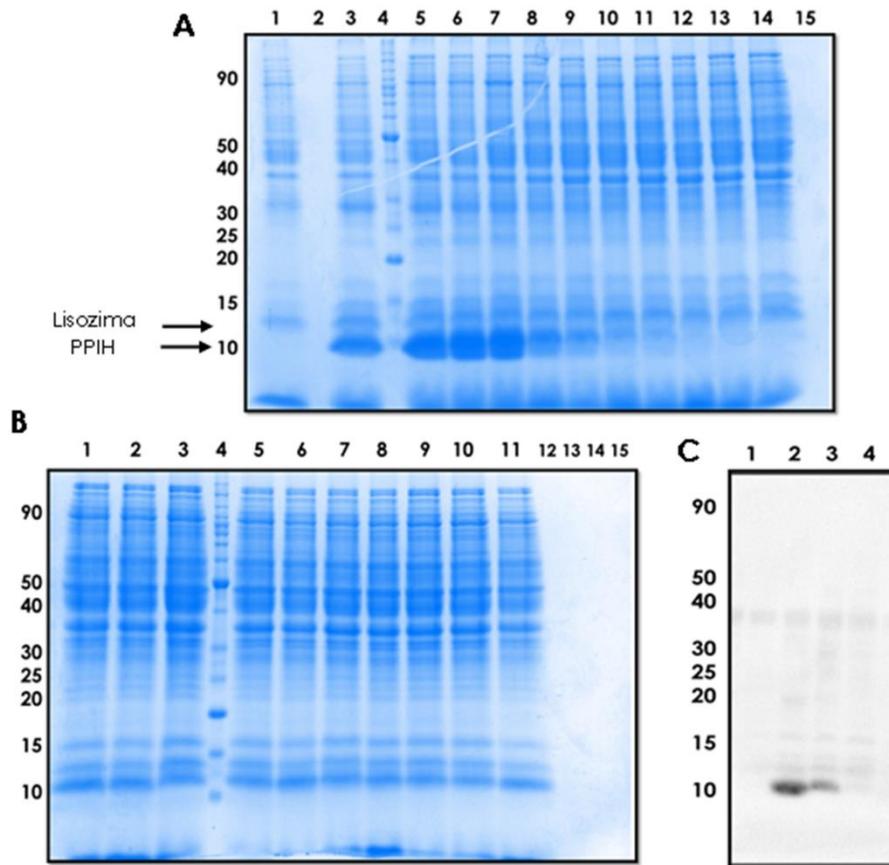
Se alcanzó el estado de equilibrio respecto a concentraciones de biomasa y glucosa para cada una de las condiciones. Esto concuerda con lo reportado anteriormente (Niño, 2012), quien también alcanzó el estado de equilibrio respecto a biomasa y sustrato. Además cabe señalar que el trabajo citado y el presente soportan el hecho de que es posible mantener a las células de *E. coli* en crecimiento a lo largo del tiempo en condiciones de inducción intermitente, lo cual es novedoso y presenta una clara ventaja sobre la estrategia de inducción escalonada en cultivos continuos, ya que esta última no tiene la posibilidad de mantener el cultivo por largos periodos de tiempo (figura 7 sección de antecedentes).

En los quimiostatos la máxima concentración de biomasa y el consumo eficiente de sustrato ocurrieron durante la temperatura de crecimiento de 32 °C y 35 °C y la temperatura de inducción de 42 °C, no se pudo observar un efecto claro de la variación de la frecuencia de recirculación, lo cual pudo deberse a que los tiempos que se escogieron en este trabajo para que las células estuvieran expuestas a condiciones de crecimiento e inducción (5 y 10 min) estuvieron muy cercanos entre sí.

### **7.2 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la producción de la proteína recombinante**

#### **7.2.1 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la producción de proteína recombinante y su agregación en cuerpos de inclusión**

Al cuantificar proteína recombinante, para todas las condiciones se observó un aumento en la concentración de la misma pocas horas después de inducir. Sin embargo, antes de llegar al estado de equilibrio no fue posible cuantificarla ya que no fue posible visualizar la banda proteica correspondiente en geles SDS-PAGE (figura 16). Mediante Western blot se confirmó la presencia de la proteína recombinante hasta las 17 h de cultivo para la condición  $F_{rec}= 120$  ml/min,  $T_{crec}= 32$  °C y  $T_{ind}= 42$  °C.



**Figura 16. Perfiles proteicos de preproinsulina humana durante un cultivo continuo.**

Cuerpos de inclusión purificados de la condición  $F_{rec} = 120$  ml/min,  $T_{crec} = 35$  °C y  $T_{ind} = 42$  °C; A) SDS-PAGE. Los carriles del gel corresponden al tiempo de cultivo: **1.-** 3 h, **2.-** vacío, **3.-** 5 h, **4.-** Marcador de peso molecular en kDa, **5.-** 7 h, **6.-** 9 h, **7.-** 11 h, **8.-** 13 h, **9.-** 15 h, **10.-** 17 h, **11.-** 19 h, **12.-** 21 h, **13.-** 23 h, **14.-** 25 h, **15.-** vacío.

B) SDS-PAGE. Los carriles del gel corresponden al tiempo de cultivo: **1.-** 27 h, **2.-** 29 h, **3.-** 30 h, **4.-** Marcador de peso molecular en kDa, **5.-** 31 h, **6.-** 32 h, **7.-** 33 h, **8.-** 34 h, **9.-** 35 h, **10.-** 36 h, **11.-** 37 h, **12 al 15.-** vacíos.

C) Western-blot. Los carriles corresponden a los tiempos de cultivo: **1.-** 3 h, **2.-** 9 h, **3.-** 15 h, **4.-** 27 h  $F_{rec} = 120$  ml/min,  $T_{crec} = 32$  °C y  $T_{ind} = 42$  °C.

Se asume la banda correspondiente a la lisozima, debido a su peso molecular 14.4 kDa y además dicha banda solo puede verse en muestras que han sido tratadas con tal proteína.

En la figura 17 se presentan las concentraciones y rendimientos de preproinsulina humana para (35-42) °C y  $F_{rec} = 120$  ml/min. "Total" se refiere a la proteína recombinante en proteína total, mientras que en cuerpos de inclusión se refiere solamente a la proteína recombinante en cuerpos de inclusión. Se observa que después de las 5 h de cultivo aumentó la concentración y el rendimiento de la

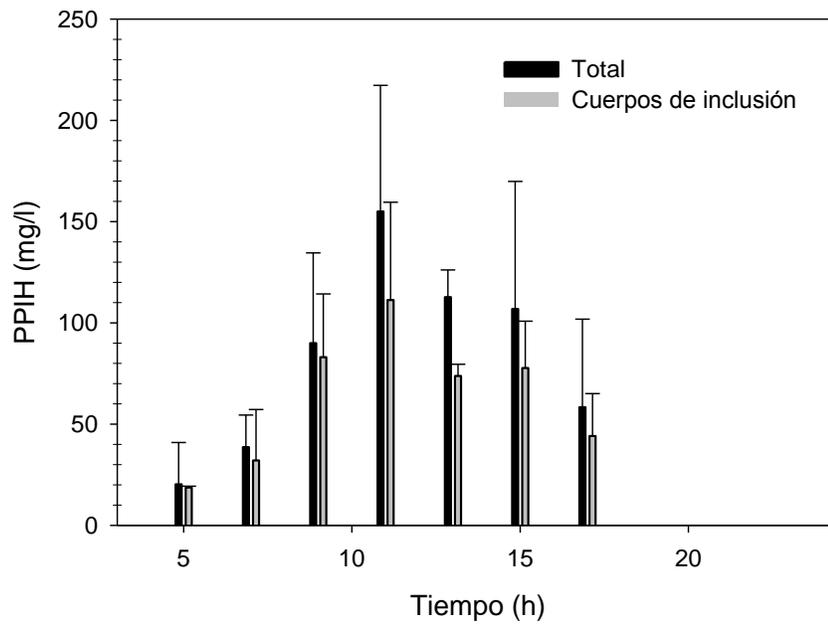
proteína recombinante y a las 11 h alcanzaron sus valores máximos de 154.93 +/- 44 mg/l en proteína total y 111.24 +/- 34 mg/l en cuerpos de inclusión; 27.02 +/- 9.43 mgP/gBPS en proteína total y 19.43 +/- 7.2 mgP/gBPS en cuerpos de inclusión. Tanto la concentración como el rendimiento de PPIH decaen a cero después de las 17 h de cultivo, 1.8 tiempos de residencia, es decir 9 h una vez iniciada la adición de medio al quimiostato.

Un comportamiento similar fue observado para el resto de las condiciones, en donde después de 5 h de cultivo inició un incremento en la concentración y rendimiento de proteína recombinante, hasta alcanzar valores máximos. Después los valores decayeron a cero (ver cuadro 10). Esto último ocurrió a las 18, 24, 25 y 27 h de cultivo para las condiciones (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min, (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min y (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, respectivamente.

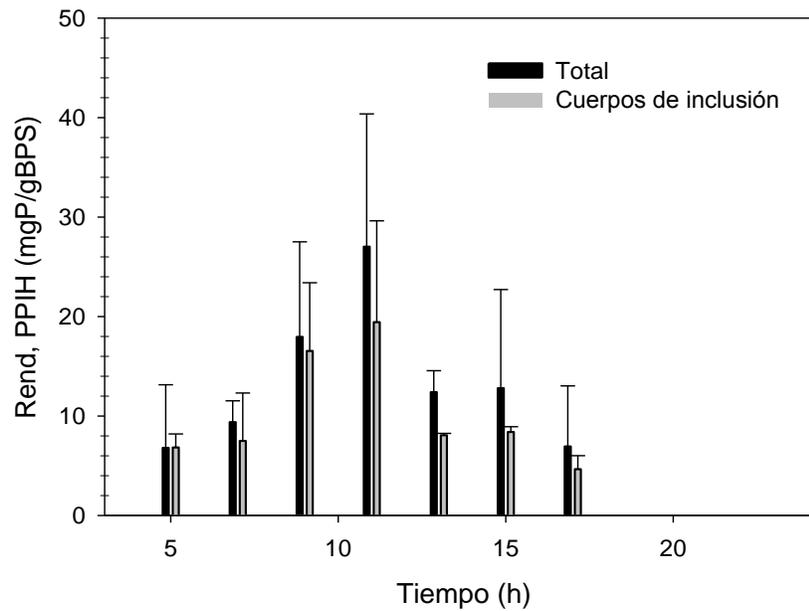
**Cuadro 10. Tiempo de cultivo cuando decaen los valores de PPIH.**

Condición	Tiempo del cultivo cuando decaen los valores de PPIH
(35-42) °C, $F_{rec}= 60$ ml/min	18 h
(35-42) °C, $F_{rec}= 120$ ml/min	17 h
(32-42) °C, $F_{rec}= 60$ ml/min	25 h
(32-42) °C, $F_{rec}= 120$ ml/min	14 h
(32-40) °C, $F_{rec}= 60$ ml/min	27 h

A



B



**Figura 17. Concentración (A) y rendimiento (B) de proteína recombinante**

En un sistema de dos compartimentos con oscilaciones de temperatura (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min. A) Concentración de PPIH en proteína total y en cuerpos de inclusión. B) Rendimientos de PPIH en proteína total y en cuerpos de inclusión. Se presenta el promedio de dos experimentos independientes para cada condición y el error estándar entre ellos.

