



Universitat Autònoma de Barcelona

Escola d'Enginyeria

Departament d'Enginyeria Química

MODELITZACIÓ I  
ESTRATÈGIES DE PROCÉS  
PER A LA PRODUCCIÓ DE  
RhuA EN *Escherichia coli*.

Memòria que per optar al grau de  
Doctor per la Universitat Autònoma de  
Barcelona presenta Jordi Ruiz i Franco

Juny de 2012



JOSEP LÓPEZ SANTÍN, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, CARLES DE MAS ROCABAYERA, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i GLÒRIA GONZÀLEZ ANADÓN, Professora Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que el titulat en Enginyeria Química Jordi Ruiz i Franco ha dut a terme sota la nostra direcció el treball amb el nom "*Modelització i estratègies de procés per a la producció de RhuA en Escherichia coli*" que presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè es prengui coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, juny de 2012

Dr. Josep López Santín

Dr. Carles de Mas Rocabayera

Dra. Glòria González Anadón



Si ens aixequem ben d'hora, però  
ben d'hora ben d'hora ben d'hora, i  
no hi ha retrets i no hi ha excuses, i  
ens posem a pensar, som un país  
imparable. Creieu-me que som  
imparables.

Pep Guardiola

A l'Eugènia,



Els meus primers agraïments són per als directors d'aquest treball, en Carles, en Josep i la Glòria. No us donaré les gràcies per assessorar-me amb el vostre criteri (que també), ni per ser allà cada vegada que he necessitat una reunió (que també) sinó que sobretot pels ànims que m'heu donat i la confiança que heu fet en mi tot aquest temps, inclús quan ja no era a la UAB. Tot i que ha costat al final ho hem aconseguit.

Agraïments a tots els companys del grup amb qui he coincidit durant aquests anys; el Goyo, la Dolors, la Glòria rossa (Caminal), la Inés, amb qui vaig compartir els meus primers experiments, en Sergio, la Trinitat, la Carmen, la Milja, en Max, en Jaume per la seva herència, entusiasme i motivació, l'Alfred i l'IPTG. Però sobretot sobretot en Juanmi i la Cristina. Tot i que els camins s'han separat últimament aquí em teniu pel que necessiteu.

Gràcies als companys de despatx per fer-ho tot més distès i agradable; Torà, Carol, Marcel i Carles. Tot i que no va tocar ni un sol Euromillón m'enduc molt del meu pas per aquest despatx.

Moltes gràcies també a la Montse, la Nati i la Míriam per totes les gestions que m'han fet gairebé a diari.

Natasa, I've probably enjoyed your stays at the UAB more than you have. Thanks for being one of us and for your incessant cheerfulness. You have a friend in Catalunya.

Agraïments també a la Rosi i la Pili, en Juanma i la Margot i en Toni i l'Òscar de la Planta Pilot per a la seva ajuda durant els últims estudis d'aquest treball.

Gràcies al Josep Coma i la Núria Adroer per haver-me donat una altra oportunitat. Espero poder tornar-vos amb resultats tot el que heu fet per mi.

Moltes gràcies a la meva família. Als meus pares pels ànims i les forces que m'heu donat sempre per acabar aquest treball que fins fa un parell de mesos semblava que no havia d'acabar mai. Com no a la meva germaneta i la seva companya d'habitació. Yolanda, vas seguint tots els meus passos: carrera, doctorat, ordinador Apple...però millorant-los en tots els sentits. Conec poca gent amb la teva capacitat (no t'acostumis a que et digui aquestes coses). Tampoc vull deixar-me els que ja no hi són. No hi ha un sol dia que no pensi en vosaltres.

A la meva altra família, la de cada diumenge. Gràcies per haver-me acollit com ho heu fet i fer-ho tot tan i tan fàcil. Anar a casa els (4) sogres i el iaio no havia estat mai tan divertit. Ah, i ja que hi som, aprofitaré per felicitar els recent casats; moltes felicitats Ferran i Maria. Gràcies també a la meva petita, la que m'ajuda a desconnectar quan estic ofuscat i no em diu mai que no a res.

I sí Eugènia, t'he deixat l'última per que com les postres, les coses bones es fan esperar. Moltes gràcies per tots aquests anys junts, i sobretot per aquests darrers 5 compartint-ho tot. Podria omplir pàgines i pàgines del que em dónes, m'ensenyes, m'inspires, em transmets i despertes en mi, però com que he de mirar de relacionar-ho amb la tesi seré ben clar: No hagués pogut sense tu. Així de fàcil. Tot el que va darrere d'aquesta pàgina t'ho dec a tu.



## ÍNDEX

<b>0</b>	<b>RESUM</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓ GENERAL</b> .....	<b>3</b>
1.1	<b>La Biotecnologia</b> .....	<b>3</b>
1.2	<b>La Biocatàlisi</b> .....	<b>5</b>
1.3	<b>Les Aldolases i la síntesi asimètrica</b> .....	<b>7</b>
1.3.1	Les Aldolases DHAP dependents .....	<b>10</b>
1.3.2	Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.....	<b>11</b>
1.4	<b>Producció de proteïnes recombinants en <i>E. coli</i></b> .....	<b>12</b>
1.4.1	El mercat de producció de proteïnes recombinants.....	<b>12</b>
1.4.2	<i>E. coli</i> com a microorganisme hoste.....	<b>13</b>
1.4.3	Producció de proteïnes recombinants en cultius d'alta densitat cel·lular d' <i>E. coli</i> .....	<b>16</b>
1.5	<b>Referències</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>CONTEXT I OBJECTIUS</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>28</b>
3.1	<b>Soques i plasmidis</b> .....	<b>28</b>
3.2	<b>Medis de cultiu</b> .....	<b>30</b>
3.3	<b>Condicions de cultiu i equipament</b> .....	<b>33</b>
3.4	<b>Purificació i immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en un sol pas per cromatografia d'afinitat a metalls (IMAC)</b> .....	<b>36</b>
3.4.1	Processament del brou de cultiu.....	<b>36</b>
3.4.2	Purificació i immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa .....	<b>37</b>
3.5	<b>Mètodes analítics</b> .....	<b>39</b>

	PÀGINA
3.5.1	Monitorització del creixement bacterià als cultius.....39
3.5.2	Quantificació de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.....39
3.6	<b>Referències</b> .....43
<b>4</b>	<b>PURIFICACIÓ I IMMOBILITZACIÓ DE RHUA PROCEDENT DE CULTIUS D'ALTA DENSITAT CEL·LULAR</b> .....44
4.1	<b>Introducció i objectius</b> .....45
4.1.1	Marc general de la purificació de proteïnes recombinants.....45
4.1.2	Procés de purificació i immobilització en un sol pas aplicat a Ramnulosa 1-fosfat aldolasa .....49
4.1.3	Objectius.....51
4.2	<b>Materials i mètodes</b> .....51
4.2.1	Soques i plasmidis.....51
4.2.2	Medis de cultiu.....52
4.2.3	Equipament de procés (no analític) utilitzat.....52
4.2.4	Condicions de cultiu.....52
4.2.5	Mètodes analítics per al seguiment del procés de producció.....53
4.2.6	Immobilització de RhuA sobre suports IMAC.....54
4.3	<b>Resultats i discussió</b> .....54
4.3.1	Caracterització dels derivats immobilitzats.....54
4.3.2	Procedència de l'extracte cel·lular.....60
4.3.2.1	Extracte cel·lular procedent de cultius amb limitació de nutrients a 37°C.....60
4.3.2.2	Extracte cel·lular procedent de cultius amb limitació de nutrients a 28°C.....62
4.3.2.3	Extracte cel·lular de cultius duts a terme a 37°C amb excés de nutrients.....64
4.4	<b>Conclusions</b> .....67
4.5	<b>Referències</b> .....69

	PÀGINA
<b>5 MODELITZACIÓ MATEMÀTICA DE LA PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA</b>	
<b>1-FOSFAT ALDOLASA.....</b>	<b>73</b>
5.1 <b>Introducció i objectius.....</b>	<b>74</b>
5.1.1 La modelització matemàtica aplicada.....	74
5.1.2 Tipus generals de models matemàtics.....	75
5.1.3 Etapes de la modelització de processos.....	76
5.1.4 Models matemàtics aplicats a bioprocessos.....	77
5.1.5 Objectius.....	82
5.2 <b>Materials i mètodes.....</b>	<b>83</b>
5.2.1 Soques i plasmidis.....	83
5.2.2 Medis de cultiu.....	83
5.2.3 Equipament de procés (no analític) utilitzat.....	84
5.2.4 Condicions de cultiu.....	84
5.2.5 Cinètiques de creixement.....	85
5.2.6 Mètodes analítics.....	86
5.2.7 Tractament matemàtic i estimació de paràmetres.....	86
5.3 <b>Desenvolupament del model matemàtic.....</b>	<b>88</b>
5.3.1 Evidències experimentals.....	88
5.3.2 Minimització d'efectes no desitjats.....	89
5.3.3 Símbols i nomenclatura utilitzada.....	91
5.3.4 Creixement no induït.....	92
5.3.5 Fase d'inducció .....	93
5.4 <b>Resultats i discussió.....</b>	<b>95</b>
5.4.1 Creixement no induït.....	95
5.4.2 Fase d'inducció.....	97
5.5 <b>Validació del model matemàtic.....</b>	<b>110</b>
5.5.1 Problemàtica de l'acumulació de glucosa.....	110

	<b>PÀGINA</b>
5.6 <b>Conclusions</b> .....	113
5.7 <b>Referències</b> .....	114
<b>6 ESTRATÈGIES ALTERNATIVES D'ADDICIÓ DE NUTRIENTS PER A LA MILLORA DE LA PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN CULTIUS A ESCALA LABORATORI</b> .....	<b>118</b>
6.1 <b>Introducció i antecedents</b> .....	118
6.2 <b>Objectius</b> .....	121
6.3 <b>Materials i mètodes</b> .....	121
6.3.1 Soques i plasmidis.....	121
6.3.2 Medis de cultiu.....	121
6.3.3 Equipament de procés (no analític) utilitzat.....	121
6.3.4 Condicions de cultiu.....	122
6.3.5 Mètodes analítics.....	123
6.4 <b>Resultats i discussió</b> .....	123
6.4.1 Regió de treball.....	123
6.4.2 Cultiu amb perfil d'alimentació establert pel model de producció.....	125
6.4.3 Estudis de seguiment del creixement per recompte cel·lular per a la definició d'estratègies d'alimentació de nutrients durant l'etapa d'inducció.....	130
6.4.4 Possibles polítiques d'alimentació de nutrients.....	135
6.4.5 Cultius amb alimentació lineal de nutrients.....	137
6.4.6 Consum de substrat segons l'estratègia alternativa implementada.....	140
6.5 <b>Conclusions</b> .....	141
6.6 <b>Referències</b> .....	142
<b>7 ADDICIÓ COORDINADA D'AMINOÀCIDS PER A LA MILLORA DE LA QUALITAT DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN CULTIUS D'ALTA DENSITAT CEL·LULAR D'<i>E. coli</i></b> .....	<b>144</b>
7.1 <b>Introducció</b> .....	144

	PÀGINA
7.1.1 Resposta restrictiva (stringent response) .....	144
7.1.2 Implementació d'estratègies alternatives.....	145
7.2 <b>Objectius</b> .....	150
7.3 <b>Materials i mètodes</b> .....	150
7.3.1 Soques i plasmidis.....	150
7.3.2 Medis de cultiu.....	150
7.3.3 Equipament de procés (no analític) utilitzat.....	150
7.3.4 Condicions de cultiu.....	151
7.3.5 Mètodes analítics.....	152
7.4 <b>Resultats i discussió</b> .....	152
7.4.1 Estudi de la composició de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.....	152
7.4.2 Determinació de les quantitats necessàries de cada aminoàcid.....	155
7.4.3 Produccions totals i evolució de la biomassa al sistema.....	156
7.4.4 Qualitat de la proteïna sintetitzada.....	159
7.4.5 Possible relació amb la seqüència d'aminoàcids de RhuA.....	161
7.5 <b>Conclusions</b> .....	166
7.6 <b>Referències</b> .....	168
<b>8 PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN PLANTA PILOT</b> .....	<b>171</b>
8.1 <b>Introducció i antecedents</b> .....	171
8.2 <b>Objectius</b> .....	174
8.3 <b>Materials i mètodes</b> .....	174
8.3.1 Soques i plasmidis.....	174
8.3.2 Medis de cultiu.....	174
8.3.3 Equipament de procés (no analític) utilitzat.....	175
8.3.4 Condicions de cultiu.....	175

---

	<b>PÀGINA</b>
8.3.5 Mètodes analítics.....	177
8.3.6 Immobilització de RhuA sobre suports IMAC.....	177
8.4 <b>Resultats i discussió</b> .....	<b>178</b>
8.4.1 Etapes prèvies al creixement i producció en planta pilot (desenvolupament de l'inòcul) .....	178
8.4.2 Evolució del procés .....	179
8.4.3 Nivells de proteïna.....	184
8.4.4 Comparació amb altres estratègies.....	186
8.4.5 Immobilització.....	190
8.5 <b>Conclusions</b> .....	<b>191</b>
8.6 <b>Referències</b> .....	<b>192</b>
<b>9 CONCLUSIONS GENERALS I TREBALL FUTUR</b> .....	<b>194</b>
<b>10 LLISTAT DE PUBLICACIONS</b> .....	<b>197</b>

## RESUM

Aquest treball es centra en l'estudi del procés de producció de la proteïna Ramnulosa 1-fosfat aldolasa (RhuA) en cultius d'alta densitat cel·lular d'*Escherichia coli* M15ΔglyA [pREP-4] pQEαβrham i la seva posterior purificació i immobilització a partir de cromatografia d'afinitat a metalls.

En primer lloc, i partint d'estratègies de producció en bioreactor a escala laboratori implementades en treballs anteriors, s'estudia l'efecte de l'estratègia de cultiu sobre els rendiments de purificació de RhuA respecte de la resta de proteïnes citoplasmàtiques produïdes pel microorganisme hoste [capítol 4 – *Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular*]. Es determina que certes estratègies de cultiu poden afectar negativament les propietats de la proteïna recombinant produïda amb repercussions no només en termes d'activitat enzimàtica si no també en quant als rendiments en el procés de purificació posterior. Així doncs, s'analitza el procés d'obtenció de RhuA de manera global i no únicament en l'etapa de producció en bioreactor.

En segon lloc, havent definit un nou paràmetre clau en el procés, la qualitat de la proteïna recombinant com a unitats d'activitat per mil·ligram de RhuA ( $UA \cdot mg^{-1}_{RhuA}$ ), es modelitza matemàticament el procés de producció en bioreactor [capítol 5.- *Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa*] per tal d'identificar l'efecte de les principals variables sobre aquest paràmetre i poder establir i implementar estratègies de control amb l'objectiu de minimitzar els efectes negatius sobre la qualitat proteica. La modelització es realitza sobre una estratègia de procés base diferent de les heretades de treballs anteriors, que permet obtenir qualitats proteiques de partida superiors i identifica l'acumulació de glucosa, principal font de carboni, com a possible causa de degradació proteica ben entrada la fase d'inducció del cultiu a partir d'IPTG.

Per altra banda, l'observació de la dinàmica dels processos de producció en bioreactor i l'efecte de la inducció sobre el creixement cel·lular i sobre la pròpia producció de RhuA planteja la necessitat de redefinir les estratègies de cultiu implementades durant l'etapa d'inducció [capítol 6.- *Estratègies alternatives d'addició de nutrients per a la millora de la producció de RhuA*]. Gairebé des de l'inici de l'etapa d'inducció del cultiu recombinant, s'observa que la replicació cel·lular s'atura, la qual cosa entra en

contradicció amb els perfils exponencials pre-programats d'alimentació de nutrients establerts fins al moment en aquesta etapa. S'estableixen perfils alternatius d'alimentació basats en la modelització de procés i l'estudi de la dinàmica del consum de glucosa. Algunes d'aquestes estratègies porten a l'obtenció de nivells de proteïna recombinant intracel·lular considerablement superiors als obtinguts amb estratègies de cultiu estàndard.

La sobrecàrrega metabòlica que representa per al cultiu la producció de RhuA, sumat al fet que la soca de treball presenta una auxotròfia per glicina com a marcador de selecció, fa que es plantegin noves estratègies de procés durant la fase d'inducció del cultiu [capítol 7.- *Addició coordinada d'aminoàcids per a la millora de la qualitat de RhuA*] per a reduir l'estrès cel·lular i els processos proteolítics derivats d'aquest. L'estudi de l'estructura primària de RhuA porta a identificar els aminoàcids amb major presència a la seva seqüència i aquells que presenten proporcions considerablement allunyades de la mitjana de proteïnes citoplasmàtiques d'*E. coli*. Amb l'objectiu de reduir el conjunt de respostes cel·lulars amb efectes negatius sobre la proteïna recombinant derivades de l'elevada demanda d'aminoàcids per a la seva sobreexpressió, l'addició al medi prèviament a la inducció del cultiu d'una certa quantitat dels aminoàcids identificats, porta en alguns casos a millores considerables en quant a la qualitat de la proteïna recombinant produïda.

En últim lloc, i amb l'objectiu d'avaluar la viabilitat del procés a una major escala [capítol 8.- *Producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en planta pilot*], es porta la producció de RhuA a planta pilot amb una estratègia de cultiu a l'etapa d'inducció resultant d'una combinació de les estratègies amb millors resultats a escala laboratori. Si bé només s'ha realitzat un únic estudi en planta pilot, i per tant es difícil extreure'n conclusions més fermes, els resultats obtinguts suposen uns augments molt importants en termes d'activitat enzimàtica respecte el millor dels resultats a escala laboratori i augments considerables dels nivells de proteïna intracel·lular acumulada respecte cultius estàndard induïts a la mateixa relació inductor – biomassa. Per altra banda, els rendiments assolits en la immobilització per cromatografia d'afinitat a metalls són superiors al 90 %.



## 1. INTRODUCCIÓ GENERAL

### 1.1. La Biotecnologia

Biotecnologia és, en general, el terme emprat per tal de descriure la utilització i/o modificació dels processos biològics per a un finalitat determinada. Segons l' **OECD** (Organització per al Desenvolupament i Cooperació Econòmica), la biotecnologia és l'aplicació dels principis científics i enginyerils en el processament de materials a través d'agents biològics. Aquest és un camp molt ampli i és per això que tradicionalment s'ha establert una classificació en funció del sector final d'aplicació. Així doncs, la biotecnologia moderna es sol categoritzar en els següents camps:

- *Biotecnologia blanca o industrial*, que persegueix l'equilibri entre la satisfacció de la demanda de determinats productes al mercat i l'impacte ambiental associat als processos per a la seva obtenció. La utilització d'enzims, microorganismes i productes amb base "bio" en el sector químic, alimentari, tèxtil i energètic entre d'altres, permet no només el desenvolupament de processos industrials competitius en termes econòmics, si no que a més, pot representar importants fonts d'estalvi d'aigua, energia i matèries primes així com una menor generació de residus. Aquesta disciplina s'està introduint progressivament al mercat de la indústria química (química fina, farmacèutica, productes de tipus *bulk*, plàstics...) amb creixements notables que segons dades bibliogràfiques es xifren a partir del 5% l'any 2006 fins a 10 – 20% l'any 2010 [1]. La biotecnologia industrial es basa principalment en la biocatàlisi, fermentació i cultius microbiològics juntament amb la genètica molecular i l'enginyeria enzimàtica i metabòlica [1]. L'anàlisi estadístic de les biotransformacions industrials actuals (Figures 1.1 i 1.2) permet classificar la tipologia i el camp d'utilització dels productes que se n'obtenen on destaquen principalment els sectors farmacèutic i alimentari amb percentatges al voltant del 50% i 20% respectivament [2].
- *Biotecnologia verda*, amb aplicació directa al sector agrari. El desenvolupament i la utilització de cultius modificats permet reduir les necessitats de treball de la terra (i per tant, pot representar un estalvi important en combustibles fòssils

per a la maquinària) , disminuir els requeriments de pesticides, i l'adaptació a condicions climàtiques desfavorables per al creixement.

- *Bioteχνologia vermella o sanitària*, que incideix directament en les àrees de desenvolupament de nous medicaments (incloent teràpies avançades com la teràpia cel·lular i genètica), vacunes i diagnosi.
- *Bioteχνologia blava*, que fa referència a l'explotació dels recursos marins (algues, microorganismes extremòfils i altres) en processos de tipus industrial, alimentari i sanitari.

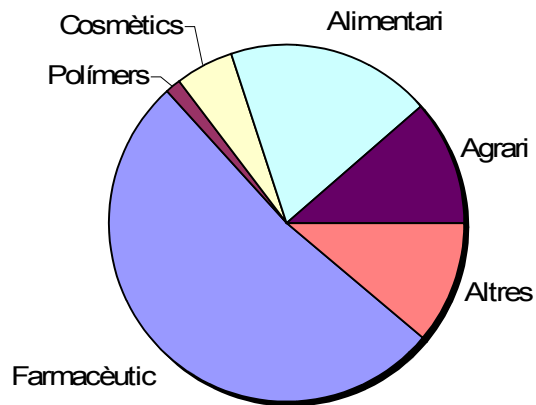


Figura 1.1.- Sectors de destí dels productes obtinguts en les biotransformacions industrials [2].

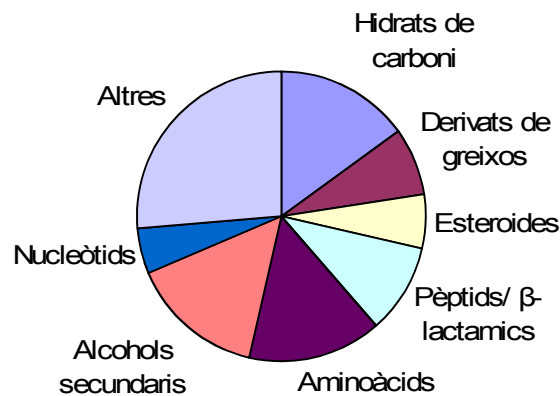


Figura 1.2.- Classificació dels principals productes obtinguts en les biotransformacions industrials [2].

## 1.2. La Biocatàlisi

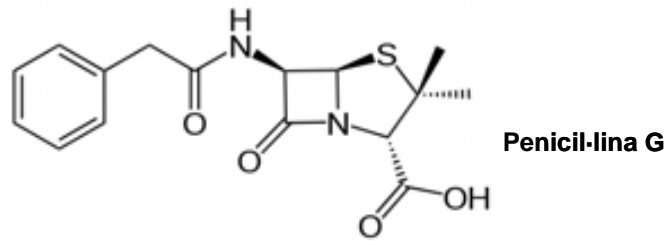
La biocatàlisi pot definir-se de manera general com un procés en el qual s'utilitza una molècula d'origen biològic (normalment un o diversos enzims) per tal de dur a terme una determinada reacció química amb elevada especificitat i selectivitat per als substrats i productes finals de la reacció respectivament. Les biotransformacions dutes a terme a través d'enzims purificats total o parcialment i/o microorganismes s'han introduït progressivament en la indústria química, des de la producció de principis químics tipus *bulk* com productes d'alt valor afegit emmarcats al sector de la química fina.

La biocatàlisi se sol definir o descriure a partir de la comparació amb els processos químics – orgànics tradicionals a nivell d'avantatges i inconvenients front d'aquests últims [3-5]. Es consideren com a principals avantatges els següents:

- La utilització d'un enzim en una reacció de síntesi permet a més d'incrementar la selectivitat i/o regioselectivitat d'aquesta, la diferenciació entre substrats enantiòmers.
- El fet que un enzim presenti activitat a temperatura quasi ambient i òptims al voltant de 40-60°C, pH al voltant de la neutralitat (entre 5-7 unitats) i en medi aquós, permet el desenvolupament de processos industrials en condicions "mediambientalment sostenibles" allunyades dels extrems als quals s'hauria de treballar a través de síntesi orgànica tradicional. A la figura 1.3 es mostra la

comparativa en la reacció d'hidròlisi de Penicil·lina G per a l'obtenció de l'àcid 6-aminopenicil·linànic (per a la preparació de penicil·lines i cefalosporines sintètiques) conduït a través de processos biocatalítics front els químics tradicionals [3].

- Un procés biocatalitzat, en general, porta a una menor generació de productes secundaris no desitjats.
- Els enzims, quan s'utilitzen en la seva forma immobilitzada en un suport sòlid, poden ser reutilitzats en successius lots de producció ja que es poden recuperar fàcilment del medi de reacció a partir d'operacions mecàniques.
- La gestió d'un enzim com a residu no presenta grans complicacions ja que pot ser degradat biològicament.



Procés Enzimàtic	
Enzim immobilitzat (tm)	1
Amoníac (tm)	45
Aigua (m <sup>3</sup> )	10000
Temperatura d'operació (°C)	30

Procés Químic	
Dimetilclorosilà (tm)	300
N,N'-Dimetilànilina (tm)	800
Fosfopentaclorur (tm)	600
Amoníac (tm)	160
Diclorometà (m <sup>3</sup> )	4200
n-butanol (m <sup>3</sup> )	4200
Temperatura d'operació (°C)	-40

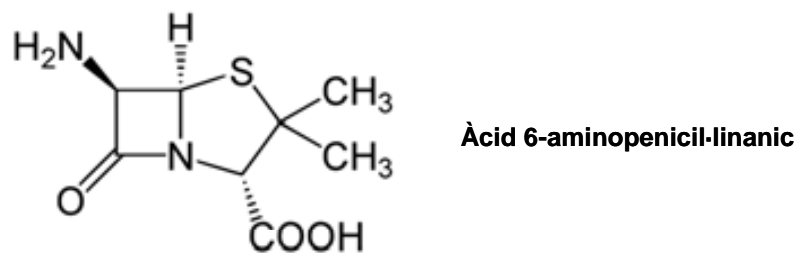


Figura 1.3.- Comparativa entre els processos enzimàtic i químic per a la hidròlisi de la Penicil·lina G. Les dades tabulades fan referència a la hidròlisi de 1000 tones de Penicil·lina G [3].

No obstant però, la biocatàlisi presenta certs inconvenients front la síntesi orgànica tradicional:

- Els enzims presenten baixes estabilitats en certes condicions de reacció; pH i temperatura extrems, presència de dissolvents orgànics agressius...
- Concentracions relativament baixes de determinats elements metàl·lics poden conduir a la inhibició de la seva activitat.
- La presència d'altres enzims en el medi de reacció (peptidases) pot conduir a reaccions paral·leles d'hidròlisi i per tant disminuint els rendiments globals del procés.
- En termes econòmics, els cicles de desenvolupament de processos enzimàtics per a una nova aplicació són sovint massa llargs, la qual cosa condueix a que se'n desestimi la seva utilització front als processos químics tradicionals.

### 1.3. Les aldolases i la síntesi asimètrica

Les aldolases (*EC 4.1.2.*; *4.1.3.*) són un tipus d'enzims que pertanyen al grup de les liases que catalitzen la reacció química d'addició aldòlica, és a dir, la reacció reversible de formació d'enllaços C-C a través de l'atac nucleofílic d'una cetona o compost donador a un aldehyd (o cetona) o compost acceptor. Tot i que la majoria d'aldolases presenten especificitat pel substrat donador, toleren un ampli ventall de substrats acceptors, de cadenes de longitud entre 1 i 6 carbonis [6]. Com a conseqüència d'aquesta reacció, els productes sintetitzats presenten dos (o més) centres quirals adjacents nous [7] (Figura 1.4).

La formació i el trencament d'enllaços C-C és una de les peces clau de la química orgànica, i un dels principals processos del metabolisme dels organismes vius. En processos de síntesi química convencionals, és a dir, sense especificitat per als substrats de la reacció, l'obtenció de compostos amb una estereoquímica determinada passa per etapes de protecció i desprotecció de grups funcionals que s'ha d'evitar que reaccionin. Aquests processos consumeixen temps i recursos i sovint condueixen a baixes selectivitats en quant als productes obtinguts.

El fet que les aldolases permetin la síntesi de productes amb una estereoquímica específica, fa d'aquests enzims eines molt interessants per a l'obtenció de derivats de sucres no convencionals com ara les estatines (per al tractament del colesterol),

epotilones (per a la inhibició de la divisió de les cèl·lules canceroses), àcids siàlics (amb importants funcions de senyalització cel·lular) i aminopoliols precursors d'imonociclitol. Aquests últims juguen un paper molt important en la inhibició d'enzims de les famílies de les glicosidases i glicosiltransferases com a eines de control de la inhibició enzimàtica de la hidròlisi d'enllaços glicosídics, amb importants efectes en el control de les funcions cel·lulars [8-10]. Aquests enzims intervenen en processos de digestió intestinal, sistemes de control de qualitat al reticle endoplasmàtic i en el catabolisme de glicoconjugats entre d'altres. És per això doncs, que la seva inhibició pot representar efectes molt importants en el catabolisme d'hidrats de carboni, maduració i transport de glicoproteïnes i en l'alteració dels processos de reconeixement cèl·lula – cèl·lula i/o cèl·lula – virus. Per tant doncs, els iminiclitols i d'altres mimètics d'hidrats de carboni, poden presentar aplicacions terapèutiques importants com a agents antitumorals i antiinfecciosos entre d'altres [11].

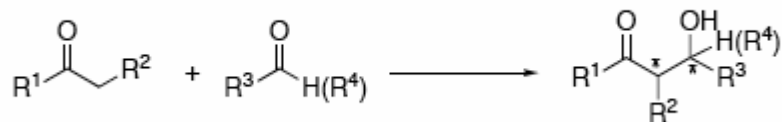


Figura 1.4.- Reacció típica d'addició aldòlica. El producte resultant presenta dos centres quirals nous adjacents (\*) [7].

Les aldolases es solen classificar principalment en funció de dos criteris; el seu mecanisme de catàlisi i el substrat donador o nucleòfil de la reacció aldòlica per al qual són dependents [6, 12-14]. Així doncs, tot i que les aldolases toleren un gran nombre de substrats acceptors, poden actuar com a nucleòfils dihidroxiacetona fosfat (DHAP), Glicina, Acetaldehid, Piruvat i Fosfoenolpiruvat (PEP) (Figura 1.5). Per altra banda, atenent al mecanisme de reacció, les aldolases es poden classificar en tipus I i II. Les aldolases de tipus I no requereixen l'ajut d'un cofactor ja que l'activació de l'atac nucleofílic es du a terme a partir de la formació d'una base de Schiff [6, 14-16] en un residu de lisina al centre actiu de l'enzim prèviament a l'addició estereoespecífica a l'acceptor (Figura 1.6). Aquestes, són aldolases que principalment s'han trobat en espècies animals i plantes superiors, tot i que també certes referències les situen en organismes procariotes [6]. Les aldolases de tipus II, que principalment s'han trobat en espècies procariotes i eucariotes inferiors, presenten un mecanisme de reacció basat en el suport d'un cofactor ( $Zn^{2+}$ ) que actua com un àcid de Lewis (acceptor d'electrons)

al centre actiu de l'enzim per tal d'activar el substrat donador de la reacció aldòlica [6, 14] (Figura 1.7).

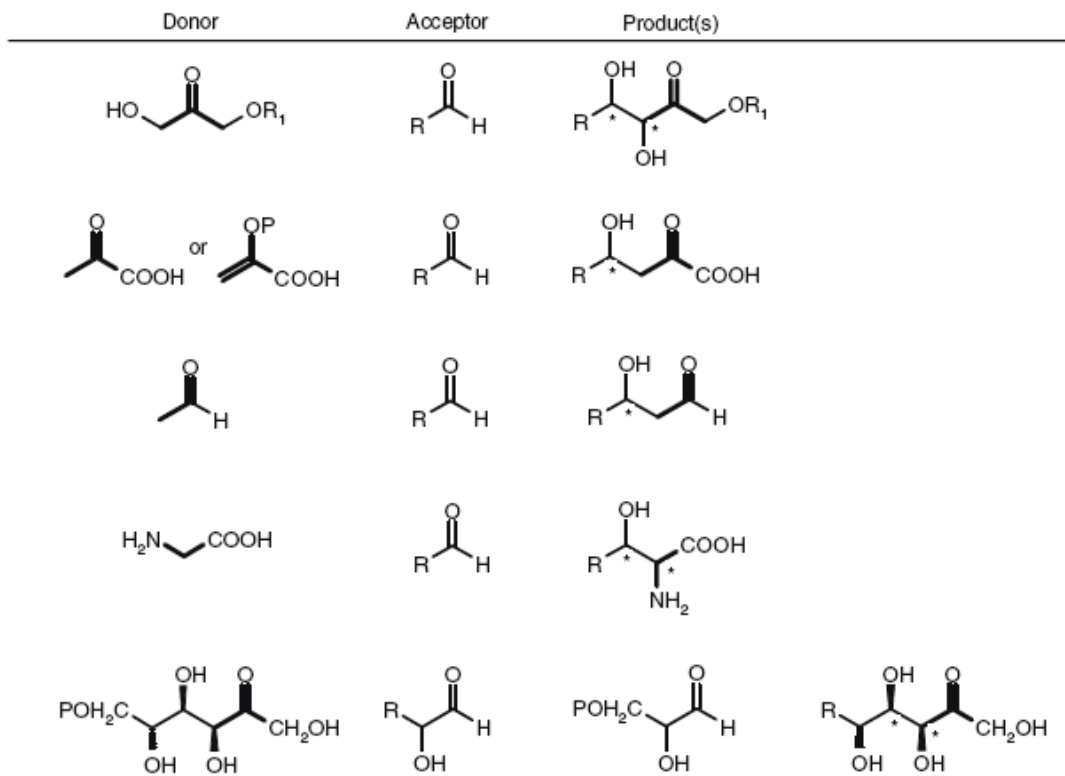


Figura 1.5.- Classificació de les aldolases en funció del substrat donador de la reacció aldòlica. R<sub>1</sub> pot ser un àtom d'hidrogen (H) o bé una molècula de fosfat (PO<sub>4</sub>), P és una molècula de fosfat [6].

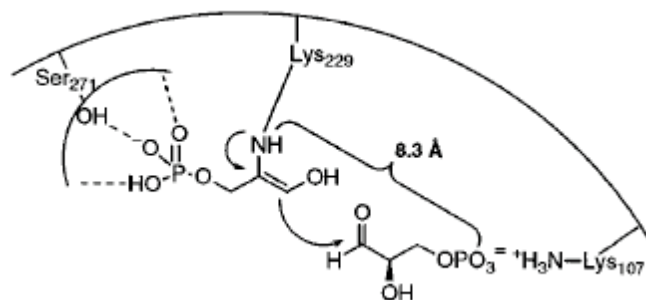


Figura 1.6.- Mecanisme de formació de base de Schiff entre residus conservats de lisina en el centre actiu d'aldolases de tipus I i el substrat donador de la reacció aldòlica [14].

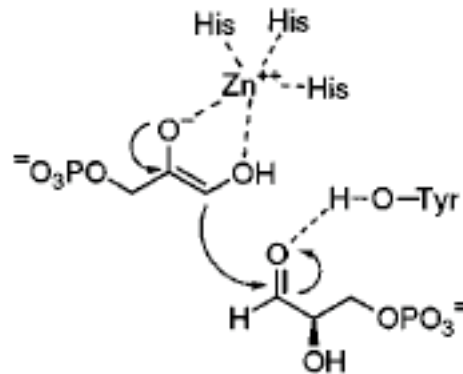


Figura 1.7.- Mecanisme d'activació del substrat donador de la reacció aldòlica a partir del cofactor  $Zn^{2+}$  de les aldolases de tipus II [14].

### 1.3.1. Les aldolases DHAP dependents

Les aldolases DHAP dependents són enzims que catalitzen la reacció reversible d'addició aldòlica entre dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i D-gliceraldehid 3-fosfat o L-lactaldehid. Són quatre els enzims que formen part d'aquest grup que presenta especificitat per a DHAP com a substrat donador de la reacció aldòlica generant productes d'estereoquímica complementària en els carbonis C3 i C4 quan catalitzen la reacció amb els seus substrats característics (Figura 1.8). Els enzims d'aquest grup però; Fructosa 1,6 bifosfat – aldolasa (FDP), Fuculosa 1 fosfat – aldolasa (FucA), Tagatosa 1,6 bifosfat – aldolasa (TDP) i Ramnulosa 1 fosfat aldolasa (RhuA), tot i presentar una major afinitat per al gliceraldehid 3 – fosfat i lactaldehid, poden tolerar un gran nombre de substrats acceptors; aldehids alifàtics, aldehids  $\alpha$  – heterosubstituïts fosforil·lats o no fosforil·lats, la qual cosa els situa com a eines molt valuoses per a la síntesi de monosacàrids i derivats. En funció del seu mecanisme, de catàlisi, l'activació del substrat donador, en aquest cas DHAP, es du a terme de manera característica. Per al cas de les aldolases de tipus I (FDP i TDP), el grup amino lliure d'un residu específic de lisina al centre actiu de l'enzim reacciona amb DHAP per a formar una base de Schiff, que després de desprotonar-se forma una enamina que posteriorment reaccionarà amb el substrat acceptor. Per al cas de les aldolases de tipus II (FucA i



RhuA), el cofactor  $Zn^{2+}$  polaritza el grup carbonil de DHAP per a posteriorment reaccionar amb el substrat acceptor de la reacció aldòlica.

D'altra banda, han estat descrits dos enzims capaços d'emprar dihidroxiacetona (DHA) com substrat donador [17].

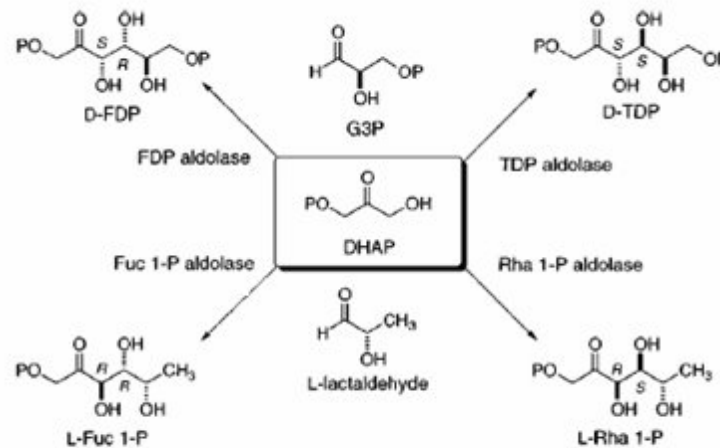


Figura 1.8.- Enzims de la família de les aldolases DHAP dependents i productes d'estereoquímica complementària a C3 i C4 formats en catalitzar la reacció aldòlica entre els substrats característics.

### 1.3.2. Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

La Ramnulosa 1 – fosfat aldolasa és un enzim que pertany al grup de les aldolases DHAP dependents que catalitza la reacció d'addició aldòlica entre DHAP i L-lactaldehid (Figura 1.9). L'enzim, amb mecanisme de catàlisi de tipus II, és a dir, a través de l'ús de  $Zn^{2+}$  com a cofactor, presenta una estructura homotetramèrica (Figura 1.10) amb 274 aminoàcids per subunitat i una massa molecular de 30149 Da [18, 19]. Els centres actius de l'enzim, 1 per subunitat, es construeixen al voltant del cofactor a partir de certs residus que actuen com a lligands d'aquest; 3 residus d'histidina i un d'àcid glutàmic propis de la subunitat i un residu de treonina de la subunitat veïna [19].

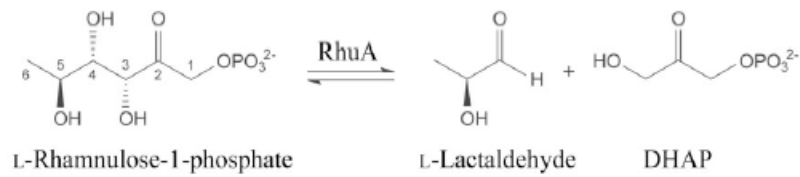


Figura 1.9.- Reacció reversible d'addició aldòlica entre DHAP i L-lactaldehid catalitzada per Ramnulosa 1 – fosfat aldolasa [19].

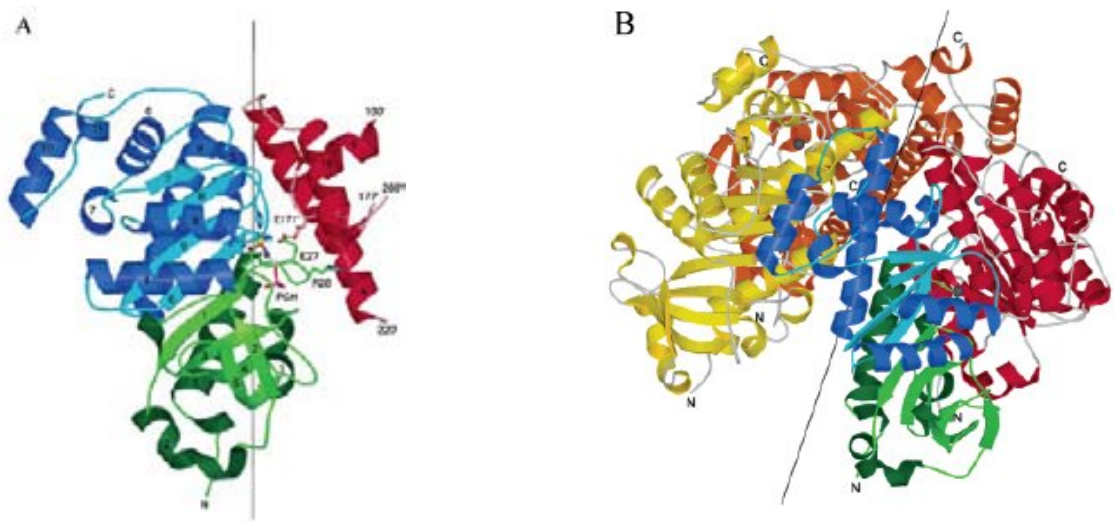


Figura 1.10.- Estructura tridimensional de la Ramnulosa 1 – fosfat aldolasa. A) Estructura d'una subunitat i la regió de la subunitat veïna que intervenen en la formació del centre actiu. B) Estructura del tetràmer [18].

#### 1.4. Producció de proteïnes recombinants en *E. coli*

##### 1.4.1. El mercat de producció de proteïnes recombinants

Els últims 20 anys han representat un increment considerable en el mercat de les proteïnes recombinants amb projeccions de quotes de mercat per sobre de 50,000 milions de dòlars l'any 2010 [20]. Els majors augments s'han produït en el desenvolupament de processos productius basats en cèl·lules de tipus animal (principalment en cèl·lules d'ovari de Hámster xinès) ja que en molts casos, la

complexitat de les macromolècules a produir per tal que siguin actives (certs patrons de plegament i determinades modificacions post-translacional com ara glicosilacions) no són possibles en microorganismes hostes com ara *E. coli* ja que no disposa de la maquinària sintètica necessària per tal de dur-ho a terme. No obstant però, la utilització d'*E. coli* com a sistema de producció de proteïnes recombinants continua sent àmpliament utilitzat gràcies als principals avantatges que presenta; creixement ràpid, alts rendiments de producció, fàcil manipulació i ampli coneixement del seu genoma que en permet la seva enginyeria per a una aplicació determinada. És per això doncs, que en processos de producció de proteïnes recombinants no glicosilades, *E. coli* és sempre la primera elecció com a microorganisme hoste.

### 1.4.2. *E. coli* com a microorganisme hoste

*Escherichia coli* és un bacteri que pertany al grup dels entèrics, per tant, Gram negatiu, no esporulat, anaerobi facultatiu i mòbil. El seu hàbitat natural és l'intestí dels animals de sang calenta (inclòs l'ésser humà), on presenta funcions de síntesi de vitamina K i contribueix a l'ambient anaerobi de l'intestí gruixut. Aquest gènere de bacteris presenta, en general, requeriments nutricionals senzills, de manera que pot metabolitzar una gran varietat de fonts de carboni tals com sucres, aminoàcids, àcids orgànics i multiplicar-se en medis en presència de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i elements traça. En general, la majoria de soques d'*E. coli* no són patògenes, tot i que algunes poden conduir a quadres diarreics a partir de la síntesi de l'antigen K [21], que permet la colonització de l'intestí prim.

A nivell genètic, *E. coli*, com a procariota presenta una organització de l'ADN en forma circular ubicat al citoplasma cel·lular sense cap tipus de membrana de separació entre cromosoma i citoplasma tal i com succeeix amb els organismes eucariotes. Per al seu ús tant en recerca com a nivell de producció industrial, sovint es treballa amb varietats genotípiques que presenten certes diferències a nivell genètic front les seves soques parentals. Així doncs, en *E. coli*, les varietats més àmpliament utilitzades per a la producció de proteïnes recombinants no glicosilades sobre les quals es practiquen certes modificacions genètiques són les de tipus B i tipus K12. En general, aquestes variacions front les soques salvatges persegueixen augments en els rendiments globals de procés. En alguns casos les modificacions genètiques estan orientades a la minimització de la formació de subproductes que poden resultar inhibitoris per al desenvolupament i creixement del cultiu. En d'altres, les modificacions silencien

l'expressió de certes proteases que actuen degradant els productes de síntesi (proteïnes recombinants) quan es dona una certa acumulació al citoplasma de la soca.

Paral·lelament, els bacteris poden presentar elements genètics que es repliquen independentment de l'ADN cromosòmic; els plasmidis. Aquests elements, dels quals n'hi pot haver diverses còpies en una mateixa cèl·lula, estan formats típicament per una cadena circular (tot i que també n'existeixen de lineals) d'ADN.

Els plasmidis contenen informació genètica que atorga a la cèl·lula portadora unes característiques que la distingeixen de la cèl·lula no portadora. Un dels grups de plasmidis més estudiats són els que contenen gens de resistència, que proporcionen a la cèl·lula portadora la capacitat de desenvolupar-se en un medi de cultiu en presència d'un o diversos antibiòtics. Aquests elements són utilitzats com a eines molt valuoses en processos biotecnològics, ja que correctament dissenyats a partir de tècniques d'enginyeria genètica, poden contenir la informació necessària per a la síntesi de determinats productes que en alguns casos poden arribar al 50% del pes sec cel·lular [22].

Els plasmidis en general presenten una estructura genètica organitzada a partir dels següents elements:

- *Replicó*; o origen de replicació, que controla el nombre de còpies de plasmidi per cèl·lula. Per a sistemes de producció de proteïnes recombinants, normalment es treballa amb derivats de ColE1 o P15A [23, 24].
- *Marcador de resistència*; que conté la informació per a atorgar a la cèl·lula la resistència a antibiòtics generalment utilitzats en cultius recombinants, com ara l'ampicil·lina, kanamicina, cloramfenicol o tetraciclina [23]. En alguns casos però, i degut a la restricció de l'ús d'antibiòtics com a eines de pressió selectiva en el creixement de cultius microbians [24], es treballa amb sistemes de deleció – complementació genètica, és a dir, amb soques a les que a partir de tècniques d'enginyeria genètica se'ls ha eliminat la capacitat de síntesi d'un determinat compost essencial per al seu desenvolupament. Introduint els gens complementaris corresponents al plasmidi, s'exerceix la pressió selectiva necessària tal que únicament les cèl·lules portadores del plasmidi puguin desenvolupar-se en medis sense suplement d'aquest compost essencial [24, 25].
- *Promotor regulable (generalment)*; per a controlar l'expressió dels gens involucrats en la síntesi dels productes d'interès codificats al plasmidi, a partir d'una inducció química o tèrmica. Un dels sistemes més àmpliament utilitzats per a la regulació de l'expressió de gens recombinants en *E. coli* són els basats

en l'operó *lac*, induïble en presència de lactosa o Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosid (IPTG) [26, 27]. L'operó *lac*, que conté els gens que codifiquen la informació per al metabolisme de la lactosa en bacteris similars a *E. coli*, s'activa en presència de lactosa (o un anàleg no metabolitzable com ara l'IPTG) i AMP cíclic. Aquest operó s'esquematitza a la Figura 1.11 i està constituït per tres gens (*lacZ*,*lacY*,*lacA*). En absència de glucosa al medi, se sintetitzen molècules d'AMP cíclic que formen el complex CAP amb les proteïnes receptores corresponents (CRP). Aquest complex s'enllaça a una regió determinada de l'operó augmentant l'afinitat de la mRNA polimerasa per al promotor (P). A partir de l'enllaç entre promotor (P) i mRNA polimerasa es transcriuen els gens *lacZ* (expressió de  $\beta$ -galactosidasa per a la hidròlisi de lactosa en galactosa i glucosa), *lacY* (expressió de la proteïna lac-permeasa responsable del transport de lactosa a l'interior de la cèl·lula) i *lacA* (expressió de tiogalactòsid transferasa, enzim no relacionat amb el metabolisme de la lactosa). El transport de lactosa (o IPTG) a l'interior de la cèl·lula juga un paper important en la regulació de tot el sistema, ja que a partir d'una transglicosilació duta a terme per l'enzim  $\beta$ -galactosidasa, es transforma en alolactosa, que s'enllaça a les molècules repressores del sistema evitant l'enllaç d'aquestes a la zona de l'operador O que no permetria al seu torn l'enllaç de la mRNA polimerasa a la zona P. Per altra banda, un segon punt important de regulació del sistema és la presència de glucosa al medi, que inhibeix la producció d'AMP cíclic que promou l'augment en l'afinitat de la mRNA polimerasa a la regió del promotor.

- *Seqüències típiques;* d'iniciació de traducció així com terminadors translacionals i traduccionals..
- *Informació genètica corresponent a la síntesi del producte d'interès;* on verdaderament es codifica la informació de la proteïna heteròloga objectiu del procés que es du a terme. En alguns casos, la seqüència corresponent a una determinada proteïna recombinant pot presentar certes adhesions corresponents a la informació genètica de proteïnes de fusió. Aquestes proteïnes (o sovint petits pèptids), poden representar certs avantatges en les etapes de purificació de la proteïna d'interès gràcies a la seva afinitat cap a determinats tipus de suport utilitzats en etapes de purificació i/o d'immobilització proteica [24, 28, 29]. En certs casos a més, donat que un dels principals problemes en la producció de proteïnes recombinants en *E. coli* és la formació de cossos d'inclusió per acumulació de proteïna recombinant i plegaments defectuosos, certes proteïnes de fusió augmenten la solubilitat de

la proteïna d'interès evitant la formació d'agregats proteics amb possible pèrdua d'activitat [24, 28, 29].

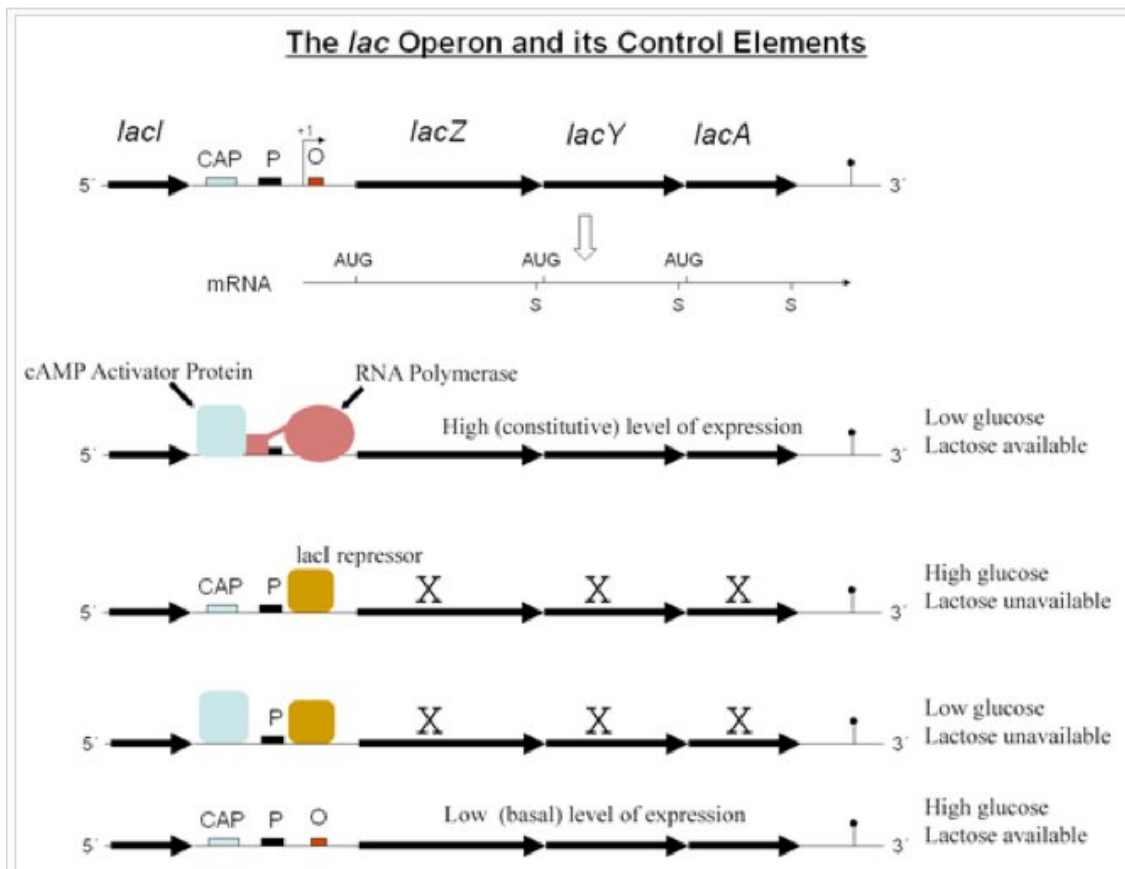


Figura 1.11.- Esquema de regulació de l'operó *lac*.

#### 1.4.3. Producció de proteïnes recombinants en cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli*

Els processos de producció de proteïnes recombinants, ja sigui a nivell industrial com al laboratori per a la realització d'assaigs, persegueixen l'optimització en la productivitat del compost d'interès. No obstant però, en aquest tipus de processos les condicions de treball poden tenir repercussions considerables en el metabolisme dels microorganismes conduint a situacions d'inhibició, no només del creixement sinó també en la síntesi dels compostos d'interès. És per això, que la condició indispensable per tal d'assolir l'èxit en un cultiu recombinant és l'estudi de la integració dels aspectes genètics de la soca de treball i les condicions operacionals del sistema.

Així doncs, en el desenvolupament d'un procés de producció de proteïnes recombinants en *E. coli* es tenen en compte temes d'enginyeria genètica per a la construcció de la soca amb millors propietats per a la síntesi del producte d'interès, composició del medi de cultiu adequat des del punt de vista dels requeriments nutricionals de la soca i altres particularitats del procés, així com aspectes de l'enginyeria clàssica per tal de definir les estratègies d'operació més adients.

Típicament, *E. coli* produeix acetat com a subproducte del creixement inclús en condicions aeròbiques utilitzant glucosa com a font de carboni. A nivells relativament baixos (al voltant de  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), aquest presenta un efecte inhibitori tant del creixement del cultiu com de la producció de proteïna recombinant per afecció de la maquinària sintètica relacionada amb els processos de transcripció i traducció [30]. Lògicament a més, la seva producció significa una diversificació de la font de carboni o substrat, que en altres condicions de procés hauria contribuït a la producció de biomassa o de proteïna recombinant [30]. La producció d'acetat o acetogènesi resulta de la necessitat de regeneració de  $\text{NAD}^+$  consumit durant la glucòlisi i del reciclat del coenzim A (CoASH) necessari per a convertir el piruvat a acetil-CoA com a punt de partida del cicle dels àcids tricarboxílics (Figura 1.12). Donat que el cicle dels àcids tricarboxílics oxida completament l'acetil-CoA a  $\text{CO}_2$  (amb  $\text{O}_2$  com a acceptor final d'electrons), l'acetogènesi només té lloc quan el cicle no funciona o bé quan el flux de carboni a les cèl·lules sobrepassa la seva capacitat metabòlica [31]. Dit d'altra manera, la producció d'acetat té lloc quan les cèl·lules sobrepassen una certa velocitat llindar de consum de glucosa on la màxima velocitat de consum d'oxigen no és suficient per a metabolitzar la totalitat de glucosa aportada. En aquestes condicions limitants, s'inhibeix l'expressió de diversos enzims relacionats amb el cicle dels àcids tricarboxílics, de manera que el flux de carboni es deriva cap a altres vies metabòliques.

Aquesta problemàtica es pot tractar des d'un punt de vista de procés, és a dir, limitant la velocitat de consum de glucosa de les cèl·lules a partir d'un control estricte de la política d'addició de nutrients al medi de cultiu. En aquest sentit, el desenvolupament de processos de producció de proteïnes recombinants operant els reactors de treball en regim discontinu alimentat, pot permetre mantenir velocitats específiques de creixement constants en valors inferiors als llindars que provocarien la saturació de certes etapes del metabolisme de la font de carboni.

Per altra banda, la substitució de glucosa com a font de carboni per glicerol pot representar una possible solució a la problemàtica en la generació d'acetat ja que les màximes velocitats de consum de glicerol són generalment inferiors a les de la glucosa. D'aquesta manera, la velocitat de consum d'oxigen pot deixar de ser una

limitació i per tant evitar l'entrada de la font de carboni a rutes de producció alternatives no desitjades [30].

La producció d'acetat pot tractar-se per altra banda, des d'un punt de vista de l'enginyeria genètica. En aquest sentit, la utilització de variacions genotípiques de soques d'E. coli tipus B, poden representar reduccions considerables en la producció d'acetat respecte de soques de tipus K12 inclús en condicions d'excés de glucosa [32, 33].

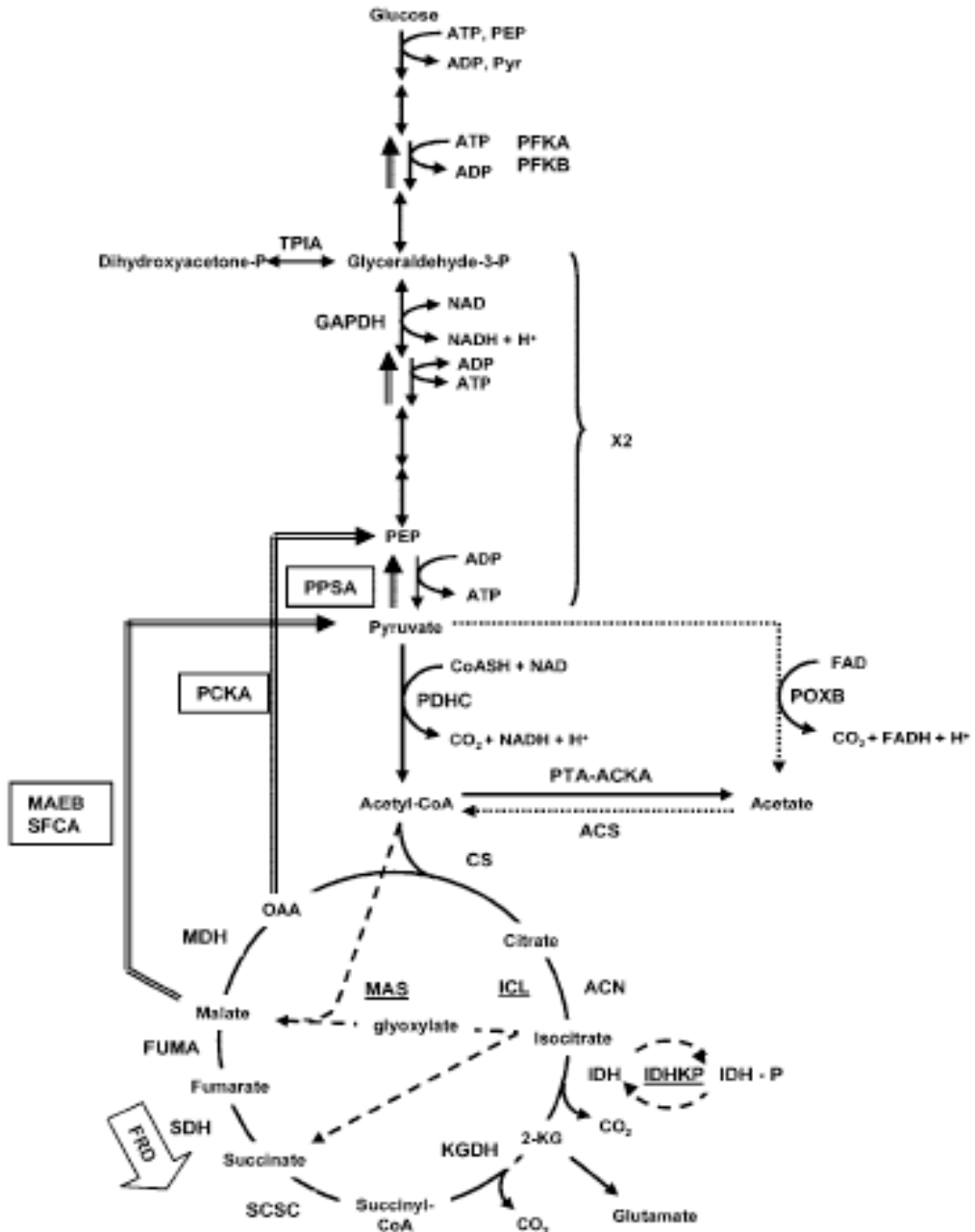


Figura 1.12.- Metabolisme central d'E. coli; Glucòlisi i cicle dels àcids tricarboxílics [31].



Des d'un punt de vista de procés, l'estratègia operacional basada en la limitació en l'addició de nutrients al medi de cultiu implica l'operació en règim discontinu alimentat (fed-batch) amb un perfil exponencial d'addició per mantenir prop de zero la concentració de substrat limitant (típicament la font de C). Encara que hi ha d'altres formes d'addició discontinua alimentada (per exemple, addició lineal) l'exponencial és una de les més utilitzades en els processos de producció. A més de minimitzar la formació de subproductes no desitjats del metabolisme, com ara l'acetat, evita possibles situacions d'anaerobiosis en cultius d'elevada densitat cel·lular. En primer lloc, i tal com s'ha mencionat anteriorment, el fet de mantenir la velocitat de consum de glucosa en valors baixos evita puntes en el consum d'oxigen disponible del cultiu. Si a aquest fet se suma que la transferència d'oxigen de la fase gas (alimentada als reactors a partir de sistemes de difusió) es veu cada vegada més perjudicada per l'augment de viscositat deguda al creixement cel·lular, la satisfacció de la demanda d'oxigen a les cèl·lules es veurà progressivament més compromesa, fins a tal punt que es poden arribar a produir fenòmens d'estratificació als reactors de procés, distingint regions amb condicions aeròbies i regions anaeròbies.

Si bé les estratègies de procés basades en la limitació de l'addició de nutrients poden representar certs avantatges en alguns aspectes operacionals, en d'altres poden comprometre en cert grau les condicions de desenvolupament d'un cultiu bacteriològic. La limitació de font de carboni pot conduir a situacions d'estrès cel·lular que es veuen agreujades durant la inducció de la síntesi del producte recombinant en qüestió. Si durant les etapes de creixement la limitació de nutrients ja és evident, la sobreexpressió del producte recombinant codificat a l'ADN heteròleg pot portar a l'expressió de certes proteïnes amb funcions de degradació del producte recombinant sintetitzat [34] amb l'objectiu d'extreure'n recursos per a sostenir el creixement, el manteniment cel·lular i la pròpia síntesi de producte recombinant. La limitació de nutrients a més, deixa la maquinària sintètica relacionada amb la producció de proteïnes en unes condicions clarament desfavorables respecte una situació d'excés de nutrients [34]. És per això doncs que tant a nivell genètic (en quant a la construcció dels vectors o ADN heteròleg) com a nivell de procés, s'ha de trobar una solució de compromís que permeti el manteniment de la sobreexpressió del producte recombinant en condicions de limitació de nutrients.

La producció de proteïnes recombinants és un procés altament dependent de l'estabilitat de l'ADN heteròleg de les cèl·lules portadores [35]. És per això doncs que per tal d'assegurar la presència plasmídica es treballa amb marcadors de selecció tal i

com s'ha enunciat anteriorment. No obstant però, el manteniment de l'ADN plasmídic indueix a respostes d'estrès cel·lular, sobretot quan la proteïna objectiu té un grau d'expressió elevat [23]. La sobrecàrrega metabòlica per al seu manteniment està estretament relacionada amb el nombre de còpies per cèl·lula [36] mentre que les principals perturbacions del sistema depenen dels gens que s'hi troben codificats [37] com ara els marcadors de selecció (expressats de forma constitutiva) i els del producte d'interès (regulats normalment a partir de promotors forts). La sobreexpressió de les proteïnes recombinants codificades a l'ADN plasmídic sovint ve acompanyada d'inhibicions en el creixement cel·lular degut als recursos que s'hi destinen i redireccions del metabolisme degut als elevats requeriments energètics en processos no relacionats amb el creixement. Per altra banda, velocitats elevades de producció de proteïna recombinant poden portar associats certs fenòmens d'inhibició de la síntesi de components relacionats amb la maquinària de producció de proteïnes amb conseqüències fatals per a la síntesi de proteïnes no heteròlogues necessàries per a les activitats de manteniment cel·lular [37]. A més, en aquestes condicions de sobreexpressió, poden tenir lloc fenòmens d'instabilitat plasmídica i de replicació d'aquest fora de control, la qual cosa incrementa un grau més la sobrecàrrega metabòlica associada al procés. Donat que aquestes situacions d'estrès repercuteixen en la quantitat i la qualitat del producte recombinant, l'estudi de possibles esquemes d'inducció gradual, modelització i optimització del procés pot aportar millores importants en els rendiments globals del sistema.

La sobreexpressió de proteïnes recombinants al citoplasma cel·lular pot presentar certs avantatges front d'altres esquemes d'operació en quant a rendiments de producció i simplicitat en la construcció i disseny de l'ADN plasmídic. Ara bé, la situació d'estrès generada a partir del procés, si no es gestiona correctament, pot portar a clars inconvenients en quant a degradació del producte d'interès a partir de proteïnes amb activitat proteolítica generades per la cèl·lula com a resposta a les condicions en què es troba. Per a resoldre aquestes situacions, sovint es treballa amb varietats genotípiques d'*E. coli* deficientes en certes proteases [24]. En d'altres casos, la solució passa per una construcció plasmídica orientada a l'expressió de la proteïna recombinant en qüestió i el seu transport dirigit cap a l'espai periplasmàtic o la seva secreció al medi de cultiu [28, 32]. Els esquemes de producció basats en el transport a l'espai periplasmàtic presenten certs avantatges front l'expressió al citoplasma en termes de proteòlisis, ja que aquests fenòmens tenen menor abast. Per altra banda, la concentració de proteïnes natives és molt menor que al citoplasma, de manera que les etapes de purificació es poden simplificar considerablement. No obstant però, l'èxit del

transport a l'espai periplasmàtic presenta una alta dependència del tipus de proteïna recombinant a sintetitzar, i és que en alguns casos, els pèptids senyal utilitzats per al transport poden presentar problemes en la seva fusió a la proteïna d'interès quedant aquesta doncs al citoplasma. Existeixen per altra banda estudis de secreció de la proteïna recombinant al medi de cultiu, ara bé, si bé es veritat que la seva purificació respecte d'altres proteïnes es simplifica degut a la baixa concentració de proteïnes natives al medi, la proteïna d'interès es dilueix considerablement. Si més no, *E. coli* no es un microorganisme òptim des del punt de vista de l'excreció de proteïnes al medi de cultiu, així doncs, quan aquest és l'esquema de producció a implementar, sovint es treballa amb d'altres microorganismes hostes que ho facilitin, com ara bacteris Gram positiu o llevats [32].

### 1.5. Referències

1. Soetaert, W. and E. Vandamme, The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology journal*, 2006. 1(7-8): p. 756-769.
2. Straathof, A.J., S. Panke, and A. Schmid, The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in Biotechnology*, 2002. 13(6): p. 548-556.
3. Buchholz, K., V. Kasche, and U.T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 1st ed. 2005: Wiley-VCH.
4. Aehle, W., *Enzymes in Industry*. 3rd ed. 2007: Wiley-VCH.
5. Bommarius, A.S. and B.R. Riebel, *Biocatalysis: Fundamentals and applications*. 2004, Wiley-VCH.
6. Samland, A.K. and G.A. Sprenger, Microbial aldolases as C-C bonding enzymes--unknown treasures and new developments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006. 71(3): p. 253-264.
7. Palomo, C., M. Oiarbide, and J.M. García, The aldol addition reaction: an old transformation at constant rebirth. *Chemistry*, 2002. 8(1): p. 36-44.
8. Saotome, C., et al., Synthesis and enzymatic evaluation of five-membered iminocyclitols and a pseudodisaccharide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2000. 8(9): p. 2249-2261
9. Liang, P.H., et al., Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBiochem*, 2006. 7(1): p. 165-173.

10. Andersen, S.M., et al., Syntheses of sugar-related trihydroxyazepanes from simple carbohydrates and their activities as reversible glycosidase inhibitors. *Carbohydrate research*, 2000. 326(1): p. 22-33.
11. Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications. 1st ed, ed. P. Compain and O.R. Martin. 2007: John Wiley & Sons.
12. Fessner, W.D., Enzyme mediated C-C bond formation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998. 2(1): p. 85-97.
13. Wymer, N. and E.J. Toone, Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000. 4(1): p. 110-119.
14. Takayama, S., G.J. McGarvey, and C.H. Wong, Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annual Review of Microbiology*, 1997. 51: p. 285-310.
15. Fullerton, S.W., et al., Mechanism of the Class I KDPG aldolase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006. 14(9): p. 3002-3010.
16. Lorentzen, E., et al., Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry*, 2005. 44(11): p. 4222-4229.
17. Schurmann, M. and G.A. Sprenger, Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(14): p. 11055-11061.
18. Kroemer, M., I. Merkel, and G.E. Schulz, Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry*, 2003. 42(36): p. 10560-10568.
19. Kroemer, M. and G.E. Schulz, The structure of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (class II) solved by low-resolution SIR phasing and 20-fold NCS averaging. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography.*, 2002. 58(5): p. 824-832.
20. Pavlou, A.K. and J.M. Reichert, Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 2004. 22(12): p. 1513-1519.
21. Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, Brock. *Biología de los Microorganismos*. 10th ed. 2006: Pearson Prentice Hall.
22. Graumann, K. and A. Premstaller, Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology journal*, 2006. 2: p. 164-186.

23. Sørensen, H.P. and K.K. Mortensen, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2005. 115(2): p. 113-128.
24. Baneyx, F., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in Biotechnology*, 1999. 10(5): p. 411-421.
25. Vidal, L., et al., Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008. 134(1-2): p. 127-136.
26. Donovan, R.S., C.W. Robinson, and B.R. Glick, Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996. 16(3): p. 145-154.
27. Santillán, M. and M.C. Mackey, Influence of catabolite repression and inducer exclusion on the bistable behavior of the lac operon. *Biophysical Journal*, 2004. 86(3): p. 1282-1292.
28. Baneyx, F. and M. Mujacic, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 2002. 22(11): p. 1399-1408.
29. Makrides, S.C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 1996. 60(3): p. 512-538.
30. Eiteman, M.A. and E. Altman, Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, 2006. 24(11): p. 530-536.
31. Wolfe, A.J., The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2005. 69(1): p. 12-50.
32. Choi, J., K. Keum, and S. Lee, Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 2006. 61(3): p. 876-885.
33. Noronha, S.B., et al., Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using <sup>13</sup>C-NMR/MS. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. 68(3): p. 316-327.
34. Sandén, A.M., et al., Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. 81(2): p. 158-166.
35. Yee, L. and H.W. Blanch, Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1992. 10(12): p. 1550-1556.
36. Bailey, J.E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 1993. 48: p. 29-52.

37. Hoffmann, F. and U. Rinas, Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2004. 89: p. 73-92.

## 2. CONTEXT I OBJECTIUS

Aquest treball s'emmarca dintre dels projectes d'investigació:

- Nuevos desarrollos en Ingeniería Bioquímica: Optimización de procesos de producción de proteínas recombinantes y de síntesis enzimática . (CTQ2005-01706).
- Procesos Biotecnológicos integrados para la obtención de compuestos bioactivos (CTQ2008-00578).

El treball es desenvolupa en el sí d'un grup de recerca que té com a principal camp d'investigació la producció de proteïnes recombinants en cultius d'alta densitat cel·lular i la seva aplicació en processos biocatalítics. En concret, aquest treball es centra en la modelització i control de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius d'alta densitat cel·lular de la soca d'*E. coli* M15ΔglyA [pREP-4] pQEαβrham [1] així com en la integració dels processos de producció i la seva purificació i immobilització en un sol pas [2] per cromatografia d'afinitat a metalls per a la posterior utilització en reaccions enzimàtiques.

En anteriors treballs al grup de recerca s'ha estudiat l'efecte de diversos paràmetres en la productivitat de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa i d'altres enzims de la mateixa família (en d'altres sistemes d'expressió) [3-7]. Els resultats més satisfactoris es van obtenir amb un sistema d'expressió basat en auxotròfia per glicina, emprant un plasmidi que la complementava (veure Materials i Mètodes per una descripció del sistema – secció 3.1). La producció en cultius d'alta densitat cel·lular s'assolia emprant un procés discontinu alimentat amb una addició exponencial de nutrients. En aquest sentit, aprofundir en l'efecte de la composició del medi de cultiu utilitzat i en l'estratègia de procés implementada no només en la fase de creixement no induït sinó també durant la inducció del sistema sobre els rendiments de producció ha permès definir esquemes de treball amb elevats rendiments de producció i pocs problemes operacionals derivats de la formació de subproductes del creixement amb propietats inhibidores. No obstant però, calia desenvolupar un model matemàtic que permetés identificar les variables clau i proposar estratègies de control del procés extensibles a la producció d'altres proteïnes. D'altra banda, la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa no s'havia analitzat des d'un punt de vista global integrant les posteriors

etapes de purificació i immobilització de l'enzim. Així doncs, no s'havia tingut en compte la repercussió de les estratègies implementades a l'etapa de producció (per exprimir al màxim el potencial productiu de la soca) sobre els rendiments globals del procés. És a partir d'aquestes premisses que es defineixen els objectius d'aquest treball:

- Avaluar la repercussió de les estratègies de producció tipus heretades de treballs anteriors al grup de recerca sobre els rendiments de recuperació de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa per cromatografia d'afinitat a metalls. Les estratègies van ser desenvolupades pel Dr. Jaume Pinsach (amb qui es va col·laborar en aquesta part específica del treball).
- Definir els esquemes i les estratègies de procés amb millors resultats en quant a la qualitat ( $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ) de la proteïna recombinant. En aquest sentit, no es persegueix només la maximització de l'activitat específica ( $\text{UA} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) o de la concentració màssica de proteïna ( $\text{mg}_{\text{RhuA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) per separat, sinó que es treballa amb aquest nou paràmetre definit, la qualitat, que permet avaluar el possible grau de degradació de la proteïna degut a fenòmens proteolítics com a conseqüència de l'estrès causat per la pròpia síntesi i les condicions de cultiu. A partir dels esquemes que es desenvolupin es realitzaran estudis de millora i implementació de co-estratègies a partir de tècniques de modelització del procés i suplementació del medi de cultiu amb compostos que disminueixin els efectes adversos que causa l'expressió de la proteïna recombinant sobre la seva qualitat.
- Construir, calibrar i validar un model matemàtic que permeti la descripció del procés i l'establiment d'estratègies d'operació controlades a partir de les prediccions del model.
- Posant el focus en la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada, es triaran les estratègies i esquemes que presentin la major productivitat (unitats d'activitat per unitat de volum i temps) i menors taxes de degradació de la proteïna. La degradació, en una elevada intensitat és la responsable de les pèrdues d'activitat enzimàtica si els residus afectats estan d'alguna manera implicats en el centre actiu de l'enzim, però en condicions no tan severes pot associar-se amb els baixos rendiments d'immobilització sobre suports de tipus



IMAC si els residus afectats són els més accessibles, com ara els de la cua de 6 Histidines amb què la proteïna s'expressa fusionada.

- S'implementarà una combinació d'aquests esquemes en un procés en planta pilot amb l'objectiu de comprovar si l'escalat té algun efecte sobre els rendiments globals del procés i per altra banda si existeix algun tipus de sinergia en la combinació d'aquestes estratègies front els resultats de la seva implementació individual.

### Referències

1. Vidal, L., et al., Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008. 134(1-2): p. 127-136.
2. Ardao, I., et al., One step purification-immobilization of fuculose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. 39: p. 22-27.
3. Durany, O., et al., Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 2004. 39: p. 1677-1684.
4. Durany, O., C. de Mas, and J. López-Santín, Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry*, 2005. 40: p. 707-716.
5. Pinsach, J., et al., Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. 43(7): p. 507-512.
6. Pinsach, J., C. de Mas, and J. López-Santín, Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: Application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochemical Engineering Journal*, 2008. 41(2): p. 181-187.
7. Vidal, L., et al., High-level production of recombinant His-tagged rhamnulose 1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2003. 78(11): p. 1171-1179.

### 3. MATERIALS I MÈTODES

Es descriuen els principals materials i mètodes emprats durant aquest estudi. En alguns casos però, s'apliquen certes modificacions respecte els mètodes estàndard, i es descriuen de manera específica al capítol corresponent.

#### 3.1. Soques i plasmidis

L'enzim d'estudi d'aquest treball, Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, s'obté fusionada a una cua de 6 residus d'histidina a l'extrem N-terminal, a partir de cultius d'alta densitat cel·lular de la soca d'*E. coli* M15ΔglyA [pREP-4] pQEαβrham [1], derivada d'una soca parental de tipus K12. La soca, presenta a nivell cromosòmic una deleció del gen *glyA*, responsable de la síntesi de l'enzim Serina Hidroximetil Transferasa (SHMT), implicat en la principal ruta biosintètica de glicina a *E. coli*.

La complementació d'aquesta auxotròfia així com l'expressió de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa es troben codificades al plasmidi pQEαβrham (Figura 3.1) derivat dels vectors comercials tipus PQE40 de Qiagen.

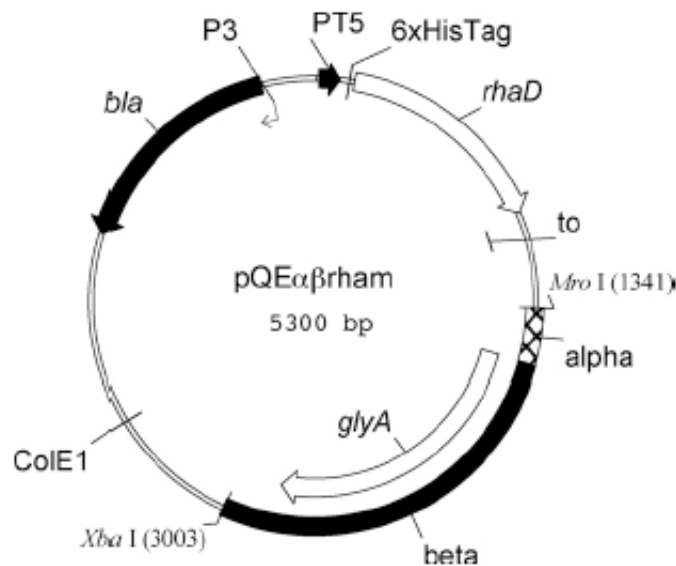


Fig. 3.1.- Plasmidi pQEαβrham derivat dels vectors comercials PQE40 de Qiagen.

L'expressió de SHMT queda codificada al gen *glyA*, del qual n'existeix una còpia al vector sota el control del promotor constitutiu P3. D'aquesta manera, com a eina de pressió selectiva, únicament les soques portadores d'aquest vector es podran desenvolupar correctament en medis de cultiu en absència de glicina.

L'expressió de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, codificada al gen *rhaD*, queda controlada pel promotor fort T5 (reconegut per la RNA polimerasa) i dues seqüències de l'operador *lac* que assegurin una regulació estricta del nivell d'expressió de la proteïna recombinant; bloquejada en presència de nivells elevats de proteïna repressora del sistema *lac*, i activada en presència d'IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosid) o lactosa. El vector comercial, conté a més la seqüència responsable per a l'expressió d'una cua de 6 residus d'Histidina (6xHis) fusionada a l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant en qüestió, permetent d'aquesta manera la seva separació de la resta de proteïnes citoplasmàtiques d'*E. coli* a partir de tècniques de cromatografia d'afinitat a metalls.

Per altra banda, el vector també conté la seqüència que codifica l'expressió de l'enzim  $\beta$ -lactamasa (*bla*), atorgant d'aquesta manera la resistència de la soca a antibiòtics betalactàmics (típicament ampicil·lina). Per al cas d'estudi, aquesta eina de pressió selectiva únicament s'utilitza en fases inicials del creixement en medi complex, on donat que aquests es basen en extractes proteics no definits amb possible presència de glicina, existeix el risc de pèrdua del plasmidi per tal de disminuir la sobrecàrrega metabòlica que aquest representa.

La soca utilitzada és a més portadora del vector pREP-4 (Figura 3.2) que a banda d'atorgar a la soca la resistència a l'antibiòtic kanamicina, expressa de manera constitutiva la proteïna repressora del sistema *lac* (codificada a *lacI*) assegurant d'aquesta manera la repressió de l'expressió de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en absència d'inductor (lactosa o IPTG).

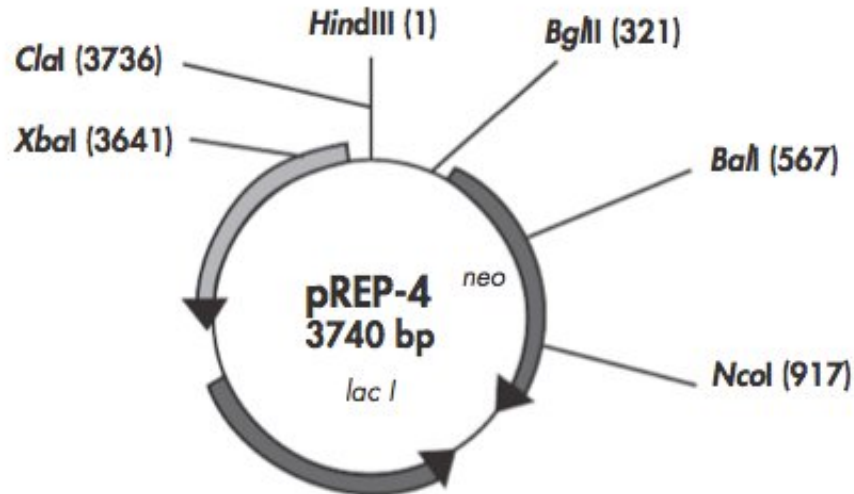


Figura 3.2.- Vector pREP-4 (Qiagen).

### 3.2. Medis de cultiu

La soca de treball, *E. coli* M15ΔglyA [pREP-4] pQEαβrham, es conserva a -80°C per al seu ús en cultius, adherida en suports toroïdals de tipus plàstic (Cryobilles - AES Chemunex). Les diferents etapes del procés típic de creixement i producció dut a terme al laboratori es mostren a la figura 3.3.

Les etapes inicials de creixement o revifament de la soca a partir dels crio-stocks, es duen a terme en medi complex LB (10 g·L<sup>-1</sup> de peptona, 5 g·L<sup>-1</sup> d'extracte de llevat i 10 g·L<sup>-1</sup> de clorur sòdic) suplementat amb ampicil·lina i kanamicina (ambdós a 0.1 g·L<sup>-1</sup>) com a elements de pressió selectiva per tal d'assegurar el manteniment dels vectors.

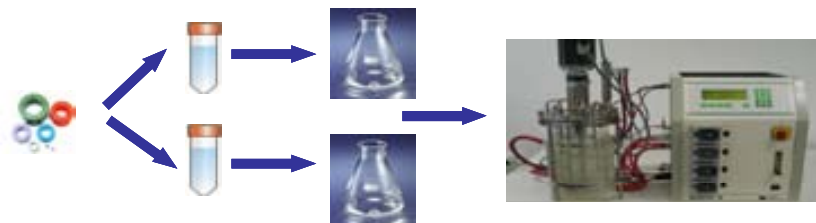


Figura 3.3.- Etapes d'un procés de creixement i producció típic al laboratori.

La següent etapa del procés, en Erlenmeyer equipat amb deflectors per tal d'afavorir bons nivells d'homogeneïtzació, es du a terme en medi definit de composició detallada a la taula 3.1 sense suplement d'antibiòtics.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/l)</b>
Glucosa	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.973
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.596
NaCl	0.458
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.112
FeCl <sub>3</sub>	0.006
Tiamina	0.025
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.001
Elements traça	0.08 (mL / 100 mL de medi)*

Taula 3.1.- Composició del medi definit emprat a les etapes de creixement en Erlenmeyer. (\*) La composició dels elements traça es detalla a la taula 3.2.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/l)</b>
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.04
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.74
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.16
CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.55
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.42
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.02

Taula 3.2.- Composició dels elements traça emprats en la preparació del medi definit de creixement.

El creixement en bioreactor a escala laboratori es du a terme en dues etapes diferenciades. La primera d'elles, operant en règim discontinu, parteix d'un medi definit, altra vegada sense suplement d'antibiòtics, de composició detallada a la taula 3.3. Per altra banda, la segona etapa del procés es du a terme operant el reactor en discontinu alimentat implementant una política d'addició de nutrients determinada. La solució alimentada al reactor presenta la composició detallada a la taula 3.4.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/l)</b>
Glucosa	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4
NaCl	1.8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.45
FeCl <sub>3</sub>	0.02
Tiamina	0.1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.004
Elements traça	2.86 (mL / L de medi)*

Taula 3.3.- Composició del medi definit emprat a les etapes de creixement en règim discontinu en bioreactor a escala laboratori. (\*) La composició dels elements traça es detalla a la taula 3.2.

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/l)</b>
Glucosa	478
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9.56
FeCl <sub>3</sub>	0.49
Tiamina	0.33
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.089
Elements traça	(62.9 mL / L de medi)*

Taula 3.4.-Composició de la solució de nutrients emprada a la segona etapa del procés de creixement i producció en bioreactor a escala laboratori. (\*) La composició dels elements traça es detalla a la taula 3.2.

Per als estudis en planta pilot, els medis definits utilitzats en l'etapa de creixement en discontinu presenten la mateixa composició que els utilitzats a escala laboratori (taula 3.3). Per altra banda, la solució de nutrients utilitzada a escala planta pilot a l'etapa de creixement i producció en règim discontinu alimentat presenta la composició detallada a la taula 3.5.

Les solucions de nutrients emprades a les etapes d'alimentació en bioreactor (tant a escala laboratori com en planta pilot) no inclouen els compostos en base a fosfats amb l'objectiu d'evitar la precipitació de sals càlciques i magnèsiques. D'aquesta manera doncs, s'alimenten independentment al bioreactor (en forma de solucions

concentrades) en base als requeriments del cultiu, segons rendiments calculats a raó de  $0.05 \text{ g}_P \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .

<b>Component</b>	<b>Concentració (g/l)</b>
Glucosa	300
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.75
FeCl <sub>3</sub>	0.3
Tiamina	0.3
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.060
Elements traça	(40 mL / L de medi)*

Taula 3.5.-Composició de la solució de nutrients emprada a la segona etapa del procés de creixement i producció en bioreactor a escala planta pilot. (\*) La composició dels elements traça es detalla a la taula 3.2.

Per a l'etapa d'inducció, tant als estudis en planta pilot com a escala laboratori, s'utilitza IPTG (Sigma Aldrich) com a agent inductor. En funció de l'estratègia d'inducció aplicada al procés, la solució mare (en aigua miliQ) es prepara a una concentració o altra (420  $\mu\text{M}$  per als estudis amb inducció contínua o 100 mM per als estudis amb inducció amb un únic impuls).

### 3.3. Condicions de cultiu i equipament

A la figura 3.3 s'han detallat les etapes principals d'un procés de creixement i producció a escala laboratori. En aquest punt se'n descriuran de manera general les condicions per a un cultiu estàndard. No obstant però, i donat que en aquest estudi s'han utilitzat diverses estratègies de procés particulars a més dels estudis en planta pilot, aquestes es descriuran específicament al capítol corresponent.

Partint de la soca conservada a  $-80^\circ\text{C}$  en suports de tipus plàstic, es du a terme una etapa de revifament overnight (10 – 12 hores) en medi complex LB a  $37^\circ\text{C}$  i volum final de 15 mL amb suplementes d'antibiòtic per tal d'assegurar el manteniment dels vectors. Transcorregut aquest període de temps i assolida una densitat òptica al voltant d' 1.5 - 2 unitats a 600 nanòmetres es prenen 5 mL del pre-cultiu i es carreguen en un Erlenmeyer amb 95 mL de medi definit de composició detallada a la taula 3.1. El cultiu es manté en un agitador orbital termostatitzat a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  fins a

esgotament de la font de carboni, la qual cosa ocorre a les 4- 4.5 hores d'haver inicial el cultiu amb densitats òptiques al voltant d'1 - 1.5 unitats a 600 nanòmetres.

S'inoculen 80 mL del cultiu en Erlenmeyer en un bioreactor a escala laboratori (Figura 3.4) (Fermentador Biostat B de Sartorius amb volum útil d'1.5 L) equipat amb sensors de temperatura, pH i oxigen dissolt, i carregat amb 720 mL de medi definit estèril de composició detallada a la taula 3.3. Les consignes dels principals paràmetres operacionals; temperatura, pH i concentració d'oxigen dissolt es fixen a 37°C, 7 unitats i 50 % de la saturació respectivament i es mantenen controlats a partir de la unitat de control (DCU) amb què ve equipat el bioreactor. El control de pH del medi de cultiu al bioreactor es du a terme a partir de l'addició d'una solució d'amoníac al 15%. Per altra banda, el control de la concentració d'oxigen dissolt es realitza a partir de la manipulació de la velocitat d'agitació al reactor (490 – 1150 rpm). Durant les primeres hores del creixement al bioreactor, no hi ha manipulació automàtica del cabal d'aire o de la proporció oxigen / aire a l'entrada del sistema. No obstant però, en assolir concentracions cel·lulars elevades, es produeixen oscil·lacions considerables en la concentració d'oxigen dissolt al medi, de manera que aquest s'ha controlat manualment a partir de la manipulació de la velocitat d'agitació, del cabal de gasos a l'interior del reactor (1.5 – 2 vvm) i de la proporció de la mescla aire / oxigen, que a les etapes finals del cultiu poden arribar a una relació 20:80 (en percentatge volumètric).

S'inicia d'aquesta manera una etapa de creixement en règim discontinu fins a esgotament total de la font de carboni al medi de cultiu (12-14 hores) amb valors de la densitat òptica al voltant de 20 – 25 unitats a 600 nanòmetres. A banda de l'anàlisi off-line de la principal font de carboni (glucosa), el final de la fase de creixement en discontinu es pot identificar a partir de l'increment sobtat del pH i de la concentració d'oxigen dissolt al medi de cultiu. És a partir d'aquest moment quan es passa a operar el procés en règim discontinu alimentat a partir de l'addició (segons un perfil exponencial) d'una solució concentrada de nutrients amb l'objectiu de mantenir la velocitat de creixement constant a 0.2 – 0.25 h<sup>-1</sup>. Aquest tipus d'estratègies es basen en la limitació del substrat limitant (típicament la font de carboni) de manera que únicament se n'alimenta la quantitat estricta per a sostenir el creixement a la velocitat específica fixada, és a dir, evitant-ne la seva acumulació de al medi de cultiu. En alguns dels processos descrits en aquest treball, les velocitats específiques de creixement s'han fixat en altres valors. En aquests casos, les estratègies implementades es descriuen als capítols corresponents.