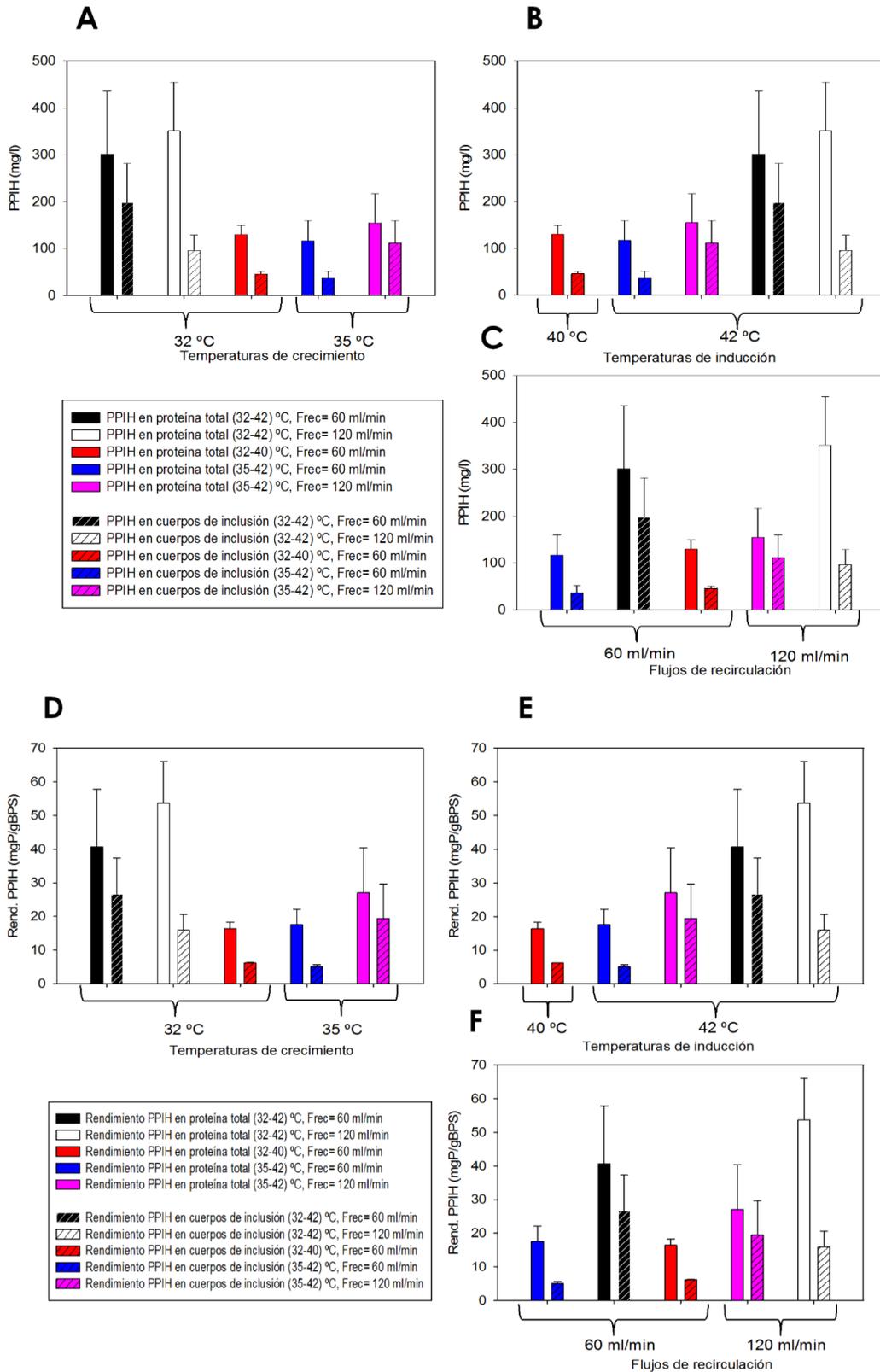
La concentración de proteína recombinante al estado de equilibrio fue cero en todos los casos. Sin embargo, en la condición (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min la concentración de proteína se mantuvo por un periodo de tiempo mayor comparado con las otras condiciones (hasta 27 h). Tal prevalencia de proteína recombinante pudo ser resultado de haber disminuido la temperatura de inducción (de 42 °C a 40 °C). Por otro lado, disminuir la temperatura de crecimiento a 32 °C también tuvo un impacto positivo sobre la permanencia de la proteína después del inicio de la inducción, ya que fue posible cuantificarla hasta 27 h después de iniciado el cultivo. Se sugiere este hecho debido a que a 32 °C no se sobre-expresan genes de choque térmico (lo cual se discutirá adelante).

La mejor relación de temperaturas y flujos de recirculación para obtener proteína recombinante durante un periodo prolongado fue (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, pero en donde se obtuvo un mayor rendimiento de proteína recombinante total y en cuerpos de inclusión fue usando (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min (ver cuadro 10), lo cual se pudo deber a la mayor temperatura de inducción. Con estas observaciones es evidente que temperaturas de crecimiento bajas propician la mayor permanencia de proteína recombinante durante el cultivo además de resultar en mayores concentraciones y rendimientos de la misma.

Las dinámicas de la HSR y de la síntesis de proteína recombinante bajo el control de un sistema de expresión termo-inducible dependen de la magnitud y de la velocidad del incremento de temperatura (Lemaux *et al.*, 1978; Yamamori y Yura 1980; Villaverde *et al.* 1993; Caspeta *et al.* 2009). En este caso se probaron dos temperaturas de inducción: 40 °C y 42 °C, mientras que la velocidad del incremento de temperatura fue inmediata, es decir, no se empleó una estrategia lenta de calentamiento. Es posible que este cambio brusco de temperatura haya tenido un fuerte impacto sobre la fisiología y metabolismo celular de *E. coli* por lo que pudiera ser responsable de la pérdida de su capacidad para producir la proteína recombinante al estado de equilibrio.

Debido a que no fue posible obtener un valor para la concentración de proteína recombinante al estado de equilibrio (lo cual implicó que no se pudieran comparar,

entre condiciones, las concentraciones de proteína al estado de equilibrio), en la figura 18 se reportan las máximas concentraciones y rendimientos de preproinsulina total y en cuerpos de inclusión. Bajo las condiciones de (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min se observó una mayor acumulación de preproinsulina total (351.09 +/- 73.7 mg/l) con un rendimiento de 53.67 +/- 8.7 mg de PPIH/ g de biomasa, mientras que la mayor acumulación de preproinsulina en cuerpos de inclusión se observó bajo (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min (197.17 +/- 59.48 mg/l) con un rendimiento de 26.62 +/- 7.5 mg de PPIH/ g de biomasa.



**Figura 18. Máximas concentraciones y rendimientos de proteína recombinante (Preproinsulina total y preproinsulina en cuerpos de inclusión).**

A-C) Concentraciones de PPIH, D-F) Rendimientos de PPIH. Se presenta el promedio de dos experimentos independientes para cada condición y el error estándar entre ellos.

En la figura 18 se puede apreciar que, en general, cuando la temperatura de crecimiento fue 32 °C y la de inducción 42 °C se obtuvo una mayor concentración de preproinsulina total. Los flujos de recirculación no parecieron tener un efecto claro. Respecto a la preproinsulina agregada en cuerpos de inclusión, la máxima concentración y rendimiento se obtuvo cuando la temperatura de crecimiento fue de 32 °C, la de inducción 42 °C y un flujo de recirculación de 60 ml/min. La temperatura baja de crecimiento tuvo un impacto positivo sobre la concentración de proteína recombinante, es decir, la producción de la misma se vio favorecida cuando la temperatura estuvo por debajo de la temperatura crítica para la sobreexpresión de proteínas de choque térmico. Tales resultados coinciden con reportes que han evaluado que los incrementos en la temperatura, desde 30 °C a 33 °C, a 36 °C o 39 °C, resultan en velocidades de síntesis de proteínas de choque térmico del 7.8 %, 19.6 % y 33.3 % respecto a las máximas observadas cuando la temperatura se incrementa desde 30 °C a 42 °C. Esto sugiere que la temperatura crítica para inducir la sobre-síntesis de proteínas de choque térmico es de 33 °C; sin embargo, la síntesis de la proteína heteróloga inicia a temperaturas por arriba de 38 °C (Villaverde *et al.*, 1993).

Varios autores han reportado el efecto de los tiempos de inducción sobre la producción en proteína recombinante en sistemas termo-inducibles. Gupta y colaboradores en 1999 evaluaron en una cepa de *E. coli* con el plásmido pACYC177, distintos tiempos de inducción en cultivos que previamente estuvieron a 30 °C. La temperatura de inducción fue 42 °C y se expusieron a tal temperatura durante períodos de 2, 3, 5 y 10 min. Inmediatamente después de este tiempo la temperatura de los cultivos fue cambiada a 37 °C y se monitoreó la densidad celular así como la actividad de la enzima recombinante ( $\beta$ -galactosidasa) durante 5 h. Se encontró que los menores tiempos de inducción (dos y tres minutos) dieron lugar a una mayor actividad específica de la enzima comparada con la de 5 y 10 min de inducción. Esto se atribuyó a que en dos minutos se alcanzó un óptimo nivel de inducción. Algo parecido al trabajo anterior, realizaron Srivastava y colaboradores en 2005, los cuales utilizaron una cepa de *E. coli* con el plásmido

pRSET-INF $\alpha$  2b y realizaron cambios de temperatura en el cultivo de 30 °C a 42 °C a 37 °C. Los tiempos en que las células estuvieron a 42 °C fueron 5, 10 y 15 min. En este trabajo se encontró la mayor concentración de proteína recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2b) cuando el tiempo de inducción fue de 5 min. Los dos trabajos anteriores se realizaron a nivel matraz y en general se concluye que los mejores tiempos de inducción respecto a concentración de proteína recombinante se ubican entre los 2 y 5 min. Estos tiempos de inducción suelen ser poco factibles de alcanzar durante un cultivo en biorreactores de gran escala debido a la aparición de gradientes. De tal forma, en esos sistemas hay que considerar que el aumento de temperatura no puede ser instantáneo sino gradual.

A continuación se discuten otros trabajos con respecto al presente, sobre lo que se ha reportado en biorreactores en cuanto a producción de proteína recombinante por inducción térmica.

Chao y colaboradores en 2002 realizaron cultivos en biorreactor en donde se determinó el mejor tiempo de inducción. En primer lugar se halló la mejor temperatura de inducción evaluando desde 33 °C hasta 40 °C. La temperatura a la cual se obtuvo una mayor concentración de proteína recombinante (carbamoilasa) fue a 39 °C. La estrategia de calentamiento fue cambiar de 30 °C a 39 °C y después a 37 °C, empleando 10 y 20 min de inducción (tiempo en que las células estuvieron a 39 °C). Las células expuestas a 39 °C durante 20 min de inducción térmica generaron los máximos rendimientos en términos de actividad específica de la enzima, empleando cultivos en matraces, tanto en cultivo lote como en lote alimentado. En cultivos en biorreactor, los tiempos de inducción única (aumento de la temperatura a una de inducción, seguida de la disminución a una de crecimiento) que favorecieron una mayor producción de proteína recombinante fueron de 20 min. En el presente trabajo los tiempos de exposición de la célula a condiciones de inducción y de crecimiento estuvieron dados por el flujo de recirculación. En este caso, dichos tiempos fueron de 5 y 10 min, siendo este último en el cual se encontró una mayor concentración de proteína recombinante en cuerpos de inclusión en la condición (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. Esto concuerda con lo señalado por Chao y colaboradores, los cuales reportaron que con un

tiempo de inducción de 20 min se obtiene una mayor concentración de proteína recombinante. En este punto, cabe señalar que en los experimentos que tales autores reportan, el cambio súbito de temperatura (inducción a 39 °C) es único (en una ocasión la temperatura del cultivo se aumentó a una de inducción, seguida de su disminución a una de crecimiento), mientras que en el presente trabajo, los cambios intermitentes de temperaturas de crecimiento e inducción se mantuvieron a lo largo de todo el cultivo.

Existen otros trabajos en donde se han utilizado tiempos de inducción más prolongados. Por ejemplo, Chao y colaboradores (2004) utilizaron una cepa de *E. coli* con el plásmido pRA-A11ts-187Z productora de la proteína recombinante  $\beta$ -galactosidasa. La temperatura de inducción se escogió con base a un experimento en el cual un cultivo a 30 °C fue súbitamente aumentado de temperatura. Las temperaturas de inducción probadas fueron 33 °C, 35 °C, 40 °C y 42 °C, siendo 40 °C la temperatura a la cual se obtuvo mayor actividad específica de la enzima. En el siguiente experimento los cultivos estuvieron expuestos a cambios de temperaturas de 30 °C a 40 °C a 37 °C y los tiempos de inducción evaluados fueron 45, 60, 90 y 120 min. La mayor actividad total de la enzima se obtuvo cuando el tiempo de inducción fue de 60 min, por otro lado con tiempos de inducción de 90 min y 120 min este valor disminuyó considerablemente hasta casi 4 órdenes de magnitud.

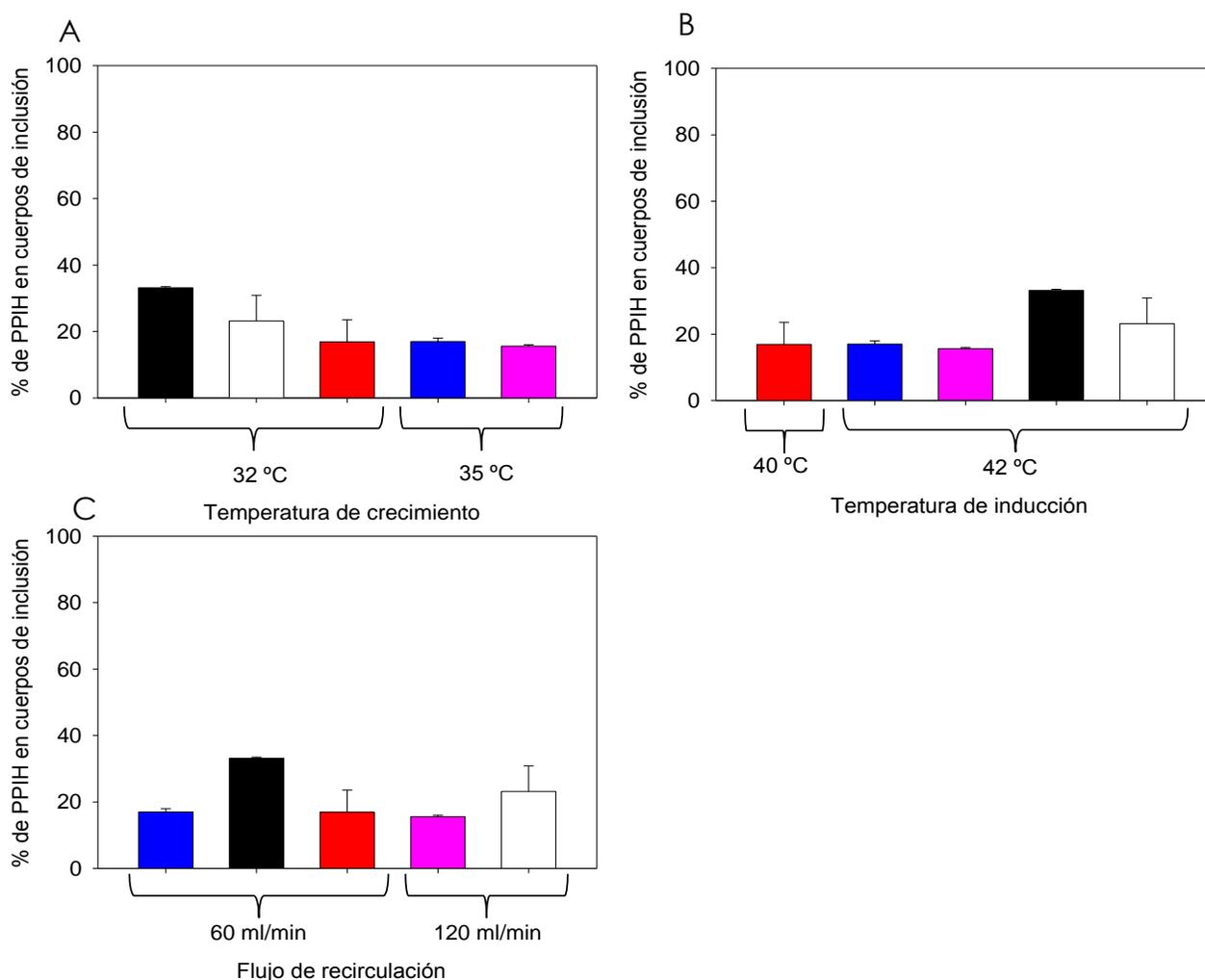
En 2006 Aucoin y colaboradores llevaron a cabo dos experimentos independientes en biorreactores con un volumen de operación de 12 l; el primero de ellos consistió en mantener cultivos de *E. coli* pND-GFP a 30 °C con un aumento a 42 °C durante una hora, seguido de la disminución de temperatura a 30 °C. El segundo experimento consistió en mantener el cultivo de dicha cepa a 37 °C, después un aumento a 42 °C durante una hora y finalmente se regresó a la temperatura de 37 °C. Cabe señalar que en ambos experimentos la inducción fue única (una hora a 42 °C durante todo el cultivo). La segunda estrategia fue en donde se obtuvo un mayor rendimiento de la proteína recombinante GFP (hasta 1.5 veces más al compararse con la primera estrategia). Con estos resultados se concluye que la producción de la proteína recombinante se vio favorecida cuando las diferencias

entre las temperatura de crecimiento e inducción es menor. En el presente trabajo, los cambios de temperatura estuvieron entre (35-42) °C, (32-42) °C y (32-40) °C, con un  $\Delta T$  de 7 °C, 10 °C y 8 °C respectivamente y la relación de temperaturas en donde se obtuvo una mayor concentración de proteína recombinante fue (32-42) °C, es decir, cuando el  $\Delta T$  fue mayor, lo que contrasta con los resultados de Aucoin *et al.*, (2006).

Aucoin *et al.*, 2006 también estudiaron el efecto de inducciones intermitentes a nivel matraz, con cultivos de *E. coli* pNd-GFP a 37 °C, los cuales fueron inducidos intermitentemente, una hora a 42 °C y una hora a 37 °C durante todo el cultivo. Paralelamente realizaron otros experimentos a nivel matraz en donde los cultivos se mantuvieron a 37 °C y únicamente hubo un aumento de temperatura a 42 °C durante una hora a lo largo del cultivo y después la temperatura fue disminuida a 37 °C. Estos experimentos demostraron que la estrategia de inducción intermitente durante todo el cultivo tuvo un efecto positivo sobre la producción de proteína recombinante comparada con la inducción única seguida por una disminución de temperatura. El rendimiento de proteína recombinante fue hasta 5.3 veces mayor con la primera estrategia. El sistema de cultivo utilizado en el presente trabajo permitió la oscilación continua de temperatura, es decir, a lo largo del cultivo se mantuvieron a las células inducidas intermitentemente y esto favoreció la producción de la proteína recombinante, aunque después de cierto tiempo esta dejó de observarse en geles SDS-PAGE y en WB.

La acumulación de proteínas en cuerpos de inclusión presenta diversas ventajas: la proteína puede ser aislada y concentrada por un paso de centrifugación, reduciendo los costos de procesamiento posteriores y facilitando la producción de proteínas tóxicas para las células (Lee, 1996; Carrio y Villaverde, 2005 y Lee *et al.*, 2006). Es por eso que el porcentaje de proteína recombinante agregada en cuerpos de inclusión es importante. Por ejemplo, Khan *et al.*, (1998) en cultivos tipo lote alimentado con *E. coli* pQE-30 obtuvieron un porcentaje de recuperación de hasta 95 % de la hormona de crecimiento recombinante ovina. Gracias a este porcentaje tan alto fue posible solubilizar a la proteína recombinante y purificarla en un solo paso de cromatografía por filtración en gel.

En el presente trabajo la máxima acumulación de preproinsulina en cuerpos de inclusión fue 33 % (ver figura 19); la cual se observó cuando las temperaturas de crecimiento e inducción fueron de 32 °C y 42 °C respectivamente. La frecuencia de recirculación no tuvo un efecto claro sobre la PPIH agregada. Este porcentaje (33 %) fue superior al máximo reportado por Niño, 2012 que fue de 20 %, sin embargo este último valor fue al estado de equilibrio y el reportado en la presente tesis se refiere al máximo valor durante todo el cultivo.



**Figura 19. Porcentaje de preproinsulina agregada en cuerpos de inclusión.**

A) Respecto a temperaturas de crecimiento, B) Respecto a las temperaturas de inducción. C) Respecto a los flujos de recirculación. Azul: (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. Rosa: (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min. Negro: (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min. Blanco: (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min. Rojo: (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min.

### **7.2.2 Conclusiones parciales**

La inducción oscilatoria permitió mantener las células en crecimiento durante todo el cultivo, mientras se produjo proteína recombinante, sin embargo esta última no estuvo presente hasta el final del cultivo.

La concentración de proteína recombinante al estado de equilibrio para todas las condiciones fue de cero.

Las temperaturas de crecimiento e inducción en donde se obtuvo una mayor concentración y rendimiento de preproinsulina fueron 32 °C y 42 °C respectivamente.

Las temperaturas en cada compartimento tuvieron un efecto sobre la prevalencia de la proteína a lo largo del cultivo, ya que cuando la  $T_{\text{crec}}$  fue de 32 °C y  $T_{\text{ind}}$  fue de 40 °C la proteína se mantuvo durante más tiempo en el cultivo (hasta 27 h).