La política d'addició de nutrients implementada al sistema durant l'etapa de creixement i producció en règim discontinu alimentat respon a un esquema de control en llaç obert [2]. El volum de solució de nutrients a alimentar al reactor en un determinat instant de temps  $t$ , es determina a partir de la resolució de les equacions de creixement de la biomassa i consum de glucosa definides per al cas d'estudi (equació 3.1). L'alimentació però, no es realitza en continu si no a partir d'addicions discretes en intervals de temps ( $\Delta t$ ) de 60 segons. A nivell d'instrumentació, l'alimentació de nutrients al bioreactor es realitza a partir d'una microbureta MICRO BU 2030 (Crison instruments) equipada amb una xeringa de volum útil de 2.5 mL (Hamilton) governada a partir del sistema supervisor del procés desenvolupat en Visual Basic 6.

$$V_{ad}(t) = \frac{1}{S_F} \cdot \left( \frac{m_{SX}}{\mu_{fix}} + \frac{1}{Y_{XS}} \right) \cdot X(t) \cdot V(t) \cdot (\exp(\mu_{fix} \cdot \Delta t) - 1) \quad (\text{Eq.3.1})$$

On:

- $V_{ad}(t)$  és el volum (L) de solució de nutrients a afegir al reactor a l'instant de temps  $t$ .
- $S_F$  és la concentració de glucosa a la solució de nutrients ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).
- $m_{SX}$  és el coeficient de manteniment cel·lular;  $0.1 \text{ g}_{\text{gluc}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  per a la soca d'estudi.
- $\mu_{fix}$  és la velocitat específica de creixement fixada a l'etapa en règim discontinu alimentat ( $\text{h}^{-1}$ ).
- $Y_{XS}$  és el rendiment biomassa substrat;  $0.382 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}_{\text{gluc}}^{-1}$  per a la soca d'estudi.
- $X(t) \cdot V(t)$  és la biomassa total al sistema a l'instant  $t$  ( $\text{g}_{\text{DCW}}$ ) que es determina a partir de les condicions amb les que s'inicia la fase d'alimentació de nutrients i la velocitat específica de creixement fixada (equació 3.2).
- $\Delta t$  és l'increment de temps entre dues addicions (h).

$$X(t) \cdot V(t) = X_0 \cdot V_0 \cdot \exp(\mu_{fix} \cdot t) \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Assolida una densitat òptica al voltant de 60 unitats a 600 nanòmetres, s'inicia l'etapa de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a partir de la inducció del cultiu amb IPTG. Segons les estratègies de procés implementades, la inducció es realitza segons un esquema o un altre. Cada cas es descriu al capítol corresponent. Durant la inducció

a més, s'han implementat diverses polítiques d'addició de nutrients amb l'objectiu de satisfer els requeriments nutricionals de la soca tant per al creixement i tasques de manteniment cel·lular com per a la producció de proteïna recombinant. Cada una d'aquestes estratègies es descriu també al capítol corresponent.

A nivell d'instrumentació, l'addició d'IPTG al medi de cultiu canvia segons l'esquema implementat. Per als estudis d'inducció contínua, l'addició es realitza per separat de l'alimentació a partir d'una microbureta MICRO BU 2030 (Crison instruments) equipada amb una xeringa de volum útil d'1mL (Hamilton) governada també a partir del propi sistema supervisor. Per als estudis d'inducció en un sol impuls, l'addició d'IPTG al bioreactor es realitza asèpticament a través d'una de les boques del capçal del reactor.

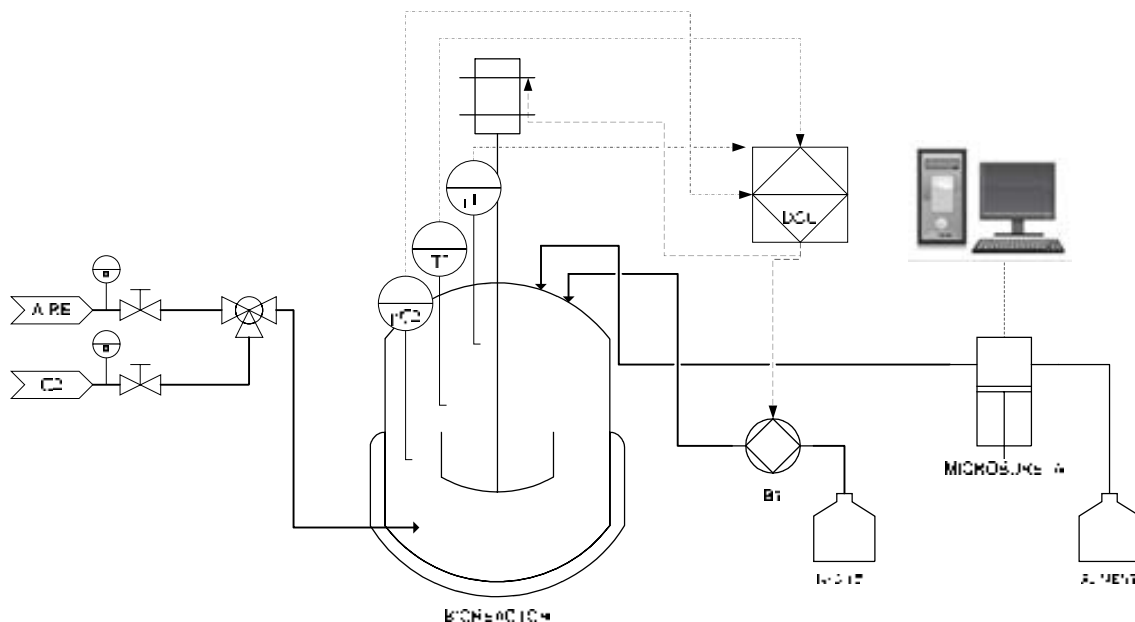


Figura 3.4.- Diagrama funcionament del bioreactor a escala laboratorial.

### 3.4. Purificació i immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en un sol pas per cromatografia d'afinitat a metalls (IMAC)

#### 3.4.1. Processament del brou de cultiu

El brou de cultiu resultant del procés de creixement i producció en bioreactor a escala laboratorial es centrifuga a 10,000 rpm durant 20 minuts a una temperatura de 4°C emprant una centrífuga Beckman J2-21 M/E. Es descarta el sobrenedant i es ressuspen la fracció sòlida en tampó de lisi de composició: 43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM Imidazol, 300mM NaCl a pH=8 a una relació d'1mL de tampó per cada 0.3 g de pèl·lets.

S'aplica un cicle de lisi a la ressuspensió per disruptió mecànica a 2.57 kbar i 4°C mitjançant un disruptor Constant Systems LTD One Shot i una posterior centrifugació a 14,000 rpm i 4°C durant 35 minuts. Es descarta la fracció sòlida resultant i es conserva l'extracte cel·lular o lisat a un 0.02% d'azida sòdica (per a evitar una possible proliferació microbiològica) per als processos de purificació i d'immobilització.

#### 3.4.2. Purificació i immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

El procés de purificació i immobilització en un sol pas de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa [3] té com a objectiu la retenció d'una determinada activitat enzimàtica per mL del suport utilitzat al procés. Els cicles d'immobilització es realitzen a raó de 9:1 (mL de solució enzimàtica : mL de suport). D'aquesta manera, prèviament es determina l'activitat enzimàtica del lisat o extracte cel·lular obtingut a 3.4.1 a fi de conèixer la dilució que se n'ha de fer (amb tampó de lisi a volum final de 9 mL) per tal d'immobilitzar l'activitat enzimàtica total desitjada al suport.

El suport IMAC emprat, Co-IDA (Chelating Sepharose FF Amersham Biosciències-GE Healthcare) consisteix en una matriu entrellaçada d'agarosa amb grups funcionals d'àcid iminodiacètic on s'immobilitza cobalt a raó de 3:1 (volum de solució 0.2 M de  $\text{CoCl}_2$  : volum de suport) per tal d'establir coordinació amb els residus de la cua d'histidines amb la que s'expressa fusionada la proteïna recombinant.

Per al procés d'immobilització, 1 mL de la dilució d'extracte cel·lular es conserva a 4°C i agitació suau per tal d'establir l'estabilitat d'aquest a les condicions d'immobilització. Per altra banda, 1mL del suport emprat s'addiciona a 9 mL de la dilució d'extracte cel·lular i es manté a les mateixes condicions. Periòdicament, com a eina de seguiment del procés d'immobilització, es mesura l'activitat enzimàtica de les següents fraccions fins a valor constant de l'activitat enzimàtica del sobrenedant.

- Blanc o referència (ref.), és a dir, la dilució de l'extracte cel·lular conservada a les condicions d'immobilització (4°C i agitació suau)..
- Sobrenedant (sn), o fracció del sistema lliure de partícules de suport, resultat de deixar decantar el suport de la suspensió. És en aquesta fracció on es pot

observar quina és la quantitat d'enzim (en termes d'activitat) que queda pendent d'immobilitzar.

- Suspensió (susp), o mescla de dilució de l'extracte cel·lular més suport. En aquesta fracció es mesura l'activitat específica total de la mescla.

Una vegada assolit l'equilibri entre els processos d'adsorció i desorció de l'enzim al suport es determinen els principals paràmetres de la immobilització (rendiment d'immobilització i activitat immobilitzada) (equacions 3.3 i 3.4). A l'exemple de la figura 3.5 es pot observar com es determinen a partir de les dades experimentals.

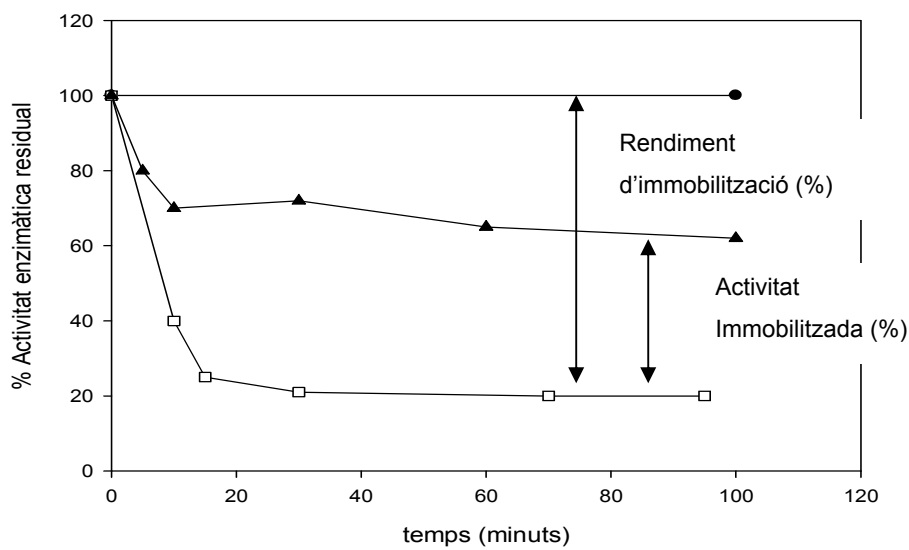


Figura 3.5.- Seguiment d'un procés típic d'immobilització enzimàtica i determinació dels paràmetres principals d'aquest. % d'activitat residual de la fracció blanc o referència (●), % d'activitat residual de la fracció suspensió (▲), % d'activitat residual de la fracció sobrenedant (□).

$$Rdmt(\%) = 100 \cdot \frac{Act_{ref} - Act_{sn}}{Act_{ref}} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

$$Act_{immobilitzada}(\%) = 100 \cdot \frac{Act_{susp} - Act_{sn}}{Act_{ref}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

### 3.5. Mètodes analítics

#### 3.5.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

El creixement bacterià es monitoritza a partir de mesures de densitat òptica a 600 nm. Les mostres extretes del bioreactor es dilueixen en tampó de composició 100 mM Tris-HCl per tal de mantenir valors d'absorbància entre 0.2 – 0.8, rang lineal de l'espectrofotòmetre (Philips PU8620). La relació entre densitat òptica i pes sec cel·lular es realitza en base a una correlació obtinguda prèviament, que estableix un valor de  $0.31 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$  per cada unitat de densitat òptica per a la soca en qüestió.

Per a d'altres determinacions, 1 mL de brou de cultiu es centrifuga a 13,000 rpm durant 4 minuts a 4°C. Posteriorment a un tractament de filtració del sobrenedant a  $0.22 \mu\text{m}$  s'analitzen glucosa i àcids orgànics com a subproductes del creixement. Els nivells de glucosa al medi s'analitzen mitjançant dues tècniques:

- Enzimàtica; a partir de l'equip YSI (Yellow Spring Instruments).
- Per cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC), emprant un equip Hewlett Packard 1050 amb detector IR Hewlett Packard 1047 utilitzant columnes Aminex HPX-87H de Biorad i eluent de composició 15mM d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  a cabal fix de  $0.6 \text{ min}^{-1}$ .

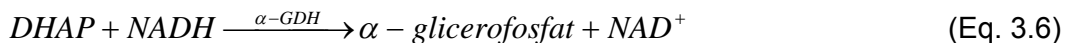
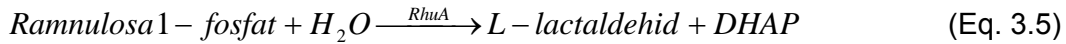
L'àcid acètic com a subproducte del creixement es monitoritza a partir de cromatografia a les mateixes condicions que les descrites per a la glucosa, mentre que l'àcid làctic es determina enzimàticament mitjançant el detector YSI.

#### 3.5.2. Quantificació de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

Per a la quantificació dels nivells d'activitat enzimàtica i concentració màssica de proteïna, es pren la fracció sòlida resultant del procés de centrifugació realitzat a 3.5.1 i s'ajusta la densitat òptica a 3 unitats mitjançant la seva ressuspensió en tampó Tris-HCl 100 mM a pH=7.5. Les suspensions es sotmeten a quatre cicles de 15 segons de sonicació en fred (4°C) amb un interval entre cicles de 2 minuts emprant un sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials). Les restes cel·lulars s'eliminen per centrifugació i se'n separa el sobrenedant per a la realització d'anàlisis.

La quantificació de l'activitat aldolàsica es basa en l'acoblament de dues reaccions enzimàtiques (equacions 3.5 i 3.6 i taula 3.6), la primera de les quals és la reacció

natural de l'enzim d'estudi on Ramnulosa 1-fosfat es trenca en L-lactaldehid i dihidroxiacetonafosfat (DHAP). El segon procés enzimàtic és la desaparició de NADH per reacció amb DHAP catalitzada per l'enzim glicerol 3-fosfat deshidrogenasa, permetent un seguiment del seu abast per espectrofotometria a 340 nanòmetres amb un equip Cary Varian. Es defineix aleshores una unitat d'activitat com la quantitat de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa capaç de convertir 1 µmol de Ramnulosa 1-fosfat en DHAP i L-lactaldehid per minut a pH 7.5 i 25°C.



Component	Concentració
NADH	0.15 mM
L-Ramnulosa 1-fosfat	2 mM
α-GDH	2 UA·mL <sup>-1</sup>
Tris·HCL	50 mM
KCl	100 mM

Taula 3.6.-Condicions de l'assaig enzimàtic de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a pH 7.5 i temperatura de 25°C. A volum final d'1mL.

El càlcul de l'activitat aldolàsica d'una mostra es realitza a partir de l'equació 3.7.

$$\text{Activitat} \left( \frac{\text{UA}}{\text{ml}} \right) = \frac{\Delta \text{Abs}_{340}}{\varepsilon} \cdot \frac{V_t}{V_e} \cdot D_f \cdot L_p \quad (\text{Eq. 3.7})$$

On:

- $\Delta \text{Abs}_{340}$  és la variació de l'absorbància per minut a 340 nm ( $\text{min}^{-1}$ ).
- $\varepsilon$  és el coeficient d'extinció molar del NADH ( $6.22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).
- $V_t$  és el volum total de l'assaig (1 o 2 mL segons el tipus d'assaig).
- $V_e$  és el volum de la solució enzimàtica utilitzat a l'assaig (0.02 o 0.04 mL segons el tipus d'assaig).
- $D_f$  és el factor de dilució de la mostra.
- $L_p$  és el camí òptic (1cm).

Per altra banda, la determinació de la concentració màssica de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a les mostres analitzades es realitza a partir de dos procediments analítics.

En primer lloc, es determina la quantitat total de proteïna soluble a les mostres a partir del mètode colorimètric de Bradford (595 nanòmetres) establert per PIERCE Biotechnology (<http://www.piercenet.com>) mitjançant la utilització del compost Comassie<sup>®</sup> Protein Assay Reagent. El calibrat del mètode es du a terme a partir de la utilització de sèrum d'albúmina bovina com a estàndard proteic.

En segon lloc, per tal de determinar el percentatge de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa respecte la resta de proteïnes intracel·lulars a les mostres a processar, es duen a terme anàlisis d'electroforesi en gels d'Invitrogen NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris segons les especificacions del fabricant (<http://www.invitrogen.com>) i es quantifiquen les bandes obtingudes a partir del software de densitometria Kodak Digital Science<sup>®</sup>. A títol d'exemple, la figura 3.6 permet observar l'evolució del percentatge de RhuA respecte de la resta de proteïnes intracel·lulars a diferents temps de mostreig (cadascun dels carrils verticals) en un procés típic de producció a escala laboratori. Dintre del conjunt de bandes obtingudes en destaquen dues; en primer lloc la corresponent a SHMT, expressada constitutivament com a complementació de l'auxotròfia de la soca per glicina. En segon lloc, la corresponent a Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, que analitzada de dreta a esquerra permet observar l'evolució del cultiu, d'un estat no induït (i per tant amb expressió basal molt reduïda) a un estat d'inducció amb augment progressiu de concentració. Per altra banda, i per tal d'establir la referència de pesos moleculars, també es punxa al gel d'electroforesi un marcador (Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range de Bio-Rad) que conté les següents proteïnes: Miosina (209 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (124 kDa), sèrum d'albúmina bovina (80 kDa), ovoalbúmina (49.1 kDa), anhidrasa carbònica (34.8 kDa), inhibidor de tripsina de soja (28.9 kDa), lisozim (20.6 kDa) i aprotinina (7.1 kDa).

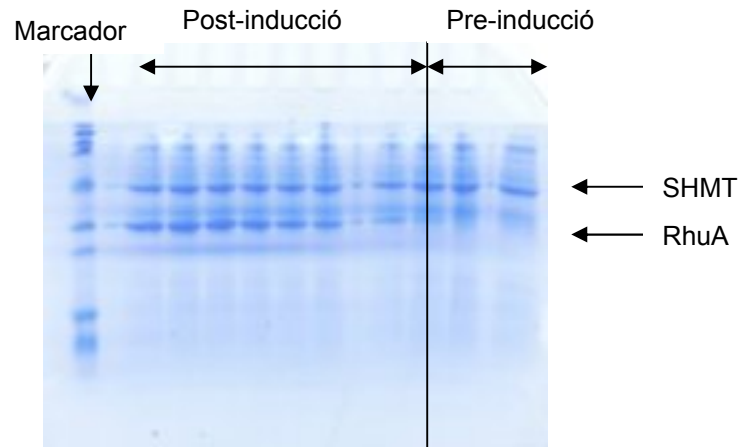


Figura 3.6.- Gel d'electroforesi per al seguiment de l'evolució del percentatge de RhuA respecte la resta de proteïnes intracel·lulars de les mostres obtingudes a diferents temps del cultiu.

En últim lloc, per tal d'analitzar l'abast de possibles fenòmens d'hidròlisi de la proteïna recombinant a nivell de la cua de 6 residus d'histidina amb la què s'expressa fusionada, es determina a partir de tècniques de Dott Blott el percentatge de RhuA que conserva els 6 residus intactes respecte la RhuA total produïda. Per a cada mostra a analitzar, es transfereixen 3  $\mu$ L d'extracte cel·lular a una membrana de nitrocel·lulosa (Amersham Hybond – ECL GE Healthcare) i aquesta es deixa reposar durant 1 hora a temperatura ambient amb l'objectiu de fixar-hi correctament les mostres transferides. Posteriorment s'estableix un primer període de bloqueig de 30 minuts a partir de la incubació de la membrana en una solució de tampó salí PBS-Tween de composició detallada a la taula 3.7 amb un 5% de llet desnatada en pols (Sigma Aldrich) com a agent de bloqueig. S'estableix un segon cicle d'incubació, també amb tampó PBS-Tween i 5% de llet desnatada en pols, però aquesta vegada en presència d'anticossos de ratolí Anti-6xHis (Roche) a dilució 1:50 durant 1 hora. Després d'aquesta incubació es realitzen tres cicles de rentat de 10 minuts amb tampó PBS-Tween prèviament a un tercer cicle d'incubació d'1 hora en tampó de bloqueig i en presència de l'anticòs Anti - mouse IgG alcalina fosfatasa (Merck) a dilució 1:5000. Després d'aquest període d'incubació es realitzen tres cicles de rentat de 10 minuts amb tampó PBS-Tween i es procedeix a la fase de detecció, que es du a terme amb el kit d'alcalina fosfatasa conjugat de BioRad, incubant la membrana en 24 mL d'aigua mQ i 250  $\mu$ L de cada un dels reactius del kit (A i B) fins que es desenvolupa color a les regions de la membrana on s'han transferit les mostres d'extracte cel·lular.



S'escafeja la membrana i es quantifiquen les bandes obtingudes amb el software de densitometria Kodak Digital Science ®.

Component	Concentració (per litre)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42 g
KCl	0.20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
NaCl	8 g
Tween 20	1 mL

Taula 3.7.-Composició (per litre) del tampó PBS-Tween per als estudis de Dott Blott.

### 3.6. Referències

1. Vidal, L., et al., Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2008. **134**(1-2): p. 127-136.
2. Pinsach, J., C. De Mas, and J. Lopez-Santin, A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. Biochemical Engineering Journal, 2006. **29**(3): p. 235-242.
3. Ardao, I., et al., One step purification-immobilization of fuculose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**: p. 22-27.

#### 4. PURIFICACIÓ I IMMOBILITZACIÓ DE RHUA PROCEDENT DE CULTIUS D'ALTA DENSITAT CEL·LULAR

##### Resum

L'alt valor afegit de compostos amb potencial ús terapèutic porten a la realització d'estudis de millora contínua donat l'elevat cost en la seva obtenció. D'aquesta manera doncs, quan els processos de síntesi passen per la utilització de proteïnes recombinants com a biocatalitzadors és de vital importància tenir en compte aspectes econòmics, donats els costos de producció d'aquestes. És per això que se'n persegueix la màxima reutilització en diferents lots consecutius de síntesi, la màxima estabilitat a les condicions de reacció i per altra banda l'optimització del procés global de la seva obtenció.

Aplicant aquests criteris a la síntesi de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa s'han desenvolupat estratègies de producció alternatives a les habituals per a la sobreexpressió de proteïnes recombinants en cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* amb l'objectiu de millorar els rendiments globals del procés de la seva obtenció. Per una banda, la disminució de la temperatura dels cultius, de 37°C a 28°C ha permès l'obtenció de proteïna recombinant més activa i més fàcilment purificable respecte els processos convencionals de producció, amb rendiments de recuperació al voltant del 93%. Per altra banda, el fet de mantenir un excés de font de carboni al medi, en condicions inhibidores de creixement ha conduït a l'obtenció de resultats igualment positius amb augments considerables tant de la qualitat com dels rendiments de recuperació, al voltant del 95%.

Paral·lelament, la caracterització dels derivats immobilitzats procedents de processos de purificació i immobilització en un sol pas han permès determinar que en utilitzar suports tipus IMAC (Co-IDA), per sobre de 6.4 UA·mL<sup>-1</sup> de suport les reaccions de síntesi poden presentar limitacions en la transferència de matèria i per tant no aprofitar tota la potencialitat de l'enzim immobilitzat. Aquests derivats, amb una estabilitat gairebé del 100%, no han mostrat pràcticament desorció d'enzim als 40 dies en condicions de conservació a 4°C.

### 4.1. Introducció i objectius

#### 4.1.1. Marc general de la purificació de proteïnes recombinants

El procés global de producció de proteïnes recombinants a partir d'un organisme hoste no finalitza en la fase pròpiament de síntesi d'aquestes en bioreactor sinó que passa per una etapa de purificació o "*downstream*", que en alguns casos pot representar més del 50 % del temps i els costos associats al procés, donats els elevats requeriments de qualitat, puresa i seguretat en l'actual mercat de producció de compostos amb aplicacions terapèutiques [1-4].

Els processos de purificació normalment transcorren a través de l'eliminació de contaminants que en alguns casos poden arribar a tenir propietats molt semblants a les del producte d'interès, de manera que es poden arribar a patir pèrdues importants en els rendiments de producció globals. No obstant però, la integració de les diferents etapes d'un procés de producció pot portar al desenvolupament de metodologies productives que redueixen els contaminants des d'un origen [5-7]. En el cas de la producció de proteïnes recombinants, els principals contaminants del producte d'interès són la resta de proteïnes expressades per l'organisme hoste. Dins d'aquest grup a més, es poden incloure les proteases [8, 9], compostos amb estructura proteica que són sintetitzats per la cèl·lula amb l'objectiu de degradar determinades proteïnes per a un fi concret. La presència d'aquestes en un extracte cel·lular o en un medi determinat (en cas que l'organisme hoste disposi d'un aparell d'excreció) pot influir doblement de manera negativa sobre el rendiment de producció global; per una banda pel fet de representar una font de contaminació i per l'altra per la possibilitat de degradació de la proteïna recombinant sintetitzada.

El principal objectiu d'un procés de purificació o *downstream* d'una proteïna recombinant doncs, és òbviament l'obtenció d'un compost amb un elevat grau de puresa, però no només això, interessa que presenti una elevada estabilitat que la faci apta per ser utilitzada reiteradament amb el temps sense perdre activitat i a més el seu "*forma*" permeti una fàcil recuperació d'aquesta del medi de reacció on s'ha utilitzat.

S'ha de tenir en compte que la presència de contaminants com ara altres proteïnes d'un extracte cel·lular pot portar a la producció incontrolada de diversos compostos que poden interferir en les reaccions d'interès o bé en les posteriors etapes de separació o purificació dels compostos "*objectiu*".

Tot i que la metodologia de purificació d'un determinat producte obtingut a partir d'un cultiu recombinant varia moltíssim no només de producte a producte sinó també

segons la font d'aquest (organisme hoste), hi ha determinades etapes que generalment es conserven; aquest és el cas de la separació de la biomassa respecte del medi de cultiu, necessària tant com si el producte d'interès s'excreta al medi de cultiu com si roman al citoplasma (Figura 4.1).

Si es centra l'atenció en *Escherichia coli* com a microorganisme hoste, a menys que la proteïna recombinant d'interès s'expressi fusionada a un pèptid senyal que en dirigeixi la seva secreció al periplasma i posteriorment la seva excreció al medi de cultiu, la gran majoria de les proteïnes que expressa es troben al citoplasma [9, 10]. Així doncs, la fracció descartable de la primera etapa en el procés de purificació és el sobrenedant o medi de cultiu.

A partir de la fracció recuperada d'aquesta primera etapa del procés de purificació s'obté un extracte o lisat cel·lular per mitjà de tècniques de ruptura mecànica, lisi enzimàtica o sonicació que ha de ser separat de les restes cel·lulars insolubles o *debris* [1, 11].

La producció de proteïnes recombinants a *E. coli* pot dirigir-se cap a la síntesi de proteïna en forma soluble o cap a la formació d'agregats proteics anomenats *cossos d'inclusió*, que per una banda faciliten la seva separació de la resta de compostos intracel·lulars i per l'altre fa la proteïna recombinant menys susceptible de l'atac de proteases. No obstant però, tot i que els cossos d'inclusió poden presentar certa activitat enzimàtica s'acostuma a dur a terme una etapa posterior de replegament per a conferir a la proteïna la seva estructura nativa [5, 6, 8, 9].

En cas que la proteïna es trobi en forma de cossos d'inclusió, aquesta quedarà juntament amb les restes cel·lulars insolubles, de manera que s'ha d'afegir algun agent solubilitzant per tal de separar-la. En cas però que la proteïna s'expressi en forma soluble el procés de purificació es pot conduir a través de diverses tècniques en funció de la naturalesa de la proteïna expressada, incloent entre d'altres: tècniques cromatogràfiques, ultrafiltració, nanofiltraió etc...

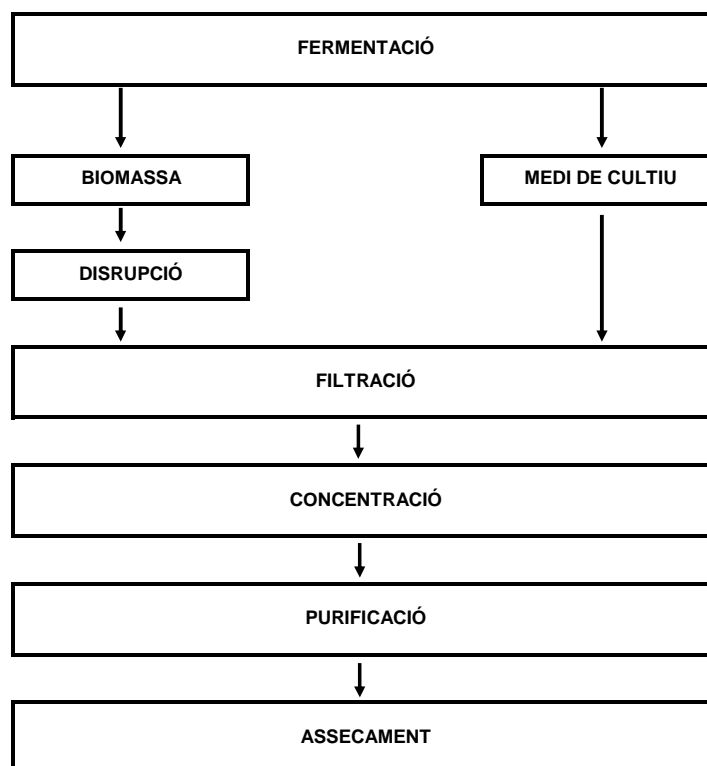


Figura 4.1.- Esquema general d'un procés típic de Downstream a *Escherichia coli*.

El resultat final del procés de purificació d'un extracte cel·lular és un concentrat de la proteïna d'interès, precipitada amb algun agent químic, en forma de suspensió o bé en forma soluble. En molts casos però, donat l'ús de la proteïna purificada com a biocatalitzador en una determinada reacció, és interessant disposar d'un sistema robust, estable i de fàcil manipulació. És per això doncs que sovint es treballa amb derivats proteics immobilitzats [1, 11-13], és a dir, sistemes que retenen la proteïna d'interès atorgant-li propietats que no tindria en forma soluble.

La utilització d'enzims en forma immobilitzada o insoluble, presenta clars avantatges front a la forma soluble atenent a criteris econòmics [1, 12, 14, 15]. Donat l'elevat preu que presenten aquests, resulta interessant poder-los reutilitzar en diversos lots de producció o en operació en continu, la qual cosa es pot assolir quan s'atrapa l'enzim en una matriu o sistema tal que en permeti una separació fàcil del medi de cultiu. El fet d'utilitzar derivats immobilitzats permet també superar les limitacions imposades per la seva solubilitat en un determinat medi de reacció [1, 11-13], la qual cosa porta a augments notables de productivitat volumètrica donada una major presència d'enzim al sistema.

La utilització de determinades matrius o agents immobilitzants a més, poden atorgar a l'enzim en qüestió un increment en la seva estabilitat respecte la seva forma soluble ja que per una banda dificulten l'accés de determinades proteases a zones especialment sensibles de l'enzim i per l'altra, eviten mitjançant una certa rigidificació de la seva estructura un possible desplegament parcial que els podria fer perdre part de la seva activitat [1, 11, 15-20].

Per altra banda però, la utilització d'enzims en forma immobilitzada per al seu ús com a biocatalitzadors presenta certs inconvenients, tant des del punt de vista de procés, com econòmic, ja que el cost de les matrius o agents immobilitzants és sovint bastant elevat [1] .

La immobilització enzimàtica pot portar segons la tècnica aplicada a pèrdues d'activitat, en alguns casos considerables, per efecte entre d'altres de la mateixa rigidificació que per contrapartida n'augmenta l'estabilitat. En el mateix context, la utilització de partícules poroses com a suports per a la immobilització enzimàtica pot presentar limitacions en la transferència de matèria de substrats i productes [1, 11, 13, 18, 20, 21], de manera que les velocitats de reacció observades no es corresponen amb les velocitats teòriques corresponents a la concentració real d'enzim al suport.

S'han desenvolupat moltes tècniques per a la immobilització d'enzims [1, 15-17, 19, 20, 22] basades en inclusions en determinades matrius o en la formació d'enllaços amb aquestes , des d'adsorcions fins a covalents (Figura 4.2). Un dels principals paràmetres o criteris a tenir en compte és precisament la força d'aquesta interacció, on s'ha de trobar un compromís entre un enllaç excessivament feble que pot dur a pèrdues progressives d'enzim per efecte de la desorció i un enllaç massa fort, que pot dur a interaccions no desitjades amb la superfície de la matriu que acabin amb pèrdues d'activitat irreversibles.

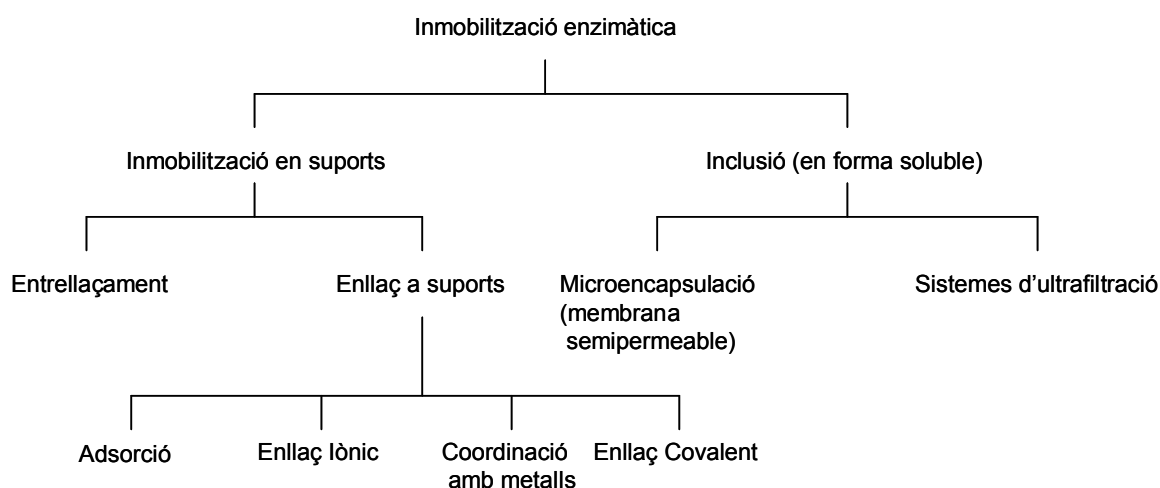


Figura 4.2.- Tècniques principals d'immobilització enzimàtica.

Sovint els processos de purificació d'un determinat enzim present en un extracte cel·lular passen per una etapa d'immobilització en un suport, aprofitant una característica de l'enzim que el faci compatible o afí amb aquest per a posteriorment dur a terme una etapa de desorció i obtenir un concentrat proteic. En el cas però, en què l'enzim produït es destini directament a reaccions de síntesi, es pot dur a terme el que es coneix com a purificació i immobilització en un sol pas [18, 19, 23], obtenint com a resultat un derivat immobilitzat d'elevada puresa amb un estalvi important de temps i costos de processament. No obstant però, un procés d'aquest tipus ha de tenir en compte que en la purificació i immobilització simultània de l'enzim d'interès, poden quedar "atrapats" al suport immobilitzant determinades proteïnes per efecte d'alguna interacció inespecífica amb la matriu. Aquest fet pot resultar en alguns casos, per qüestions de qualitat, una limitació important.

#### 4.1.2. Procés de purificació i immobilització en un pas aplicat a Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

La tècnica IMAC [24-31] o cromatografia d'afinitat a metalls immobilitzats ha estat l'emprada per a la purificació i immobilització simultània de RhuA procedent d'extractes cel·lulars [18].

La tecnologia de separació IMAC es basa en la coordinació que s'estableix entre un ió metàl·lic immobilitzat en la matriu i un grup donador d'electrons de la superfície de la proteïna en qüestió. Els metalls més àmpliament utilitzats acostumen a ser Cu (II),

Zn(II), Co (II), Ni (II) i Fe (III). Per altra banda, tot i que un bon nombre de residus proteics presenten afinitat per aquests tipus de suport, la immobilització de proteïnes en matrius d'aquest tipus es basa sobretot en la disponibilitat i accessibilitat de residus d'histidina, a través del grup imidazol, i la presència en posicions properes d'altres aminoàcids del tipus aromàtic (Trp, Phe i Tyr ) que poden augmentar-ne la retenció.

Donat que els residus d'histidina presenten un caràcter hidrofòbic, aquests no acostumen a trobar-se accessibles a la superfície d'una proteïna. Per tant doncs, a priori els derivats immobilitzats que se'n poden obtenir seran d'una elevada puresa, és a dir, amb poques interaccions inespecífiques, sempre i quan la proteïna en qüestió a immobilitzar s'hagi expressat amb determinades modificacions genètiques que la facin afí a aquest tipus de suport. Les modificacions més típiques consisteixen a expressar la proteïna d'interès a una cua de 6 residus d'histidina a un dels seus extrems.

En aquest cas la proteïna recombinant d'estudi, Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, s'expressa fusionada a una cua d'histidines [32] al seu extrem N per a facilitar-ne la seva purificació i immobilització en un sol pas en suports de tipus IMAC. En anteriors treballs al grup de recerca on s'emmarca aquest treball [18], s'ha comprovat que la utilització d'aquesta tècnica com a procés de purificació i separació de la proteïna d'interès en una única etapa, presenta a més de la coordinació que s'estableix entre els residus d'histidina de l'extrem N de la proteïna i el metall immobilitzat, un bescanvi del metall del centre actiu de la proteïna amb el metall immobilitzat a la matriu del compost utilitzat a la immobilització. Es va comprovar que el tipus de metall emprat influeix directament i amb diferent intensitat en l'activitat enzimàtica del derivat immobilitzat resultant del procés. D'aquesta manera doncs, la tria del metall a immobilitzar en la matriu d'agarosa no és quelcom arbitrari, sinó funció de l'estudi de l'activitat resultant del procés.

En estudis de desorció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa del suport emprat a la immobilització [33], es va determinar que la utilització de Cobalt (front a Níquel, Coure i Zinc) com a metall immobilitzat conduïa a augments de l'activitat específica de l'enzim desorbit entre 3 i 4 vegades respecte la situació inicial (abans de començar el procés de purificació). Per altra banda, la utilització de Níquel, Coure i Zinc va conduir a enzims purificats de menor activitat específica. Es creu que aquest fet pot estar relacionat amb un possible canvi d'estructura del centre actiu que afavoreixi la interacció de l'enzim amb els seus substrats naturals. No s'ha estudiat però quina pot ser la situació amb substrats no naturals de l'enzim en qüestió.

Cal destacar el cas del Zinc, que tot i ser el metall que conté la proteïna en el seu centre actiu porta a l'obtenció d'enzim purificat de menor activitat específica. Els estudis realitzats per I. Ardao [18] van demostrar que al procés de purificació també hi



podia tenir lloc una pèrdua del metall del centre actiu, d'aquí que l'activitat específica de l'enzim desorbit pogués ser menor que la inicial.

Tant el bescanvi del metall del centre actiu com la seva pèrdua en processos de purificació per IMAC, no han estat modelitzats. Així doncs, la utilització d'un metall o un altre respon únicament a criteris empírics. En el cas d'estudi, donat que es va comprovar que la utilització de Cobalt com a metall immobilitzat conduïa a derivats immobilitzats de major activitat específica, es va decidir utilitzar-lo en els processos realitzats.

##### 4.1.3. Objectius

Els elevats costos del procés de purificació d'una determinada proteïna recombinant, en termes de nombre d'operacions necessàries, temps requerit i cost de materials, justifiquen el fet que s'investigui en l'optimització global del procés, no només en termes de proteïna activa produïda sinó també en proteïna purificable i utilitzable com a biocatalitzador.

Així doncs aquest capítol es centrarà en l'estudi del procés de purificació i immobilització en un sol pas de RhuA atenent a criteris de caracterització del suport, en termes de càrrega enzimàtica i estabilitat del derivat enzimàtic immobilitzat obtingut així com la dependència de l'estratègia de producció de l'enzim en el posterior procés de purificació.

Part d'aquest treball es va realitzar en col·laboració amb el Dr. Jaume Pinsach que en aquell moment era el responsable de la part de cultiu bacterià i de la implementació d'estratègies per a la millora de la producció i de la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada.

## 4.2. Materials i mètodes

### 4.2.1. Soques i plasmidis

(Veure secció general de soques i plasmidis utilitzats; 3.1)

La soca *E. coli* M15ΔglyA [pREP4] portadora del vector pQEαβrham es va utilitzar per a la sobreexpressió, en cultius d'alta densitat cel·lular, de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

##### 4.2.2. *Medis de cultiu*

(Veure secció general de medis de cultiu emprats; 3.2)

Per al desenvolupament dels pre-cultius, a partir d'estocs de la soca conservats en glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , es va utilitzar medi LB. Els cultius en Erlenmeyer (inòculs) i bioreactor, per altra banda, es van dur a terme partint de medi definit de composició detallada a la secció general de medis de cultiu.

##### 4.2.3. *Equipament de procés (no analític) utilitzat*

Per a dur a terme els cultius descrits en aquest estudi es va utilitzar el següent equipament:

- Fermentador Biostat B (Sartorius) amb capacitat total de 2L i volum útil d'1.5 L i unitat de control digital (DCU) per al desenvolupament dels cultius a escala laboratori.
- Centrifugadora Beckman J2-21 M/E, sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials) i disruptor cel·lular mecànic One Shot (Constant Systems LTD) per al processament del brou de cultiu.

##### 4.2.4. *Condicions de cultiu*

El procés pren com a punt de partida el desenvolupament *overnight* d'un pre-cultiu en medi complex LB a un volum final de 15 mL. Assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1.5 – 2 unitats, s'inocula un Erlenmeyer carregat amb medi definit (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb un 5% d'inòcul a un volum total de 100 mL. Transcorregudes 4 hores, i assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1 unitat, s'inoculen 80 mL del contingut de l'Erlenmeyer a un reactor escala laboratori carregat amb medi definit fins a un volum total de 800 mL. Es fixa una consigna de 7 unitats per al pH i 50% de saturació per a la concentració d'oxigen dissolt a la unitat de control del procés (DCU).

Després de 12-14 hores de procés, s'esgota la font de carboni carregada inicialment i s'inicia una etapa en discontinu alimentat a partir de l'addició d'una solució concentrada de nutrients (de composició descrita a la secció general de materials i

mètodes). En aquest estudi es realitzen tres estratègies de procés diferents segons les condicions a les que transcorre la fase d'alimentació en discontinu:

- En un cas, la fase d'alimentació en discontinu es du a terme a 37°C i a un ritme d'alimentació de nutrients que permeti mantenir una velocitat específica de creixement de 0.1 h<sup>-1</sup> amb limitació de font de carboni al medi de cultiu.
- En segon lloc, igualment mantenint la limitació de font de carboni al cultiu, la fase d'alimentació en discontinu es du a terme a 28°C i a un ritme d'alimentació de nutrients que permeti mantenir una velocitat específica de creixement de 0.1 h<sup>-1</sup>.
- En últim lloc, si bé el ritme d'alimentació de nutrients implementat permet un creixement a una velocitat específica entre 0.1 i 0.2 h<sup>-1</sup>, la fase d'alimentació en discontinu es du a terme a 37°C però mantenint unes condicions inhibidores de creixement a partir d'un excés de glucosa al medi (60 g·L<sup>-1</sup>).

En tots tres casos l'etapa d'inducció del cultiu es du a terme a partir d'una addició contínua d'inductor (IPTG). El perfil implementat d'alimentació d'inductor al bioreactor es de tipus exponencial pre-programat a un ritme tal que permeti mantenir constant la relació inductor – biomassa durant tota l'etapa. Aquests esquemes d'inducció es condueixen a partir de la utilització d'una segona microbureta (MICRO BU 2030 de Crison instruments equipada amb una xeringa de volum útil d'1mL de Hamilton) tal i com es descriu al capítol de materials i mètodes (secció 3.3). En els casos on el cultiu es du a terme amb limitació de font de carboni, els nivells d'inductor (concentració volumètrica) es mantenen en tot moment per sota dels 13 µmol·L<sup>-1</sup>. Per altra banda, al cultiu conduït en concentracions inhibidores de substrat, els nivells d'inductor són majors que al cas anterior però inferiors a 25 µmol·L<sup>-1</sup>, ja que en aquests casos s'ha de vèncer la repressió dels gens responsables del transport actiu d'inductor a l'interior de la cèl·lula originats per l'excés de glucosa al medi.

#### 4.2.5. Mètodes analítics per al seguiment del procés de producció

##### 4.2.5.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.1)

##### 4.2.5.2. Quantificació dels nivells de proteïna recombinant

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.2)

En aquest estudi, a més, es realitza una caracterització de la proteïna recombinant a nivell de conservació dels 6 residus d'histidina amb què s'expressa fusionada. Aquesta caracterització es du a terme en base a la utilització de tècniques de Dott Blott (veure secció general de materials i mètodes analítics utilitzats: 3.5.2) que determinen el percentatge de proteïna, respecte el total sintetitzat, que conserva la cua de 6 residus d'histidina intacta.

##### 4.2.6. Immobilització de RhuA sobre suports IMAC

###### 4.2.6.1. Processament del brou de cultiu

(Veure secció general de mètodes de processament del brou de cultiu: 3.4.1)

###### 4.2.6.2. Immobilització sobre suports IMAC

(Veure secció general de purificació i immobilització de RhuA: 3.4.2)

### 4.3. Resultats i discussió

#### 4.3.1. Caracterització dels derivats immobilitzats

Per a la utilització de derivats immobilitzats com a biocatalitzadors en reaccions de síntesi, un primer pas consisteix a determinar quines són les condicions òptimes en termes de càrrega enzimàtica sota les quals s'ha de dur a terme el procés d'immobilització. És interessant que el derivat immobilitzat obtingut, no presenti en la seva aplicació en síntesi limitacions en la transferència de matèria de substrats i/o productes a través de la partícula porosa o suport de la immobilització. Si es treballa a unes condicions de càrrega d'enzim tals que l'etapa controlant del procés sigui la velocitat de reacció aleshores s'estarà aprofitant tot l'enzim immobilitzat al suport, de manera que es podrà augmentar la productivitat volumètrica en un sistema afegint més derivat immobilitzat. Per contrapartida, si es treballa a càrregues enzimàtiques tals

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

que l'etapa limitant del procés sigui la difusió de substrats, s'estarà desaprofitant part del potencial de l'enzim.

Els extractes cel·lulars utilitzats en els processos d'immobilització i purificació en un sol pas a partir de cromatografia d'afinitat a metalls immobilitzats (IMAC) d'aquesta part de l'estudi procedeixen de cultius cel·lulars duts a terme a partir d'estratègies amb limitació de font de carboni a 37°C (Fig 4.3.) [34]. Els cultius es van induir en continu mantenint una relació inductor – biomassa constant tal i com s'indica a la secció de materials i mètodes.

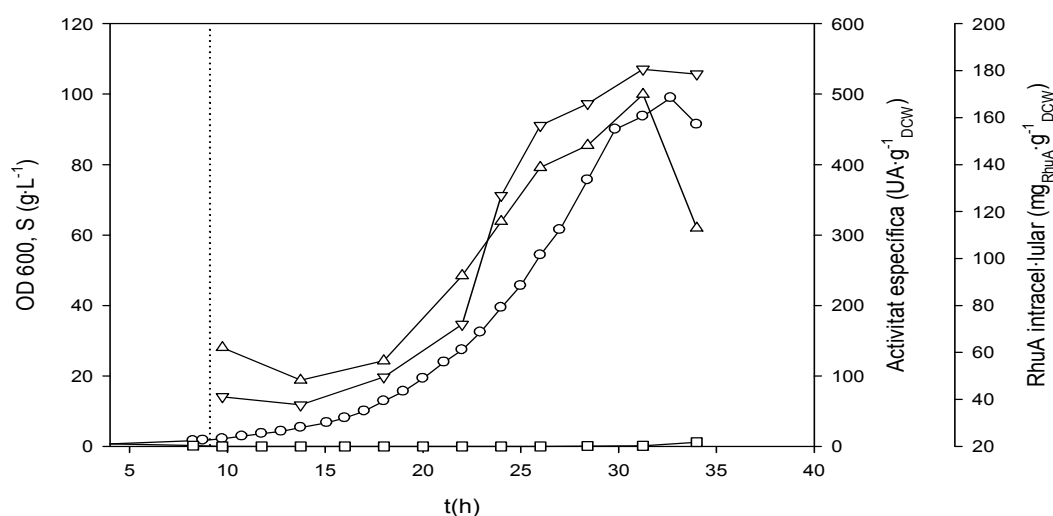


Fig. 4.3. Cultiu cel·lular dut a terme a 37°C amb limitació de font de carboni i inducció contínua a relació inductor – biomassa constant. La línia de punts indica el moment a partir del qual comença l'addició contínua d'IPTG. (o-o) densitat òptica, (□-□) glucosa, (Δ-Δ) activitat específica i (▽-▽) proteïna expressada per gram de pes sec.

La figura 4.4 mostra els resultats de la immobilització de RhuA, a raó d'1, 5, 10, 20 i 50 unitats d'activitat per mL de suport. S'observa que per a tots processos d'immobilització realitzats, el rendiment d'immobilització assolit a l'operació es troba entre el 45 i el 60%. Estudis realitzats prèviament [35], van demostrar que per a proteïnes de la mateixa família que RhuA, es podien assolir rendiments d'immobilització i purificació en un sol pas majors del 90%.

Per tant doncs, entre el 55 i el 40% de la proteïna present a la solució d'extracte cel·lular emprat en cada experiment roman activa al sobrenedant però sense immobilitzar al suport.

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

Per al tipus de suport utilitzat, la càrrega màxima de proteïna fusionada a cua de 6 histidines es troba, segons les dades del fabricant [36], al voltant de  $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de suport. Així doncs en totes les immobilitzacions dutes a terme, excepte quan la càrrega de l'experiment és de  $50 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  de suport, la càrrega d'enzim no supera aquesta quantitat (Taula 4.1) i per tant la saturació del suport no sembla ser una causa probable per als baixos rendiments d'immobilització.

Per altra banda, el fet que el punt de partida de la immobilització és extracte cel·lular podria portar a pensar que certes proteïnes expressades per *E. coli* podrien jugar un paper de competència amb RhuA per als llocs actius del suport. Donat però que la immobilització enzimàtica es dóna en presència d'imidazol i que a més, els residus d'histidina no tenen tendència a quedar exposats a la superfície proteica més accessible pel seu caràcter hidrofòbic, aquest fet pot descartar-se també com a causa dels baixos rendiments d'immobilització.

Els baixos rendiments d'immobilització, i tot i la redundància, el fet que es detecti proteïna activa al sobrenedant, pot portar a pensar que existeixi alguna afecció de la proteïna que n'eviti la immobilització, però conservant-ne l'activitat. En aquest sentit tot semblaria indicar que únicament pot tractar-se dels residus implicats en la immobilització, és a dir, de la cua d'histidines de l'extrem N terminal.

Càrrega enzimàtica ( $\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ suport)	Càrrega proteica ( $\text{mg}_{\text{RhuA}}\cdot\text{mL}^{-1}$ suport)
1.56	0.36
5.15	1.58
9.94	3.42
20.86	7.18
54.42	16.61

Taula 4.1. Càrrega enzimàtica i proteica per mL de suport per a cada immobilització realitzada.

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

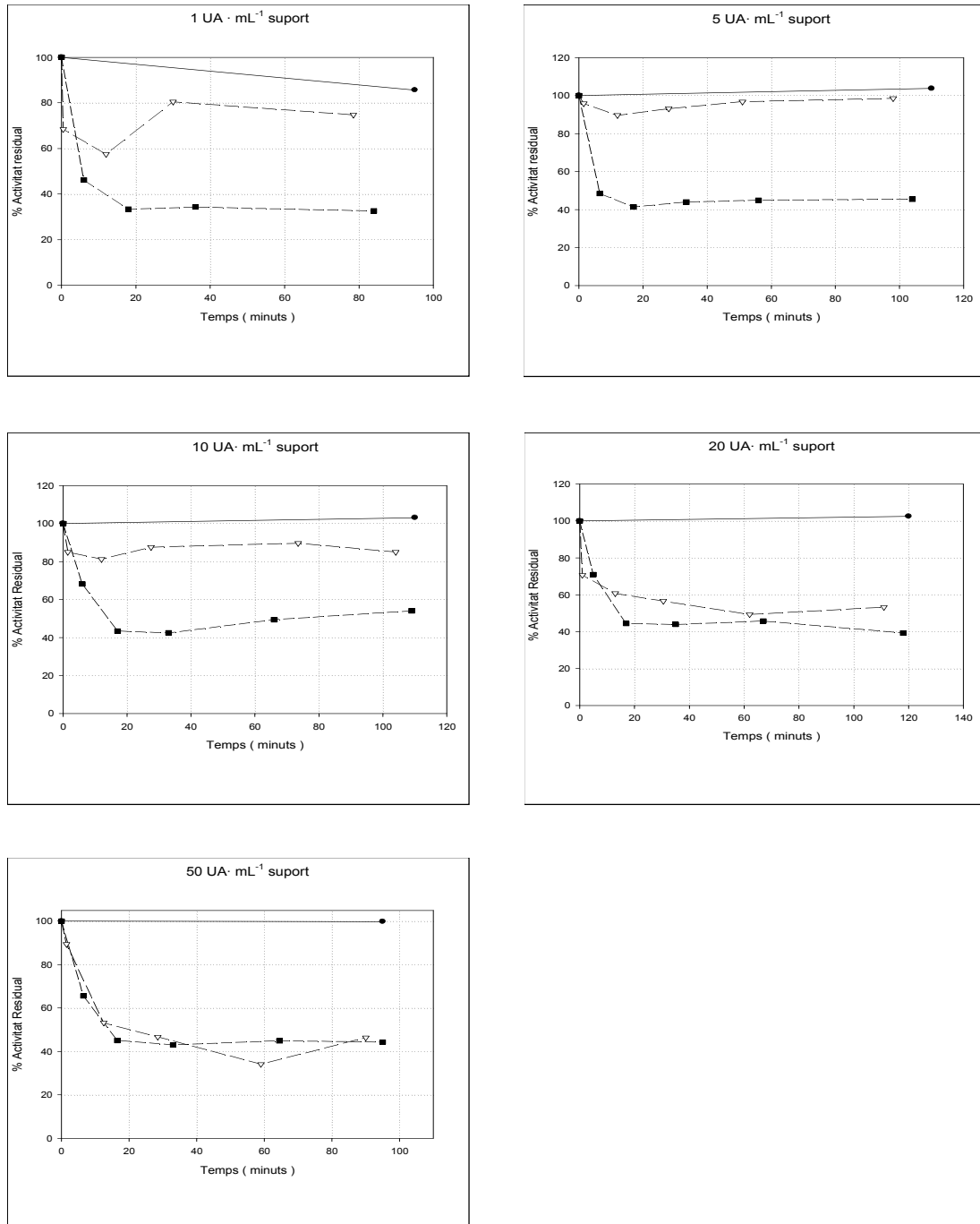


Fig. 4.4 Immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa procedent d'extractes cel·lulars de cultius duts a terme a 37°C amb limitació de font de carboni. Figures corresponents a 1, 5, 10, 20 i 50 UA·mL<sup>-1</sup> de suport. (-●-) Referència, (-▽-) Suspensió, (-■-) Sobrenedant.

Per altra banda, es va analitzar l'activitat immobilitzada ressuspenent el derivat sòlid en tampó de lisi (43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol, 300mM NaCl a pH=8), és a dir sense RhuA activa present al sobrenedant. A la Figura 4.5 es presenten aquests valors comparant-los amb l'activitat retinguda, calculada indirectament com a diferència entre l'activitat a la suspensió i al sobrenedant (veure

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

secció general de materials i mètodes: 3.4.2) Es va observar que independentment dels valors teòrics d'enzim immobilitzat al suport, la tendència en l'activitat mesurada del derivat era asimptòtica, és a dir, a partir d'una certa quantitat d'enzim immobilitzat el procés presentava limitacions en la transferència de matèria, resultant una velocitat global del procés enzimàtic (difusió de substrats, reacció enzimàtica i difusió de productes de la reacció) menor que la corresponent a la quantitat teòrica d'enzim immobilitzat. Per tant doncs, en base als resultats, les condicions de treball a partir de les quals la velocitat de l'etapa reacció mesurada correspon a la màxima teòrica abans el procés no presenti limitacions en la transferència de matèria es troben al voltant de  $3.25 - 6.4 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  de suport. Donat que els rendiments en l'operació d'immobilització es troben al voltant del 50 %, la preparació d'un derivat immobilitzat amb la càrrega adequada d'enzim es dona quan es treballa a relacions d'immobilització entre 5 i  $10 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$  de suport.

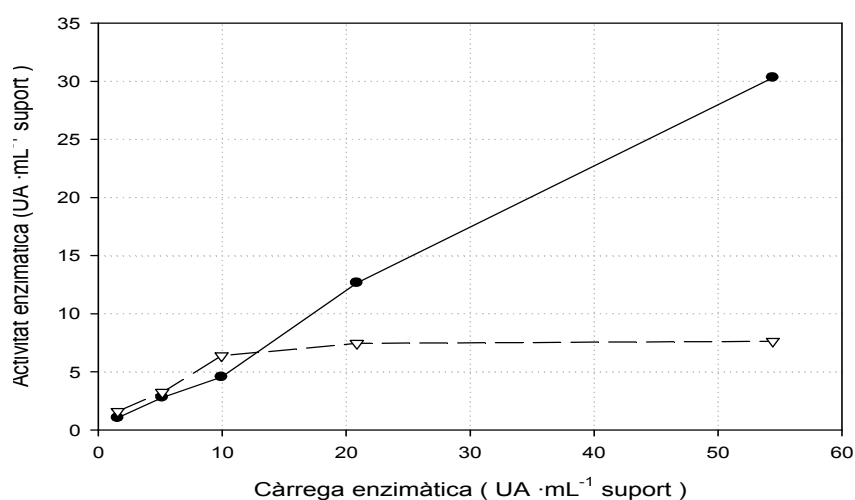


Fig. 4.5. Activitat enzimàtica mesurada i activitat teòrica (sense limitacions en la transferència de matèria) dels derivats immobilitzats obtinguts a partir d'extractes cel·lulars procedents d'estratègies de cultiu amb limitació de font de carboni a 37°C. (—●—) Activitat teòrica immobilitzada, (---▽---) Activitat mesurada

Una de les condicions per tal que la utilització d'un derivat enzimàtic immobilitzat en un procés de síntesi sigui econòmicament favorable front la utilització de l'enzim en la seva forma soluble és que presenti una major estabilitat a les condicions de reacció i conservació. D'aquesta manera es va avaluar l'estabilitat a 40 dies a les condicions de conservació (tampó de lisi, 0.02% d'azida sòdica a 4°C) tant de lisat cel·lular en forma soluble com del derivat immobilitzat que se n'obté així com de RhuA purificada (procedent d'una etapa prèvia d'immobilització i posterior desorció de suports tipus



#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

IMAC) en forma soluble i immobilitzada en suport de tipus IMAC (Fig. 4.6). En tots tres casos, la proteïna utilitzada procedia de cultius cel·lulars a 37°C duts a terme a partir d'estratègies basades en una limitació de font de carboni durant les fases de creixement i inducció, on aquesta última es va realitzar de forma contínua a relació inductor – biomassa constant. S'observa que quan s'emmagatzema l'enzim en forma soluble, tant extracte cel·lular com RhuA purificada, l'activitat als 40 dies es troba entre el 40 i el 60% de l'activitat inicial, mentre que per als derivats immobilitzats les pèrdues són gairebé negligibles.

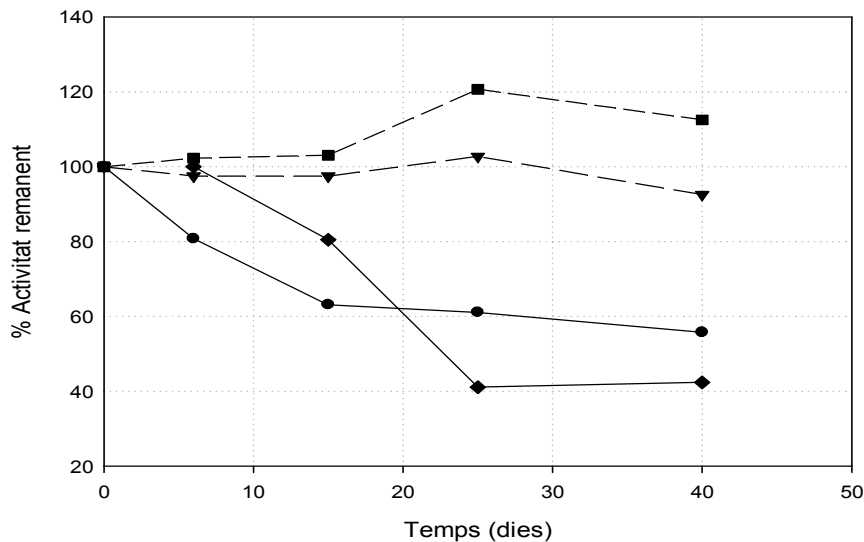


Fig.4.6. Estabilitat a les condicions de conservació de l'enzim soluble i el derivat immobilitzat. (●) Extracte cel·lular soluble, (◆) RhuA purificada soluble, (■) Derivat immobilitzat procedent d'extracte cel·lular, (▼) Derivat immobilitzat procedent de RhuA purificada.

A les mateixes condicions de conservació es va mesurar el percentatge d'activitat desorbida del suport per als derivats immobilitzats procedents tant d'extracte cel·lular com de RhuA purificada. Es va observar que en ambdós casos només entre un 3 i 3.5% de l'activitat inicial del derivat es va desorbir del suport en 40 dies, de manera que tot i tractar-se d'una tècnica d'immobilització amb interaccions entre suport i enzim relativament febles el percentatge de desorció és menyspreable.

##### 4.3.2. Procedència de l'extracte cel·lular

La col·laboració amb el Dr. Jaume Pinsach va obrir una via d'investigació per tal d'explicar els baixos rendiments d'immobilització obtinguts a partir d'extracte cel·lular procedent de cultius duts a terme segons estratègies amb limitació de font de carboni a 37°C. D'aquesta manera es van plantejar dues estratègies alternatives de cultiu amb l'objectiu de reduir l'estrès cel·lular degut a la sobreexpressió de RhuA i proporcionar unes condicions tals que es minimitzessin els fenòmens proteolítics que poden tenir lloc a la cèl·lula pel fet de mantenir una limitació prolongada de nutrients i l'augment sobtat de la quantitat de proteïna recombinant al citoplasma.

##### 4.3.2.1. Extracte cel·lular procedent de cultius amb limitació de nutrients a 37°C

A partir de les estratègies inicials de cultiu bacterià (Figura 4.3), basades en la imposició d'un ritme de creixement a velocitat constant mitjançant una limitació de nutrients, tant en la fase no induïda com d'inducció, es va observar que a partir d'un cert punt, tant l'activitat específica del cultiu ( $UA \cdot g^{-1} DCW$ ) com la qualitat de la proteïna sintetitzada ( $UA \cdot mg^{-1}$ ) disminuïen dràsticament (Fig.4.7). Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts en les immobilitzacions a diferents càrregues enzimàtiques, on es va observar que al voltant d'un 50% de l'enzim inicial a l'extracte quedava actiu i pendent d'immobilitzar al suport (Fig 4.4), va portar a pensar que durant el procés de producció de RhuA podien tenir lloc a la cèl·lula mecanismes de resposta a la situació de limitació de nutrients i a la sobreexpressió de proteïna recombinant en forma d'atac proteolític a l'enzim sintetitzat. Aquest atac semblaria ser en principi parcial, ja que en el procés d'immobilització la fracció de RhuA no immobilitzada segueix sent activa, ara bé, una possible degradació de la cua de 6 residus d'histidina amb que s'expressa fusionada podria donar resposta als baixos rendiments d'immobilització. A partir d'un cert moment però aquests fenòmens de proteòlisi podrien deixar de ser neutres des del punt de vista de l'activitat enzimàtica de RhuA i començar a tenir lloc en residus de l'enzim implicats en el seu centre actiu amb una pèrdua irreversible d'activitat (Fig. 4.7).

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

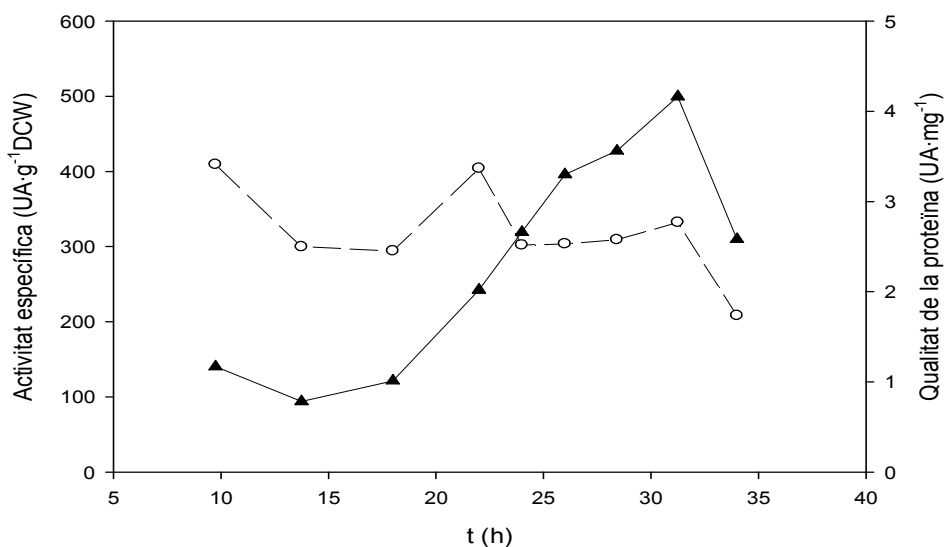


Fig. 4.7. Evolució de l'activitat específica i de la qualitat de la proteïna sintetitzada en cultius amb limitació de nutrients a 37°C. (-▲-) Activitat específica, (-○-) Qualitat proteica.

Per tal de comprovar si els baixos rendiments d'immobilització podien estar relacionats amb una pèrdua parcial de la cua d'histidines de l'extrem N de la proteïna recombinant, es van dur a terme anàlisis de Dott Blot (Fig.4.8).

Mitjançant aquesta tècnica es pot determinar quin percentatge o fracció de proteïna recombinant sintetitzada present en una mostra conserva la cua de 6 residus d'histidina. Aquesta metodologia és sensible únicament a les molècules de proteïna amb la cua de 6 histidines senceres, de manera que molècules que la tinguin parcialment degradada no seran detectades.

Els resultats de l'aplicació d'aquesta metodologia sobre les mostres procedents d'aquest tipus d'estratègia de cultiu van permetre observar que, gairebé durant tota la fase d'inducció del cultiu, la quantitat de RhuA que conservava la cua de 6 histidines disminuïa progressivament fins a situar-se al voltant del 20% de la inicial.

Si comparem aquests resultats amb els rendiments d'immobilització obtinguts, al voltant del 50%, veiem que la immobilització de RhuA sobre els suports IMAC pot donar-se tot i que la cua d'histidines estigui parcialment degradada. No podem confirmar però, l'estat de la cua d'histidines de la fracció de RhuA no immobilitzada sobre el suport. Tan sols es pot afirmar amb seguretat que no en conserva els 6 residus. Així doncs no sabem amb certesa quin és el límit inferior en nombre de residus d'histidina necessaris per tal d'assegurar la immobilització de la molècula al suport.

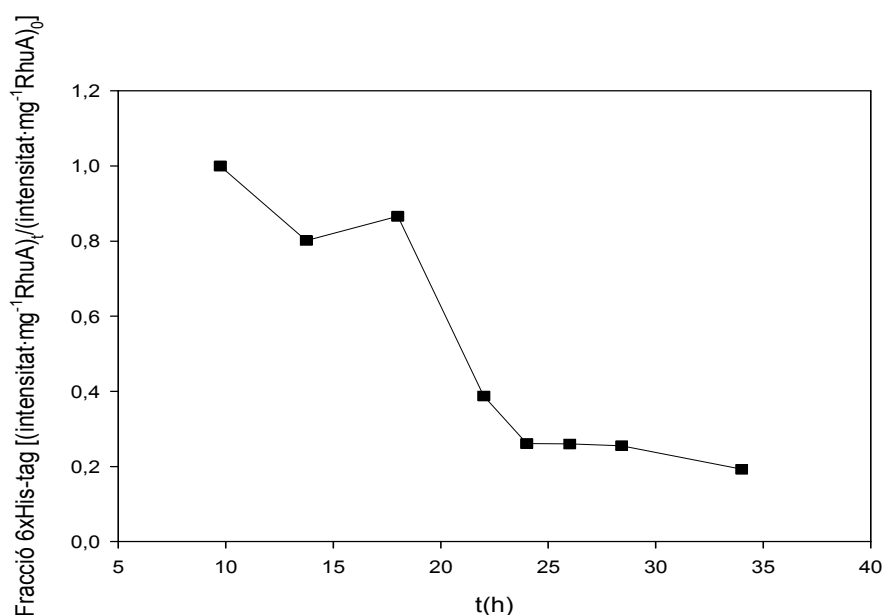


Fig. 4.8. Evolució del contingut específic de cua d'histidines de la RhuA expressada al llarg de la fase d'inducció d'un cultiu dut a terme amb limitació de nutrients a 37°C.

#### 4.3.2.2. Extracte cel·lular procedent de cultius amb limitació de nutrients a 28°C

La primera estratègia alternativa de cultiu avaluada va consistir en la disminució de la temperatura del procés durant la fase discontinua alimentada, tant a l'etapa de creixement no induït com a la inducció.

Una disminució en la temperatura pot conduir a canvis tant al creixement del microorganisme com en la velocitat de síntesi i degradació de proteïnes recombinants i natives. Diversos autors han descrit l'efecte de la temperatura del cultiu sobre la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada quan se'n produeix una acumulació sobtada per efecte de la seva sobreexpressió [10, 37-39]. En alguns casos l'acumulació massiva de proteïna recombinant al citoplasma pot portar a problemes i deficiències en el seu plegament. Quan això passa el microorganisme pot engegar una maquinària de síntesi de xaperones per al correcte plegament de la proteïna, i en cas de no ser possible, aquestes mateixes, al posseir una certa activitat proteolítica, poden degradar la proteïna mal plegada. Tot i que també s'han reportat plegaments proteics incorrectes al citoplasma en cultius duts a terme a temperatures baixes [39], es pot

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

pensar a priori que 28°C és una temperatura suficient com per a evitar aquest tipus de plegaments incorrectes i per altra banda assegurar l'expressió de proteïna recombinant amb una dinàmica més relaxada que a partir de les estratègies inicials de cultiu (37°C) i per tant evitar possibles degradacions.

El seguiment de l'activitat específica del cultiu i de la qualitat de la proteïna sintetitzada (Fig. 4.9) permeten veure que, al llarg de la fase d'inducció del procés, els fenòmens proteolítics semblen haver disminuït respecte el cultiu dut a terme a 37°C .

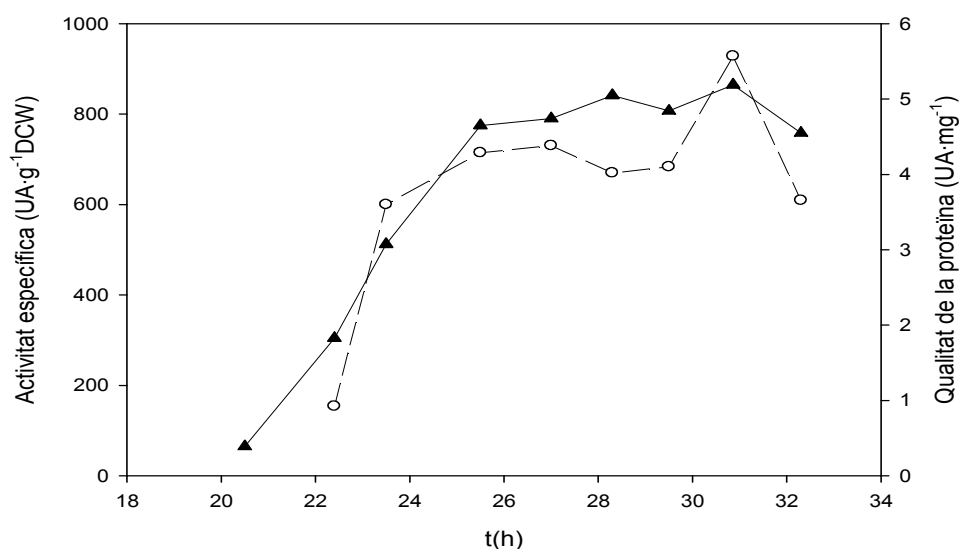


Fig. 4.9. Evolució de l'activitat específica i de la qualitat de la proteïna sintetitzada en cultius amb limitació de nutrients a 28°C. (---▲---) Activitat específica, (---○---) Qualitat proteica.

Tant l'activitat específica com la qualitat de la proteïna tenen un comportament similar al llarg de la fase d'inducció, després d'assolir un nivell màxim es mantenen bastant constants fins al final del cultiu, i en el cas de la qualitat en valors majors que els inicials obtinguts per al cultiu dut a terme amb limitació de nutrients a 37°C.

La immobilització de RhuA procedent de lisat cel·lular processat a partir de l'última mostra del cultiu va permetre assolir un rendiment al voltant del 90-93 %, notablement superior a l'obtingut per a l'anterior estratègia. Anàlisis de Dott Blot de seguiment del cultiu (Fig. 4.10) van demostrar que l'actual estratègia de cultiu reduïa els fenòmens proteolítics pel fet de no observar una disminució apreciable del contingut de RhuA fusionada a cua de 6 residus d'histidina.

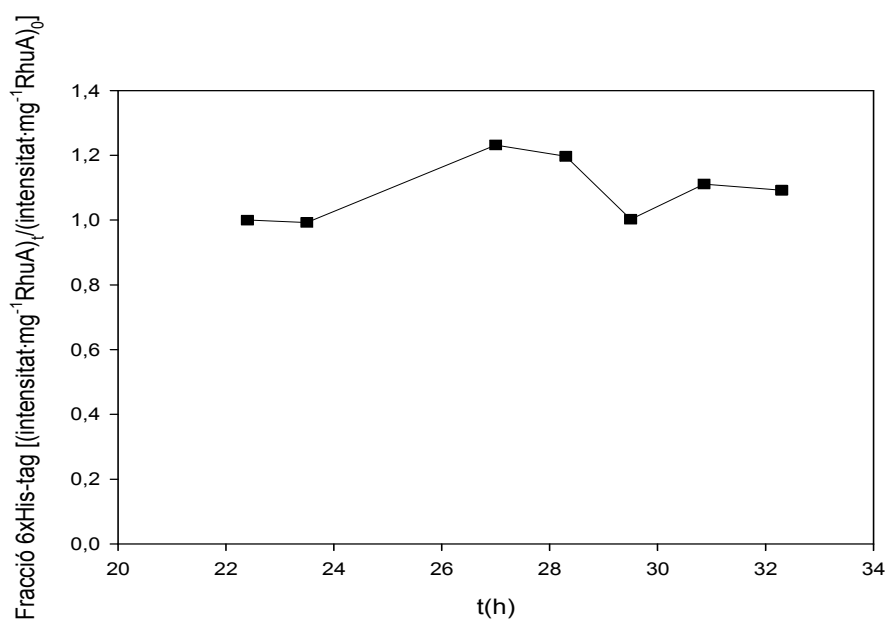


Fig. 4.10. Evolució del contingut específic de cua d'histidines de la RhuA expressada al llarg de la fase d'inducció d'un cultiu dut a terme amb limitació de nutrients a 28°C.

#### 4.3.2.3. *Extracte cel·lular de cultius duts a terme a 37°C amb excés de nutrients*

A banda de la sobreexpressió de proteïna recombinant el cultiu bacterià també pot entrar en situacions d'estrès cel·lular pel fet de mantenir una estratègia d'alimentació de nutrients basada en la limitació de la font de carboni disponible [40-42]. Davant d'una situació de manca de nutrients i elevada demanda d'aminoàcids tant per a la síntesi de proteïna recombinant com de les pròpies xaperones i proteases responsables del plegament i la degradació proteica respectivament, la proteïna recombinant sintetitzada pot degradar-se amb l'objectiu d'obtenir aminoàcids per tal de fer front a la demanda imposada per la inducció i els mecanismes de defensa. D'aquesta manera es planteja una segona estratègia de cultiu alternativa (Fig 4.11.) basada en un creixement a velocitat entre (0.1 – 0.2 h<sup>-1</sup>) durant la fase discontinua alimentada però mantenint en tot moment una concentració inhibidora de font de carboni (60 g·L<sup>-1</sup>). La inducció, igual que en els cultius anteriors es va dur a terme de manera contínua mantenint constant la relació inductor – biomassa. No obstant, en aquest cas, la concentració volumètrica d'IPTG al cultiu durant l'etapa d'inducció es va mantenir a nivells superiors respecte els dos anteriors casos ja que a les condicions

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

d'excés de substrat a les que es va mantenir el cultiu, el transport actiu d'IPTG a l'interior de la cèl·lula es pressuposa inhibit [43], de manera que se'n va afavorir el transport per difusió. Tot i que la velocitat de creixement del cultiu es va mantenir al voltant dels mateixos valors que en les estratègies anteriors, a priori es pot suposar que l'excés en la font de carboni pot representar un alleujament de l'estrès durant la fase d'inducció.

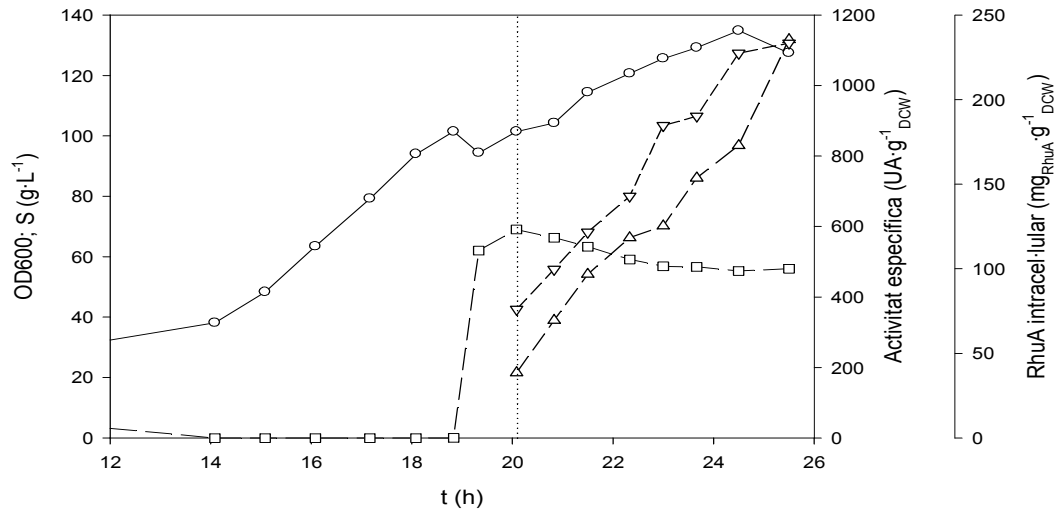


Fig. 4.11. Cultiu cel·lular dut a terme a 37°C amb concentració inhibidora de font de carboni i inducció contínua a relació inductor – biomassa constant. La línia de punts indica el moment a partir del qual comença l'addició contínua d'IPTG. (—○—) densitat òptica (—□—) concentració de glucosa, (---△---) activitat específica i (---▽---) proteïna expressada per gram de pes sec.

El seguiment de l'activitat específica i la qualitat de la proteïna sintetitzada durant el cultiu (Fig. 4.12) permeten observar que efectivament, tot i mantenir una temperatura de 37°C, l'estratègia de cultiu evita que els processos proteolítics que tenen lloc quan el cultiu es du a terme en condicions de limitació de glucosa no es produeixin en aquest cas.

#### 4.- Purificació i immobilització de RhuA procedent de cultius d'alta densitat cel·lular

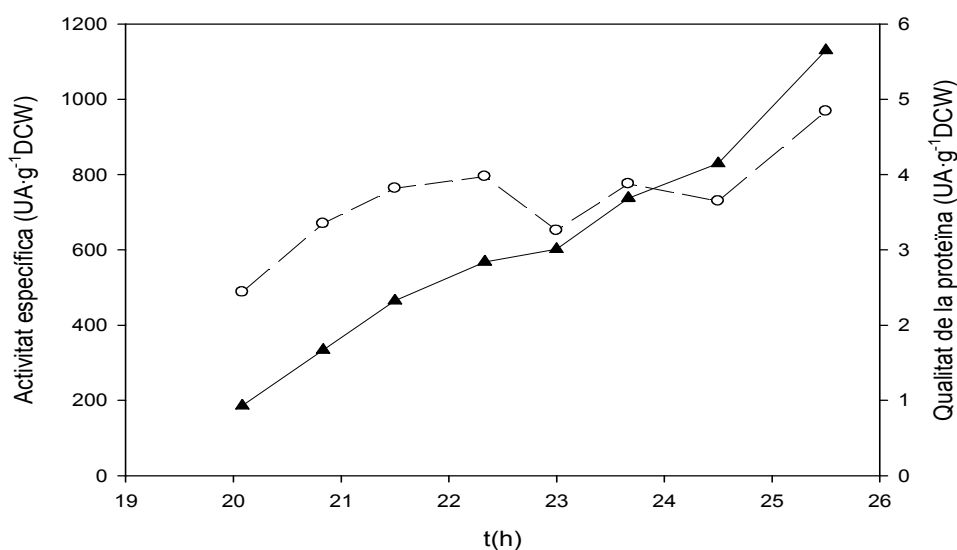


Fig. 4.12. Evolució de l'activitat específica i de la qualitat de la proteïna sintetitzada en cultius en condicions inhibidores de font de carboni a 37°C. (-▲-) Activitat específica, (--○--) Qualitat proteica.

Quan s'analitza el contingut específic en cua d'histidines de la proteïna sintetitzada a partir d'aquesta estratègia de cultiu (Fig. 4.13) tot i que s'observa una certa disminució, la fracció de proteïna expressada que conserva intacte els 6 residus d'histidina al seu extrem N al final de la fase d'inducció és d'un 80%.

La immobilització de l'enzim del lisat procedent del brou final de fermentació sobre suports de tipus IMAC, amb un rendiment proper al 95%, confirma que aquesta estratègia alternativa de cultiu permet també aturar significativament els processos de degradació parcial de la proteïna recombinant.



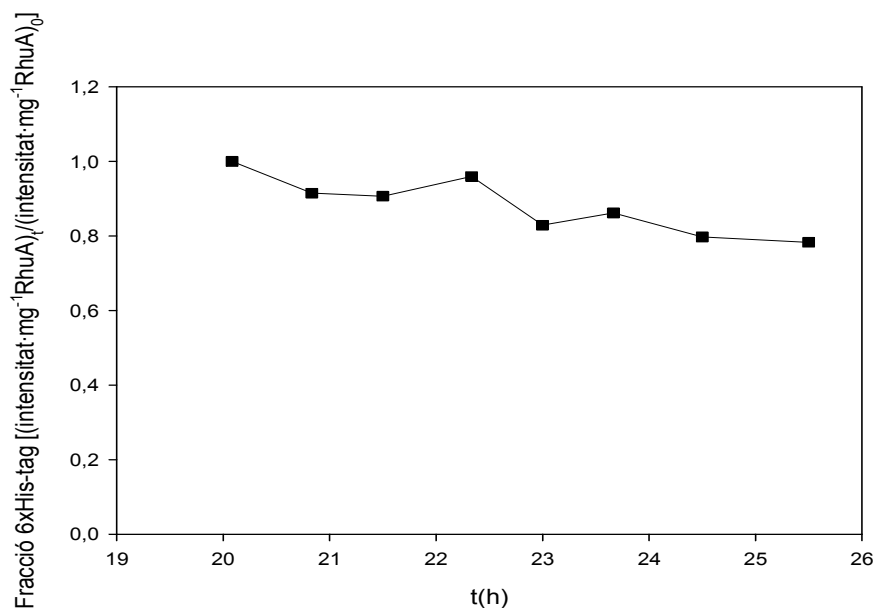


Fig. 4.13. Evolució del contingut específic de cua d'histidines de la RhuA expressada al llarg de la fase d'inducció d'un cultiu dut a terme en condicions inhibidores de font de carboni a 37°C.

#### 4.4. Conclusions

Els estudis de caracterització de càrrega enzimàtica sobre suports de tipus IMAC han permès determinar que la immobilització de  $3.5 - 6.4 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$  de suport suposa l'obtenció de derivats enzimàtics que no presenten limitacions en la transferència de matèria de substrats quan s'utilitzen en reaccions de síntesi, és a dir, que la velocitat de reacció observada coincideix amb la màxima segons la quantitat d'enzim immobilitzat. Aquest fet per tant pot ser aprofitat alhora d'optimitzar la càrrega de derivat enzimàtic en un reactor per a dur a terme un procés de síntesi.

Segons l'estratègia de cultiu a partir de la qual s'indueix a la soca productora a sintetitzar la proteïna recombinant, s'ha pogut observar una influència directe sobre el rendiment global del procés. La qualitat de l'enzim i el rendiment d'immobilització sobre suports de tipus IMAC depenen en gran mesura de les condicions a les que s'ha dut a terme el cultiu. D'aquesta manera, estratègies de cultiu basades en variacions de les condicions de creixement i inducció respecte les estratègies inicials han permès obtenir una proteïna recombinant de major qualitat i de més fàcil processament pels mètodes de purificació emprats. En aquest sentit, ja sigui per disminució de la temperatura durant les fases de creixement i inducció del cultiu, de 37°C a 28°C o pel

fet de mantenir un excés de nutrients al medi en contraposició a la limitació habitual durant els cultius, s'han disminuït els processos proteolítics que per un costat degradaven parcial o totalment la cua de 6 histidines amb que s'expressa fusionada la proteïna per a poder ser purificada per cromatografia d'afinitat, i en el pitjor dels casos afectació de l'activitat enzimàtica. Així doncs, la integració de les operacions de producció i purificació i immobilització en un sol pas de l'enzim sintetitzat han permès millorar els rendiments de recuperació d'aquest per al seu ús en síntesi, de valors al voltant del 50% a valors superiors al 90%.

No obstant però, tot i la millora experimentada a partir de les estratègies de cultiu alternatives implementades, tant a nivell de qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada com en els rendiments d'immobilització d'aquesta sobre suports IMAC, la metòdica operacional presenta certs inconvenients que cal considerar:

- En primer lloc, en referència als esquemes d'inducció en continu implementats, si bé aquests permeten relaxar la producció de proteïna recombinant respecte un esquema d'inducció tradicional basat en un sol impuls d'inductor al medi de cultiu, en contrapartida prolonguen el cultiu en el temps sense obtenir resultats significativament millors que els que s'obtenen a partir d'esquemes d'inducció tradicionals, és a dir, la productivitat (unitats d'activitat per unitat de volum i temps) es veu disminuïda.
- En segon lloc, en referència als cultius conduïts a 28°C durant la fase discontinua alimentada, una reducció de temperatura implica també una reducció en la velocitat de creixement del cultiu i de síntesi de proteïna recombinant. Per tant, altra vegada la productivitat disminueix.
- En tercer lloc, i en referència als cultius duts a terme en condicions inhibidores de font de carboni, intentar mantenir concentracions de glucosa al voltant de 60 g·L<sup>-1</sup> presenta moltes dificultats a nivell experimental. Si no s'exerceix un control molt estricte del cultiu, pot tenir lloc una generació important d'acetat i per tant inhibir tant el creixement com l'expressió de proteïna recombinant.

És per aquests motius doncs, que els estudis que es plantejaran als següents capítols parteixen d'estratègies d'operació en condicions de limitació de font de carboni a l'etapa discontinua alimentada, amb esquemes d'inducció basats en un sol impuls d'IPTG al medi de cultiu i a temperatura de treball de 37°C. Sobre aquestes

condicions, es perseguirà l'obtenció d'una proteïna recombinant d'alta qualitat i uns rendiments d'immobilització elevats a partir de la implementació de co-estratègies de cultiu de diferent naturalesa.

#### 4.5. Referències

1. Buchholz, K., V. Kasche, and U.T. Bornscheuer, Biocatalysts and Enzyme Technology. 1st ed. 2005: Wiley-VCH.
2. Kalyanpur, M., Downstream processing in the biotechnology industry. Methods in Biotechnology, 2000. 9: p. 1-10.
3. U.S. Dept. of Health and Human Services, F.a.D.A., Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Office of Regulatory Affairs, Guidance for industry: PAT, a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance <http://www.fda.gov>, 2004.
4. Beilen, J.B.v. and Z. Li, Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13: p. 338-344.
5. Graumann, K. and A. Premstaller, Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. Biotechnology Journal, 2006(1): p. 164-186.
6. Choi, J.H., K.C. Keum, and S.Y. Lee, Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science, 2006. 61: p. 876-885.
7. Swartz, J.R., Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Current Opinion in Biotechnology, 2001. 12(2): p. 195-201.
8. Murby, M., M. Uhlén, and S. Stahl, Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 1996. 7: p. 129-136.
9. Baneyx, F. and M. Mujacic, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nature Biotechnology, 2004. 22(11): p. 1399-1408.
10. Baneyx, F., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1999. 10: p. 411-421.
11. Aehle, W., Enzymes in Industry. 3rd ed. 2007: Wiley-VCH.
12. Tramper, J., Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts. Biotechnology and Bioengineering, 1996. 52: p. 290-295.
13. Klibanov, A.M., Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. Science, 1983. 219: p. 722-727.