Al variar los flujos de recirculación no se observó una tendencia clara sobre la concentración de proteína recombinante, aunque el mayor valor para ésta se obtuvo cuando el flujo de recirculación fue de 120 ml/min y la mayor concentración de proteína recombinante en cuerpos de inclusión se obtuvo cuando el flujo de recirculación fue de 60 ml/min.

### **7.3 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la estabilidad del plásmido recombinante**

Debido a que no fue posible alcanzar el estado de equilibrio respecto a concentración de preproinsulina, se estudió el impacto de los parámetros de operación sobre la estabilidad del plásmido.

La estabilidad del plásmido se refiere a la capacidad de las células de contener al mismo y mantener la integridad estructural del plásmido (y por lo tanto de generar plásmidos capaces de mantener el gen que codifica el producto de interés) y al menos una copia del plásmido por célula (Primrose y Ehrlich, 1981).

### **7.3.1 Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre las células que contienen el plásmido recombinante**

El número de unidades formadoras de colonias durante los cultivos continuos se presenta en la figura 20. Se realizó cuenta viable para cuatro de las condiciones evaluadas una vez iniciado el cultivo continuo. Se utilizaron dos concentraciones de ampicilina, 50 mg/l que es la concentración inicial del cultivo (etapa lote) y 114 mg/l que es la concentración del medio de adición cuando se inicia el cultivo continuo. Las colonias que crecieron en placas que contienen antibiótico se consideraron como colonias que poseen el plásmido recombinante, mientras que aquellas colonias que crecen en placas sin antibiótico se consideran como el total de las células en el quimiostato (con y sin el plásmido recombinante).

En todas las condiciones (ver figura 20 y anexo 11.1) no se observaron células sin plásmido antes del inicio del cultivo continuo (línea vertical continua), sin embargo para la condición (35-42) °C, 120 ml/min y (32-42) °C, 120 ml/min hacia el estado de equilibrio existió una diferencia en tres órdenes de magnitud entre células que contenían el plásmido y las que no. En la condición (32-42) °C, 60 ml/min, hacia el estado de equilibrio esta diferencia fue de poco más de un orden de magnitud y para la condición (32-40) °C, 60 ml/min no existió diferencia entre las células que contenían el plásmido y las que no, hay que señalar, que solo se realizó conteo de células hasta las 29 h de cultivo; para el resto de las condiciones a este tiempo hubo un marcado descenso de células que contenían el plásmido, por eso se infiere que para esta condición en particular no hubo una diferencia de más de un orden de magnitud al estado de equilibrio. Este hecho puede asociarse a una baja temperatura de inducción (40 °C), ya que se ha demostrado que en sistemas de expresión que utilizan los promotores del fago lambda a temperaturas de inducción por arriba de 42 °C se ve favorecida la propagación de células sin plásmido y a temperaturas entre 38 °C y 40 °C la propagación de células sin plásmido es menor comparada a la de 41 °C. (Villaverde et al., 1993; Siegel y Ryu, 1985; Hortacsu y Ryu, 1990).

Respecto a los flujos de recirculación, se encontró una menor reducción de la población que contenía el plásmido recombinante, cuando  $F_{rec} = 60$  ml/min (10 min como tiempo de permanencia promedio en cada compartimento) al compararse cuando  $F_{rec} = 120$  ml/min. Esto demostró que las células fueron menos susceptibles a perder el plásmido recombinante cuando estuvieron un mayor tiempo expuestas a las proteínas de choque térmico.

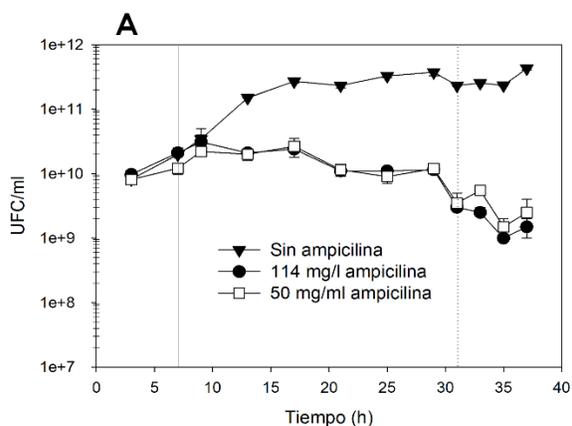
La temperatura de inducción tuvo un fuerte impacto sobre la estabilidad segregacional del plásmido, ya que cuando se utilizó la menor temperatura de inducción (40 °C), las células que contenían el plásmido permanecieron durante un mayor tiempo en el cultivo.

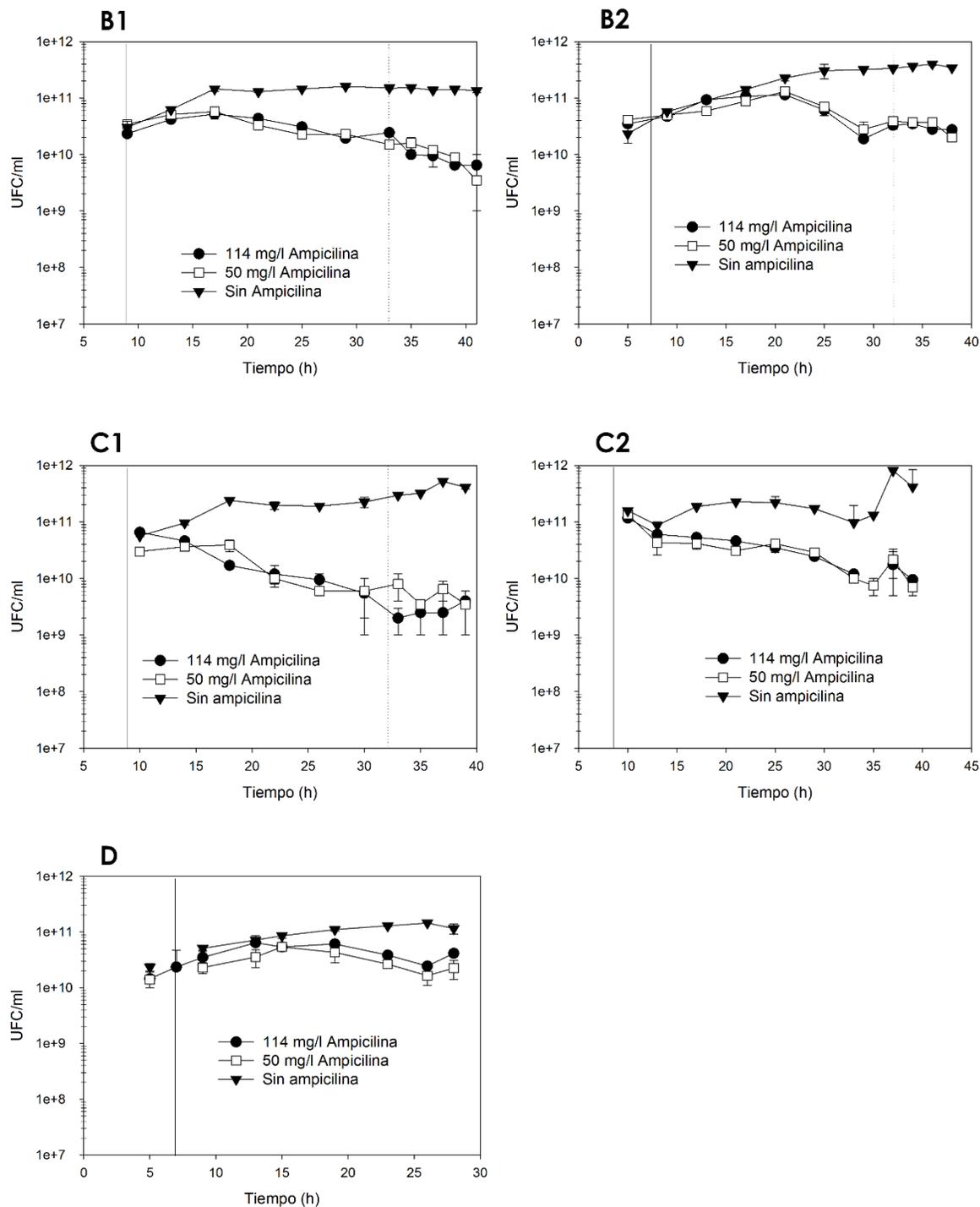
Fue evidente la presencia de dos poblaciones en el quimiostato: células que contenían el plásmido recombinante y células que no lo contenían. Este fenómeno es común en sistemas donde se utilizan promotores fuertes, como el promotor del fago lambda ( $P_L$ ) utilizado en el presente trabajo, ya que se trata de un promotor 10 veces más fuerte que el promotor  $P_{lacUV5}$ , 5.6 veces más que  $P_{lac}$ , 2 veces más que el promotor  $P_{tacI}$  y 1.7 veces más que los promotores  $T7 P_{A1}$  y  $P_{A2}$  (Deuschle *et al.*, 1986). En 1995 Andersson y colaboradores evaluaron el comportamiento de células de *E. coli* bajo condiciones de limitación de fuente de energía utilizando la estrategia de cultivo tipo lote alimentado. Observaron que la población de células que contenían el plásmido disminuyó bruscamente mientras que la población que no contenía el plásmido incrementó. Cabe señalar que la población que no contenía el plásmido fue mucho menor cuando el cultivo no estaba inducido. Dichos autores determinaron que la exposición de los cultivos a diferentes magnitudes de estrés por IPTG provoca la segregación celular. Asimismo, la disminución de la población que contenía el plásmido recombinante fue de menos de un orden de magnitud, lo cual está asociado con la inducción, según los autores (debido a sus observaciones de que cuando el cultivo no estaba inducido la población sin plásmido fue menor). Además se ha reportado que la pérdida de plásmido puede incrementarse ampliamente en el caso de plásmidos multicopias, cuando los genes son tóxicos para el hospedero o se reduce de otra manera la

velocidad de crecimiento o cuando las células son cultivadas a altas densidades celulares o en cultivos continuos (Baneyx, 1999).

Por otro lado, se sabe que en cultivos continuos la velocidad de crecimiento de la bacteria influye sobre la estabilidad del plásmido (Nancib y Boudrant, 1992, Weber y San, 1987, Ryan y Parulekar, 1991; Flickinger y Rouse, 1993) y la expresión del gen (Seo y Bailey, 1986; Curless *et al.*, 1990). Por ejemplo, un comportamiento generalmente observado es que a bajas velocidades de crecimiento el plásmido es más estable y es menos probable que exista inestabilidad segregacional; tal como lo reportaron Seo y Bailey (1986) los cuales evaluaron distintas tasas de dilución en un quimiostato con una cepa de *E. coli* HB101 pDM246 y observaron que a medida que la D incrementa, las bacterias resistentes al marcador de selección (ampicilina en este caso) disminuyeron en el cultivo.

Debe notarse que en el presente trabajo se usaron tasas de dilución relativamente altas comparadas con las de Niño, 2010 y Yépez, 2013 ( $0.072 - 0.26 \text{ h}^{-1}$ ) y se obtuvo una menor pérdida de las UFCs que contienen el plásmido recombinante cuando se utilizaron tasas de dilución menores ( $0.16 \text{ h}^{-1}$ ) lo cual concuerda con lo reportado por Seo y Bailey (1986).





**Figura 20. Células con y sin plásmido**

Promedio del conteo de placas por duplicado para una condición y en algunos casos para su duplicado. Línea vertical continua: inicio del cultivo continuo, línea vertical continua: inicio del estado de equilibrio. A) (35-42) °C,  $F_{rec} = 120$  ml/min, B1) (32-42) °C,  $F_{rec} = 60$  ml/min, B2) (32-42) °C,  $F_{rec} = 60$  ml/min (duplicado de B1), C1) (32-42) °C,  $F_{rec} = 120$  ml/min, C2) (32-42) °C,  $F_{rec} = 120$  ml/min (duplicado de C1) D) (32-40)°C,  $F_{rec} = 60$  ml/min.

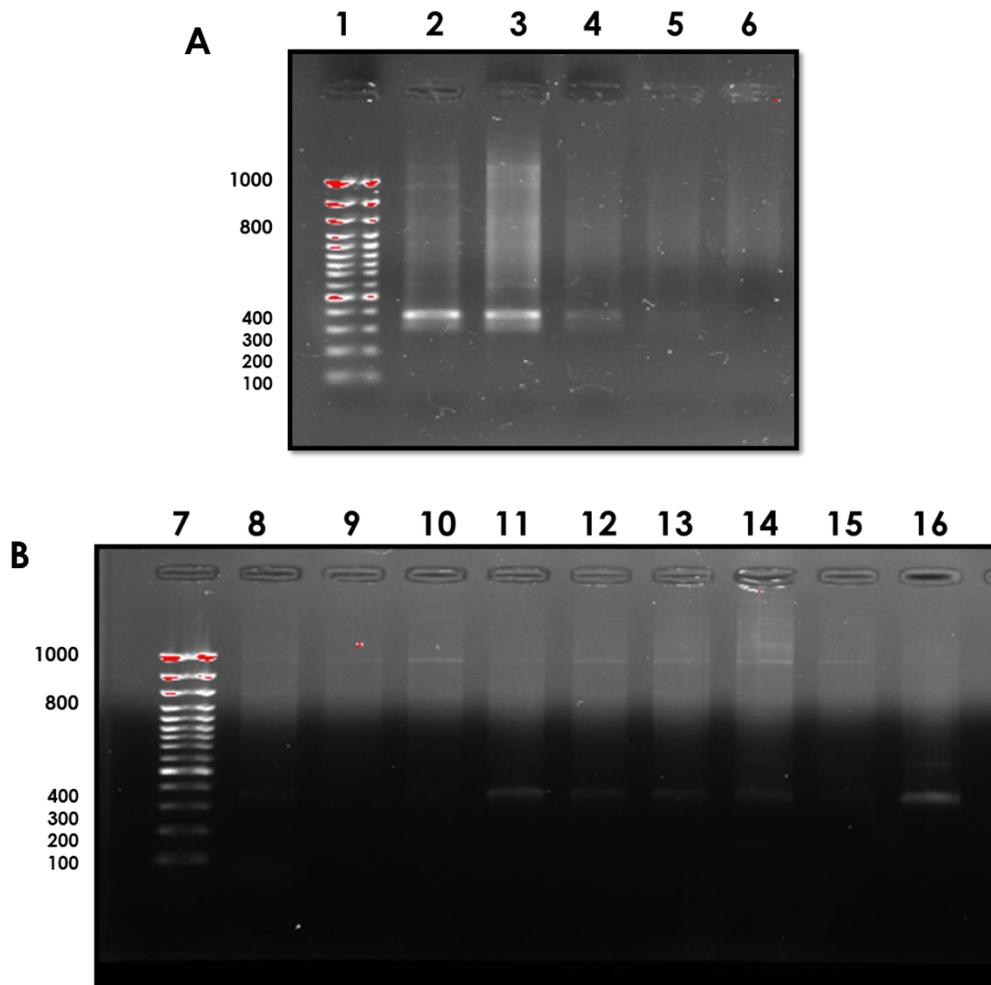
El estado fisiológico de las células que no contienen el plásmido recombinante (subpoblación en el cultivo) todavía no es conocido, pero se ha sugerido que sufren una pérdida de la capacidad biosintética y esto tiene un efecto negativo sobre la producción de proteína recombinante, cuando estas células están en un cultivo con células que contienen el plásmido (Andersson *et al.*, 1995).

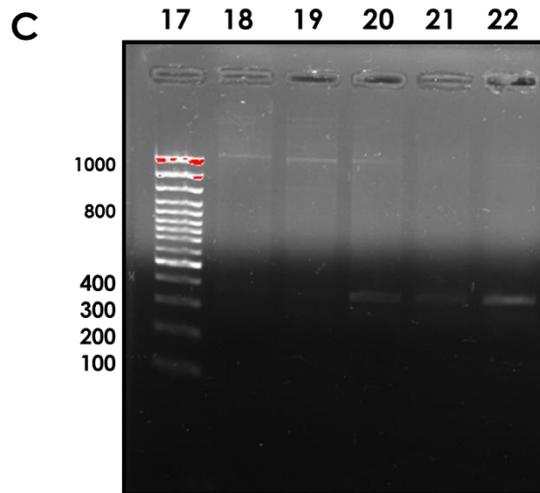
### **7.3.2. Efecto de la frecuencia de recirculación y la temperatura sobre la presencia del gen de la preproinsulina humana.**

En cuatro de las cinco condiciones evaluadas por duplicado: (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min, (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, ocurrió la pérdida del gen de interés (preproinsulina humana), a lo largo del cultivo. Tal y como se aprecia en la figura 19 A, a las 2 h de cultivo (previo a la inducción), 8 h y 24 h se observó el fragmento correspondiente al gen de la preproinsulina humana con un peso aproximado de 379 pb. Sin embargo, a las 35 y 40 h de cultivo ya no se observó la banda de interés, lo cual demostró que en estos puntos del cultivo el gen de la preproinsulina humana ya no estaba presente. La ausencia de este gen explica la pérdida de la proteína recombinante en el cultivo. Algo parecido ha sido reportado por Kadam y colaboradores en 1986, los cuales utilizaron una cepa de *B. subtilis* 1A289 con el plásmido pEAA, que contenía el gen de la alfa amilasa y el gen de resistencia al cloranfenicol. Concluyeron que el gen recombinante propició la inestabilidad del plásmido, ya que después de perder el gen recombinante, resultó un plásmido estable (este plásmido contiene la secuencia que confiere la resistencia a cloranfenicol, pero carece del gen recombinante).

Wei y colaboradores en 1988, evaluaron la estabilidad del plásmido pAT5 en *B. subtilis*. Para ello utilizaron cultivos tipo lote empleando dos modalidades, la primera consistió en cultivos con marcador de selección (kanamicina) y la segunda, cultivos sin el marcador de selección. Se determinó que en ambas modalidades el plásmido sufrió inestabilidad segregacional y estructural. La inestabilidad estructural consiste en rearrreglos del DNA o en la pérdida física de fragmentos del plásmido. En el presente trabajo pudimos observar mediante electroforesis, el gen de la PPIH

(en cuatro condiciones) al inicio de los cultivos. Sin embargo, no sabemos si ocurrieron otro tipo de modificaciones a nivel de plásmido (rearrreglos, otras deleciones). Con base en estas observaciones es posible asumir que la pérdida del fragmento que codifica a la proteína recombinante incrementó la estabilidad del plásmido, es decir, se generó un vector no productivo pero que conservó la capacidad para realizar las funciones básicas de la célula hospedera.





**Figura 21. Análisis electroforético del producto de PCR.**

A) **1.-** marcador de peso molecular en pb, muestras de la condición (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min correspondientes al tiempo de cultivo: **2.-** 2 h, **3.-** 8 h, **4.-** 24 h, **5.-** 35 h, **6.-** 40 h, B) **7.-** marcador de peso molecular en pb, muestras de la condición (32-40 °C),  $F_{rec}= 60$  ml/min correspondientes al tiempo de cultivo: **8.-** 25 h, **9.-** 29 h, **10.-** 35 h. Muestras de la condición (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min correspondientes al tiempo de cultivo: **11.-** 3 h, **12.-** 5 h, **13.-** 9 h, **14.-** 11 h, **15.-** 23 h, **16.-** 35 h, C) **17.-** marcador de peso molecular en pb, muestras de la condición (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min correspondientes al tiempo de cultivo: **18.-** 33 h, **19.-** 34 h, muestras de la condición (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min correspondientes al tiempo de cultivo: **20.-** 24 h, **21.-** 35 h, **22.-** 40 h.

Respecto a la condición (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min, el gen que codifica para la proteína de interés se mantuvo a lo largo del cultivo (figura 19 B y C), sin embargo no hubo proteína recombinante al final del cultivo. Una posible explicación de este resultado sería una degradación de la proteína recombinante, ya que esta reportado que una de las proteínas de choque térmico llamada Clp (proteasa, producto de la respuesta de choque térmico), está involucrada con la degradación de proteínas anormales (Maurizi, 1992; Goff y Goldberg, 1985; Goff y Goldberg, 1987). Además una sobre-expresión de la proteína recombinante puede resultar en la degradación de la misma (Maurizi, 1992).

Harcum y Bentley, en 1999 realizaron cultivos continuos de *E. coli* JM105, en donde evaluaron la actividad proteolítica de las proteasas La (producto del gen *lon*) y Clp. El cultivo se mantuvo a 37 °C y se dieron dos pulsos de calor (aumento de la temperatura a 42 °C, en donde se mantuvo 2 h y luego se disminuyó a 37 °C) a las 69 y 116 h. Después del primer aumento y disminución de temperatura hubo un

incremento de la actividad proteolítica del 25 %, y permaneció elevada durante 46 h más. Después del segundo aumento/disminución de temperatura, la actividad proteolítica incrementó un 30 % adicional, comparada con las muestras tomadas antes del segundo pulso de temperatura. Es decir, la actividad proteolítica fue casi el doble al compararse con las muestras del cultivo cuando aún no habían sido inducidas. La disminución de la actividad específica de la enzima recombinante fue asociada directamente a la actividad proteolítica presentada. Lo anterior evidenció que la sobre-expresión de la proteína recombinante en un sistema termo-inducido, favoreció la degradación de la misma por proteasas (Clp y La). Es posible que la ausencia de proteína recombinante en el presente trabajo, para la condición (32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min (en las últimas horas de cultivo), se deba a una degradación de la misma, tal como lo reportan Harcum y Bentley, 1999.

Además, Harcum y Bentley en 1993 encontraron niveles elevados de actividad proteolítica después de 24 h de haber aumentado la temperatura a 42 °C y disminuido a una temperatura de crecimiento, lo cual sugiere que aún después de disminuir la temperatura de inducción a una de crecimiento, la actividad proteolítica estuvo presente. Esto también puede estar relacionado con la ausencia de proteína recombinante en el sistema evaluado en el presente trabajo; ya que las oscilaciones de temperatura existieron durante todo el cultivo, lo cual pudo haber propiciado la degradación de la proteína recombinante aún a una temperatura de crecimiento.