14. Godfrey, T. and S. West, Industrial Enzymology. 2nd ed. 1996: Nature Publishing Group.
15. Katchalski-Katzir, E. and D.M. Kraemer, Eupergit C, a carrier for immobilisation of enzymes of industrial potential. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000. 10: p. 157-176.
16. Pedroche, J., et al., Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels: A practical example in the hydrolysis of casein. Enzyme and Microbial Technology, 2002. 31: p. 711-718.
17. Mateo, C., et al., Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-poliethylenimine composites. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 68: p. 98-105.
18. Ardao, I., et al., One step purification-immobilization of fucose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. Enzyme and Microbial Technology, 2006. 39: p. 22-27.
19. Pessela, B.C.C., et al., One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of a Thermophilic Poly-His-Tagged  $\alpha$ -Galactosidase from *Thermus* sp. Strain T2 by using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Sepabeads. Biomacromolecules, 2003. 4: p. 107-113.
20. Suau, T., et al., Immobilization of fucose-1-phosphate aldolase from *Escherichia coli* to glyoxal-agarose gels by multipoint covalent attachment. Biocatalysis and Biotransformation, 2005. 23(3/4): p. 241-250.
21. Grunwald, P., K. Hansen, and W. Grunber, The determination of effective diffusion coefficients in a polysaccharide matrix used for the immobilization of biocatalysts. Solid State Ionics, 1997. 101-103: p. 863-867.
22. Ferrarotti, S.A., et al., Immobilization and stabilization of a cyclodextrin glycosyltransferase by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. Biotechnology Progress, 2006. 22: p. 1140-1145.
23. Mateo, C., et al., One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports. Biotechnology and Bioengineering, 2001. 76(3): p. 269-276.
24. Vunnum, S., et al., Immobilized metal affinity chromatography : modeling of nonlinear multicomponent equilibrium. Chemical Engineering Science, 1995. 50(11): p. 1785-1803.
25. Chaga, G., Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. J. Biochem. Biophys Methods, 2001. 49: p. 313-314.

26. Sung-Yuan, T., et al., Effect of number of poly(His) tags on the adsorption of engineered proteins on immobilized metal affinity chromatography adsorbents. *Process Biochemistry*, 2006. 41(9): p. 2058-2067.
27. Mateo, C., et al., Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *Journal of Chromatography A*, 2001. 915: p. 97-106.
28. Johnson, R.D., R.J. Todd, and F.H. Arnold, Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c. *Journal of Chromatography A*, 1996. 725: p. 225-235.
29. Smith, M.C., et al., Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263(15): p. 7211-7215.
30. Westra, D.F., et al., Immobilised metal-ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA. *Journal of Chromatography B*, 2001. 760: p. 129-136.
31. Patwardhan, A.V. and M.M. Ataii, Site accessibility and the pH dependence of the saturation capacity of a highly cross-linked matrix: Immobilized metal affinity chromatography of bovine serum albumin on Chelating Superose. *Journal of Chromatography A*, 1997. 767: p. 11-23.
32. Vidal, L., et al., Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2008. 134: p. 127-136.
33. Ruiz, J., Estudi de derivats enzimàtics immobilitzats de Ramnulosa-1-fosfat aldolasa. 2007.
34. Ruiz, J., et al., Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry*, 2009. 44(9): p. 1039-1045.
35. Ardao, I., et al., One step purification-immobilisation of fuculose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. 39: p. 22-27.
36. Amersham-Pharmacia-Biotech, *Affinity Chromatography: principles and methods*. 2001.
37. Mitraki, A. and J. King, Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Nature Biotechnology*, 1989. 7: p. 690-697.

38. Pinsach, J., et al., Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. 43(7): p. 507-512.
39. Hoffmann, F. and U. Rinas, Role of Heat-Shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. 89: p. 143-161.
40. Sandén, A.M., et al., Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. 81(2): p. 158-166.
41. Rinas, U. and F. Hoffmann, Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. 89: p. 73-92.
42. Chung, H.J., W. Bang, and M.A. Drake, Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006. 5(3): p. 52-64.
43. Donovan, R.S., C.W. Robinson, and B.R. Glick, Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1996. 16(3): p. 145-154.

## 5. MODELITZACIÓ MATEMÀTICA DE LA PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA

### Resum

Els estàndards de qualitat i la repetibilitat requerits a la indústria farmacèutica [1-3] en els processos de producció de compostos d'elevat valor afegit, així com la contínua reducció de costos tant a nivell de producció com en investigació a la que s'enfronten les companyies per tal de seguir sent competitives, han portat al desenvolupament de models matemàtics per a la descripció de processos productius. La utilització d'aquests models implica un important estalvi de costos i recursos associats a la producció donat que la seva explotació permet, sense necessitat d'experimentació massiva, trobar les condicions òptimes de producció d'un determinat compost. Per altra banda també, el fet de disposar d'un model matemàtic acurat d'un determinat procés, permet la seva implementació en tasques de control i automatització. D'aquesta manera, l'actuació sobre variables de procés es basa sobre un coneixement fonamental d'aquest i no en lleis estrictament empíriques.

D'aquesta manera, s'ha desenvolupat un model matemàtic per al procés de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius d'elevada densitat d'*E. coli* induïts a partir d'un únic impuls d'IPTG. Donat que el principal objectiu del model de producció és l'optimització de les condicions de cultiu i el seu ús en tasques de control del procés, s'ha plantejat un model de tipus no estructurat i no segregat basat en l'efecte de la presència d'inductor en el medi de cultiu sobre l'evolució de la biomassa i la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

El model presenta un bon nivell d'ajust en les principals variables del sistema i permet descriure amb una exactitud notable el moment a partir del qual els rendiments globals de procés poden començar a disminuir considerablement per efecte de fenòmens de tipus proteolític.

### 5.1. Introducció i objectius

#### 5.1.1. La modelització matemàtica aplicada

La modelització matemàtica, als sectors químics i/o biotecnològics, s'ha consolidat amb el temps com a eina bàsica en la predicció del comportament i evolució de processos, ja que proporcionant un grau de detall equiparable a l'experimentació, representa front d'aquesta un important estalvi de temps i costos associats [4-8]. És més, si es disposa d'una descripció acurada d'un procés, mitjançant el tractament matemàtic correcte, es pot explotar el model que el descriu amb l'objectiu d'optimitzar productivitats, temps i/o recursos, i dur a terme a la pràctica únicament aquelles estratègies que numèricament (sobre el paper) han donat bons resultats.

La modelització d'un procés és una aproximació o traducció matemàtica d'una situació real definida (sistema), i com a tal, descriu de manera simplificada el comportament d'aquest [9]. El grau de simplificació del model respecte de la realitat dependrà en gran mesura de l'aplicació o l'ús que se'n vulgui donar i de la informació disponible per a la seva elaboració.

És per això que per tal de construir una descripció matemàtica d'un procés determinat s'han de tenir en compte els següents punts:

- Quina serà la utilitat del model.
  - Disseny de procés
  - Control de procés
  - Solució de problemes
  - Aspectes ambientals
- Quina és la forma, estructura i precisió del model.
- Quines són i com d'acurades són les dades de què es disposa.
- Quines són i quin abast tenen les eines matemàtiques de què es disposa.
- Com s'ha de plantejar la validació del model.



- Quines són les dades de què s'ha de disposar amb prou precisió per tal d'assegurar la qualitat predictiva del model.

En particular, al camp dels bioprocessos, resulta gairebé impossible descriure de manera completa els fenòmens que tenen lloc en una cèl·lula a unes determinades condicions de cultiu. És per això que quan l'objectiu d'un procés biotecnològic és la producció en "massa" d'un determinat metabòlit, es limita el grau de descripció del model a les relacions entre una sèrie de variables principals fàcilment mesurables a partir de les quals poder implementar estratègies de control i tècniques d'optimització i predicció. La tria d'aquestes variables depèn en gran mesura de la instrumentació disponible i de la celeritat amb què es requereixin aquestes dades per tal de controlar el procés.

### 5.1.2. Tipus generals de models matemàtics

La modelització de processos, es basa en una primera etapa d'identificació de variables de procés, principis químics i físics que les relacionen, i construcció d'equacions per a plasmar aquestes relacions. En funció de l'aplicació concreta del model però, el tipus de construcció varia [10-12].

Des del punt de vista de la seva naturalesa es pot distingir entre models de tipus:

- *Mecanística*, basats en les expressions de transferència de matèria, calor i quantitat de moviment, que tot i que inclouen sovint paràmetres de tipus empíric, estan construïts a partir d'un coneixement fonamental del procés. Són anomenats també "*white box models*" o "*first principles models*".
- *Empíric*, on el coneixement del procés deriva únicament de l'experimentació i no de principis bàsics. Aquests models es construeixen forçant el sistema a respondre front a determinades entrades o inputs per tal de crear una col·lecció de situacions entrada - sortida que descriuran el procés en un rang determinat de condicions. Aquests models s'anomenen també "*black box models*".

Normalment, però, en modelització de processos es treballa amb models de tipus "*grey box*" amb elements d'ambdós tipus, on tot i que el model es construeix sobre

balanços, acostumen a incorporar termes de caràcter empíric, sobretot pel que fa a expressions cinètiques i coeficients de transferència de matèria i energia.

### 5.1.3. *Etapas de la modelització de processos*

La construcció d'un model matemàtic per a la descripció d'un determinat procés consta d'un esquema iteratiu basat principalment en set etapes (Fig. 5.1) [9]:

- Descripció del sistema, objectiu de la modelització i per tant el grau de detall que volem assolir.
- Identificació dels mecanismes físico-químics que tenen lloc al procés d'estudi (reacció química, transferència de calor...)
- Estudi i avaluació de les dades disponibles, tant mesurades directament del procés com paràmetres estimats.
- Construcció de les equacions característiques del model, o relacions entre les principals variables del sistema.
- Establir procediments de resolució de les equacions plantejades a partir de mètodes numèrics.
- Anàlisi de la solució i comportament del model en base a les expectatives.
- Validació del model. Tot i que n' existeixen diverses tècniques les més freqüents consisteixen a comparar el comportament entre el model i el sistema real.

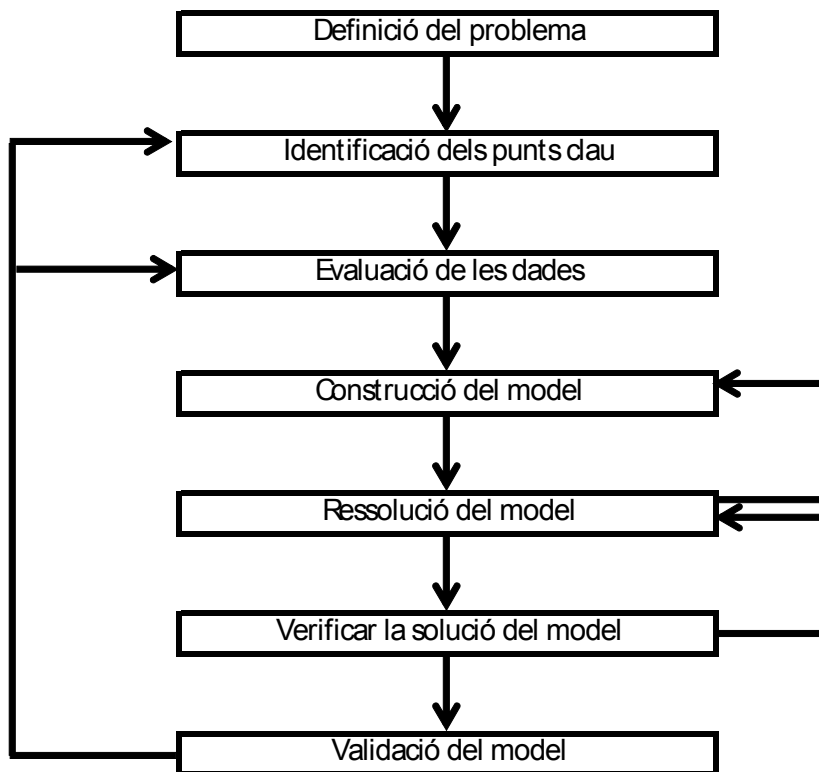


Fig. 5.1. Set etapes principals de la modelització de processos.

### 5.1.4. Models matemàtics aplicats a bioprocessos

Degut a l'ampli ventall de disciplines que estudien els bioprocessos, existeixen diverses tendències en la seva modelització [7, 8]. En particular, al camp de la biotecnologia i microbiologia aplicada, la forma que es pot donar al model de descripció d'un determinat bioprocés dependrà del tipus d'estudi que es vulgui dur a terme.

Des del punt de vista de producció en planta pilot o industrial d'un determinat metabòlit o proteïna recombinant a partir d'una soca donada, l'interès pot resultar més aviat de tipus pràctic i enfocat a la millora i optimització de la seva producció. En aquest cas per tant, és bàsic que les principals variables mesurades es puguin relacionar entre elles per tal de determinar l'efecte que tenen sobre la producció o el rendiment global del procés.

Si es decideix treballar amb models basats en un coneixement bàsic del procés, al camp dels cultius microbiològics s'acostuma a modelitzar segons dues tendències ben diferenciades:

- Models de tipus estructurat [13-17]
- Models de tipus no estructurat [18-29]

En termes generals, un model no estructurat considera la biomassa del sistema com una sola variable ( $X$ ), mentre que un model estructurat la considera com a un conjunt de compartiments que representen la seva estructura intracel·lular. Així doncs, és freqüent trobar models matemàtics de representació de microorganismes recombinants basats en 3 o més compartiments (Fig. 5.2) [14], també anomenats *pools*, que descriuen la biomassa a diferents nivells :

- A: Components actius de la biomassa; ribosomes, mRNA, tRNA, *building blocks*.
- P: DNA plasmídic.
- E: Producte codificat al DNA plasmídic.
- G: Material estructural i genètic de la cèl·lula (DNA).

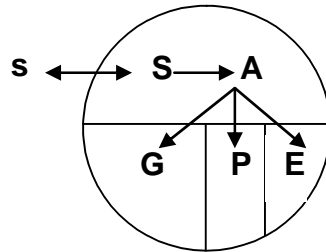


Fig. 5.2.- Model estructurat en quatre compartiments. "s" substrat limitant extracel·lular; "S", substrat limitant intracel·lular; "A", compartiment actiu que inclou *building blocks*, ribosomes, mRNA, tRNA; "G", compartiment que inclou la part genètica i estructural de la cèl·lula; "P", DNA plasmídic; "E", proteïna recombinant.

Aquests tipus de models són àmpliament utilitzats i acceptats per a descriure el comportament de cultius duts a terme amb microorganismes recombinants, on per l'efecte de la sobreexpressió de proteïnes heteròlogues, la biomassa del sistema està sotmesa a canvis constants als diferents nivells descrits anteriorment. Així doncs, els models estructurats pretenen descriure la disminució observable experimentalment en el creixement del microorganisme a partir de la redirecció dels fluxos entre els diferents *pools* en haver induït el cultiu, i la caiguda de la producció de la proteïna recombinant a partir de la disminució del contingut de RNA cel·lular i DNA plasmídic.

Des del punt de vista de l'estat fisiològic del microorganisme, aquests models aporten molta més informació que un model de tipus no estructurat, ara bé, les mesures necessàries per a l'estimació dels paràmetres que el constitueixen no sempre són a l'abast de qualsevol laboratori, i en segons quins casos requereixen elevats temps d'anàlisi. És per això que pot resultar interessant, sobretot des del punt de vista de procés si l'objectiu consisteix a controlar un cultiu microbiològic, treballar amb models matemàtics que descriguin el comportament d'un sistema a partir de variables macroscòpiques fàcilment mesurables.

Així doncs, es poden plantejar models de tipus no estructurat que depenguin de variables mesurables a partir d'instrumentació habitual en un laboratori amb un temps d'anàlisi raonable:

- Espectrofotòmetres per a la mesura de densitat òptica per a la determinació de biomassa.
- HPLC's o similars per a la mesura de composició del medi de cultiu.
- Kits i altres reactius per a la determinació de concentració de proteïna.

Els models no estructurats, poden presentar components de tipus més "gris" que els models descrits anteriorment, ara bé, l'objectiu principal d'ambdós és prou diferent, coneixement front aplicació en producció.

Com s'ha dit anteriorment, la base dels models "first principles" consisteix en els balanços de matèria, energia i quantitat de moviment aplicats a un sistema. En un cultiu microbiològic, els models més senzills són els aplicables al creixement sobre un determinat medi, descrivint únicament l'evolució de substrat i biomassa i en determinats casos la generació de subproductes o metabòlits associats al creixement.

Quan es modelitza també la producció d'una proteïna recombinant amb efectes notables sobre el creixement del microorganisme en qüestió, els models prenen una major complexitat. Si es parla de models no estructurats aplicats a cultius de microorganismes recombinants, actualment es treballa en dues línies prou diferenciades:

- Les que consideren que la càrrega metabòlica que suposa la sobreexpressió d'una proteïna heteròloga origina fenòmens de segregació en la població microbiana [30-32].

- Les que consideren que la sobreexpressió d'una proteïna heteròloga té un efecte directe no específic sobre la velocitat específica de creixement [21, 33, 34].

Els models definits segons el primer cas s'apropen als models de tipus estructurat, és a dir, es té en compte l'estat fisiològic de la cèl·lula durant el procés. D'aquesta manera, es descriuen els efectes observables experimentalment sobre la velocitat específica de creixement global del cultiu quan s'indueix la producció d'una determinada proteïna recombinant a partir de la distinció entre grups de població microbiana. Així doncs, alguns dels models proposats a la bibliografia es basen en un esquema segregacional [31] constituït per les següents poblacions:

- $X^+$  o fracció de cèl·lules viables portadores de plasmidi o DNA heteròleg. Es poden replicar i créixer amb normalitat al medi de cultiu i són capaces d'expressar els gens codificats al DNA plasmídic.
- $X^-$  o fracció de cèl·lules viables no portadores del plasmidi. Es poden replicar i créixer amb normalitat al medi de cultiu però no són capaces d'expressar els gens heteròlegs.
- $X_n$  o fracció de cèl·lules viables però no cultivables (VBNC). No presenten capacitat de formació de colònies, ara bé, conserven activitat metabòlica.
- $X_L$  o cèl·lules lisades, procedents de qualsevol de les tres poblacions anteriors.

Els models basats en fenòmens de segregació es poden descriure matemàticament a partir de la relació entre les diferents subpoblacions (Fig. 5.3) que poden aparèixer en induir la producció de proteïna recombinant en un cultiu.

A partir d'aquestes relacions es podrien construir una sèrie d'equacions, que per a un cultiu típic operant en discontinu alimentat, serien del tipus:

$$X = X^+ + X^- + X_n + X_L \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$\frac{dX^+}{dt} = (\mu^+ - \phi - \alpha - \sigma) \cdot X^+ - \frac{X^+}{V} \cdot F_S \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$\frac{dX^-}{dt} = (\mu^- - \varepsilon - \omega) \cdot X^- + \alpha \cdot X^+ - \frac{X^-}{V} \cdot F_S \quad (\text{Eq. 5.3})$$

$$\frac{dX_n}{dt} = \phi \cdot X^+ + \omega \cdot X^- - \pi \cdot X_n - \frac{X_n}{V} \cdot F_S \quad (\text{Eq. 5.4})$$

$$\frac{dX_L}{dt} = \varepsilon \cdot X^- + \sigma \cdot X^+ + \pi \cdot X_n - \frac{X_L}{V} \cdot F_S \quad (\text{Eq 5.5})$$

On:

- $X$  fa referència a la concentració total de biomassa, com a resultat de la suma de totes les subpoblacions descrites anteriorment.
- $\mu^+$  és la velocitat específica de creixement de les cèl·lules viables portadores de plasmidi.
- $\mu^-$  és la velocitat específica de creixement de les cèl·lules no portadores de plasmidi.
- $\phi$  és la velocitat de transformació de les cèl·lules viables portadores de plasmidi a cèl·lules viables però no cultivables.
- $\alpha$  és la velocitat de transformació de les cèl·lules portadores de plasmidi a cèl·lules no portadores.
- $\sigma$  és la velocitat de lisi o taxa de mort cel·lular de les cèl·lules viables portadores de plasmidi.
- $\pi$  és la velocitat de lisi o taxa de mort cel·lular de les cèl·lules viables però no cultivables.
- $\varepsilon$  és la velocitat de lisi o taxa de mort cel·lular de les cèl·lules no portadores de plasmidi.
- $\omega$  és la velocitat de transformació de les cèl·lules no portadores de plasmidi a cèl·lules viables però no cultivables.

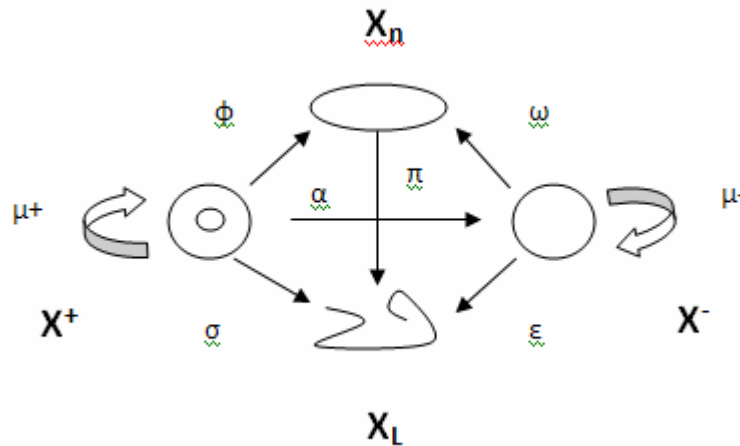


Fig. 5.3. Possible esquema de segregació en un cultiu microbiològic induït.

Els models de tipus segregat aporten molta informació de l'estat fisiològic cel·lular, ara bé, també requereixen un elevat nombre de dades que en alguns casos s'han d'obtenir a partir de tècniques complexes d'anàlisi per tal de ser calibrats. Per altra banda, tampoc hi ha massa estudis a la bibliografia que posin de manifest quins són els grups de població microbiana capaços d'expressar el gen heteròleg codificat al DNA plasmídic, si ho fa únicament la fracció denominada com a  $X^+$  o també la fracció VBNC.

Es per això doncs, que si la disponibilitat de recursos d'anàlisi és limitada, i l'objectiu de la modelització no és altre que el seguiment, la predicció, l'optimització del procés a partir de les seves propietats macroscòpiques i la implementació en funcions de control i automatització, la millor opció consisteix en la modelització no estructurada i no segregada. D'aquesta manera es poden descriure les respostes d'estrès cel·lular degudes a la sobreexpressió d'una proteïna recombinant, que condueixen a la disminució de la velocitat específica de creixement global del cultiu, per causes no específiques, simplement treballant els termes de les equacions que representen les magnituds que experimentalment s'observa que canvien amb el temps.

### 5.1.5. Objectius

El treball presentat en aquest capítol té com a principal objectiu la formulació, calibratge i validació d'un model matemàtic per a la descripció de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en funció del grau d'inducció del sistema en cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* operant en règim discontinu alimentat. Tot i que en el capítol anterior s'ha treballat amb inducció de tipus contínua com a estratègia alternativa i



novedosa, aquest capítol es basa, per tal de simplificar el sistema, en induccions simples a partir d'un pols únic d'IPTG al medi de cultiu. En funció dels resultats es pot decidir en un futur generalitzar-lo a altres condicions.

El model pretén ser una eina útil per al control, predicció i optimització del procés de producció de RhuA a partir de les relacions que s'estableixin entre variables macroscòpiques fàcilment mesurables; concentració cel·lular i de principal font de carboni al cultiu i concentració de proteïna per litre de reactor. Així doncs el model es plantejarà com a tipus no estructurat, considerant la biomassa com una variable única sense tenir en compte la interacció entre els seus diferents compartiments.

A nivell cel·lular, la producció de RhuA es troba regulada pel promotor fort T5 induïble per IPTG, la qual cosa condueix a efectes segregacionals al cultiu una vegada s'ha induït la producció de proteïna recombinant degut a la sobrecàrrega metabòlica que aquesta representa. Donat que es desconeix quina o quines de les subpoblacions presents en el cultiu induït són les responsables de la producció de RhuA, quina subpoblació manté un cert creixement tot i la presència d'inductor al cultiu o si en realitat la segregació al cultiu es basa en la presència de cèl·lules induïdes i cèl·lules no induïdes, es descriurà l'efecte observable experimentalment sobre la velocitat de creixement de manera no específica, és a dir a partir d'un model no segregat.

### 5.2. Materials i mètodes

#### 5.2.1. Soques i plasmidis

(Veure secció general de soques i plasmidis utilitzats: 3.1)

La soca *E. coli* M15ΔglyA [pREP4] portadora del vector pQEαβrham es va utilitzar per a la sobreexpressió, en cultius d'alta densitat cel·lular, de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

#### 5.2.2. Medis de cultiu

(Veure secció general de medis de cultiu emprats 3.2)

Per al desenvolupament dels pre-cultius, a partir d'estocs de la soca conservats en glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , es va utilitzar medi LB. Els cultius en Erlenmeyer (inòculs) i bioreactor, per altra banda, es van dur a terme partint de medi definit de composició detallada a la secció general de medis de cultiu.

### 5.2.3. Equipament de procés (no analític) utilitzat

Per a dur a terme els cultius descrits en aquest estudi es va utilitzar el següent equipament:

- Fermentador Biostat B (Sartorius) amb capacitat total de 2L i volum útil d'1.5 L i unitat de control digital (DCU) per al desenvolupament dels cultius a escala laboratori.
- Centrifugadora Beckman J2-21 M/E, sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials) i disruptor cel·lular mecànic One Shot (Constant Systems LTD) per al processament del brou de cultiu.

### 5.2.4. Condicions de cultiu

El procés pren com a punt de partida el desenvolupament *overnight* d'un pre-cultiu en medi complex LB a un volum final de 15 mL. Assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1.5 – 2 unitats, s'inocula un Erlenmeyer carregat amb medi definit (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb un 5% d'inòcul a un volum total de 100 mL. Transcorregudes 4 hores, i assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1 unitat, s'inoculen 80 mL del contingut de l'Erlenmeyer a un reactor escala laboratori carregat amb medi definit fins a un volum total de 800 mL. Es fixa una consigna de 7 unitats per al pH i 50% de saturació per a la concentració d'oxigen dissolt a la unitat de control del procés (DCU).

Després de 12-14 hores de procés, s'esgota la font de carboni carregada inicialment i s'inicia una etapa en discontinu alimentat a partir de l'addició d'una solució concentrada de nutrients (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb l'objectiu de mantenir un creixement a velocitat constant de  $0.225\text{ h}^{-1}$  a les mateixes condicions operacionals que durant l'etapa en discontinu. Es realitzen addicions puntuals de fosfats concentrats independentment del medi d'alimentació davant de la impossibilitat de mantenir-los en solució en aquest. El criteri d'addició de

fosfats aplicat respon a valors experimentals de rendiments determinats al grup de recerca corresponents a  $0.05 \text{ g}_P \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .

Assolida una densitat òptica aproximada de 60 unitats s'indueix el cultiu amb un impuls d'IPTG a un valor inicial determinat de la relació inductor – biomassa (I/X) entre 0.4 i  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  segons l'experiment, mantenint el ritme exponencial d'alimentació de nutrients fixat a l'etapa de creixement no induït.

Degut a l'efecte de la sobreexpressió de RhuA sobre el creixement del cultiu, es produeix una certa acumulació de font de carboni (glucosa) al medi de cultiu després d'un temps d'haver induït. A partir del moment en què se'n detecta presència al medi ( $0.5 - 0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), s'interromp periòdicament l'alimentació de nutrients al sistema per evitar-ne una major acumulació. El restabliment de l'alimentació es realitza en base a l'evolució del pH del medi, ja que en esgotar-se la font de carboni el pH augmenta notablement. El cultiu es dona per finalitzat quan tot i no haver alimentat nutrients entre dos instants donats de temps, la concentració de glucosa, en excés al medi, no experimenta variacions.

### 5.2.5. Cinètiques de creixement

Per als experiments previs per a la determinació d'una primera aproximació dels paràmetres cinètics de creixement de la soca, es va preparar una sèrie de cultius en matràs d'Erlenmeyer en medi definit a diferents concentracions inicials de glucosa entre 0 i  $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (taula 5.1). En tots ells, la inoculació es va dur a terme a partir de cultius en medi complex tal i com es descriu a la secció general de condicions de cultiu. Per a tots els cultius preparats es va seguir l'evolució del creixement de la biomassa a  $37^\circ\text{C}$  i els nivells de glucosa al medi .

## 5.- Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

Compost	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>	E <sub>7</sub>	E <sub>8</sub>	E <sub>9</sub>
glucosa	1	2	3	5	10	20	40	60	80
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
NaCl	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02	0,04	0,06	0,1	0,22	0,45	0,9	1,35	1,8
FeCl <sub>2</sub>	1,00E-03	2,00E-03	3,00E-03	5,00E-03	1,00E-02	0,02	5,00E-02	0,07	0,09
tiamina	5,00E-03	0,01	0,015	0,025	0,05	0,1	0,3	0,3	0,4
CaCl <sub>2</sub>	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	2,08E-03	4,16E-03	8,32E-03	1,24E-02	1,64E-02
sol. El. Traça (mL/L)	0,143	0,286	0,429	0,715	1,43	2,86	5,72	8,58	11,44

Taula 5.1.- Composició dels medis de cultiu preparats per a les determinacions de les primeres aproximacions dels paràmetres cinètics del creixement de la soca a 37°C. Les composicions dels diferents compostos s'expressen en g·L<sup>-1</sup>. La composició dels elements traça es detalla a la taula 3.2 de la secció de materials i mètodes generals.

### 5.2.6. Mètodes analítics

#### 5.2.6.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.1).

#### 5.2.6.2. Quantificació dels nivells de proteïna recombinant

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats 3.5.2)

### 5.2.7. Tractament matemàtic i estimació de paràmetres

L'estimació dels paràmetres en què es basa el model de producció proposat i les simulacions a diferents condicions experimentals es van realitzar amb el software comercial gPROMS (Process Systems Enterprise Ltd).

Per a l'estimació dels paràmetres ( $\theta$ ) del model, gPROMS utilitza la següent funció objectiu ( $\Phi$ ) per tal de maximitzar la probabilitat que el model matemàtic realitzi una bona predicció dels valors obtinguts experimentalment:

$$\Phi = \frac{N}{2} \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \min_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NV_i} \sum_{k=1}^{NM_{ij}} \left[ \ln(\sigma_{ijk}^2) + \frac{(\tilde{z}_{ijk} - z_{ijk})^2}{\sigma_{ijk}^2} \right] \right\} \quad (\text{Eq. 5.6})$$

On:

N: Nombre de mesures preses en un experiment donat

$\theta$ : Paràmetres a estimar.

Els valors acceptables estan subjectes a un rang  $\theta^l \leq \theta \leq \theta^u$  prèviament suposat.

N E: Nombre d'experiments duts a terme

N V<sub>i</sub>: Nombre de variables mesurades a l'experiment *i*

N  
Nombre de mesures de la variable *j* a l'experiment *i*

M<sub>ij</sub>:

$\sigma^2_{ijk}$ : Variància de la mesura *k* de la variable *j* a l'experiment *i*

$\tilde{z}_{ijk}$ : Mesura *k* de la variable *j* a l'experiment *i*

$z_{ijk}$ : Valor predit *k* de la variable *j* a l'experiment *i*

La funció objectiu admet diversos tipus de models de variància a definir per l'usuari:

Variància constant  $\sigma^2 = \omega^2$  (Eq. 5.7)

Variància constant relativa  $\sigma^2 = \omega^2 \cdot (\tilde{z}^2 + \varepsilon)$  (Eq. 5.8)

Variant del model de variància constant relativa  $\sigma^2 = \omega^2 \cdot (\tilde{z}^2 + \varepsilon)^\gamma$  (Eq. 5.9)

El model de variància constant relativa (equació 5.8) ha estat calibrat per a cada una de les variables mesurades (dades no incloses) i utilitzat en la funció objectiu per a l'estimació dels paràmetres cinètics del model de producció de RhuA.

Per altra banda, el tractament matemàtic de les dades experimentals necessari per a la determinació de les velocitats inicials de producció de proteïna recombinant per cultius induïts a diferent relació inicial inductor – biomassa s'ha dut a terme amb els *toolboxes SplineTool i Curve Fitting* de MATLAB (Mathworks). *SplineTool*, és un paquet de MATLAB que proporciona eines de creació, visualització i anàlisi d'aproximacions de dades experimentals per mitjà de *splines*. Els *splines* són ajustos polinomials per segments o trams que s'utilitzen per a representar funcions en intervals molt amples on un ajust polinomial simple no seria possible. Les eines d'avaluació que proporciona *SplineTool* permeten determinar els valors de les derivades de les funcions que representen amb el temps i així obtenir-ne els valors inicials que han estat necessaris per a la construcció del model de producció. *Curve Fitting Toolbox* és un paquet de

MATLAB, que de la mateixa manera que Splinetool proporciona eines d'ajust i anàlisi de corbes i superfícies a dades experimentals. L'anàlisi o post-processat dels ajustos pot utilitzar-se per al càlcul de velocitats inicials per a la construcció del model de producció.

### 5.3. Desenvolupament del model matemàtic

El model de producció desenvolupat en aquest treball s'aplica a les etapes de creixement, tant en règim discontinu com en règim discontinu alimentat, i inducció a partir d'un únic pols d'IPTG a una relació inicial inductor – biomassa donada.

#### 5.3.1. Evidències experimentals

La formulació del model matemàtic i l'estructura de les seves equacions, sobretot pel que fa als termes que s'utilitzaran per a descriure la disminució tant de la velocitat específica de creixement com de la velocitat específica de producció de RhuA, dependran de les tendències experimentals que presentin les variables que es segueixen. Així, per a un cultiu d'alta densitat cel·lular induït a partir d'un únic pols d'IPTG (Fig. 5.4), on es mesuren experimentalment la densitat òptica ( $OD_{600}$ ), la concentració de glucosa al medi i la concentració de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, es poden diferenciar dues tendències en el comportament de les variables delimitades pel moment de la inducció:

- Etapa de creixement: on pel règim d'alimentació imposat la biomassa experimenta un creixement de tipus exponencial, la concentració de glucosa es manté pràcticament a zero, i la concentració de proteïna recombinant a nivells basals d'expressió. Tot i que l'etapa de creixement inclou dues subetapes (creixement en discontinu i creixement en discontinu alimentat) es pren com a referència (per a la modelització del sistema) o temps inicial de creixement el moment en què s'inicia la fase de creixement en discontinu alimentat.
- Etapa d'inducció: on després d'un augment inicial de la velocitat de creixement, aquesta disminueix progressivament per efecte de la sobreexpressió de RhuA i com a conseqüència, comença a acumular-se glucosa al medi de cultiu a partir d'un cert temps en presència d'inductor. La concentració de proteïna augmenta

sobradament donat el caràcter regulable del sistema d'expressió, amb una velocitat específica de producció que amb el temps també disminueix per efecte de la càrrega metabòlica que suposa la síntesi de RhuA. La concentració de proteïna recombinant s'expressa en termes màssics ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i no en termes d'activitat enzimàtica. L'activitat enzimàtica, encara que pugui relacionar-se directament amb la quantitat si la proteïna es plega correctament, està afectada per fenòmens com la proteòlisi [35] no considerats en el model.

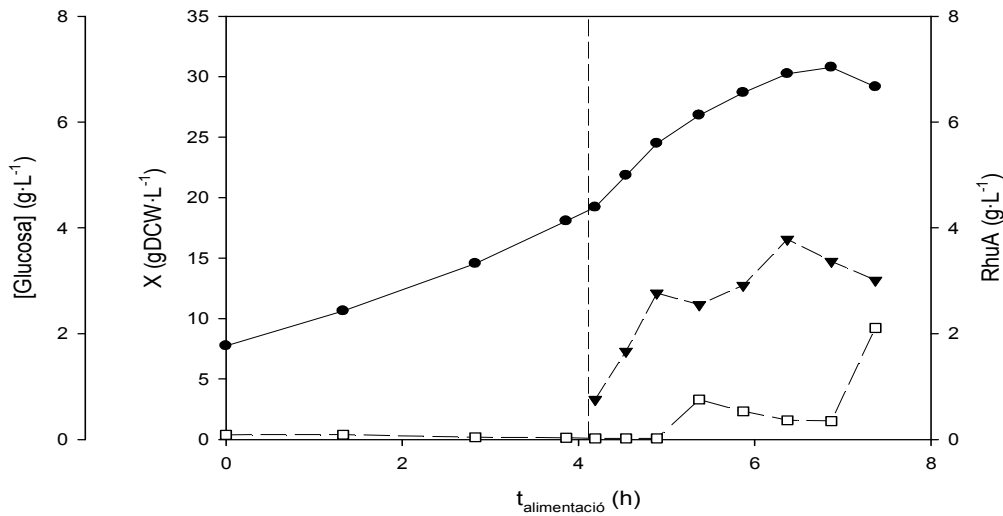


Fig. 5.4. Cultiu d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* induït a partir d'un únic impuls d'IPTG. La línia discontinua indica el moment de la inducció. (-•-) Biomassa, (--□--) Glucosa, (--▼--) RhuA.

### 5.3.2. Minimització d'efectes no desitjats

Les cinètiques de creixement d'un microorganisme i producció d'un determinat metabòlit o com en aquest cas, una proteïna recombinant, depenen àmpliament de les condicions ambientals a les que es dugui a terme el cultiu microbiològic corresponent. D'aquesta manera doncs, mantenint paràmetres com la temperatura, pH i concentració d'oxigen dissolt a nivells controlats, la formulació del model matemàtic de producció se'n pot fer independent i per tant evitar-ne una major complexitat.

Per altra banda, determinats subproductes del metabolisme cel·lular, com en aquest cas l'àcid acètic generat quan la velocitat d'entrada de glucosa a la cèl·lula sobrepassa la capacitat d'assimilació del cicle dels àcids tricarboxílics, pot jugar un

paper important en fenòmens d'inhibició per sobre d'1 g·L<sup>-1</sup>, tant del creixement cel·lular com de la producció de proteïna recombinant.

Estudis previs al grup de recerca on s'integra aquest treball van permetre determinar que per a la soca d'estudi, velocitats específiques de creixement per sobre de 0.3 h<sup>-1</sup> conduïen a la formació d'àcid acètic. D'aquesta manera, per tal d'evitar la inhibició, els cultius s'havien de dur a terme per sota d'aquest llindar.

En últim lloc, nombroses referències bibliogràfiques destaquen la influència de la velocitat de creixement o ritme d'alimentació de nutrients en la producció de determinades proteïnes recombinants. Tot i que aquest fet depèn de cada cas, i no sempre es pot generalitzar, s'emfatitza que ritmes d'alimentació de nutrients prou alts però inferiors als límits a partir dels quals es pot generar acètic al sistema, poden deixar la maquinària de síntesi proteica dels microorganismes en un estat comparativament millor que a ritmes d'alimentació baix. Per al cas concret d'estudi, un mateix grau d'inducció (50 µM IPTG i relació inductor - biomassa entre 1.6 – 1.8 µmol IPTG·g<sup>-1</sup><sub>DCW</sub> a l'inici de la inducció) en dos cultius conduïts a velocitats de creixement de 0.1 i 0.22 h<sup>-1</sup> respectivament, van portar a nivells d'activitat específica i RhuA intracel·lular acumulada (Fig. 5.5) significativament diferents. Els valors assolits al cultiu dut a terme a una velocitat de creixement major doblen els nivells de RhuA del cultiu a velocitat de creixement de 0.1 h<sup>-1</sup>.

D'aquesta manera, donat que el model matemàtic de producció de proteïna recombinant es vol construir en funció del grau d'inducció del cultiu i no del ritme de creixement d'aquest, el marc experimental es centrarà en cultius conduïts a velocitat de creixement de 0.22 – 0.25 h<sup>-1</sup>, que per una banda no presenten generació d'acètic significativa i per l'altre permeten assolir nivells de RhuA acumulada superiors a cultius conduïts a velocitats de creixement menor.



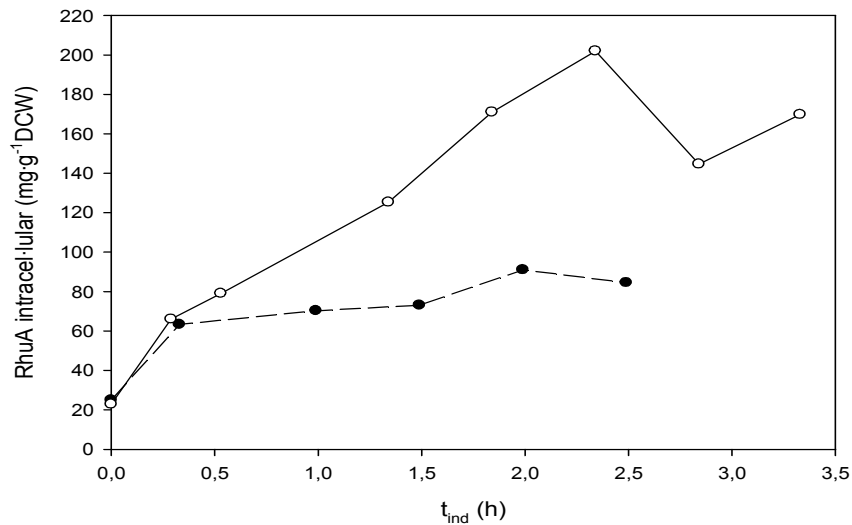


Fig. 5.5. Nivells de RhuA intracel·lular acumulada per a 2 cultius induïts a 50  $\mu\text{M}$  d'IPTG i relació inductor – biomassa d' $1.6 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . (—○—) Cultiu dut a terme a velocitat de creixement de  $0.22 - 0.25 \text{ h}^{-1}$ . (---●---) Cultiu dut a terme a velocitat de creixement de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ .

Havent vist les tendències de les variables principals del sistema abans i després d'induir i el marc de condicions experimentals i limitacions a tenir en compte, es plantejarà un model basat en dues etapes, l'una per a la descripció únicament del creixement del microorganisme i l'altra per a la producció de RhuA una vegada el cultiu ha estat induït.

### 5.3.3. Símbols i nomenclatura utilitzada

$f(\text{Ind})$	Funció matemàtica de la influència de l'inductor sobre $g_s$ i $q_p$
$F_s$	Cabal d'alimentació de nutrients al reactor ( $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$g_s$	Funció de "shock" deguda a la sobreexpressió de proteïna recombinant (adimensional)
$l$	Concentració d'inductor al medi ( $\mu\text{M}$ )
$k_1$	Efecte tipus 1 <sup>er</sup> ordre en el creixement ( $\text{h}^{-1}$ )
$k_2$	Efecte tipus 1 <sup>er</sup> ordre en la velocitat específica de producció de RhuA

	$(h^{-1})$
$K_{is}$	Constant d'inhibició per substrat ( $g_{\text{substrat}} \cdot L^{-1}$ )
$k_{p1}$	Paràmetre del model ( $h^{-1}$ )
$k_{p2}$	Paràmetre del model ( $\mu\text{mol IPTG} \cdot g_{\text{DCW}}^{-1}$ )
$K_S$	Constant de semi-saturació per substrat ( $g_{\text{substrat}} \cdot L^{-1}$ )
$k_{s1}$	Paràmetre del model ( $h^{-1}$ )
$k_{s2}$	Paràmetre del model ( $\mu\text{mol IPTG} \cdot g_{\text{DCW}}^{-1}$ )
$m_{sx}$	Coefficient de manteniment cel·lular ( $g_{\text{substrat}} \cdot (g_{\text{DCW}} \cdot h)^{-1}$ )
$P$	Concentració de RhuA ( $g_{\text{RhuA}} \cdot L^{-1}$ )
$q_p$	Velocitat específica de producció de RhuA ( $g_{\text{RhuA}} \cdot (g_{\text{DCW}} \cdot h)^{-1}$ )
$q_{p0}$	Velocitat específica inicial de producció de RhuA ( $g_{\text{RhuA}} \cdot (g_{\text{DCW}} \cdot h)^{-1}$ )
$q_{p\text{basal}}$	Velocitat específica constitutiva de producció de RhuA ( $g_{\text{RhuA}} \cdot (g_{\text{DCW}} \cdot h)^{-1}$ )
$S$	Concentració de glucosa al reactor ( $g_{\text{substrat}} \cdot L^{-1}$ )
$S_0$	Concentració de glucosa a la solució d'aliment ( $g_{\text{substrat}} \cdot L^{-1}$ )
$V$	Volum total (L)
$X$	Concentració de biomassa ( $g_{\text{DCW}} \cdot L^{-1}$ )
$Y_{xs}$	Rendiment biomassa - substrat ( $g_{\text{DCW}} \cdot g_{\text{substrat}}^{-1}$ )
$(Y_{xs})_{ap}$	Rendiment aparent biomassa - substrat ( $g_{\text{DCW}} \cdot g_{\text{substrat}}^{-1}$ )
$\mu$	Velocitat específica de creixement ( $h^{-1}$ )
$\mu_{ind}$	Velocitat específica de creixement durant la inducció ( $h^{-1}$ )
$\mu_{max}$	Velocitat específica de creixement màxima ( $h^{-1}$ )

#### 5.3.4. Creixement no induït

L'etapa de creixement no induïda es descriu a partir de les variables  $V$  (volum total),  $X$  (concentració de biomassa per litre de cultiu),  $S$  (concentració de glucosa al medi de cultiu) i  $P$  (concentració de RhuA per litre de cultiu). La cinètica de creixement del

microorganisme, que inclou un terme d'inhibició per excés de substrat al medi, es descriu a partir d'un model tipus Aiba. Es considera que la variació del volum al sistema es degui únicament a l'addició de nutrients durant la fase discontinua alimentada, tant al creixement com durant l'etapa d'inducció (equació 5.10).