Otra explicación de la falta de producción de la PPIH en estados tardíos del cultivo podría deberse a mutaciones sin sentido originadas en algún punto del crecimiento (cambio de un triplete a codones de término UAA, UAG o UGA en marcos abiertos de lectura). Este tipo de mutaciones originan que la traducción de la proteína termine prematuramente (Snyder y Champness, 2007). Cabe señalar que el efecto de este tipo de mutaciones son mayormente observadas en genes heterólogos que resultan en un incremento de la carga metabólica. Es decir, las células que expresan el gen heterólogo poseen una velocidad de crecimiento inferior al de las células no-productoras generadas por las mutaciones sin sentido.

### **7.3.3 Conclusiones parciales**

La inestabilidad segregacional del plásmido (evaluada en cuatro condiciones), se reflejó como una disminución de la población de células con el plásmido recombinante. Este hecho comenzó una vez iniciada la inducción intermitente y antes del estado de equilibrio, así que en vez de ser un efecto de la frecuencia de recirculación y temperaturas de crecimiento e inducción, es posible que la causa de este comportamiento sea precisamente la inducción intermitente en el sistema desde horas tempranas del cultivo.

Al realizar la amplificación del gen de la preproinsulina humana, este se observó solamente en horas tempranas del cultivo, en cuatro condiciones ((35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min, (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min). La ausencia de este gen al final del cultivo, explica la pérdida de la proteína recombinante en el mismo. En la condición restante ((32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min) el gen se mantuvo a lo largo del cultivo, mientras que la proteína recombinante no. Para este caso se sugirió una degradación de la misma por proteasas producto de la HSR (respuesta de choque térmico) y una mutación sin sentido.

### **7.4 Comparación de cultivos continuos termo-inducidos de dos compartimentos**

El quimiostato es una herramienta analítica que permite evaluar parámetros del cultivo sobre una característica en particular, mientras las condiciones del cultivo permanecen constantes. Esto ofrece la posibilidad de evaluar la concentración de la proteína recombinante al estado de equilibrio, tal como lo reportaron Niño, 2012 y Yopez, 2013, los cuales después, de un barrido de tasas de dilución, encontraron la  $D$  óptima. En donde hubo mayor concentración de proteína recombinante al estado de equilibrio.

Sin embargo, en el presente trabajo la manipulación de las variables del cultivo continuo tales como las temperaturas en cada compartimento y el flujo de recirculación; evidenciaron la inestabilidad del plásmido a lo largo del tiempo. La

cual (aunada a la ausencia del gen de la PPIH en cuatro condiciones y una probable degradación de la PPIH) tuvo un impacto negativo sobre la producción de la proteína recombinante, ya que al estado de equilibrio esta fue cero.

Aun así, fue posible realizar una comparación (valor máximo alcanzado antes del estado de equilibrio) entre la mejor condición de Niño, 2012, la cual consistió en dos reactores interconectados entre sí con un tiempo de circulación de 6 min y  $T_{\text{rec}}$ : 35 °C y  $T_{\text{ind}}$ : 42 °C con una  $D= 0.146 \text{ h}^{-1}$  y la mejor condición para el presente trabajo (32-42) °C, 120 ml/min, se encontró que la concentración de PPIH en cuerpos de inclusión en mg/ml es hasta 10 veces mayor en el trabajo de Niño, esto puede atribuirse al empleo de una tasa de dilución menor.

## 8. CONCLUSIONES

Se alcanzó el estado de equilibrio respecto a concentraciones de biomasa y de sustrato en un sistema termo-inducido de dos compartimentos para todas las condiciones evaluadas en este trabajo, lo cual es una ventaja respecto a estrategias típicas de inducción, en donde la inducción escalonada no permite mantener el crecimiento celular durante largos períodos de tiempo.

No se obtuvo concentración de preproinsulina al estado de equilibrio. La frecuencia de recirculación no tuvo un efecto importante sobre la producción de proteína recombinante ya que no se observó alguna tendencia al variarla (antes del estado de equilibrio). Por otro lado las temperaturas de crecimiento e inducción tuvieron un efecto notorio sobre la producción de proteína recombinante, ya que la mayor concentración de esta se obtuvo cuando se mantenía una alta temperatura de inducción (42 °C) y a su vez una baja temperatura de crecimiento en donde no se propició la sobre-expresión de proteínas de choque térmico (32 °C). Al oscilar las temperaturas entre 32 °C y 42 °C la mayor concentración de preproinsulina total se obtuvo para frecuencias de 120 ml/min, mientras que la mayor concentración de preproinsulina en cuerpos de inclusión y el mayor porcentaje de preproinsulina agregada en cuerpos de inclusión se obtuvo para frecuencias de 60 ml/min.

La ausencia del gen de la preproinsulina al final del cultivo en las condiciones (35-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (35-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min, (32-42) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, (32-40) °C,  $F_{rec}= 60$  ml/min, explica la pérdida de la proteína recombinante hacia el final de los cultivos. En la condición restante ((32-42) °C,  $F_{rec}= 120$  ml/min) el gen se mantuvo a lo largo del cultivo, mientras que la proteína recombinante no. Esto pudo haber sido consecuencia de una degradación de la misma por proteasas producto de la respuesta de choque térmico o una mutación sin sentido.

## 9. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de verificar la posible degradación de la PPIH en un cultivo continuo como el estudiado en el presente trabajo, se sugiere realizar ensayos de RT-PCR semicuantitativa para monitorear los niveles de expresión de los genes *Clp* (proteasa) y el de la PPIH.

Secuenciar el plásmido para verificar la presencia de mutaciones sin sentido.

Tomando en cuenta los estudios de Caspeta, 2009, en donde se demostró que bajas tasas de calentamiento tienen un efecto positivo sobre la producción de PPIH, se sugiere evaluar una estrategia de inducción en donde precisamente el calentamiento sea lento, esto podría realizarse en un quimiostato de un solo compartimento.

Las estrategias de termo-inducción investigadas en este trabajo, podrían ser interesantes si se evaluaran en una cepa de *E. coli* que posea un plásmido estable.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Allen, S.P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K. y Easton, A. M. (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174 (21), 6938–6947.

Ami, D., Natalello, A., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M. y Doglia, S. M. (2005) Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS Letters*, (579), 3433–3436.

Andersson, L., Yang, S., Neubauer, P., y Enfors, S.O. (1995) Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J. of Biotechnol.* 46 (3), 255-263.

Aucoin, M. G., McMurray-Beaulieu, V., Poulin, F., Boivin, E. B., Chen, J., Ardelean, F. M., Cloutier, M., Choi, Y. J., Miguez, C. B., y Jolicoeur, M. (2006) Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microb Cell Fact.* 5 (27).

Balbás, P. (2001) Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotech.* 19, 251-267.

Baneyx F. y Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 22(11), 1399-408.

Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechnol.* 10(5), 411-421.

Beaucage, S., Miller, C. A. y Cohen, S. N. (1991) Gyrase dependent stabilization of pSC101 plasmid inheritance by transcriptionally active promoters. *EMBO. J.* 10, 2583-2588.

Bentley, W. W. y Kompala, D. S. (1990) Stability in continuous culture in recombinant bacteria: a metabolic approach. *Biotechnol. Lett.* 12, 329-334.

Berg, C. M., Liu, L., Coon, M., Strausbough, L. D., Gray, P., Vartak, N. B., Brown, M., Talbot, D. y Berg, D. E. (1989) pBR322 derived multicopy plasmid harbouring long inserts are often dimers in *E. coli* K-12. *Plasmid*, 21, 138-141.

Birnboim H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.

Bowden, G. A., Paredes, A.M., y Georgion G. (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bio/Technol.* 9 (8), 725- 730.

Buell, G., Schulz, M.F., Selzer, G., Chollet, A., Rao Novva, A., Semon, D., Escanez, S. y Kawashima, E. (1985). Optimizing the expression in *E. coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-C (IGF-1). *Nucleic. Acids. Res.* 13 (6), 1923-1938

Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* 9 (4), 671-680.

Bukhari, A. J., y Zipser, D. (1973). Mutants of *Escherichia coli* with a defect in the degradation of nonsense fragments. *Nature New Biol.* 243, 238-241.

Carrio, M. M. (1999) Proteolytic digestion of bacterial inclusion body proteins during dynamic transition between soluble and insoluble forms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1434 (1), 170-176.

Carrio, M. M. y Villaverde, A. (2001) Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* 489 (1), 29-33.

Carrio, M. M. y Villaverde, A. (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96 (1), 3-12.

Carrió, M. M. y Villaverde, A. (2005) Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J. Bacteriol.* 187(10), 3599-3601.

Carrio, M. M., Cubarsi, R. y Villaverde, A. (2000) Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett.* 471 (1), 7-11.

Carvajal, P., Gibert, J., Campos, N., Lopera, O., Barbera, E., Torne, J.M. y Santos, M. (2011) Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding. *Biotechnol. Prog.* 27 (1), 232-240.

Cashel, M., Gentry, D., Hernandez, V., Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cell and Mol Biol*, 1458-1496.

Caspeta, L. (2009) Escalamiento descendente del proceso de producción de proteína heteróloga por termo-inducción de cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*: estudio de la respuesta transcripcional al choque térmico. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.

Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolívar, F. y Ramírez, O.T. (2009) The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol. Bioeng.* 102(2), 468-482.

Caspeta, L., Lara, A., Pérez, N., Flores, N., Bolívar, F. y Ramírez, T. (2013) Enhancing thermo-induced recombinant protein production in *Escherichia coli* by temperature oscillations and post-induction nutrient feeding strategies. *J. Biotechnol.* 167, 47-55.

Caulcott, C.A. y Rhodes, M. (1986) Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.* 4 (6), 142-146.

Chao, Y. P., Law, W., Chen, P. T. y Hung, W. B. (2002) High production of heterologous proteins in *Escherichia coli* using the thermo-regulated T7 expression system. *App. Microbiol. Biotechnol.* 58(4), 446-453.

Chao, Y. P., Wen, C. S. y Wang, J. Y. (2004) A facile and efficient method to achieve *LacZ* overproduction by the expression vector carrying the thermo-regulated promoter and plasmid copy number. *Biotechnol. Prog.* 20(2), 420-425.

Chuang, S. E., Blattner, F. R. (1993) Characterization of twenty-six new heat shock genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175(16), 5242-5252.

Chung, C.H. y Goldberg, A.L. (1981). The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 78 (8), 4931-4935.

Corchero, J. L. (1996) The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *J. Biotechnol.* 48 (3), 191-200

Corchero, J. L., y Villaverde, A. (1998) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (6), 625-632.

Curless, C., Pope, J. y Tsai, L. (1990) Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 6, 149-152.

Datar, R., Cartwright, T. y Rosen C.G., (1993) Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study of tissue plasminogen activator. *Bio/Technol.* 11, 349-357.

De Bernardez, E., Schwarz, E. y Rudolph, R. (1999) Inhibition of Aggregation Side Reactions during in Vitro Protein Folding. *Methods in Enzymology.* 309, 217-240

DeBoer, H.A., Comstock, L.J. y Vasser, M. (1983). The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21-25.

Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H. (1986) Promoters of *Escherichia coli*: A hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO J.* 5 (11), 2987-2994.

Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C. G. (1997) Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* 1995, 177(6), 1497-1504.

Dong, H., Nilsson, L. y Kurland, C. G. (1995) Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol*, 177(6), 1497-504.

Emory, S. A. and Belasco, J. G. (1990) The ompA 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J. Bacteriol.* 172, 4472–4481.

Enfors, S. O. (1992) Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.* 10, 310–315.

Ensley, B. D. (1986) Stability of recombinant plasmids in industrial micro-organisms. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 4(3), 263-277.

Ferenci, T. (2001) Hungry bacteria - definition and properties of a nutritional state. *Environ. Microbiol.* 3 (10), 605-611.

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J.L., Vázquez, A. y Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8, 17.

Figge, J., Wright, C., Collins, C.J., Roberts, T. M. y Livingston, D.M. (1988) Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli* lac repressor in monkey cells. *Cell*, 52, 713-722.

Flickinger, M.C. y Rouse, M. P. (1993) Sustaining protein synthesis in the absence of rapid cell division: An investigation of plasmid-encoded protein expression in *Escherichia coli* during very slow growth. *Biotechnol. Prog.* 9, 555-572.

Garcia-Fruitos, E., Aris, A., Villaverde, A. (2007) Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *App. and Environ. Microbiol.* 73 (1), 289-94.

Garcia-Fruitos, E., Carrio, M. M., Aris, A. y Villaverde, A. (2005) Folding of a misfolding-prone  $\beta$ -galactosidase in absence of DnaK. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 869–875.

Gatti-Lafranconi, P., Natalello, A., Ami, D., Doglia, S. y Lotti, M. (2011). Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *FEBS.* 278 (14), 2408-2418.

George, H. A., Powell, A.L., Dahlgren, M. E., Herber, W.K., Maigetter, R.Z., Burgess, B. W., Stirdivant, S. M. y Greasham, R. L. (1992) Physiological effects of TGF(alpha)-PE40 expression in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* 40(3), 437-45.

Georgiou, G., Valax, P. (1999) Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol.* 309, 48–58.

Gill, R.T., Valdes, J. J. y Bentley, W.E. (2000) A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 2(3), 178-189.

Goff, S. A. and Goldberg, A. L. (1987). An increased content of protease Ia, the lon gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 4508–4515.

Goff, S.A. y Goldberg, A. L. (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell*, 41, 587-595.

Goldberg, A.L. (1992) The mechanism and functions of ATP dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* 203, 9-23.

Gottesman, S., y Zipser, D. (1978). Deg phenotype of *Escherichia coli* lon mutants. *J. Bacteriol.* 133, 844-851.

Gross, C.A. (1996). Function and regulation of the heat shock proteins. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H.E. Umbarger, eds. ASM Press, Washington DC, 1382-1399.

Grossman, A. D., Erickson, J. W. y Gross, C. A. (1984) The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell*, 38(2), 383-390.

Gupta, J.,C., Jaisani, M., Pandey, G. y Mukherjee, K. J., (1999) Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible lambda PL promoter. *J. Biotechnol.* 68(2-3),125-134.

Hannig, G. y Makrides., S.C. (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotech.* 16, 54-60.

Harcum, S. W. y Bentley, E. E. (1999) Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. Implications for heterologous protein yield. *App. Biochem. Biotech.* 80, 23-37.

Harcum, S. W. y W. E. Bentley (1993) Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDa proteases in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 675–685.

Herbert, D., Elsworth, R. y Telling, C. (1956) The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14, 601-622.

Herendeen, S.L., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1979) Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139, 185–194.

Hoffman, F. y Rinas, U. (2004) Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.* 89, 73-92.

Hoffmann, F. y Rinas, U. (2000) Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16(6),1000-1007.

Hortacsu, A. y Ryu, D. D. (1990) Optimal temperature control policy for a two-stage recombinant fermentation process. *Biotechnol. Progr.* 6, 403-407.

Imanaka, T. y Aiba, S. (1981) A perspective on the application of genetic engineering stability of recombinant plasmid. *Ann. NY Acad. Sci.* 369, 1-14.

Jaén, K. (2013) Efecto de la tasa de calentamiento en el proceso de producción por termo-inducción de ADN plasmídico en *Escherichia coli*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.

Jana, S. y Deb, J. K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(3), 289-298.

Janion, C. (2008) Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J Biol Sci* 4(6), 338-344.

Jensen, E. B. y Carlsen, S. (1990) Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36(1), 1-11.

Jevsevar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J. y Menart, V. (2005) Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol. Prog.* 21, 632-639

Jurgen, B. (2000) Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 217-224

Kadam, K. L., Wollweber, K. L. Grosch, J. C. y Jao, Y. C. (1986) Investigation of plasmid instability in amylase-producing *B. subtilis* using continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 859-872.

Khan, R. H., Appa Rao, K. B. C., Eshwari, A. N. S., Totey, S. M. y Panda A. K. (1998) Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 14, 722-728.

Klein, J. y Dhurjati, P. (1995) Protein aggregation kinetics in an *Escherichia coli* strain overexpressing a *Salmonella typhimurium* CheY mutant gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1220-1225.

Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10 (12), 524-530.

Kowit, J. D., y Goldberg, A. L. (1977). Intermediate steps in the degradation of a specific abnormal protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252, 8350-8357.

Lee, G.H., Cooney, D., Middelberg, A.P. y Choe, W. S. (2006) The economics of inclusion body processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 29, 73-90.

Lee, S. Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14, 98-105.

Lemaux, P. G.; Herendeen, S. L.; Bloch, P. L. y Neidhardt, F. C. (1978) Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell.* 13, 427-434.

Lethanh, H. (2005) The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb. Cell Fact.* 4 (6).

Lewin, B. (1997) *Genes VI*. Oxford University Press. New York, NY.

Lieb, M. (1966) Studies of heat-inducible lambda bacteriophage. I. Order of genetic sites and properties of mutant prophages. *J. Mol. Biol.* 16, 149-163.

Lieb, M. (1981) A fine structure map of spontaneous and induced mutations of the lambda repressor gene, including insertions of IS elements. *Mol Gen Genet* 184, 364-371.

Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.

Mason, A. A., Dünner, J., Indra, P. y Colangelo, T. (1999) Heat induced expresión and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Applied Environ. Microbiol.* 65(8), 3433-3440.

Matsui, T., Sato, H., Sato, S., Mukataka, S. y Takahashi, J. (1990) Effects of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 54, 619-624.

Maurizi, M. R. (1992). Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*, 48, 178-201.

Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S. H., Gottesman, S. (1990) Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem*, 265(21), 12546-12552.

Meacock, P. A. y Cohen, S. N. (1980) Partitioning of bacterial plasmid during cell division, a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell.* 20, 529-542.

Menart, V., Jevsevar, S., Vilar, M., Trobis, A. y Pavko, A. (2003) Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR, PL promoters from phage lambda. *Biotechnol. Bioeng.* 83(2), 181-190.

- Mergulhao, F.J., Summers, D.K. y Monteiro, G.A. (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* 23(3),177-202.
- Mohan, S. y Kumar, A. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Bioscience Bioeng.* 4, 303-310.
- Nahalka, J. (2008) Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to alpha-d-glucose-1-phosphate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 219–223.
- Nahalka, J. y Nidetzky, B. (2007) Fusion to a pull-down domain: a novel approach of producing *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase as insoluble enzyme aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 454–461.
- Nahalka, J. y Patoprsty, V. (2009) Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3). *Org. Biomol. Chem.* 7, 1778–1780.
- Nahalka, J., Vikartovska, A. y Hrabarova, E. (2008) A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis. *J. Biotechnol.* 134, 146–153.
- Nancib, N. y Bordrant, J. (1992) Effect of growth rate on stability and gene expression of a recombinant plasmid during continuous culture of *E. coli* in a non-selective médium. *Biotechnol. Lett.* 14, 643-648.
- Nauta, A., Van den Burg, B., Karsens, H., Venema, G., Kok, J. (1997) Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative molecular modeling. *Nat Biotechnol.* 15, 980-983.
- Niño, O. (2012) Diseño de un cultivo continuo para la producción de proteína recombinante en un sistema de inducción térmica. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., Rhodius, V. A. (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* 20(13), 1776-1789.
- Nordstrom, K. y Austin, S. J. (1989) Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 23, 37-69.
- Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R. y Fink, A. L. (1994) Native-like secondary structure in interleukin-1 b inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. *Biochem.*, 33, 2628–2634.
- Palomares, L. A. y Ramírez, O. T. (2000) "Bioreactor Scale-Down"; in: *The Encyclopedia of Cell Technology*; Spier, R.E. (ed). The Wiley Biotechnology Series, John Wiley and Sons; 1,174-183.

Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. y Ramirez, O.T. (2004) Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* 267, 15-52.

Panda, A.K. (2003) Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 85, 43-93.

Parsell, D. A. y Sauer, R. T. (1989) Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes Dev.* 3, 1226-1232.

Patra, A. K., Gahlay, G. K., Reddy, B. V., Gupta, S. K. y Panda, A. K. (2000) Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-C expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 26, 7075-7081.

Paulsson, J. y Ehrenberg, M. (2001) Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q. Rev. Biophys.* 34, 1-59.

Peternal, S. y Komel, R. (2011) Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8275-8287.

Peternal, S., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V. y Komel, R. (2008) Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb. Cell Fact.* 7, 34.

Phue, J.N., Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J. y Shiloach, J. (2005). Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays. *Biotechnol and Bioeng* 90, 805-820.

Primrose, S. B., y Ehrlich, S. D. (1981) Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. *Plasmid*, 6 (2), 193-201.

Ramírez, O. T., Flores, E. y Galindo E. (1995) Products and bioprocess based on genetically modified organisms: review of engineering issues and trends in the literature. *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* 3, 165-197.

Remaut, E., Stanssens, P. y Fiers, W. (1981). Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the pL promoter of coli phage lambda. *Gene*, 15, 81-93.

Rinas, U. (1996) Synthesis rate of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 12, 197-200.

Rinas, U. y Bailey, J. E. (1992) Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre-beta-lactamase into cytoplasmic inclusion bodies. *App. Environ. Microbiol.* 59 (2), 561-566.

Rudolph, R. (1996) Successful protein folding at industrial scale. In: Protein engineering: principles and practice, John Wiley and sons: New York. 293–298.

Ryan, E. y Parulekar, S. J. (1991) Recombinant protein synthesis and plasmid instability in continuous culture of *E. coli* JM103 harboring a high copy number plasmid. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 415-429.

Sandén, A. M., Prytz, I., Tubulekas, I., Förberg, C., Le, H., Hektor, A., Neubauer, P., Pragai, Z., Harwood, C., Ward, A., Picon, A., De Mattos, J. T., Postma, P., Farewell, A., Nyström, T., Reeh, S., Pedersen, S., Larsson, G. (2003) Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol Bioeng.* 81(2),158-166.

Santos-Etxepare, M., Arestin, M., Castelruiz, A., Simón, M. (2010) Sistemas de expresión de proteínas en *Escherichia Coli* para la producción de biofármacos. Alternativas y criterios de selección. *Biotech Magazine*. <http://www.mendeley.com/research/sistemas-expresi%C3%B3n-prote%C3%ADnas-en-escherichia-coli-para-la-producci%C3%B3n-biof%C3%A1rmacos-alternativas-y-crite/>

Sawers, G. y Jarsch, M. (1996). Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 1-9.