Durant l'etapa de creixement no induït, els nivells de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa són els basals o constitutius de la soca expressats per  $q_{p\text{basal}}$  (equació 5.13). L'equació però, presenta certes limitacions, se suposa que l'expressió de proteïna recombinant és permanent i independent de la quantitat de substrat disponible al medi de cultiu. Aquesta expressió és vàlida sempre i quan el cultiu disposi de substrat. En absència de substrat no només s'aturaria el creixement sinó també la producció de proteïna.

$$\frac{dV}{dt} = F_S \quad (\text{Eq. 5.10})$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F_S \cdot X}{V} \quad (\text{Eq. 5.11})$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_S}{V} \cdot (S_0 - S) - \left( \frac{\mu}{Y_{XS}} + m_{SX} \right) \cdot X \quad (\text{Eq. 5.12})$$

$$\frac{dP}{dt} = q_{p\text{basal}} \cdot X - \frac{F_S \cdot P}{V} \quad (\text{Eq. 5.13})$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \cdot \exp\left(\frac{-S}{K_{iS}}\right) \quad (\text{Eq. 5.14})$$

### 5.3.5. Fase d'inducció

La fase d'inducció es caracteritza per un canvi sobtat en la producció de RhuA degut a la presència d'inductor al medi de cultiu i per una disminució gradual de la velocitat de creixement amb el corresponent augment de la concentració de glucosa al medi. Donat que el model que es vol plantejar és de tipus no segregat, la disminució observada en la velocitat de creixement es descriurà no a partir de l'aparició de subpoblacions al cultiu amb diferents patrons de creixement sinó a partir d'un efecte directe no específic sobre la velocitat de creixement global. Segons el treball de Lee i

Ramírez [21] aquest efecte es pot descriure a partir d'una funció  $g_s$  que s'aplica sobre la velocitat de creixement del cultiu, fent-la decreixer durant la fase d'inducció.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{ind} \cdot X - \frac{F_s \cdot X}{V} \quad (\text{Eq. 5.15})$$

$$\mu_{ind} = \mu \cdot g_s \quad (\text{Eq. 5.16})$$

$$\frac{dg_s}{dt} = -k_1 \cdot g_s \quad \text{amb} \quad g_s(0) = 1 \quad (\text{Eq. 5.17})$$

$$k_1 = \frac{k_{s1} \cdot (f(Ind))}{k_{s2} + (f(Ind))} \quad (\text{Eq. 5.18})$$

En les equacions anteriors es considera com a temps inicial el moment de la inducció i es defineix  $k_1$  com a funció matemàtica que depèn del grau d'inducció al que s'ha sotmès el cultiu.

Per altra banda, ja que pot existir durant la fase de producció una redirecció dels fluxos de nutrients, l'equació diferencial per l'evolució del substrat al sistema es plantejarà en funció d'un rendiment aparent substrat – biomassa:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_s}{V} \cdot (S_0 - S) - \left( \frac{\mu_{ind}}{(Y_{XS})_{ap}} \right) \cdot X \quad (\text{Eq. 5.19})$$

Degut a la presència d'IPTG al medi de cultiu s'activa la maquinària de síntesi de proteïna recombinant al sistema ( $q_p$ ) segons una funció que dependrà alhora de la velocitat basal o constitutiva d'expressió de RhuA i del grau d'inducció del sistema.

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X - \frac{F_s \cdot P}{V} \quad (\text{Eq. 5.20})$$

En últim lloc, donat que el sistema segueix augmentant el volum per efecte de l'alimentació de nutrients, l'equació 5.10 segueix essent vàlida també per a l'etapa d'inducció del cultiu.

#### 5.4. Resultats i discussió

Els experiments realitzats per al calibratge del model matemàtic es van dur a terme en un rang de concentració d'IPTG al medi entre 0 i 70  $\mu\text{M}$ , la qual cosa correspon a un rang de relació inductor – biomassa entre 0.4 i 2.83  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . La taula 5.2 presenta una relació dels diferents experiments duts a terme que van conduir a l'obtenció de nivells de RhuA intracel·lular entre 105 i 230  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  en funció del cultiu.

$[\text{IPTG}]_0$ ( $\mu\text{M}$ )	8	10	20.5	36	54.6	69.5
$(I/X)_0$ ( $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ )	0.4	0.5	1	2	2.83	1.53

Taula 5.2. Relació dels experiments realitzats per al calibratge del model matemàtic de creixement de la soca *E. coli* M15 $\Delta$ glyA [pREP4] en medi definit i de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius d'alta densitat cel·lular.

##### 5.4.1. Creixement no induït

La determinació dels paràmetres cinètics corresponents al creixement de la soca *E. coli* M15 $\Delta$ glyA [pREP4] en medi definit es va dur a terme en dues fases. A la primera, es van realitzar cultius en Erlenmeyer en règim discontinu a diferent concentració inicial de glucosa entre 0 i 80  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per tal d'extreure una primera aproximació dels paràmetres corresponents a la cinètica d'inhibició per substrat que descriu el sistema. Es va realitzar el seguiment de la concentració de biomassa i de glucosa en cada un dels cultius i se'n van determinar les velocitats específiques de creixement màximes. A la figura 5.6 es representen les velocitats específiques de creixement màximes en funció de la concentració inicial de glucosa al medi de cultiu. Els valors experimentals van permetre determinar una primera aproximació dels paràmetres cinètics de creixement de la soca en medi definit (dades no presentades)

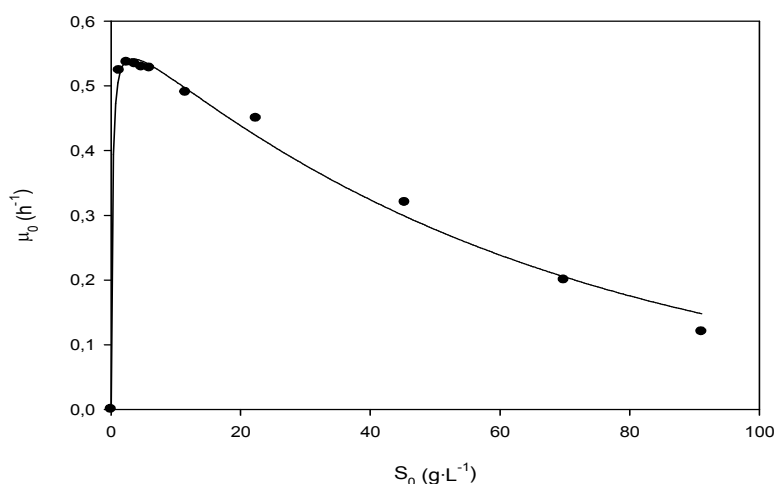


Fig. 5.6. Velocitats específiques de creixement en funció de la concentració inicial de substrat ( $S_0$ ).

Posteriorment, prenent com a valors inicials les aproximacions trobades, aquests creixements en discontinu i la fase de creixement no induït dels experiments realitzats per al calibratge del model es van utilitzar per a refinar els valors dels paràmetres cinètics i per a trobar els paràmetres corresponents al consum de substrat; rendiment biomassa – substrat i coeficient de manteniment cel·lular que es mostren a la taula 5.3.

Paràmetre	Valor
$\mu_{\max}$	$0.548 \pm 0.037$ (h <sup>-1</sup> )
$K_s$	$0.00838 \pm 0.00188$ (g·L <sup>-1</sup> )
$K_{is}$	$46.9 \pm 7.32$ (g·L <sup>-1</sup> )
$Y_{XS}$	$0.382 \pm 7.27 \cdot 10^{-4}$ (g·g <sup>-1</sup> )
$m_{sx}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$ (g·(g·h) <sup>-1</sup> )
$q_{p\text{basal}}$ (exp)	$1.29 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-4}$ (g <sub>RhuA</sub> ·(g <sub>DCW</sub> ·h) <sup>-1</sup> )

Taula 5.3. Valors determinats per als paràmetres corresponents a l'etapa de creixement no induït de la soca *E. coli* M15ΔglyA [pREP4] en medi definit.

La comparació entre els nivells de biomassa mesurats experimentals per a les fases de creixement no induït, en discontinu i discontinu alimentat, per a diversos cultius duts a terme a diferents velocitats de creixement, i els valors predits pel model matemàtic de la fase de creixement es mostren a la figura 5.7. Predicció i mesura

experimental mostren un elevat grau d'ajust. Per al cas de la concentració de glucosa (amb ajustos igualment bons), donat que els cultius es van dur a terme en condicions de limitació de font de carboni (sense acumulació), tant les prediccions del model matemàtic com les mesures experimentals es troben al voltant de  $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

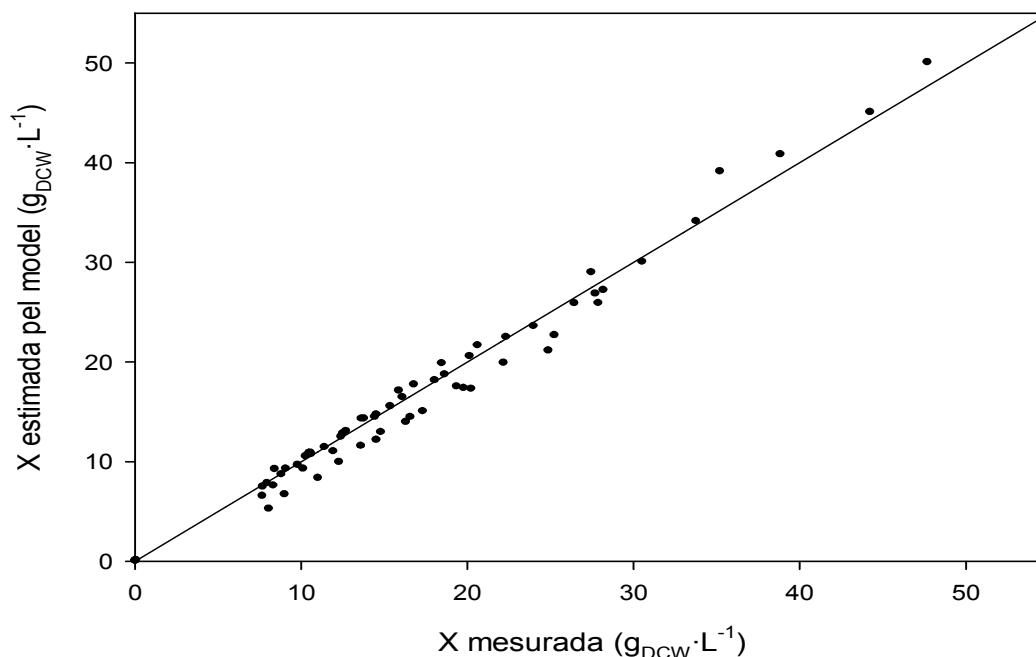


Fig. 5.7. Comparació entre les prediccions i les mesures experimentals de biomassa per a la fase de creixement no induït de cultius duts a terme a velocitat de creixement constant i limitació de font de carboni.

### 5.4.2. Fase d'inducció

El grau d'inducció dels cultius es va establir en base a experiments prèviament realitzats al grup de recerca on s'emmarca aquest treball. Es va observar que per a l'actual sistema experimental, un òptim en la producció de RhuA activa, és a dir, en l'activitat específica produïda, s'assolia en treballar a relacions inductor – biomassa entre 1 i 2  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  i concentracions d'inductor al voltant de 50 – 70  $\mu\text{M}$ .

Per altra banda, en base als resultats experimentals obtinguts al grup i les nombroses referències bibliogràfiques que descriuen efectes proteolítics en cultius amb sobreexpressió de proteïnes recombinants duts a terme a partir d'estratègies amb limitació de nutrients, el model matemàtic es plantejarà en base al contingut en

proteïna recombinant i no en termes d'activitat. És freqüent que en cultius d'aquest tipus, per efecte de la pròpia limitació de nutrients i l'excessiva demanda d'aminoàcids degut a la sobreexpressió de la proteïna recombinant, tinguin lloc pèrdues d'activitat específica per proteòlisi. Aquest efecte també s'ha observat quan s'acumula font de carboni durant la producció de proteïna, com es discutirà més endavant. La pèrdua d'activitat és de difícil integració en un model matemàtic ja que la seva quantificació no és a priori fàcilment relacionable amb una variable en concret.

En analitzar el contingut de RhuA acumulat al final de l'etapa d'inducció dels cultius presentats a la taula 5.1 es va poder observar que aquests semblaven estar relacionats amb el grau inicial d'inducció en termes de relació inductor – biomassa inicial (Fig. 5.8a). La mateixa relació però no es va observar amb la concentració inicial d'inductor al medi.



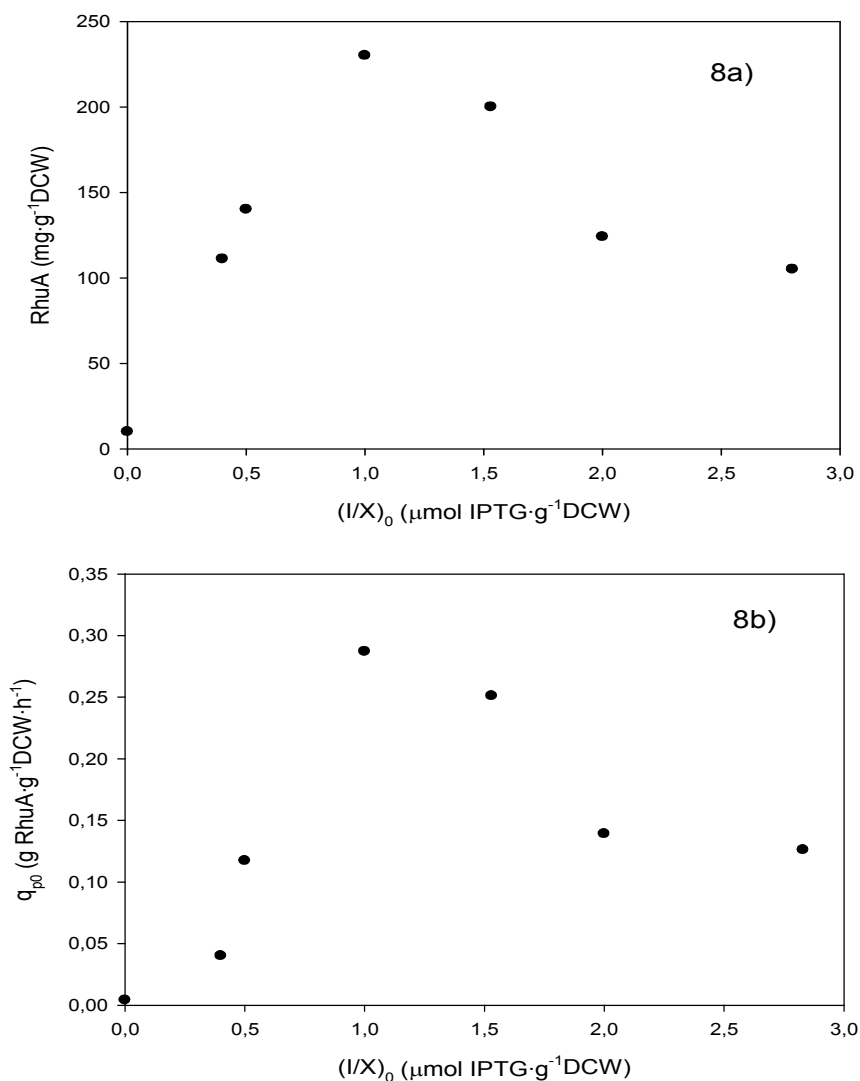


Fig. 5.8a) Contingut en RhuA acumulat als cultius duts a terme segons el grau d'inducció inicial  $(I/X)_0$  descrit a la taula 5.1. b) Velocitat específica inicial de producció de RhuA als cultius duts a terme segons el grau d'inducció inicial  $(I/X)_0$  descrit a la taula 5.2.

De la mateixa manera, en analitzar la dependència de la velocitat específica inicial de producció de RhuA ( $\text{g}_{\text{RhuA}}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) respecte la relació inicial inductor – biomassa es va observar la mateixa tendència (Fig. 5.8b). La complexitat d'una possible equació d'ajust d'aquesta tendència (que probablement és específica de cada sistema d'expressió) i l'excessiva quantitat de paràmetres que serien necessaris va portar a realitzar un ajust en base a splines amb l'eina Curvefitting de MATLAB.

Els resultats experimentals van confirmar un òptim en la producció de RhuA a una relació inductor – biomassa d'1  $\mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . Aquest òptim però, es determina en termes màssics de proteïna recombinant, no en activitat específica com s'ha enumerat anteriorment. Diverses referències bibliogràfiques apunten a què els nivells amb què s'expressen determinades proteïnes recombinants en un sistema regulable per lactosa o IPTG sota el control de promotors forts, tipus T5 o T7 pot ser el resultat d'un balanç entre la velocitat inicial específica de producció i el grau de saturació del repressor del sistema d'expressió. Un elevat grau de saturació del repressor pot conduir a efectes negatius, no només en el creixement de la soca sinó també en la velocitat específica de producció des de bon principi de la fase d'inducció.

Els perfils de velocitat específica de producció van ser calculats per a tots els experiments descrits a la taula 5.2. Tret de l'experiment dut a terme a una relació inductor – biomassa menor ( $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ), on les condicions d'inducció no van afectar significativament ni el creixement del cultiu ni la producció de RhuA, tots els altres cultius van mostrar una tendència decreixent tipus exponencial des del principi de la fase inducció. A la figura 5.9 es mostra, per als diferents cultius utilitzats en el calibratge del model matemàtic, la tendència de la velocitat específica de producció al llarg de la fase d'inducció del cultiu. En base a aquesta tendència, l'evolució de la velocitat específica de producció de RhuA es podria representar a partir del següent sistema d'equacions:

$$\frac{dq_p}{dt} = -k_2 \cdot q_p \quad \text{amb} \quad q_p(0) = q_{p0} \quad (\text{Eq. 5.21a})$$

$$k_2 = \frac{k_{p1} \cdot (f(\text{Ind}))}{k_{p2} + (f(\text{Ind}))} \quad (\text{Eq. 5.21b})$$

que a l'integrar portaria a l'equació 5.22:

$$q_p = q_{p0} \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (\text{Eq. 5.22})$$

La determinació experimental de  $k_2$  permetrà calcular  $k_{p1}$  i  $k_{p2}$ .

## 5.- Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

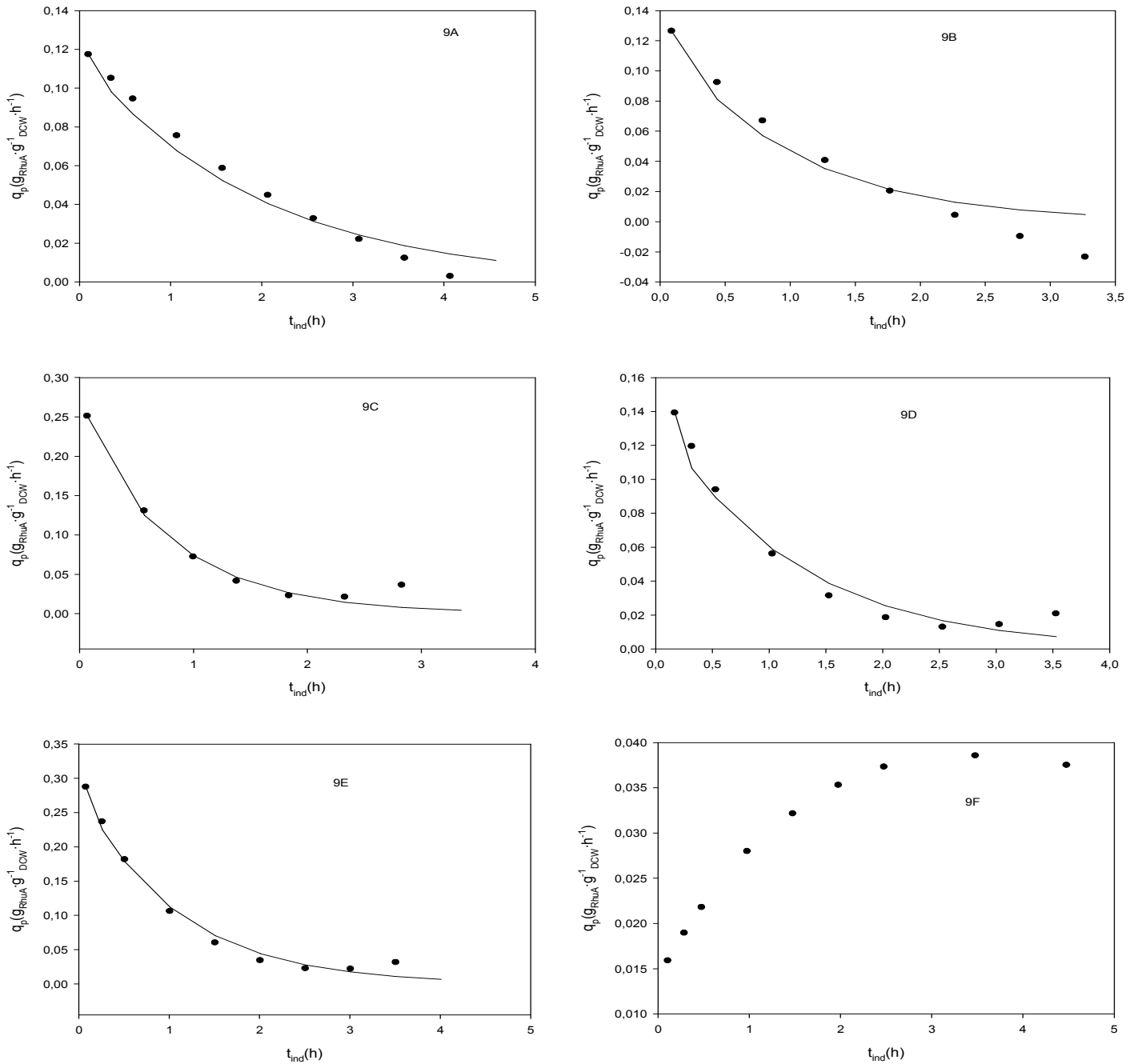


Fig. 5.9. Evolució de la velocitat específica de producció de RhuA durant l'etapa d'inducció per als diferents cultius emprats en el calibratge del model matemàtic de creixement i producció. 9A cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $0.5 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ . 9B cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $2.83 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ . 9C cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $1.57 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ . 9D cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $2 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ . 9E cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $1 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ . 9F cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1}$ .

Experimentalment, es va observar una dependència entre la tendència decreixent de la velocitat específica de producció de RhuA i el grau d'inducció aplicat al cultiu. D'aquesta manera doncs, el valor de  $k_2$  havia de presentar una relació amb el grau d'inducció del sistema.

Avaluant el temps necessari per tal que la velocitat específica de producció experimentés una reducció fins a la meitat del seu valor inicial es va determinar el valor del paràmetre  $k_2$  per a cada grau d'inducció aplicat (Fig. 5.10). Així, per a un cultiu qualsevol, tret del cultiu induït a  $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  on no es va observar cap disminució de la velocitat específica de producció si no un augment amb el temps :

$$\frac{q_p}{q_{p0}} = \frac{1}{2} = \exp(-k_2 \cdot t) \quad (\text{Eq. 5.23})$$

$$k_2 \left( \frac{I}{X} \right)_0 = - \frac{\ln\left(\frac{1}{2}\right)}{t_{1/2}} \quad (\text{Eq. 5.24})$$

Amb  $t_{1/2}$  determinat experimentalment.

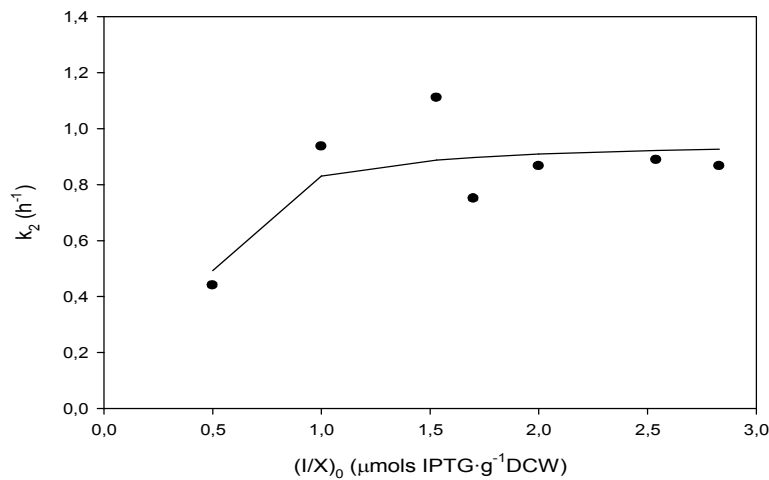


Fig. 5.10. Dependència del paràmetre  $k_2$  respecte el grau d'inducció dels cultius .

La dependència del valor de  $k_2$  respecte del grau d'inducció del sistema pot aproximar-se a un comportament tipus Michaelis-Menten definit per a relacions d'inducció superiors a  $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  (equació 5.25) on els dos paràmetres de l'equació prenen els valors  $k_{p1}=0.963 \pm 0.078 \text{ h}^{-1}$  i  $k_{p2}=0.096 \pm 0.060 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ :

$$k_2 = \frac{k_{p1} \cdot \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)}{k_{p2} + \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)} \quad (\text{Eq. 5.25})$$

Pel que fa a l'efecte en el creixement de la soca a la fase d'inducció, tret del cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ , la sobreexpressió de RhuA condueix a disminucions (després d'un augment inicial) més o menys pronunciades de la velocitat específica de creixement segons el grau d'inducció del cultiu. D'aquesta manera doncs, i per coherència amb la resta de la construcció realitzada, el valor de  $k_1$  (equacions 5.17 i 5.18) pot presentar una dependència de la relació inductor – biomassa com la següent:

$$k_1 = \frac{k_{s1} \cdot \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)}{k_{s2} + \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)} \quad (\text{Eq. 5.26})$$

Així doncs, la construcció matemàtica per a la descripció de la fase d'inducció vindrà descrita per les següents equacions (5.27 a 5.32):

$$\frac{dX}{dt} = \left[ \left( \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \exp\left( \frac{-S}{K_{is}} \right) \right) \cdot g_s \right] \cdot X - \frac{F_s \cdot X}{V} \quad (\text{Eq. 5.27})$$

$$\frac{dg_s}{dt} = - \frac{k_{s1} \cdot \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)}{k_{s2} + \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)} \cdot g_s \quad \text{amb } g_s(0) = 1 \quad (\text{Eq. 5.28})$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_s}{V} \cdot (S_0 - S) - \left( \frac{\mu_{\text{ind}}}{(Y_{XS})_{\text{ap}}} \right) \cdot X \quad (\text{Eq. 5.29})$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p \cdot X - \frac{F_s \cdot P}{V} \quad (\text{Eq. 5.30})$$

$$\frac{dq_p}{dt} = -\frac{k_{p1} \cdot \left(\frac{I}{X} - 0.4\right)}{k_{p2} + \left(\frac{I}{X} - 0.4\right)} \cdot q_p \quad \text{amb } q_p(0) = q_{p0} \quad (\text{Eq. 5.31})$$

$$\frac{dV}{dt} = F_s \quad (\text{Eq. 5.32})$$

Considerant t com el temps després d'haver induït el cultiu amb un impuls d'IPTG.

Els paràmetres corresponents a l'equació d'Aiba per al creixement amb inhibició per substrat són els mateixos que per a l'etapa no induïda del cultiu, i per tant no han de ser estimats de nou. Per altra banda, els paràmetres  $k_{p1}$  i  $k_{p2}$  han estat determinats experimentalment en base als perfils de velocitat específica de producció de RhuA per als experiments realitzats. Els tres paràmetres restants, corresponents al rendiment aparent biomassa – substrat  $(Y_{XS})_{ap}$ , i els paràmetres de l'equació de  $k_1$  (equacions 5.26 i 5.28) han estat estimats a partir del paquet d'estimació de paràmetres del software gPROMS. Per a la seva estimació es van utilitzar les mesures experimentals de concentració de biomassa, glucosa i RhuA al llarg de l'etapa d'inducció dels cultius i els valors dels paràmetres determinats prèviament, obtenint-ne el resultat presentat a la Taula 5.4. Cal destacar que el valor del rendiment biomassa – substrat aparent  $(Y_{XS})_{ap}$  presenta un valor superior al de l'etapa de creixement no induït, la qual cosa concorda amb els augments inicials de la velocitat específica de creixement als instants inicials de l'etapa d'inducció.

Paràmetre	Valor
$k_{S1}$	$0.503 \pm 1.2 \cdot 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
$k_{S2}$	$0.0573 \pm 7.69 \cdot 10^{-4} \text{ (}\mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{DCW}\text{)}$
$(Y_{XS})_{ap}$	$0.472 \pm 4.09 \cdot 10^{-4} \text{ (g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)}$

Taula 5.4. Valors determinats per a l'etapa d'inducció amb un únic impuls d'IPTG de cultius de la soca E. coli M15ΔglyA [pREP4].

De la mateixa manera que amb la fase de creixement dels cultius, si es comparen les mesures experimentals de biomassa i concentració de proteïna recombinant amb els valors predits pel model matemàtic (Figures 5.11a i 5.11b) es pot observar que les prediccions del model matemàtic són molt acurades per a aquestes variables.

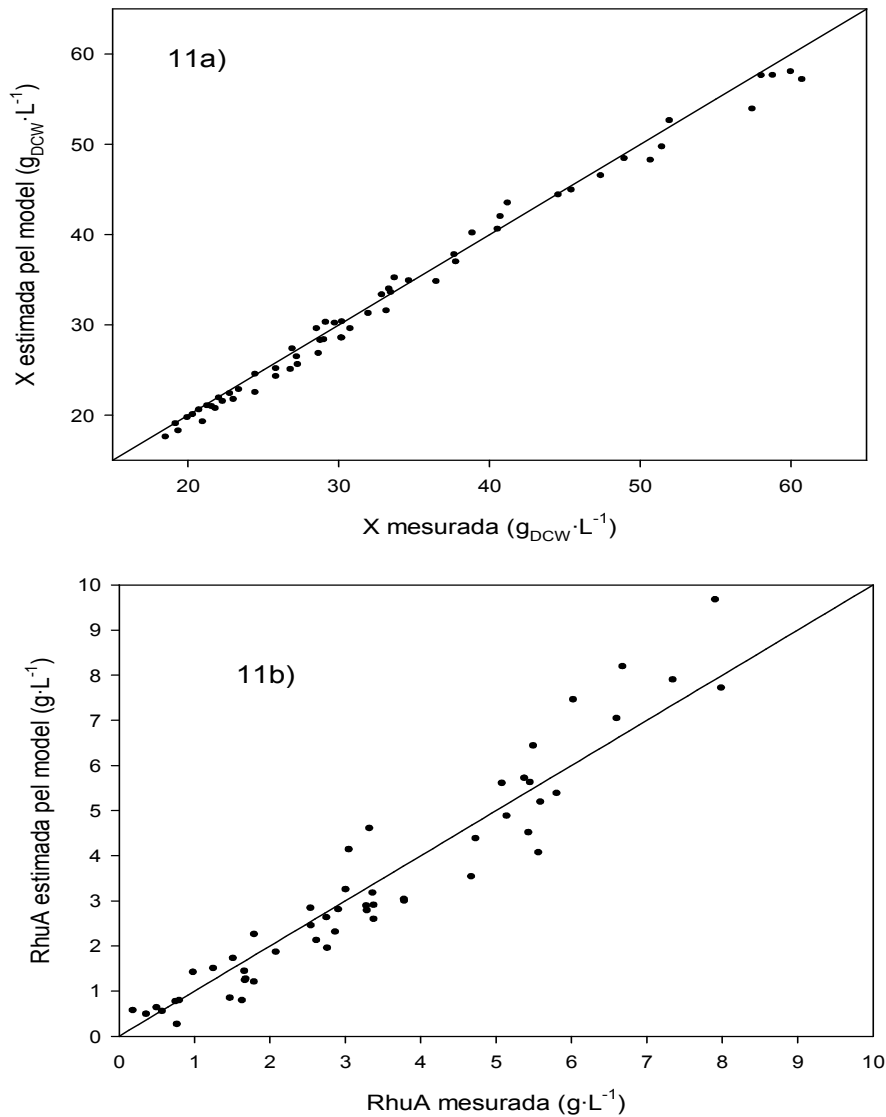


Fig. 5.11. Comparació entre les mesures experimentals i les prediccions del model matemàtic per a) la concentració de biomassa al sistema i b) la concentració de RhuA.

Una vegada han estat induïts amb IPTG, els cultius experimenten una sèrie de canvis que desemboquen en una disminució de la seva velocitat de creixement global. Donat que el sistema d'alimentació de nutrients es basa en un algorisme que funciona en llaç obert, en els experiments realitzats no s'exerceix cap tipus d'acció de control automàtica que reguli el ritme d'alimentació per a compensar la caiguda del creixement i evitar l'acumulació de substrat. Des del punt de vista del creixement, un excés de glucosa al medi pot portar a inhibicions o inclús a formació d'àcid acètic. Per altra banda, des del punt de vista de la producció de proteïna recombinant, deixant de banda l'àcid acètic, un excés de glucosa pot inhibir-ne la seva producció donat el

sistema de regulació de l'operó *lac* (veure introducció – secció 1.4.2) sota el control del qual es troba l'expressió de RhuA. D'altra banda, aquest excés pot augmentar l'activitat de les proteases dependents d'energia [35] que poden degradar l'aldolasa. Per tant, en base a les mesures experimentals de glucosa, i per tal d'evitar-ne la seva acumulació al medi, s'han implementat polítiques d'alimentació manuals en l'etapa de creixement induït. Quan les mesures experimentals superaven els  $0.5 - 0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucosa, es va procedir a interrompre l'alimentació de nutrients. A partir de la monitorització del pH i donat que només s'actua amb addició de base quan aquest es troba per sota de 6.95 unitats, es restablia l'alimentació quan aquest superava les 7 unitats, moment en què es pot considerar que el sistema es troba en condicions absolutament limitants de font de carboni. D'aquesta manera, doncs, s'han implementat cicles d'aturada – encesa ben bé a partir d'1.5 – 2 hores després d'haver induït, moment en el què el creixement es veu tan afectat que el consum de glucosa disminueix considerablement. Aquests cicles d'alimentació poden introduir-se en detall al software gPROMS, de manera que aquest els té en compte a l'hora de realitzar les estimacions dels paràmetres del model.

Les figures 5.12 a) a 5.12d) mostren els perfils experimentals i els calculats pel model per als experiments més característics (taula 5.5) realitzats per al seu calibratge.

$(I/X)_0$ ( $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ )	Particularitat de l'experiment
0.4	Inducció sense efecte sobre el cultiu
0.5	Inici de l'efecte sobre el creixement del cultiu
1	Màxim en acumulació intracel·lular de RhuA
2.83	Màxim grau d'inducció provat

Taula 5.5. Relació dels experiments més característics per al calibratge del model matemàtic de creixement i producció de RhuA.

Es pot observar que, en tots els casos el model prediu satisfactòriament els perfils de biomassa i proteïna recombinant. Pel que fa als perfils de concentració de glucosa, el model matemàtic és capaç de captar-ne les tendències generals.

El cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $0.4 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  (Figura 5.12a) no veu afectat el seu creixement durant la fase d'inducció. El model matemàtic és capaç de predir-ne el comportament donada la correcció que s'introdueix a les equacions de manera que tant la velocitat específica de creixement com la velocitat específica de producció de RhuA no es veuen afectades a relació inductor biomassa



igual o menor que  $0.4 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . Conseqüentment, no s'observa acumulació de glucosa, ja que el creixement manté la tendència exponencial desitjada.

A condicions d'inducció superiors ( $I/X \geq 0.5 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ), el creixement de la soca en el medi de cultiu es veu afectat de tal manera que es produeix una certa acumulació de glucosa a partir d'un determinat moment que depèn del grau d'inducció aplicat. Així doncs, per a relacions d'inductor - biomassa de  $0.5 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ , experimentalment s'observa una acumulació de glucosa a partir de les 2.5 hores d'haver induït el cultiu, mentre que a relacions inductor – biomassa superiors ( $3 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) aquesta acumulació es detecta després de poc més d'una hora d'haver induït. El model matemàtic construït prediu valors de concentració de substrat que tot i que presenten certa desviació front els valors experimentals, descriuen una tendència prou similar a l'experimental, podent d'aquesta manera determinar el moment en què es començarà a acumular glucosa al medi de cultiu per a un grau d'inducció donat. Els ajustos del model, inclouen les accions dutes a terme en tots els cultius, sobre el cabal d'alimentació de nutrients al sistema.

## 5.- Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

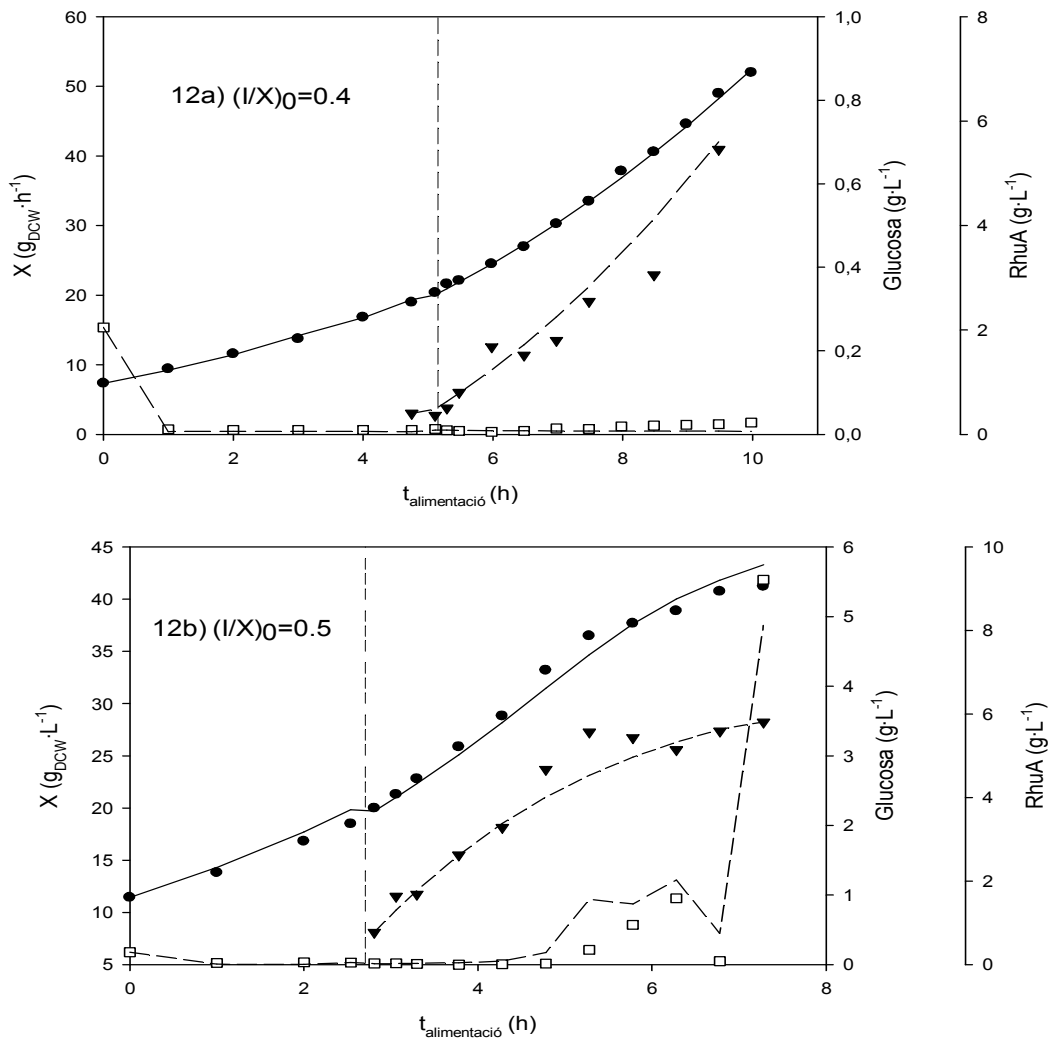


Fig. 5.12. Perfils experimentals i ajustos del model matemàtic (representats per línies sòlides o discontinües segons correspongui) construït per als cultius més característics utilitzats per al calibratge del model a les fases d'alimentació no induïda i inducció. 12a) Cultiu induït a  $0.4 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ , 12b) Cultiu induït a  $0.5 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . (•) Biomassa, (□) Concentració de glucosa al medi, (▼) Nivells de proteïna recombinant.

## 5.- Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

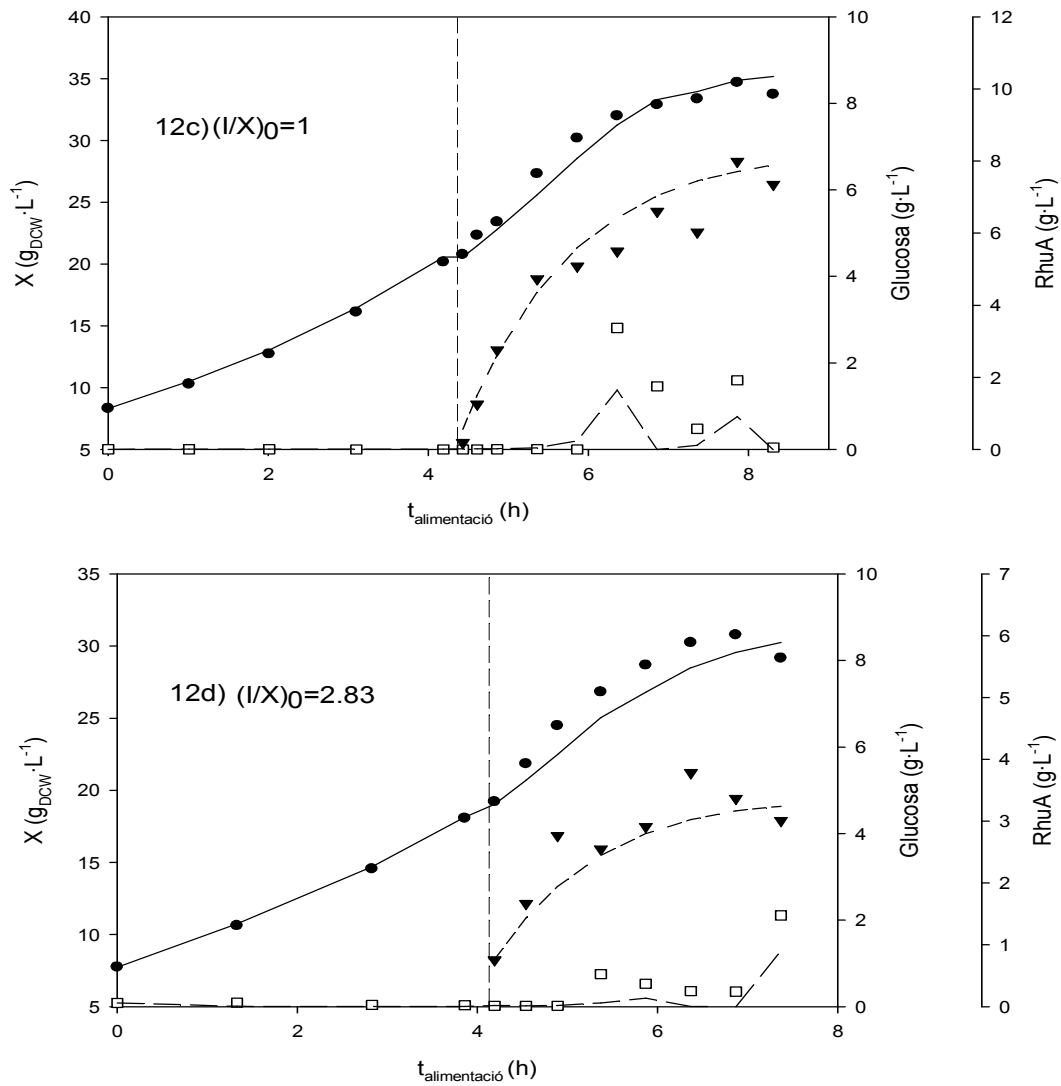


Fig. 5.12. Perfils experimentals i ajustos del model matemàtic (representats per línies sòlides o discontinües segons correspongui) construït per als cultius més característics utilitzats per al calibratge del model a les fases d'alimentació no induïda i inducció. 12c) Cultiu induït a  $1 \mu\text{mol IPTG} \cdot g^{-1}_{DCW}$  i 12d) Cultiu induït a  $2.83 \mu\text{mol IPTG} \cdot g^{-1}_{DCW}$ . (•) Biomassa, (□) Concentració de glucosa al medi, (▼) Nivells de proteïna recombinant.

### 5.5. Validació del model matemàtic

Tot i que es poden aplicar molts criteris per a la validació d'aquest model matemàtic, i en altres capítols d'aquesta tesi es presenten alguns experiments que es podrien utilitzar com a validació, en aquest capítol el model es validarà en base a la capacitat d'aquest per a predir el moment de la fase d'inducció a partir del qual la glucosa es comença a acumular al medi de cultiu.

#### 5.5.1. Problemàtica de l'acumulació de glucosa

A la secció 5.3.2, es descriuen alguns dels paràmetres o metabòlits que poden causar un efecte negatiu sobre el comportament d'un cultiu recombinant d'aquest tipus. Tot i haver ajustat els paràmetres físico-químics a valors òptims tant per al creixement del microorganisme com per a la producció de la proteïna recombinant, i treballar en condicions on es minimitza la formació de subproductes amb efectes no desitjats sobre el cultiu, l'acumulació de font de carboni pot jugar un paper important en la producció de proteïnes recombinants.