Sayadi, S., Barbotin, J.N. y Thomas, D. (1989). Effect of environmental growth conditions on plasmid stability, plasmid copy number, and catechol 2,3-dioxygenase activity in free and immobilized *Escherichia coli* cells. *Biotechnology and Bioengineering* 33, 801-808.

Schein, C.H. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technol.* 7, 1141-1148.

Seeger, A., Schneppe, B., McCarthy, J. E. G., Deckwer, W., y Rinas, U., (1995). Comparison of temperature and isopropyl-b-D-Thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 947-953.

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

Shoham, Y., y Demain, A. L., (1990) Effect of medium composition on the maintenance of a recombinant plasmid in *B. subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (5), 330-336.

Shoham, Y., y Demain, A. L., (1991) Kinetics of loss of a recombinant plasmid in *B. subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 927-935.

Siegel, R., y Ryu, D. D. Y. (1985) Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23 trpA1 in *E. coli* using two stage continuous culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 27 (1), 28-33.

Singh, S. M., y Panda, A. K. (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 303–310.

Snyder, L. y Champness, W. (2007) Molecular genetics of bacteria. 3a edición, Ed. ASM Press, Washington DC.

Sørensen, H.P.; Mortensen, K.K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 115(2), 113-28.

Srivastava, P., Bhattacharaya, P., Pandey, G., y Mukherjee, K. J., (2005) Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 41, 313-322.

Straus, D. B., Walter, W. A., Gross, C. A. (1987) The heat shock response of *Escherichia coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature*, 329, 348-351.

Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

Stueber, D. y Bujard, H. (1982) Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J.* 1, 1399-1404.

Su, TZ., Schweizer, H., y Oxender, D.L. (1990) A novel phosphate-regulated expression vector in *Escherichia coli*. *Gene*, 90(1), 129-33.

Summers, D. (1998) Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* 29, 1137-1145.

Summers, D. K., y Sherrat, D. J. (1984) Multimerization of high copy number causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and plasmid stability. *Cell*, 36, 1097-1103.

Surek, B., Wilhelm, M. y Hillen, W. (1991). Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding the heat shock response. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 488-494.

Swartz, J.R. (1996). *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, y H.E. Umbarger, eds. ASM Press. Washington, 1693-1711.

Taylor, G., Hoare, M., Gray, D. R., y Marston, F.A. (1986) Size and density of protein inclusion bodies. *Bio/Technol.* 4, 553–557.

Timms, A. R., Muriel, W., Bridges, B. A. (1999) A UmuD C-dependent pathway for spontaneous G:C to C:G transversions in stationary phase *Escherichia coli* mut Y. *Mutat. Res.* 435(1), 77-80.

Togna, A. P., Shuler, M. L., y Wilson, D. B. (1993) Effect of plasmid copy number and runaway plasmid replication on over production and excretion of  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 9, 31-39.

Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Beguin, P. y Aubert, J. P. (1991) High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *FEBS Lett.* 282, 205–208.

Upadhyay, A., Murmu, A., Singh, A. y Panda, A. (2012) Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 7, 1-11.

Valax, P. y Georgiou, G. (1993) Molecular characterization of betalactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnol. Prog.* 9, 539–547.

Valdez-Cruz, N., Ramírez, O.T. y Trujillo-Roldán, M. A. (2011). Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioengineered Bugs*, 2(2), 105-110.

Ventura, S. (2005) Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb. Cell Fact.* 4 (11).

Vera, A., Gonzalez-Montalban, N., Aris, A. y Villaverde, A. (2007) The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 1101–1106.

Vicente, M., Chater, K.F. y de Lorenzo, V. (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol. Microbiol.* 33, 8-17

Villaverde, A. y Carrio, M. M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25, 1385–1395

Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E. y Cubarsi, R. (1993) Fine regulation of *cl857*-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3485–3487.

Wallace, R.J., Holmes, W.H. (1986) Maintenance coefficients and rates of turnover of cell material in *Escherichia coli* ML308 at different growth temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* 37, 317–320.

Warnes, A., y Stephenson, J. R. (1986) The insertion of large pieces of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids. *Plasmid*, 16, 116-123.

Weber, A.E. y San, K.Y. (1987) Persistence and expression of the plasmid pBR322 in *Escherichia coli* K12 cultured in complex medium. *Biotechnol. Lett.* 9, 757-760.

Weber, P. C., (1992) Oligomerization-mediated activation of plasmid-borne genes in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 97, 127-134.

Wei, D., Parulekar, S. J., Stark, B. C. y Weigand, W. A (1988) Plasmid stability and alpha-amylase production in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* TN106(pAT5). *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1010-1020.

Worrall, D. M. y Goss, N. H. (1989) The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Aust. J. Biotechnol.* 3, 28-32.

Yamamori, T y Yura, T. (1980) Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional control. *J. Bacteriol.* 142(3), 843-851.

Yee, L. and Blanch, H. W. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *BioTechnology* 10, 1550-1556.

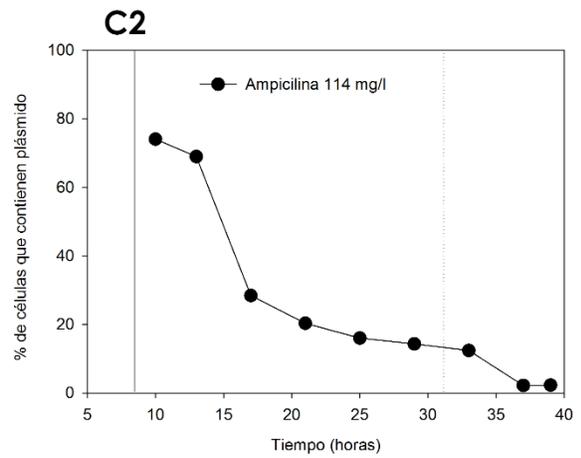
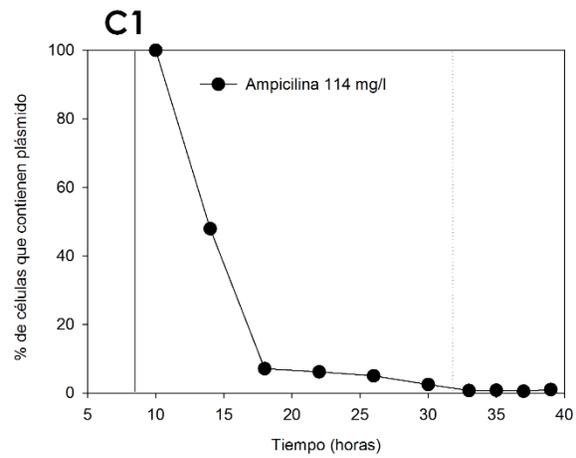
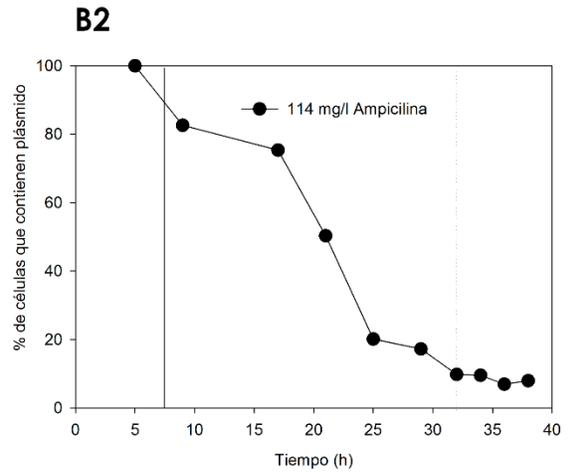
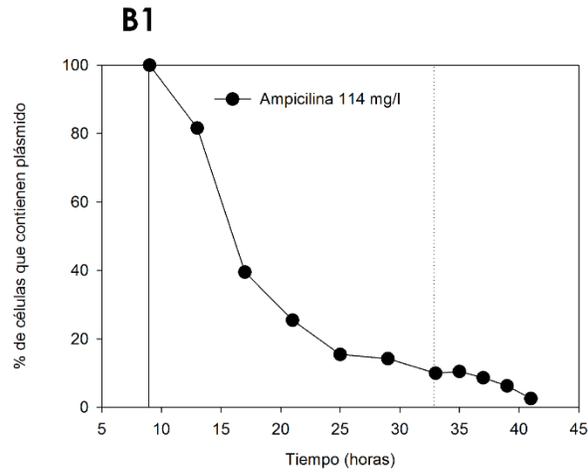
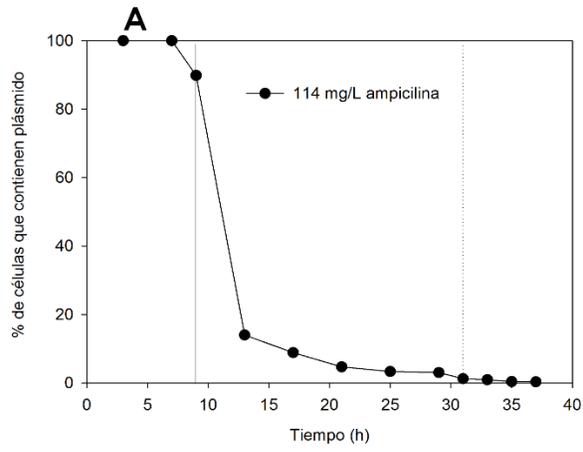
Yeppez, N. A. (2012) Evaluación de tasas bajas de crecimiento para la producción de proteína recombinante en un Sistema de cultivo continuo y termo-inducido de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Celaya.

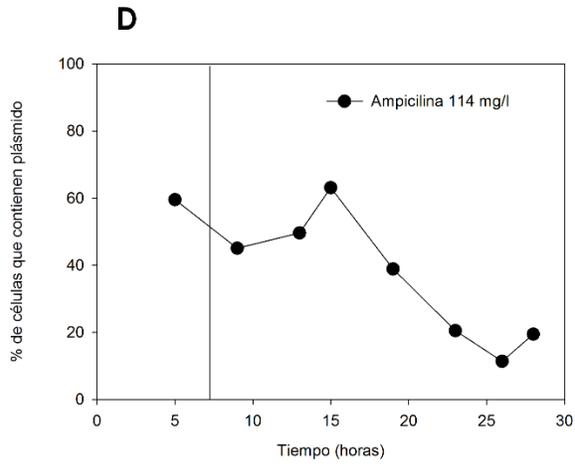
Yin, J., Li, G., Ren, X., y Herrler, G. (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Bacteriol.* 127, 335-347.

Yura, T. y Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 153-158.

# 11. ANEXOS

## 11.1 Fracción de células que contienen el plásmido





**Figura 22. Fracción de células que contienen el plásmido**

Línea vertical continua: inicio del cultivo continuo, línea vertical continua: inicio del estado de equilibrio. A) (35-42) °C, Frec= 120 ml/min, B1) (32-42) °C, Frec= 60 ml/min, B2) (32-42) °C, Frec= 60 ml/min (duplicado de B1), C1) (32-42) °C, Frec= 120 ml/min, C2) (32-42) °C, Frec= 120 ml/min (duplicado de C1) D) (32-40)°C, Frec= 60 ml/min.