Per una banda, la glucosa pot actuar com a inhibidor de sistemes d'expressió tipus *lac*, de manera que la seva concentració al medi de cultiu s'ha de mantenir baixa per assolir uns nivells d'expressió elevats.

Per altra banda, està descrit a la bibliografia que la presència de glucosa potencia l'acció de determinats grups de proteases a *E. coli*. Alguns grups de proteases poden ser expressades entre d'altres causes a *E. coli* com a resposta a una situació de limitació continuada de nutrients al medi, o bé com a conseqüència d'una excessiva demanda d'aminoàcids associada a la producció d'una determinada proteïna recombinant. La presència d'aquestes proteases pot donar lloc a disminucions notables en les productivitats d'un cultiu recombinant ja que en alguns casos poden afectar residus proteics implicats en l'activitat enzimàtica.

Experimentalment, al sistema de producció de RhuA, s'ha observat que en cultius on no s'ha aplicat una política d'alimentació de nutrients amb l'objectiu de minimitzar l'acumulació de glucosa al medi, els nivells d'activitat enzimàtica o proteïna activa experimenten una caiguda considerable (que podria atribuir-se a l'esmentada acció de proteases), mentre que en cultius on la concentració de glucosa s'ha mantingut al voltant de  $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  durant la fase d'inducció els nivells de proteïna activa s'han mantingut constants (Figures 5.13a i 5.13b). Així doncs, donada la importància de la

## 5.- Modelització matemàtica de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

presència de glucosa al medi de cultiu, la validació del model matemàtic s'ha plantejat des del punt de vista de capacitat de predicció del moment en la fase d'inducció del cultiu a partir del qual la concentració de glucosa comença a augmentar.

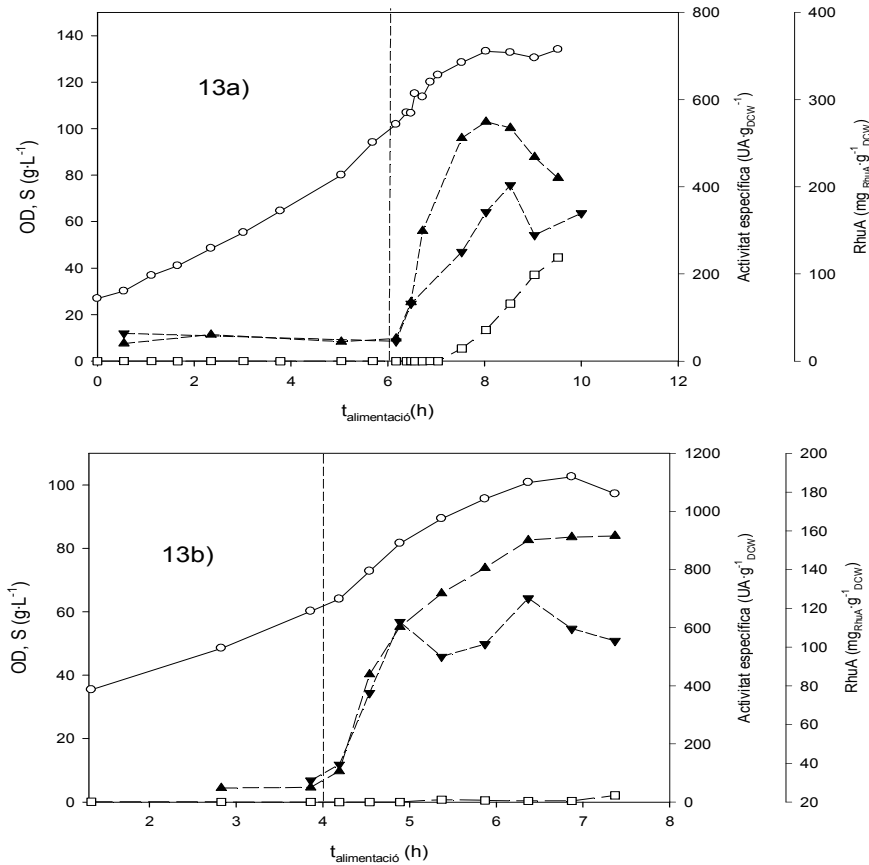


Figura 5.13. Perfils de cultius induïts sense i amb implementació de política d'alimentació de nutrients per a evitar l'acumulació de glucosa al medi de cultiu. 13a) Cultiu induït a relació inductor – biomassa d'1.62 μmol IPTG·g<sup>-1</sup> DCW sense control sobre l'alimentació de nutrients. 13b) Cultiu induït a relació inductor – biomassa de 2.83 μmol IPTG·g<sup>-1</sup> DCW amb control sobre l'alimentació de nutrients. (○-○) Biomassa, (□-□) Concentració de glucosa al medi, (▼-▼) RhuA total intracel·lular, (▲-▲) Activitat específica intracel·lular.

D'aquesta manera doncs, partint de les mesures experimentals del cultiu presentat a la figura 5.13a, induït a una relació inductor – biomassa d'1.62 μmol IPTG·g<sup>-1</sup> DCW, s'ha simulat el comportament del sistema durant la fase d'inducció d'aquest en termes de biomassa, concentració de glucosa i nivell de proteïna recombinant (en g·L<sup>-1</sup>) a les mateixes condicions inicials que les experimentals. La figura 5.14 mostra els perfils experimentals i predits pel model per a la concentració de substrat i proteïna recombinant. El valor inicial per a la velocitat específica de producció s'ha determinat

a partir de la interpolació en la corba  $q_{p0}$  front relació inductor - biomassa construïda per splines. La tendència predita pel model per a la concentració de proteïna recombinant ajusta de manera fiable el comportament experimental. Per altra banda, el perfil de concentració de glucosa al medi de cultiu predit pel model matemàtic és capaç de determinar amb una bona precisió l'instant a partir del qual aquesta es comença a acumular al medi un cert temps després d'haver induït.

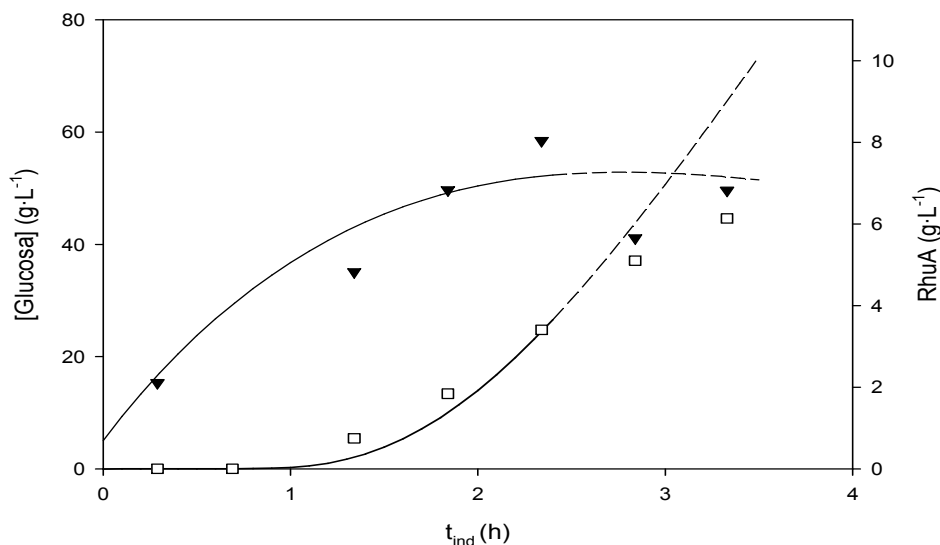


Fig. 5.14. Perfils experimentals i predits pel model matemàtic per a un cultiu induït a relació inductor – biomassa d'1.62  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . En línia discontinua es mostra el període de l'etapa d'inducció on la concentració de substrat mesurada experimentalment descriu un canvi de tendència respecte la predita. (▼) Concentració de proteïna recombinant, (□) Concentració de glucosa al medi.

La figura 5.14 permet a més observar un punt d'inflexió en el perfil experimental de la concentració de substrat al medi de cultiu. A partir de les quasi 3 hores d'haver induït el cultiu, la concentració de glucosa es desvia de la tendència exponencial que mostrava. En principi, donat que el cultiu no consumeix gairebé font de carboni una vegada el creixement es veu prou afectat per la producció de RhuA, tota la glucosa aportada hauria de quedar acumulada al medi. No obstant però, a partir de les 3 hores d'haver induït sembla que existeix un cert consum de glucosa probablement associat a fenòmens proteolítics. Aquesta desviació no pot ser predita pel model donat que aquest fenomen no s'ha contemplat en la seva formulació. Ara bé, donat que precisament el que interessa evitar és la degradació proteica en etapes avançades del cultiu, el model ja resulta d'aplicació directa ja que és capaç de predir el moment en què aquest fenomen comença a tenir lloc.

### 5.6. Conclusions

S'ha desenvolupat un model matemàtic per al creixement de la soca *E. coli* M15 $\Delta$ glyA [pREP4] pQE $\alpha$ rham en medi definit i per a la sobreexpressió de l'enzim Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius discontinus alimentats en funció del grau d'inducció del sistema. El model ha estat definit a condicions controlades de pH, temperatura i concentració d'oxigen dissolt. El model matemàtic està definit també a unes determinades condicions en termes d'alimentació de nutrients. El ritme fixat té com a objectiu mantenir en tot moment una limitació de font de carboni al medi de cultiu i treballar a una velocitat específica de creixement i de consum de substrat que per una banda evita la producció d'àcid acètic per saturació del metabolisme cel·lular, i per l'altra, en la fase d'inducció, proporciona millors resultats en quant a nivells de proteïna activa intracel·lular assolits que a ritmes més baixos.

El model matemàtic, que s'ha construït en base a una descripció no estructurada i no segregada del sistema, ha estat desenvolupat segons dues etapes, l'una per al creixement no induït i l'altra per a la inducció de la producció de RhuA. La caracterització de l'etapa no induïda es basa en la utilització de l'equació d'Aiba per a descriure el patró de creixement i de consum de substrat de la soca, mentre que la modelització de la fase d'inducció parteix de la formulació d'equacions de caràcter semiempíric per a descriure per una banda la producció de proteïna recombinant i per l'altra els efectes de la sobreexpressió d'aquesta sobre la velocitat específica de creixement del cultiu i la velocitat específica de producció de RhuA.

En base als resultats experimentals, tot indica que la relació inductor – biomassa és la responsable del comportament del sistema una vegada aquest ha estat induït. Tant la velocitat específica inicial de producció de RhuA com l'efecte sobre la velocitat de creixement i sobre la mateixa velocitat específica de producció de proteïna recombinant en presenten una clara dependència.

La descripció del sistema a partir de variables fàcilment mesurables ha permès l'elaboració d'un model que prediu satisfactòriament els perfils de biomassa, concentració de font de carboni o substrat limitant i nivells de proteïna recombinant produïts, tant a la fase de creixement no induït com a la inducció. El model matemàtic i els experiments que s'han anat plantejant en les diferents fases de construcció d'aquest han permès observar la importància de la presència de glucosa al medi durant la fase d'inducció. Després d'un cert temps d'haver induït el cultiu, la presència

de glucosa pot estimular l'acció de certes proteases donant lloc a possibles pèrdues d'activitat enzimàtica. El model matemàtic, en ser capaç de determinar el moment d'inici d'acumulació de glucosa, pot aplicar-se a la determinació de les trajectòries d'alimentació òptimes per tal d'evitar una possible acumulació de substrat al medi de cultiu que disminueixi el rendiment del procés global.

### 5.7. Referències

1. FDA, Guidance for industry: PAT- a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. <http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html>, 2004.
2. Paul McKenzie, S.K., Jean Tom, A. Erik Rubin, Mauricio Futran, Can pharmaceutical process development become high tech? AIChE Journal, 2006. 52(12): p. 3990-3994.
3. R. Simutis, R.O., M. Manikowski, S. Feyo de Azevedo, A. Lübbert, How to increase the performance of models for process optimization and control. Journal of Biotechnology, 1997. 59: p. 73-89.
4. Shyam S. Sablani, A.K.D., M. Shafiur Rahman, Arun S. Mujumdar Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques (Food Science and Technology). 2006: CRC Press.
5. J.M. Brass, F.W.J.M.M.H., M. Rohner, Application of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocesses. Journal of Biotechnology, 1997. 59: p. 63-72.
6. Rohner, M., Meyer, H.P., Applications of modelling for bioprocess design and control in industrial production. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1995. 12(2): p. 69-78.
7. Thilakavathi, M., T. Basak, and T. Panda, Modeling of enzyme production kinetics. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. 73: p. 991-1007.
8. Bailey, J.E., Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. Biotechnology progress, 1998. 14: p. 8-20.
9. Hangos, K. and I. Cameron, Process Modelling and Model Analysis. Process Systems Engineering. 2001: Academic Press.
10. Luybean, W.L., Process Modeling, Simulation and Control for Chemical Engineers 2ed. 1989: McGraw-Hill Companies.



11. John H. Seinfeld, L.L., *Mathematical Methods in Chemical Engineering: Process Modeling Estimation and Identification* v. 3. 1974: Prentice Hall.
12. Richard G. Rice, D.D.D., *Applied Mathematics for Chemical Engineers*. 1994: Wiley.
13. Abhay Joshi, B.O.P., *Escherichia coli* growth Dynamics: A three pool biochemically based description. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986. 31: p. 102-116.
14. Tang, S., J. Chen, and Z. Zhang, Structured models for recombinant human interleukin-11 fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2007. 35(2): p. 210-217.
15. Oner, E.T., et al., Modeling of the induced expression for high-level production of a foreign protein by recombinant *E. coli* under the control of the T7 phage promoter. *Process Biochemistry*, 2003. 39(3): p. 315-323.
16. William E. Bentley, R.H.D., Dhinakar S. Kompala, Dynamics of induced CAT expression in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991. 38: p. 749-760.
17. Nielsen, J., et al., Modeling fermentations with recombinant microorganisms : Formulation of a structured model. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991. 37(9): p. 802-808.
18. Esener AA, R.J., Kossen NW., Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983. 25(12): p. 2803-2841
19. Ensari, S., J.H. Kim, and H.C. Lim, Unstructured model for L-lysine fermentation under controlled dissolved oxygen. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(4): p. 1387-1390.
20. Chae, H.J., et al., Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. 69(3): p. 275-285.
21. Lee, J. and W.F. Ramirez, Mathematical modeling of induced foreign protein production by recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992. 39(6): p. 635-646.
22. N. Burhan, T.S., V. Beschkov, Mathematical modelling of cyclodextrin-glucanotransferase production by batch cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 2005. 24: p. 73-77.
23. Galvanauskas, V., et al., Model based design of a biochemical cultivation process. *Bioprocess Engineering*, 1998. 18(3): p. 227-234.

24. Levisauskas, D., et al., Model based calculation of substrate/inducer feed-rate profiles in fed-batch processes for recombinant protein production. *Biotechnology Techniques*, 1999. 13(1): p. 37-42.
25. Wang, F.S. and J.W. Sheu, Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. *Chemical Engineering Science*, 2000. 55(18): p. 3685-3695.
26. Chih-Lung Ko, F.-S.W., Run-to-run fed-batch optimization for protein production using recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2006. 30: p. 279-285.
27. Levisauskas, D., Galvanauskas, V., Henrich, S., Wilhelm, K., Volk, N., Lübbert, A., Model-Based Optimization of Viral Capsid Protein Production in Fed-Batch Culture of recombinant *Escherichia coli* *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2003. 25(255-262).
28. Betenbaugh, M.J. and P. Dhurjati, A comparison of mathematical model predictions to experimental measurements for growth and recombinant protein production in induced cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990. 36(2): p. 124-134.
29. Jenzsch, M., R. Simutis, and A. Luebbert, Generic model control of the specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* cultivations. *Journal of Biotechnology*, 2006. 122(4): p. 483-493.
30. Andersson, L., L. Strandberg, and S.O. Enfors, Cell segregation and lysis have profound effects on the growth of *Escherichia coli* in high cell density fed batch cultures. *Biotechnology Progress*, 1996. 12(2): p. 190-195.
31. Zheng, Z.Y., S.J. Yao, and D.Q. Lin, Using a kinetic model that considers cell segregation to optimize hEGF expression in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2005. 27(3): p. 143-152.
32. Miao, F. and D.S. Kompala, Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: 1. Batch cultures and kinetic modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992. 40(7): p. 787-796.
33. Mahadevan, R. and F.J. Doyle, On-line optimization of recombinant product in a fed-batch bioreactor. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(2): p. 639-646.
34. Kavanagh, J.M. and G.W. Barton, Productivity improvement of recombinant *Escherichia coli* fermentation via robust optimization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2008. 31(2): p. 137-143.

35. Pinsach, J., et al., Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch Cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. 43(7): p. 507-512.

## 6. ESTRATÈGIES ALTERNATIVES D'ADDICIÓ DE NUTRIENTS PER A LA MILLORA DE LA PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN CULTIUS A ESCALA LABORATORI

### Resum

L'exploració del model matemàtic de creixement i producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa i l'estudi de la dinàmica de creixement del cultiu en termes de replicació cel·lular han portat al plantejament de noves alternatives d'addició de nutrients a la fase d'inducció del sistema d'estudi. Les alternatives, proposades des del punt de vista d'evitar l'acumulació de glucosa al sistema, susceptible de conduir a fenòmens de tipus proteolític, han portat en alguns casos a millores en la producció de proteïna recombinant en termes màssics. En d'altres però, han permès l'obtenció de nivells similars tant d'activitat específica com de proteïna intracel·lular acumulada amb estalvis importants de nutrients. L'estudi ha permès per altra banda, determinar una estratègia de control de l'addició de nutrients basada en el model matemàtic de producció proposat. Aquesta estratègia evita l'acumulació de glucosa per sobre d'una determinada consigna a partir de la interrupció automàtica de l'addició de nutrients en base a la resolució dels balanços de matèria al sistema definits al capítol 5.

### 6.1. Introducció i antecedents

En els dos anteriors capítols d'aquest treball s'han estudiat processos de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa duts a terme segons estratègies de cultiu notablement diferents.

En un cas, i degut als resultats obtinguts anteriorment al grup de recerca on s'emmarca aquest treball, s'han conduït els processos a través d'etapes d'inducció en continu [1-3], és a dir, amb alimentació constant d'inductor (IPTG) amb un perfil paral·lel al del creixement de la soca d'estudi. Per altra banda, als estudis de calibratge i validació del model matemàtic de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa [4], l'estratègia de procés s'ha basat en una inducció a partir d'un impuls d'IPTG al medi de cultiu una vegada assolida una densitat òptica fixada.

La qualitat de la proteïna recombinant, paràmetre de referència dels estudis d'aquest treball, ha incrementat notablement en els estudis duts a terme amb inducció discreta respecte la inducció en continu ( $>8 \text{ AU} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ RhuA}$  vs  $4 \text{ AU} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ RhuA}$ ).

Els experiments amb inducció discreta han permès observar que aquesta, a partir d'una determinada intensitat, té un efecte directe sobre la velocitat de creixement del cultiu. Aquest efecte, es tradueix macroscòpicament en una disminució del consum de substrat i per tant en una acumulació d'aquest al medi.

Per altra banda, s'ha observat que el control sobre l'addició de nutrients al cultiu durant la fase d'inducció, amb l'objectiu principal de mantenir els nivells de glucosa al voltant de  $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  al medi, té una influència directe sobre la quantitat de proteïna recombinant activa acumulada intracel·lular. En evitar l'acumulació de glucosa al sistema, es minimitzen els fenòmens proteolítics (dependents d'energia) [2, 5-11] que tenen com a resultat una disminució dels rendiments globals del procés en termes de proteïna activa.

L'actual política d'alimentació de nutrients al sistema es basa en mantenir un ritme d'addició de nutrients amb tendència exponencial en el temps segons un perfil pre-establert en base als paràmetres cinètics de la soca i la velocitat de creixement desitjada [12]. Si bé aquest perfil d'addició sembla correcte tot just iniciada la fase d'inducció, no ho és al llarg de tota aquesta etapa, ja que tal i com s'ha comprovat en anteriors experiments, la velocitat de creixement mesurada en termes de densitat òptica disminueix notablement de forma gradual per efecte de la sobreexpressió de RhuA. És per això doncs que ben entrada la fase d'inducció s'intervé manualment en l'addició de nutrients al sistema per tal d'evitar l'acumulació de glucosa al medi de cultiu ja que el perfil de creixement no es correspon amb el d'alimentació.

A priori no semblaria equivocat pensar que la disminució de la velocitat específica del creixement del cultiu es un fenomen gradual que pren rellevància notable ben entrada la fase d'inducció per efecte de la sobreproducció de RhuA. De fet, aquesta consideració és la que s'ha tingut en compte a l'hora de formular el model de producció presentat al capítol anterior a partir de la següent expressió per a la velocitat de creixement:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{ind} \cdot X - \frac{F_S \cdot X}{V} \quad (\text{Eq. 5.15})$$

$$\mu_{ind} = \mu \cdot g_s \quad (\text{Eq. 5.16})$$

$$\frac{dg_s}{dt} = -k_1 \cdot g_s \quad \text{amb} \quad g_s(0) = 1 \quad (\text{Eq. 5.17})$$

Així doncs, una possible estratègia d'addició de nutrients alternativa a l'actual podria basar-se en una explotació directe del model matemàtic de producció on tenint en compte aquesta disminució gradual de la velocitat de creixement dels microorganismes es podria anar modificant automàticament el ritme d'addició de nutrients fixant una consigna o un límit en la concentració màxima permesa de glucosa al medi de cultiu.

No obstant però, en treballs de caire més biològic a la bibliografia [13], es descriu que en soques productores amb sistemes d'expressió regulats per promotors forts tipus T5 i/o T7 sotmesos a una inducció d'una determinada intensitat la dinàmica és notablement diferent, i es que es demostra que el creixement observat durant la fase d'inducció d'un cultiu recombinant es deu no a la replicació cel·lular en sí, sinó a canvis en l'estructura cel·lular que es donen quan les cèl·lules passen a un estat induït i que poden portar associats augments en la densitat òptica del cultiu. Així, el creixement en termes de replicació no és un fenomen que va minvant gradualment sinó que s'atura des d'un bon principi, atribuint els canvis de densitat òptica del cultiu a altres causes.

D'aquesta manera doncs, i prenent una aproximació diferent del procés, es poden proposar una sèrie d'experiments per tal de discriminar si en el sistema experimental objecte d'aquest estudi, l'evolució del creixement del cultiu és un fenomen atribuïble únicament a un "*desgas*" o estrès metabòlic que pren força gradualment amb l'avanç de la fase d'inducció o si per contra es pot observar el proposat a la bibliografia [13], és a dir, que just després d'induir el cultiu s'observa un estancament del creixement en termes de replicació cel·lular mentre que la densitat òptica del cultiu segueix augmentant fins a un cert límit.

En base a aquestes observacions, referències bibliogràfiques i consideracions, pot resultar de gran interès la determinació de perfils alternatius d'alimentació de nutrients al sistema [14], que per una banda concordin amb el tipus de creixement observat als cultius, i que per l'altra permetin una major automatització del procés productiu.

## 6.2. Objectius

L'objectiu d'aquest estudi és l'avaluació de possibles estratègies alternatives d'addició de nutrients a la fase d'inducció de processos de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a escala laboratori. Per tal de delimitar l'abast d'aquest estudi, es prendrà com a punt de partida un cultiu induït a la relació inductor-biomassa que ha proporcionat els millors resultats de qualitat ( $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ) de proteïna recombinant fins al moment;  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .

## 6.3. Materials i mètodes

### 6.3.1. Soques i plasmidis

(Veure secció general de soques i plasmidis utilitzats: 3.1)

La soca *E. coli* M15 $\Delta$ glyA [pREP4] portadora del vector pQE $\alpha$  $\beta$ rham es va utilitzar per a la sobreexpressió, en cultius d'alta densitat cel·lular, de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

### 6.3.2. Medis de cultiu

(Veure secció general de medis de cultiu emprats: 3.2)

Per al desenvolupament dels pre-cultius, a partir d'estocs de la soca conservats en glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ , es va utilitzar medi LB. Els cultius en Erlenmeyer (inòculs) i bioreactor, per altra banda, es van dur a terme partint de medi definit de composició detallada a la secció general de medis de cultiu.

### 6.3.3. Equipament de procés (no analític) utilitzat

Per a dur a terme els cultius descrits en aquest estudi es va utilitzar el següent equipament:

- Fermentador Biostat B (Sartorius) amb capacitat total de 2L i volum útil d'1.5 L i unitat de control digital (DCU) per al desenvolupament dels cultius a escala laboratori

- Centrifugadora Beckman J2-21 M/E, sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials) i disruptor cel·lular mecànic One Shot (Constant Systems LTD) per al processament del brou de cultiu.

#### 6.3.4. Condicions de cultiu

El procés pren com a punt de partida el desenvolupament overnight d'un pre-cultiu en medi complex LB a un volum final de 15 mL. Assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1.5 – 2 unitats, s'inocula un Erlenmeyer carregat amb medi definit (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb un 5% d'inòcul a un volum total de 100 mL. Transcorregudes 4 hores, i assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1 unitat, s'inoculen 80 mL del contingut de l'Erlenmeyer a un reactor escala laboratori carregat amb medi definit fins a un volum total de 800 mL. Es fixa una consigna de 7 unitats per al pH i 50% de saturació per a la concentració d'oxigen dissolt a la unitat de control del procés (DCU).

Després de 12-14 hores de procés, s'esgota la font de carboni carregada inicialment i s'inicia una etapa en discontinu alimentat a partir de l'addició d'una solució concentrada de nutrients (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb l'objectiu de mantenir un creixement a velocitat constant de  $0.225 \text{ h}^{-1}$  a les mateixes condicions operacionals que durant l'etapa en discontinu. Es realitzen addicions puntuals de fosfats concentrats independentment del medi d'alimentació davant de la impossibilitat de mantenir-los en solució en aquest. El criteri d'addició de fosfats aplicat respon a valors experimentals de rendiments determinats al grup de recerca corresponents a  $0.05 \text{ g}_P \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .

Assolida una densitat òptica d'aproximadament 60 unitats, s'indueix el cultiu a partir d'un impuls d'IPTG a raó de  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . A l'etapa d'inducció, els perfils d'alimentació de nutrients presenten certes diferències segons l'estratègia alternativa implementada:

- Perfil d'alimentació establert per les prediccions del model matemàtic de creixement i producció durant la fase d'inducció del cultiu.
- Perfil d'alimentació constant a  $0.27 \text{ g}_{\text{GLUC}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .
- Perfil d'alimentació constant a  $0.55 \text{ g}_{\text{GLUC}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .



### 6.3.5. Mètodes analítics

#### 6.3.5.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.1).

En aquest estudi, es van dur a terme mesures del creixement cel·lular no només en termes de densitat òptica sinó també en termes de replicació cel·lular. Per a la seva monitorització es va utilitzar un citòmetre de flux Guava EasyCyte Mini de Guava Technologies en mode de recompte total. Per tal d'analitzar per citometria les mostres del brou de cultiu, aquestes es van diluir fins a concentracions cel·lulars entre  $1 \cdot 10^4$  –  $1 \cdot 10^5$  cèl·lules·mL<sup>-1</sup>, o l'equivalent en densitat òptica entre  $1 \cdot 10^{-5}$  –  $1 \cdot 10^{-4}$ , ja que aquest és el rang de concentració cel·lular que assegura que les cèl·lules es poden mesurar individualment i no en forma d'agregats. Per a cada mostra el procediment analític (dilució i mesura) es va fer per quadruplicat i els resultats experimentals presentats en són la mitjana aritmètica.

#### 6.3.5.2. Quantificació dels nivells de proteïna recombinant

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.2)

## 6.4. Resultats i discussió

### 6.4.1. Regió de treball

Els estudis per a l'avaluació dels perfils alternatius d'alimentació de nutrients al sistema es van dur a terme a la regió experimental on s'han observat els millors resultats obtinguts fins al moment en quant a la producció de proteïna recombinant activa. A les figures 6.1a i 6.1b es mostren els resultats obtinguts en els estudis de calibratge i validació del model matemàtic, en termes de qualitat de la proteïna recombinant ( $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ) i activitat específica intracel·lular acumulada ( $\text{UA} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ). S'observa que si bé a relacions d'inductor – biomassa de  $0.5 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  l'activitat específica acumulada intracel·lular pren valors màxims, no es correspon amb un màxim en la qualitat de la proteïna recombinant. Això es degut a que la quantitat de proteïna, en termes màssics ( $\text{mg}_{\text{RhuA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ), pren valors elevats, ara bé, per motius

que podrien relacionar-se amb l'estrés cel·lular introduït per l'elevada síntesi de proteïna, aquesta no és tan activa com hauria. És per això doncs, que es van prendre com a base dels estudis que es presenten en aquest capítol, relacions d'inductor – biomassa al voltant de  $3 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . En aquests valors s'observen els màxims en termes de qualitat i activitat de la proteïna recombinant.

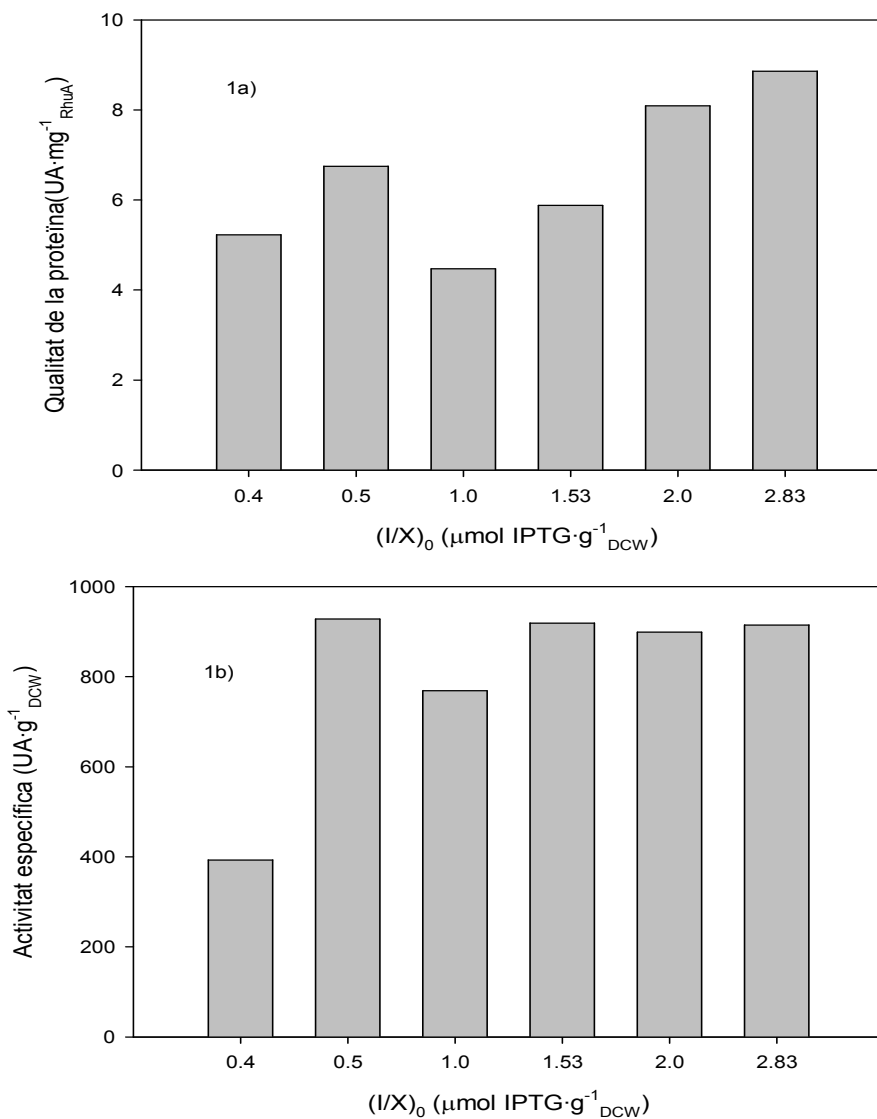


Fig. 6.1. a) Comparativa de la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada ( $\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ) a diferents graus d'inducció entre 0.4 i  $2.83 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  i b) comparativa de l'activitat específica ( $\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) per a les mateixes relacions inductor - biomassa.

6.4.2. *Cultiu amb perfil d'alimentació establert pel model de producció*

Les polítiques d'alimentació de nutrients implementades als cultius emprats per al calibratge del model matemàtic, recordem, es basen en l'addició d'aquests tenint en compte un perfil de tipus exponencial suposant que el cultiu segueix creixent a la mateixa velocitat específica a la que ho feia just abans de la inducció. Per tal d'evitar l'acumulació de glucosa al medi de cultiu, que pot conduir a fenòmens de tipus proteolític amb una disminució dels rendiments globals de producció i a inhibicions de la producció per efecte de la repressió del sistema d'expressió de la proteïna recombinant, s'establia un control de tipus manual del sistema d'addició de nutrients. Aquest control es basava en mantenir el ritme exponencial d'alimentació fins a detectar nivells de glucosa al medi de cultiu iguals o superiors a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A partir d'aquest moment s'iniciaven cicles periòdics d'interrupció del flux.

L'estratègia alternativa plantejada en aquesta secció es basa en la implementació de la capacitat predictiva del model de producció, que descriu amb exactitud l'instant a partir del qual es comença a acumular glucosa al medi. D'aquesta manera doncs, l'anticipació del model matemàtic pot permetre no "fer tard" o minimitzar el risc que es té a l'estratègia original de patir acumulacions de glucosa molt superiors a  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Per altra banda, l'ajust gradual del flux de nutrients al sistema pot evitar excedents de glucosa que es destinin a altres rutes, com ara relacionades amb fenòmens proteolítics.

A la figura 6.2 es representa l'esquema de control implementat a partir de la formulació del model matemàtic de producció construït al capítol anterior. El sistema actua en llaç obert (ja que no hi ha mesura on-line de la concentració de glucosa al medi) i és de caràcter predictiu, ja que en tot moment les decisions es prenen en funció del resultat de la resolució dels balanços de matèria al sistema aplicats al procés:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{fix} \cdot g_s) \cdot X - \frac{F_s \cdot X}{V} \quad (\text{Eq. 6.1})$$

$$\frac{dg_s}{dt} = - \frac{k_{s1} \cdot \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)}{k_{s2} + \left( \frac{I}{X} - 0.4 \right)} \cdot g_s \quad \text{amb } g_s(0) = 1 \quad (\text{Eq. 6.2})$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_S}{V} \cdot (S_e - S) - \left( \frac{\mu_{fix} \cdot g_s}{(Y_{XS})_{ap}} \right) \cdot X \quad (\text{Eq. 6.3})$$

$$\frac{dV}{dt} = F_S \quad (\text{Eq.6.4})$$

$$F_S = \frac{\mu_{fix} \cdot (X_0 \cdot V_0) \cdot \exp(\mu_{fix} \cdot t)}{(Y_{XS})_{ap} \cdot S_e} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

On els paràmetres cinètics - empírics són els determinats per al sistema d'estudi:

Paràmetre	Valor
$k_{s1}$	$0.503 \pm 2 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
$k_{s2}$	$0.0573 \pm 7.69 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$
$(Y_{XS})_{ap}$	$0.472 \pm 4.09 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$

I els paràmetres operacionals

Paràmetre operacional	Valor
$I/X$	$3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$
$\mu_{fix}$	$0.225 \text{ h}^{-1}$

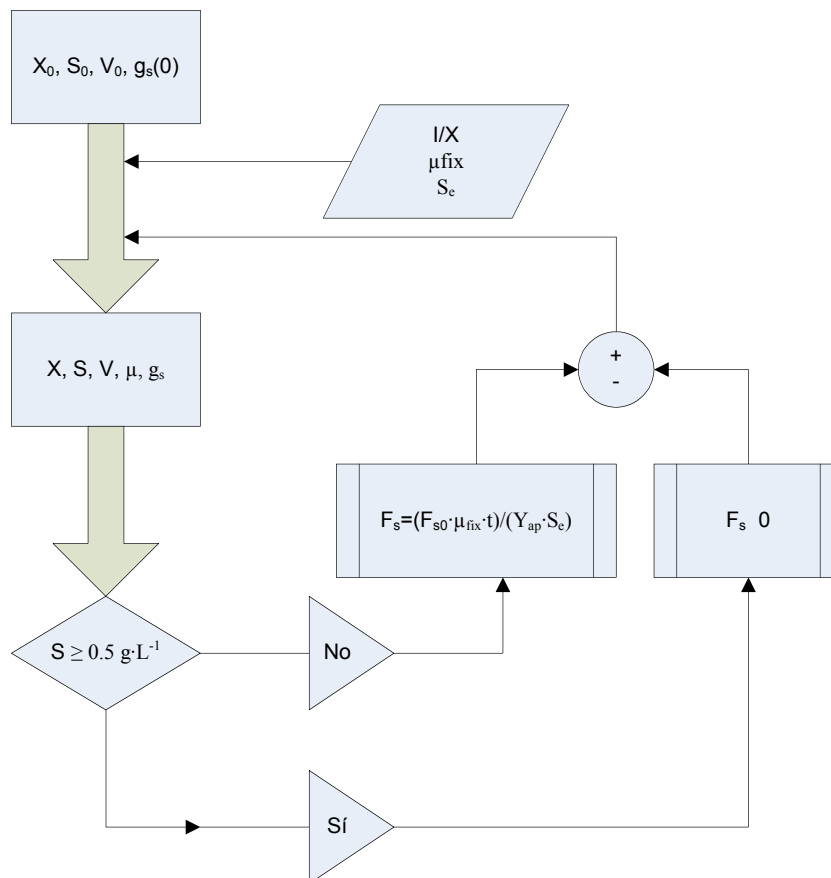


Fig. 6.2. Esquema aplicat al control del flux de nutrients al cultiu durant l'etapa d'inducció fixant  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  la concentració de glucosa màxima admissible. El sistema de control manipula el flux de nutrients al reactor segons la predicció que es fa de la concentració de glucosa al medi a partir de la resolució matemàtica dels balanços de matèria del procés.

La comparativa entre els perfils de densitat òptica en haver implementat aquesta estratègia de procés front a l'obtingut a partir de l'estratègia original (control manual després de mesurar la concentració de glucosa) es mostra a la figura 6.3. Es pot observar que els perfils coincideixen. En termes de producció de RhuA, les figures 6.4a i 6.4b mostren una comparativa, en termes relatius (%), dels perfils de RhuA activa sintetitzada ( $\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) i RhuA intracel·lular acumulada ( $\text{mg}_{\text{RhuA}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) respectivament. Tot i que potser s'accentuen lleugerament en la quantitat de RhuA intracel·lular acumulada, es podria dir que les diferències entre els perfils són gairebé nul·les.

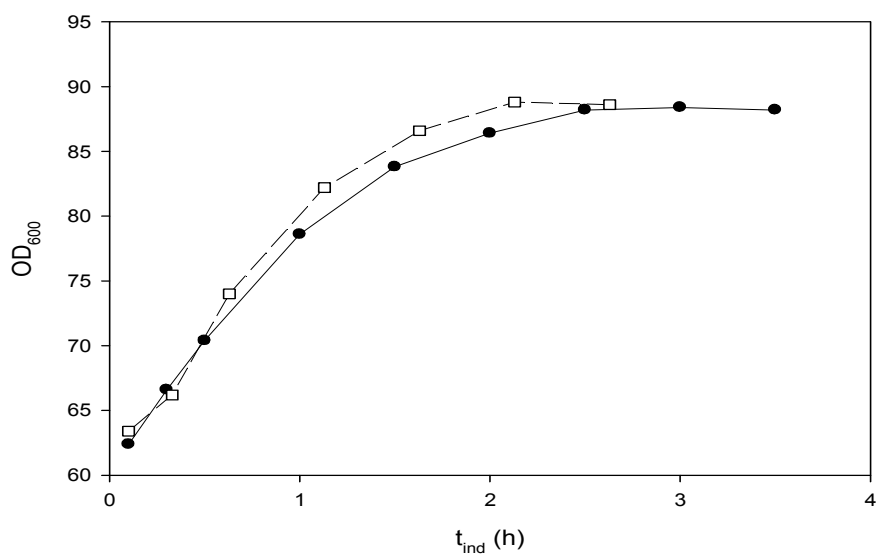


Fig. 6.3. Perfils de densitat òptica en dos cultius induïts a relació d'inducció de  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  alimentats segons una estratègia estàndard i a partir de la implementació del model matemàtic de producció de RhuA. (-•-) Alimentació de tipus estàndard, (-□-) alimentació a partir de la predicció del model matemàtic.

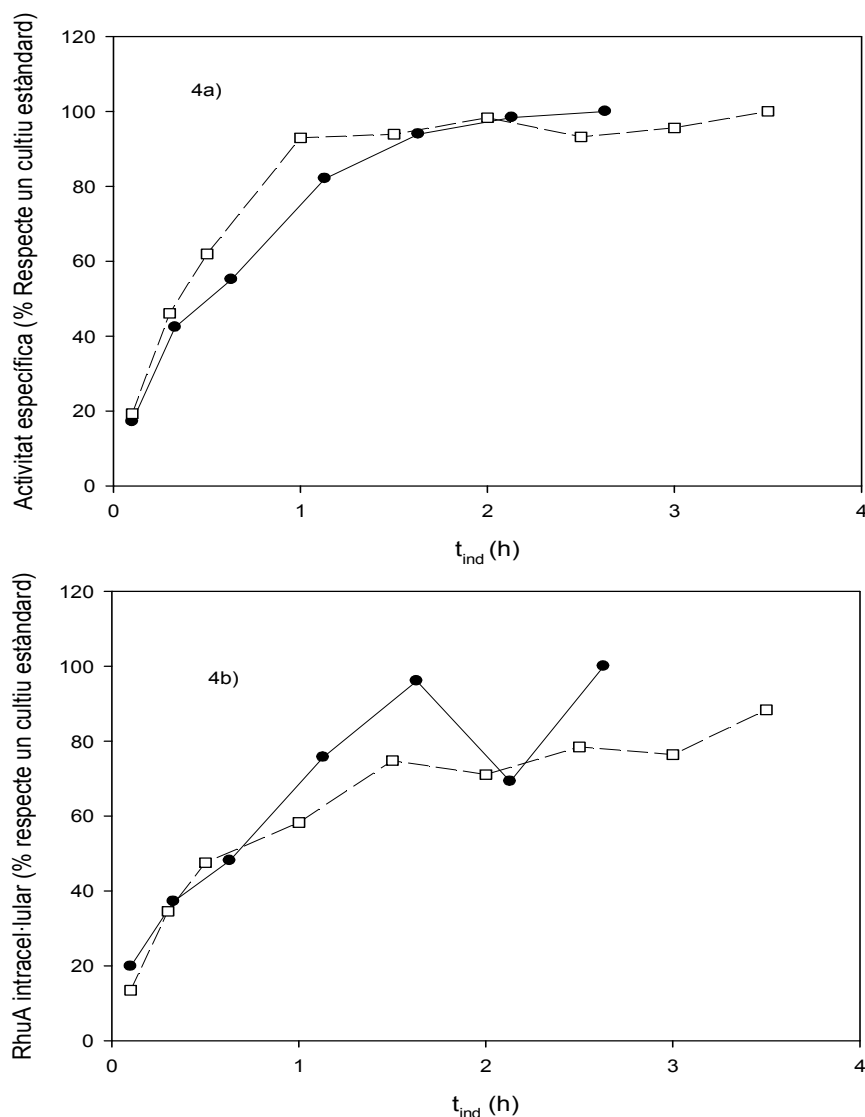


Fig. 6.4. a) Comparativa de l'activitat específica intracel·lular ( $UA \cdot g^{-1}_{DCW}$ ) en termes percentuals en dos cultius induïts a les mateixes condicions però aplicant estratègies d'addició de nutrients diferents a l'etapa d'inducció. b) Comparativa de la quantitat màssica de proteïna intracel·lular acumulada ( $mg_{RhuA} \cdot g^{-1}_{DCW}$ ) en termes percentuals en un dos cultius induïts a les mateixes condicions però aplicant estratègies d'addició de nutrients diferents a l'etapa d'inducció. En ambdós casos (-●-) fa referència al cultiu amb una estratègia d'alimentació estàndard i (-□-) al cultiu amb l'estratègia alternativa d'addició de nutrients basada en la implementació del model matemàtic de creixement i producció com a eina de control predictiu.

D'aquesta manera doncs, la utilització del model matemàtic com a eina predictiva per tal d'actuar sobre el cabal de nutrients al medi i evitar l'acumulació de glucosa al sistema condueix a resultats bastant equivalents als que s'obtenen amb les tècniques de control manual basades en l'experiència de l'operador, ara bé, permeten una major

automatització, ja que exerceixen un cert grau de desvinculació de l'operador respecte del procés.

*6.4.3. Estudis de seguiment del creixement per recompte cel·lular per a la definició d'estratègies d'alimentació de nutrients durant l'etapa d'inducció*

Tal i com s'ha enunciat anteriorment, determinades referències bibliogràfiques postulen que la reacció d'un cultiu recombinant basat en sistemes d'expressió de tipus fort a la inducció, és una disminució sobtada del creixement cel·lular en termes de replicació [13]. El creixement aparent, mesurat en termes de densitat òptica sí es manté però, durant un cert temps després de la inducció.

Per tal de comprovar aquest fet al sistema experimental d'estudi, es va fer un seguiment del recompte cel·lular en cultius induïts a relacions inductor –biomassa de 2 i 3  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  (Figures 6.5a i 6.5b) a partir de tècniques de citometria de flux. Aquestes relacions inductor – biomassa són dues de les condicions de cultiu emprades per als experiments de calibratge del model de producció. Els resultats experimentals es van comparar amb els resultats calculats suposant un augment en el recompte cel·lular paral·lel a l'augment de la densitat òptica del cultiu, és a dir, considerant el mateix valor de la velocitat de creixement. El càlcul de la concentració teòrica de cèl·lules per mL considerant una velocitat de creixement paral·lela a l'observada experimentalment en termes de densitat òptica es va dur a terme a partir de la següent expressió:

$$X\left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) = X_0\left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}}\right) \cdot \exp(\mu \cdot t) \quad (\text{Eq. 6.6})$$

On  $\mu$  és la velocitat específica de creixement observada experimentalment en termes de densitat òptica.

En ambdós casos es pot observar que el recompte mesurat és menor que el calculat a partir de la densitat òptica a 600 nm. .



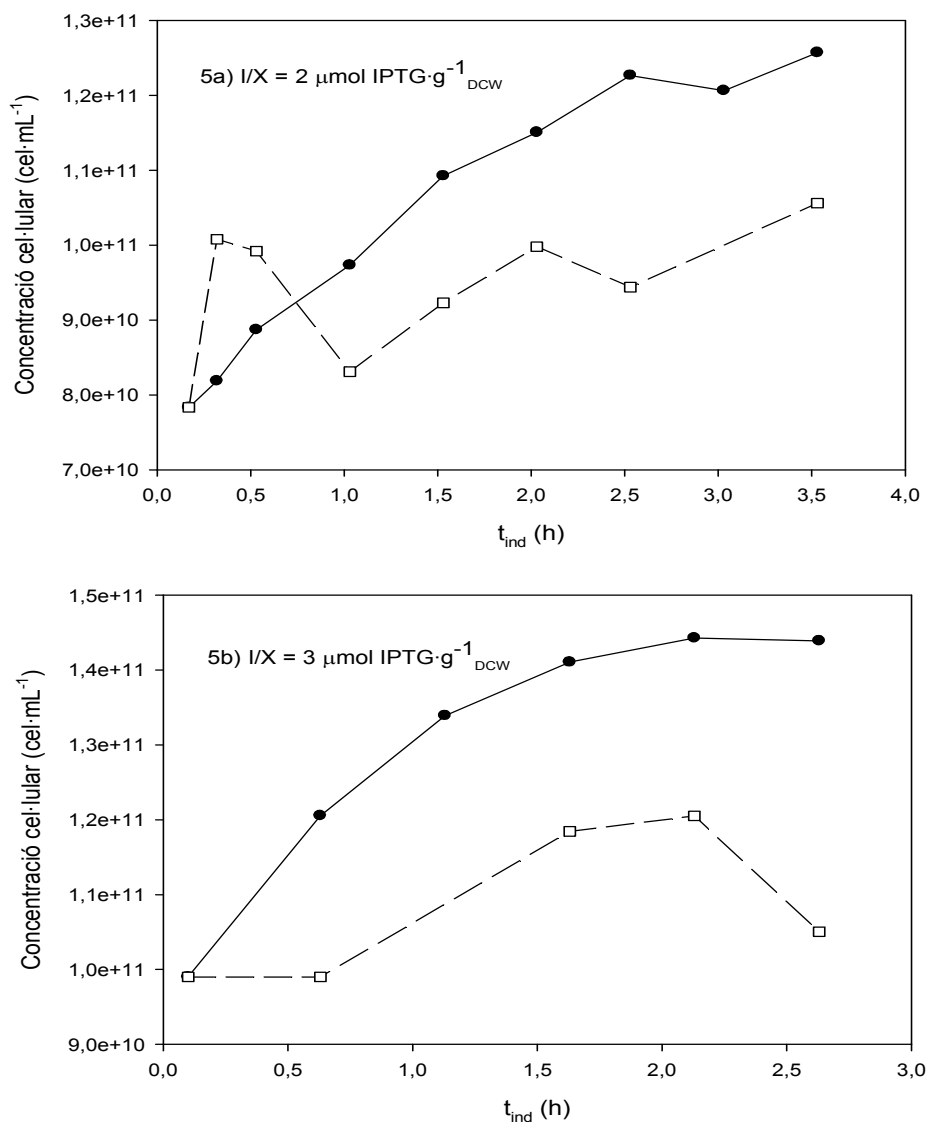


Fig. 6.5.- Comparativa entre el recompte cel·lular experimental mesurat a partir de citometria de flux i el teòric calculat a partir de l'augment de la densitat òptica per a dos cultius induïts a diferent relació inductor - biomassa. a) a I/X de 2  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$  i b) a 3  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ . (---) recompte calculat a partir de la densitat òptica, (-□-) recompte mesurat per citometria de flux.

Tot i que el recompte mesurat experimentalment permet observar un cert creixement en termes de replicació del cultiu respecte el seu valor inicial a la fase d'inducció, aquest no es correspon amb l'augment observable de densitat òptica que experimenta el cultiu durant aquesta. Per tant doncs sembla que els dos fenòmens poden existir paral·lelament, és a dir, el creixement en densitat òptica observat experimentalment es deu en part a un augment en el recompte cel·lular i als canvis experimentats per la pròpia inducció o l'acumulació de proteïna recombinant. Algunes referències bibliogràfiques [13] citen com a possible interpretació d'aquest fet l'existència d'un fenomen de segregació de la població bacteriana al cultiu, distingint-se una fracció

induïda, que no experimentaria divisió cel·lular però sí canvis en la seva estructura, i una no induïda, on la dinàmica seria la contrària. Aquesta interpretació portaria implícita l'afirmació que la mescla i la homogeneïtat en aquests sistemes no és del tot perfecte, ja que s'estaria suposant una distribució no uniforme de l'inductor. Aquest és un fenomen més probable en sistemes de majors dimensions que l'experimental, ara bé, s'ha de recordar que els polsos d'inductor són d'un volum negligible front al volum útil del sistema, motiu pel qual, l'inductor podria no arribar de la mateixa manera a tots els punts del bioreactor. De fet, per a sistemes similars, a la bibliografia es reporten casos on la distribució de nutrients al bioreactor juntament amb baixes eficàcies en la transferència d'oxigen al medi pot originar regions on la font de carboni principal es consumeixi anaeròbiament [15] i es generin per tant subproductes no desitjats. Per altra banda també, aquesta suposició és totalment oposada a la considerada al model matemàtic proposat, on únicament es contempla una sola població bacteriana al cultiu.

Aquestes incongruències en el creixement del cultiu, es veuen a més accentuades en què durant els primers 30 – 45 minuts d'inducció, on el cabal màssic d'addició de nutrients no és significativament diferent al previ a la inducció (1.15 vegades superior), la velocitat de creixement en termes de densitat òptica és entre 1.50 i 1.75 vegades l'observada a l'etapa prèvia a la inducció (Figura 6.6). És a dir, durant aquest període de temps, el ritme d'alimentació de nutrients ha augmentat de manera paral·lela al creixement per tal de mantenir-lo al voltant de  $0.225 \text{ h}^{-1}$ , i els resultats han estat velocitats específiques puntuals entre  $0.4$  i  $0.3 \text{ h}^{-1}$ .

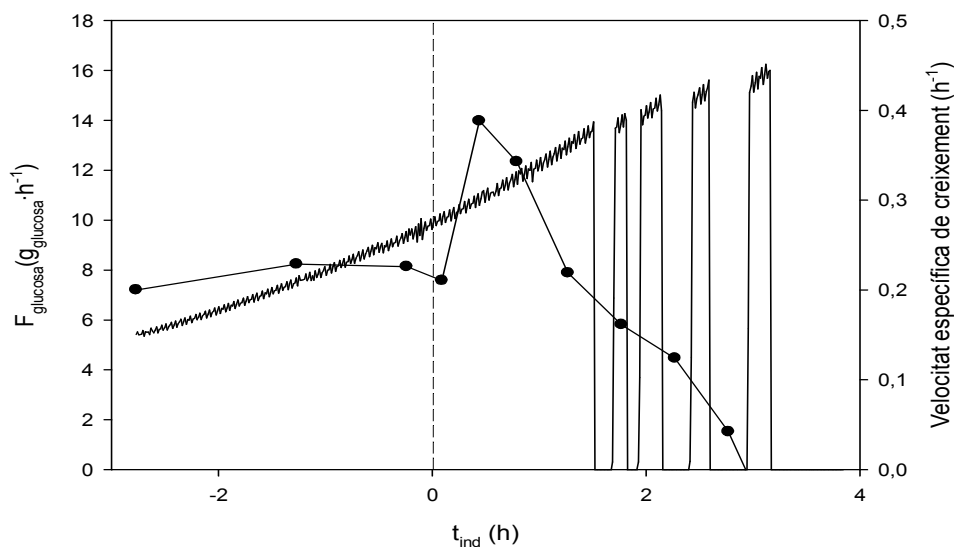


Fig. 6.6) Perfil de cabal massic d'addició de glucosa i velocitat específica de creixement durant la fase d'alimentació no induïda i induïda. La línia discontinua indica l'inici de la inducció. (-) Cabal d'addició (g glucosa.h $^{-1}$ ). (-.-) Velocitat específica de creixement (h $^{-1}$ ).

Per tal de descartar un possible error en les determinacions a partir de citometria, es va procedir a treballar amb cultius no induïts a mode de control on teòricament el patró de creixement en termes de replicació cel·lular ha de coincidir amb el corresponent a densitat òptica, ja que en principi no s'espera cap canvi en l'estructura del microorganisme donat que els nivells de producció de RhuA són els basals. Les figures 6.7a i 6.7b mostren els resultats de la comparació entre el recompte cel·lular mesurat per citometria i el recompte teòric calculat a partir de l'augment observable en la densitat òptica en dos cultius a diferents concentracions de biomassa. Es pot observar que en ambdós casos, recompte calculat a partir de la tendència observada amb la densitat òptica i el mesurat directament en termes de replicació cel·lular presenten un elevat grau de coincidència, amb la qual cosa es confirma la diferència de tendència en la replicació cel·lular en cultius induïts i no induïts.

## 6.- Estratègies alternatives d'addició de nutrients per a la millora de la producció de RhuA

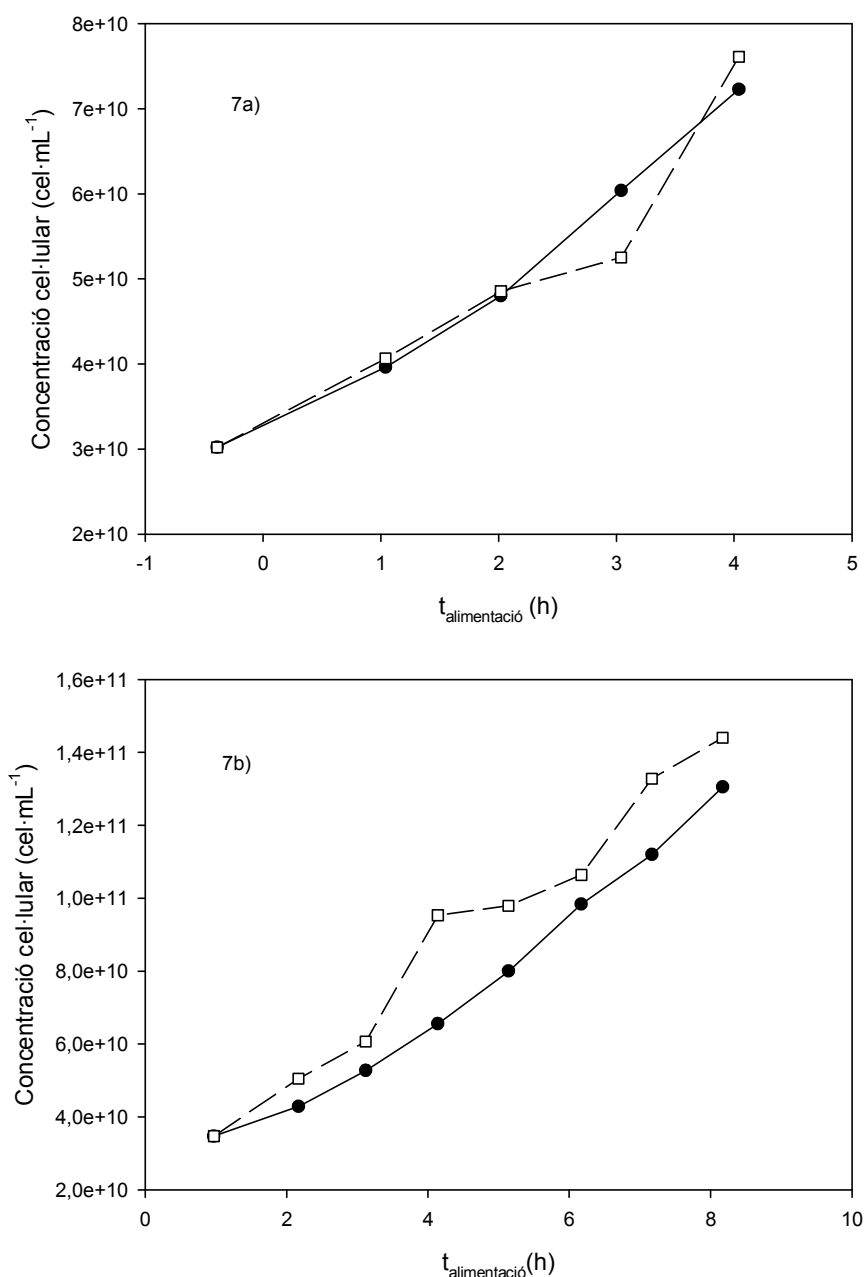


Fig. 6.7.- Comparativa entre el recompte cel·lular mesurat a partir de citometria i el recompte teòric calculat a partir de l'augment de la densitat òptica per a dos cultius no induïts. En ambdós casos; (-.-) recompte teòric, (-.-) recompte mesurat.

Donades les diferències entre els patrons de creixement en termes de replicació cel·lular en l'estat induït i el no induït, es pot deduir que el ritme d'alimentació imposat en cultius de tipus estàndard no és del tot correcte des del punt de vista conceptual. És a dir, si la replicació disminueix gairebé des de l'inici de l'etapa d'inducció, es podrien plantejar alternatives als perfils exponencials preestablerts implementats fins el moment. A continuació, es plantegen noves estratègies d'alimentació més idònies per la dinàmica que presenta el sistema una vegada induït.

## 6.4.4. Possibles polítiques d'alimentació de nutrients

Fixat el grau d'inducció de treball a  $3 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ , condicions a les quals la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada és la major assolida al rang d'estudi, es plantejaran estratègies alternatives d'alimentació de nutrients.

Per tal de determinar els possibles ritmes d'alimentació alternatiu es farà una breu anàlisi dels resultats i comportament d'un cultiu induït a la relació inductor – biomassa anterior alimentat segons un perfil d'addició exponencial preestablert.

La figura 6.8 mostra el perfil de síntesi de proteïna recombinant activa total a aquestes condicions durant l'etapa d'inducció. Es pot observar com la velocitat específica de síntesi de proteïna activa disminueix gradualment amb el temps fins que s'anul·la a partir de les 2,5 hores després d'haver induït el cultiu. Gràcies al control manual implementat ben entrada la fase d'inducció no s'observa disminució de l'activitat enzimàtica total deguda a fenòmens proteolítics.

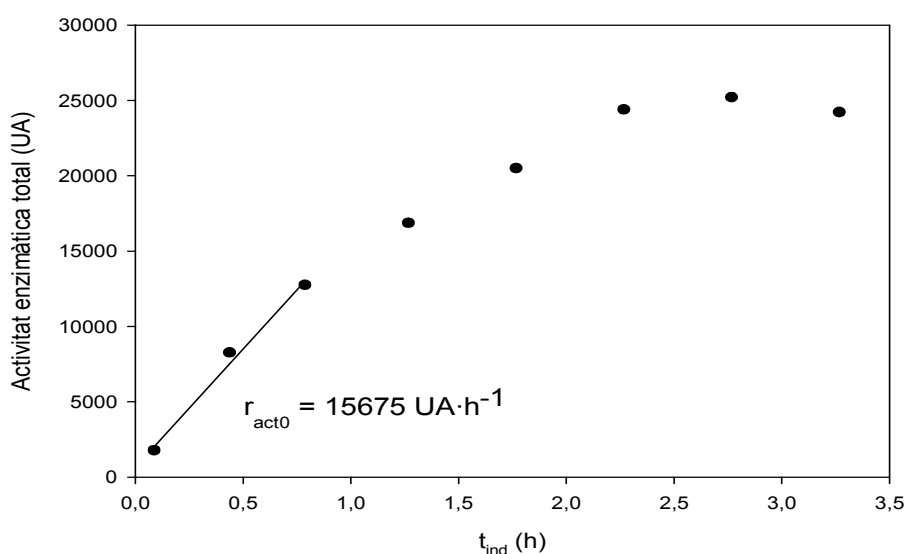


Fig. 6.8. Perfil de síntesi de RhuA activa en cultiu induït a relació inductor – biomassa de  $2.83 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  amb perfil exponencial preestablert d'alimentació de nutrients durant l'etapa d'inducció.

La linealització dels valors d'activitat enzimàtica total obtinguts als primers 45 minuts de la fase d'inducció permeten determinar un valor de la velocitat inicial de síntesi de proteïna activa al voltant de **15,000 UA·h<sup>-1</sup>**. Prenent com a aproximació que la replicació cel·lular és nul·la durant la fase d'inducció, es pot suposar que tots els nutrients aportats durant aquesta etapa es destinen a manteniment cel·lular,

preparació de la maquinària de síntesi de proteïna i a la proteïna recombinant pròpiament. La figura 6.9 mostra el perfil d'addició de nutrients (en  $g_{glucosa} \cdot h^{-1}$ ) implementat en aquest cultiu. Es pot observar que inicialment a la fase d'inducció aquest perfil respon a una tendència de tipus exponencial, mentre que a partir de la meitat de l'etapa, degut a la implementació d'un control tipus on/off el flux de nutrients s'interromp periòdicament i es restableix en funció dels nivells de glucosa detectats al medi.

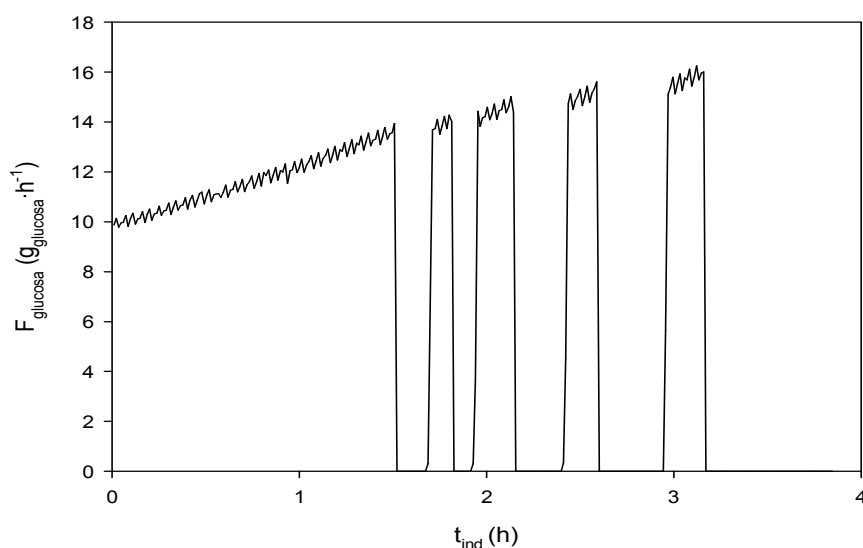


Figura 6.9. Cabal màssic d'addició de glucosa durant l'etapa d'inducció d'un cultiu induït a una relació inductor – biomassa de  $2.83 \mu\text{mol IPTG} \cdot g^{-1} \text{DCW}$ .

El perfil indicat a la figura 6.8 correspon a unes condicions de concentració de biomassa i volum de reactor determinats ( $18 g \cdot L^{-1}$  i  $1 L$  respectivament). Si es considera el valor inicial del cabal de glucosa al reactor, de  $10 g \cdot h^{-1}$ , el pas a cabal màssic específic pot determinar-se de la següent manera:

$$Flux_{específic} \left( \frac{g_{glucosa}}{g_{DCW} \cdot h} \right) = \frac{Flux \left( \frac{g_{glucosa}}{h} \right)}{X \left( \frac{g_{DCW}}{L} \right) \cdot V_r (L)} = \frac{10 \left( \frac{g_{glucosa}}{h} \right)}{18 \left( \frac{g_{DCW}}{L} \right) \cdot 1(L)} = 0.55 \frac{g_{glucosa}}{g_{DCW} \cdot h}$$

Prenent com a referència, les mateixes condicions de concentració de biomassa i volum de reactor a l'inici de la inducció, i partint de la suposició que una vegada induït el cultiu no experimenta un creixement de tipus exponencial en termes de replicació

cel·lular, s'implementaran dues polítiques d'alimentació alternativa, que corresponen al cabal emprat d'addició de glucosa al sistema i la meitat d'aquest :

- Flux de nutrients constant durant l'etapa d'inducció a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$
- Flux de nutrients constant durant l'etapa d'inducció a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$

### 6.4.5. *Cultius amb alimentació lineal de nutrients*

A partir dels raonaments anteriors, es realitzen dos cultius conduïts a partir de la mateixa estratègia de procés fins a l'etapa d'inducció de la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa. És a partir d'aquest moment on s'inicia una política d'alimentació de nutrients diferent en ambdós, per bé que lineal en tots dos casos.

La figura 6.10 mostra els perfils de biomassa (en termes de densitat òptica) i concentració de substrat per als cultius realitzats segons les diverses polítiques d'alimentació implementades a la fase d'inducció . A títol de comparació, es mostra a la mateixa figura l'evolució de la biomassa i la concentració de glucosa per a un cultiu on la fase d'inducció es va conduir a través de les estratègies estàndard, és a dir, amb alimentació exponencial de nutrients i amb control manual del nivell de glucosa a partir de la interrupció del flux de nutrients al reactor. Donat que la fase d'alimentació no induïda es va dur a terme de la mateixa manera en tots els cultius, només es mostra l'etapa d'inducció.

Tot i que existeixen diferències en els perfils de densitat òptica en els cultius representats, aquestes es troben entre un 5 i un 10 % respecte un cultiu de tipus estàndard. Com s'ha comentat amb anterioritat, part de l'increment de la densitat òptica es deu a la replicació cel·lular i part s'atribueix a la producció de proteïna recombinant. No es disposa de les dades de recompte cel·lular, però si es tenen en compte els perfils d'activitat específica i RhuA intracel·lular acumulada (figures 6.11 i 6.12) per als diferents cultius es poden extreure algunes conclusions.

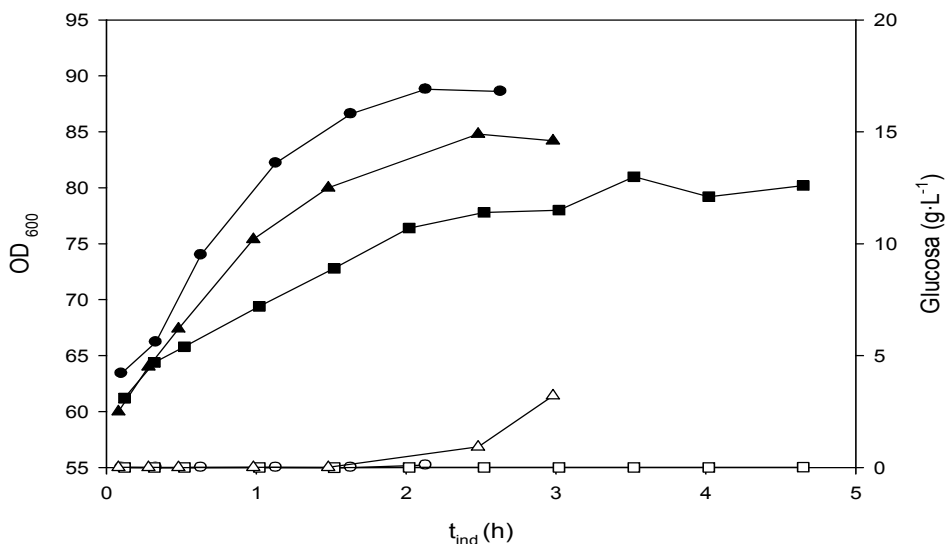


Fig. 6.10. Perfils de densitat òptica i glucosa per a cultius amb diferent política d'alimentació a la fase d'inducció. (-●-) / (-○-) Densitat òptica i concentració de glucosa en cultiu estàndard, (-■-) / (-□-) densitat òptica i concentració de glucosa cultiu alimentat a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , (-▲-) / (-△-) densitat òptica i concentració de glucosa per a cultiu alimentat a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .

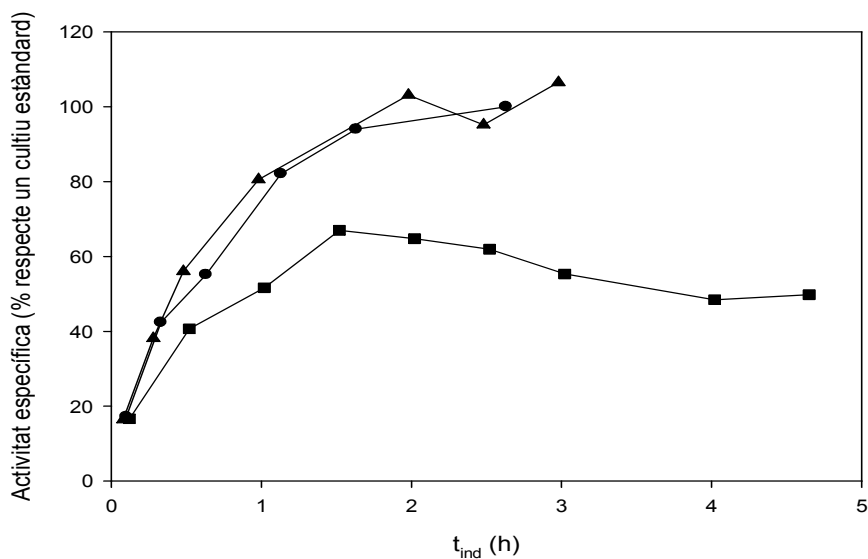


Fig. 6.11. Perfils d'activitat específica en termes relatius als resultats d'un cultiu estàndard per a cultius amb diferent política d'alimentació a la fase d'inducció. (-●-) cultiu estàndard, (-■-) cultiu alimentat a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , (-▲-) cultiu alimentat a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .



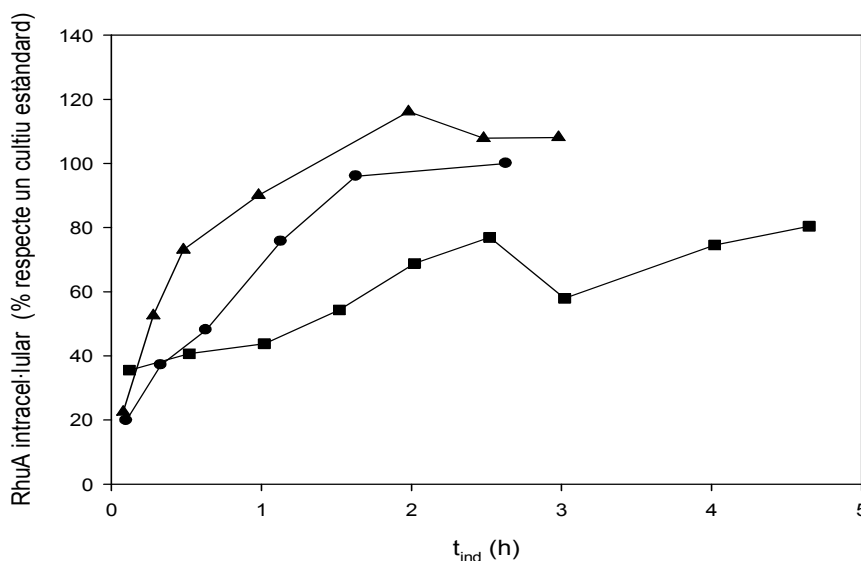


Fig. 6.12. Perfils de RhuA intracel·lular acumulada en termes relatius als resultats d'un cultiu estàndard per a cultius amb diferent política d'alimentació a la fase d'inducció. (-•-) cultiu estàndard, (-■-) cultiu alimentat a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , (-▲-) cultiu alimentat a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .

En termes d'activitat específica, els resultats del cultiu estàndard i l'alimentat a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  són pràcticament idèntics, és a dir, les polítiques d'alimentació de nutrients implementades a ambdós no condueixen a nivells d'activitat amb diferències apreciables. Per altra banda, pel que fa al cultiu alimentat a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  a la fase d'inducció, els nivells d'activitat específica són considerablement inferiors als d'un cultiu estàndard. El mateix succeeix amb els nivells de RhuA intracel·lular acumulada, que per a l'estratègia d'alimentació a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , són notablement inferiors als assolits amb un cultiu alimentat a partir d'estratègies estàndard. Els resultats obtinguts amb aquesta segona estratègia lineal alternativa ( $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ ) confirmen la pitjor disponibilitat del microorganisme a la sobreproducció de proteïnes quan els ritmes de subministrament de nutrients són baixos. Bibliogràficament aquest fenomen està relacionat amb la menor disponibilitat de RNA polimerasa activa [16]. Sumant la menor producció de RhuA i el baix ritme d'addició de nutrients en el cultiu alimentat a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  es pot justificar el menor creixement, en termes de densitat òptica, respecte les altres estratègies implementades.

No obstant però, en comparar els nivells de proteïna intracel·lular acumulada en cultius estàndard i en cultius alimentats a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , s'aprecien certes diferències destacables. Si bé és veritat que al final del cultiu els perfils s'assimilen molt més, durant una bona part de l'etapa d'inducció els nivells acumulats als cultius alimentats a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  arriben a ser al voltant d'un 34% superiors als acumulats en

cultius estàndard. Aquest fet obre una possible via d'investigació al voltant de la implementació de perfils d'alimentació de tipus lineal, possiblement més escaients d'acord amb la dinàmica de creixement observada al cultiu durant la fase d'inducció.

### 6.4.6. *Consum de substrat segons l'estratègia alternativa implementada*

A banda del potencial que ofereixen les estratègies d'alimentació lineal de nutrients a ritmes al voltant de  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , aquestes representen també certs avantatges a nivell operatiu, és a dir, s'evita la necessitat d'un control manual del flux de nutrients al llarg de l'etapa d'inducció ja que no es dona acumulació de glucosa fins gairebé al final del procés. Això simplifica notablement l'operació del sistema ja que el procés es fa independent dels temps d'anàlisi de glucosa, que en alguns casos (utilització d'HPLC's) pot representar fins a 30 minuts. S'ha de destacar a més, que una alimentació a ritme constant de nutrients, en contrapartida a un esquema exponencial pre-programat, pot afavorir a l'establiment d'unes condicions més estables i menys canviants al medi de creixement del microorganisme. En base als resultats obtinguts per citometria de flux, es confirma que a l'etapa d'inducció el creixement en termes de replicació cel·lular gairebé s'atura, per la qual cosa un perfil d'alimentació exponencial pre-programat suposa aportacions creixents de nutrients al medi i per tant necessitat de cicles d'adaptació dels microorganismes a les noves condicions. La implementació de perfils lineals d'alimentació pot evitar les readaptacions constants i es pot traduir per exemple en augments en els nivells de RhuA intracel·lular acumulada.

Per altra banda, la implementació d'algunes d'aquestes estratègies pot suposar un estalvi important de nutrients front les estratègies estàndard de cultiu. La figura 6.13 mostra l'acumulat de glucosa afegida per a cada una de les estratègies implementades. Es pot observar que per a les estratègies amb alimentació constant de  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  (on s'arriba a millorar la quantitat de proteïna intracel·lular acumulada respecte un cultiu estàndard) i amb alimentació determinada a partir del model matemàtic de producció (on no es produeix acumulació de glucosa al medi de cultiu i on els nivells de RhuA produïda són equivalents als de l'estratègia estàndard de cultiu) la glucosa total alimentada durant la fase d'inducció resulta inferior a la que s'alimenta en una estratègia de cultiu estàndard amb control manual. Si es considera un temps de 2 hores després d'haver induït, on normalment ja s'ha assolit el màxim en proteïna activa sintetitzada, els nivells de glucosa alimentada per les dues estratègies de cultiu pot arribar a ser entre un 21 i un 37 % inferior.

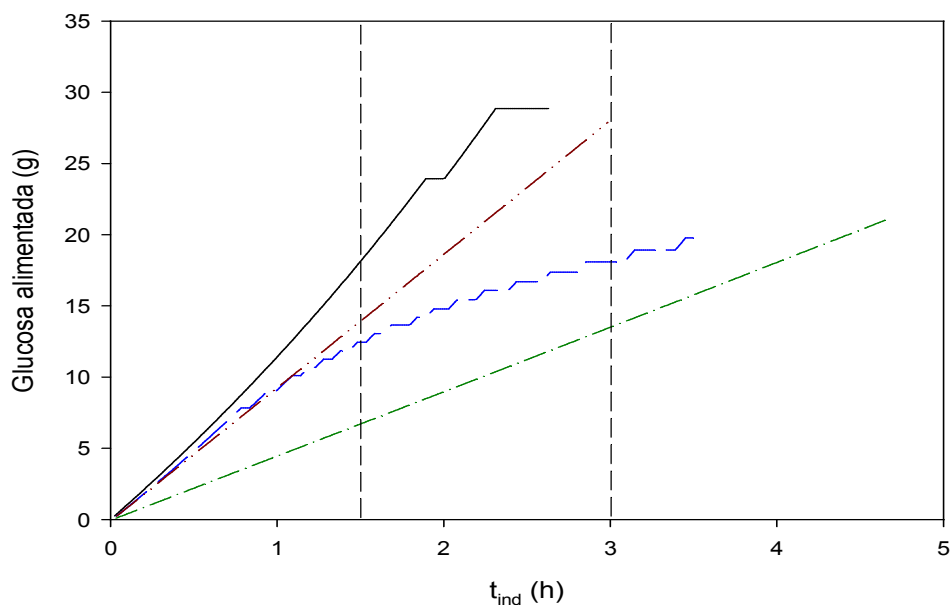


Fig. 6.13. Acumulat de glucosa afegida per a diferents estratègies de cultiu durant la fase d'inducció. En línia discontinua s'emmarca l'interval de temps de la fase d'inducció on s'assoleix el màxim en la producció de RhuA. (-) Cultiu amb perfil d'alimentació estàndard, (--) cultiu amb perfil d'alimentació establert pel model matemàtic de descripció del procés, (---) cultiu amb perfil d'alimentació constant de nutrients a  $0.27 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ , (-·-·-) cultiu amb perfil d'alimentació constant de nutrients a  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ .

## 6.5. Conclusions

S'ha comprovat que la inducció d'un cultiu a partir d'una determinada relació inductor – biomassa, porta implícit un canvi en el patró de creixement d'aquest respecte l'estat no induït. La citometria de flux ha confirmat que si bé existeix un augment en la densitat òptica del cultiu, aquest és degut parcialment a la replicació cel·lular i als canvis en l'estructura cel·lular deguts a l'expressió de la proteïna recombinant. Aquests canvis en el patró de creixement han portat a la implementació d'estratègies d'alimentació de nutrients a la fase d'inducció alternatives a les estàndard (basades en l'assumpció de creixements exponencials mantinguts) per tal d'intentar conduir el procés a través d'una política d'alimentació conceptualment correcta .

En primer lloc, s'ha desenvolupat una estratègia de control basada en la capacitat predictiva del model de creixement i producció determinat al capítol anterior d'aquest treball, que no només permet evitar l'acumulació de glucosa al medi de cultiu que

podria afavorir possibles fenòmens de tipus proteolític, sinó que a més permet dur a terme lots de producció repetitius. Donada la complexitat d'un sistema d'aquestes característiques, el fet de poder assegurar la qualitat i els rendiments previstos d'un lot de producció pot jugar un paper molt important de cara a plantejar una possible producció en massa del compost d'interès.

Per altra banda, les estratègies alternatives basades en una alimentació lineal de nutrients al sistema durant la fase d'inducció han conduït en alguns casos (a ritmes d'alimentació de  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a resultats que poden obrir noves vies d'investigació. La millora dels nivells de proteïna intracel·lular acumulada respecte a cultius alimentats segons esquemes exponencials pre-programats planteja la possibilitat que s'hagi augmentat la capacitat productiva de les cèl·lules pel fet d'haver millorat el seu ambient de creixement en haver reduït els canvis que s'hi produeixen en quant a disponibilitat i concentració de nutrients.

Les estratègies implementades, ja sigui a partir de l'explotació del model de creixement i producció o a partir d'esquemes d'alimentació lineal, han portat a millores des del punt de vista d'estalvi de nutrients respecte les estratègies estàndard on es pressuposava un creixement exponencial mantingut. Aquest estalvi de nutrients pot evitar la disponibilitat de glucosa al medi per tal de ser consumida en altres processos com ara els de tipus proteolític amb disminució dels rendiments globals.

### 6.6. Referències

1. Ruiz, J., et al., Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochemistry*, 2009. **44**(9): p. 1039-1045.
2. Pinsach, J., et al., Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch Cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008. **43**(7): p. 507-512.
3. Pinsach, J., C. de Mas, and J. Lopez-Santin, Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein in *Escherichia coli*: Application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochemical Engineering Journal*, 2008. **41**(2): p. 181-187.

4. Ruiz, J., et al., A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2011. **55**(2): p. 82-91.
5. Rozkov, A. and S.-O. Enfors, Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004. **89**: p. 163-95.
6. Enfors, S.-O. and S. Yang, The influence of energy sources on the proteolysis of a recombinant staphylococcal protein A in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 1995. **233**(3): p. 969-975.
7. Goldberg, A.L., The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *European Journal of Biochemistry*, 1992. **203**(1-2): p. 9-23.
8. Jordan, G.L. and S.W. Harcum, Characterization of up-regulated proteases in an industrial recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002. **28**(2): p. 74-80.
9. Gottesman, S., Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 1996. **30**: p. 465-506.
10. Gottesman, S., Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Annual reviews of genetics*, 1989. **23**: p. 163-198.
11. Gottesman, S. and M.R. Maurizi, Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiological Reviews*, 1992. **56**(4): p. 592-621.
12. Pinsach, J., C. de Mas, and J. Lopez-Santin, A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, 2006. **29**(3): p. 235-242.
13. Hoffman, F. and U. Rinas, Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. **89**: p. 73-92.
14. H. H.Wong, Y.C.K., S. Y. Lee, H. N. Chang, Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **60**(3): p. 271-276.
15. Yee, L. and H.W. Blanch, Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1992. **10**(12): p. 1550-1556.
16. Sanden, A.M., et al., Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **81**(2): p. 158-166.

## 7. ADDICIÓ COORDINADA D'AMINOÀCIDS PER A LA MILLORA DE LA QUALITAT DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN CULTIUS D'ALTA DENSITAT CEL·LULAR D'*E. coli*.

### Resum

Una de les conseqüències de la sobreexpressió d'una determinada proteïna recombinant en un cultiu dut a terme en condicions de limitació de nutrients, és la resposta cel·lular a l'elevada demanda d'aminoàcids per a fer front a la seva síntesi (*stringent response* o *resposta restrictiva*) que sovint pot conduir a la disminució dels rendiments globals del procés. En aquest estudi, s'han plantejat estratègies de cultiu basades en l'alimentació coordinada de determinats aminoàcids prèviament a la inducció del cultiu que han conduït en alguns casos a augments significatius en la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada. Tot i l'increment real en el cost del cultiu que pot suposar la introducció d'un determinat aminoàcid, aquesta estratègia pot representar una via a tenir en compte en funció del preu de mercat d'un determinat producte recombinant.

### 7.1. Introducció

#### 7.1.1. Resposta restrictiva (*stringent response*)

La sobreexpressió d'una proteïna recombinant en un microorganisme hoste és un procés que pot portar associats determinats fenòmens amb efectes adversos en aquest [1-14]. En primer lloc, l'elevada demanda d'aminoàcids que suposa la síntesi d'una proteïna pot imposar a la cèl·lula una sobrecàrrega metabòlica. Si a més la composició d'aquesta proteïna és molt diferent de la mitjana de proteïnes del microorganisme hoste, la sobrecàrrega és major ja que es produeix una distorsió en la xarxa de síntesi d'aminoàcids del sistema [1, 2]. Per altra banda, l'escassa disponibilitat de precursors, en aquest cas aminoàcids, amb què queda la cèl·lula en induir la producció d'una determinada proteïna recombinant, juntament amb l'augment dels nivells de proteïnes anormals al citoplasma cel·lular pot conduir a respostes front l'estrès conegudes com a "*stringent response*" o *resposta restrictiva* [2, 3, 8, 9]. Aquestes presenten normalment molts punts en comú amb respostes de tipus "*heat*

*shock*" (degudes a augments sobtats en la temperatura del cultiu) [10, 12, 14-17] basades en l'expressió de proteïnes amb activitat tipus xaperona i proteolítica. Tot i que en molts casos però, les proteïnes recombinants sobreexpressades són natives, els elevats nivells que s'arriben a acumular al citoplasma cel·lular fan que aquestes també siguin identificades per la cèl·lula com a anormals o no desitjades [7, 18]. Les respostes del tipus *heat shock* són típicament atribuïbles a augments en la temperatura dels cultius, estratègia utilitzada en determinats processos quan el sistema d'expressió d'una proteïna recombinant en un microorganisme hoste es troba sota el control de promotors de tipus *lambda* ( $\lambda$ ) [19-21]. En aquests casos, el mateix augment de temperatura que actua com a inductor també pot portar a plegaments no desitjats de la proteïna expressada que pot desembocar en degradació si el plegament no es pot assistir correctament per mitjà d'activitats de tipus xaperona.

Elevades velocitats de producció de proteïna recombinant en un sistema com el del cas d'estudi, poden també originar plegaments incorrectes en aquesta, d'aquí que els nivells de xaperones puguin augmentar, presentant activitat també de tipus proteolítica en cas que el plegament no es pugui desenvolupar de manera correcta. A més, l'elevada velocitat d'utilització d'aminoàcids per tal de construir la proteïna recombinant codificada al DNA heteròleg de la soca, origina una resposta de tipus proteolítica a l'hoste per tal de poder fer front a la demanda d'aminoàcids, degradant inclús la pròpia proteïna recombinant per tal d'obtenir-ne els precursors necessaris per a seguir sintetitzant-ne [12].

### 7.1.2. Implementació d'estratègies alternatives

Les respostes que pot desenvolupar un microorganisme hoste a la sobreexpressió de proteïnes recombinants tenen com a efecte immediat una disminució important en els rendiments globals del procés. Aquestes respostes a més, es poden veure agreujades pel tipus d'estratègia de procés que es du a terme en cultius discontinus alimentats, basades en la limitació de nutrients per tal de mantenir velocitats de creixement controlades.

Existeixen diferents estudis a la bibliografia on s'ha reportat que l'addició de determinats precursors, nutrients o metabòlits durant la fase de producció poden contrarestar les respostes d'estrès cel·lular conseqüència de la sobreexpressió d'una proteïna recombinant donada [1, 2, 5, 22, 23]. L'aplicació d'algunes d'aquestes estratègies basades en l'addició de peptona i/o extracte de llevat al medi de cultiu [22] han suposat augments importants en la producció de l'enzim gliceraldehid 3 – fosfat

deshidrogenasa. D'altres estudis, basats en l'addició d'aminoàcids al medi de cultiu durant la fase de producció presenten diferent resultats en funció de la política d'alimentació implementada.

En alguns treballs publicats, els nutrients suplementaris al medi s'han addicionat en forma de solució concentrada de casaminoàcids [23]. En aquests estudis s'han realitzat proves d'expressió de la proteïna recombinant T4 DNA ligasa en medis estàndard i en medis suplementats tant en font de carboni com en casaminoàcids. Els resultats mostren que si bé s'observa un augment en les quantitats recuperades de proteïna recombinant, aquest no es deu a una major expressió de proteïna sinó a que el medi suplementat permet un major creixement de la soca a un mateix nivell d'expressió. Aquesta política d'alimentació però, no té en compte quina és la composició (estructura primària) de la proteïna recombinant i per tant quin o quins poden ser els aminoàcids dels quals presenti major demanda el microorganisme hoste. A més, la introducció de certs elements de composició relativament desconeguda (de caràcter semicomplex) pot fer més difícil el control del sistema i més imprevisible el seu comportament.

En aquesta línia, d'altres treballs proposen estratègies d'alimentació en la fase d'inducció o producció a partir de *l'addició coordinada* d'aminoàcids [1, 2, 5]. Aquesta es basa en l'estudi de la composició en aminoàcids de la proteïna a expressar a l'hora de decidir quins són els candidats, la presència dels quals al medi de cultiu pot, a priori, fer pensar que facin augmentar els nivells de proteïna recombinant. Al mateix temps, s'ha de tenir en compte que concentracions massa elevades de determinats precursors (en aquest cas aminoàcids) pot conduir a inhibicions en la síntesi d'altres precursors. Les rutes de síntesi biològica dels diferents aminoàcids es troben molt relacionades entre elles, amb moltes etapes comuns i altament regulades, tant a nivell de transcripció, translació com d'activitat enzimàtica. A títol d'exemple, la figura 7.1 mostra de manera esquemàtica la ruta de síntesi dels aminoàcids de tipus aromàtic, Fenilalanina (Phe), Tirosina (Tyr) i Triptòfan (Trp) [24]. La presència de Phe, Tyr i Trp pot inhibir tant les primeres etapes comuns de la ruta de síntesi d'aquests, reacció entre Fosfoenolpiruvat (PEP) i Eritrosa 4 – fosfat (Ery4P), com les etapes terminals de síntesi de cada un d'ells a partir de corismat.



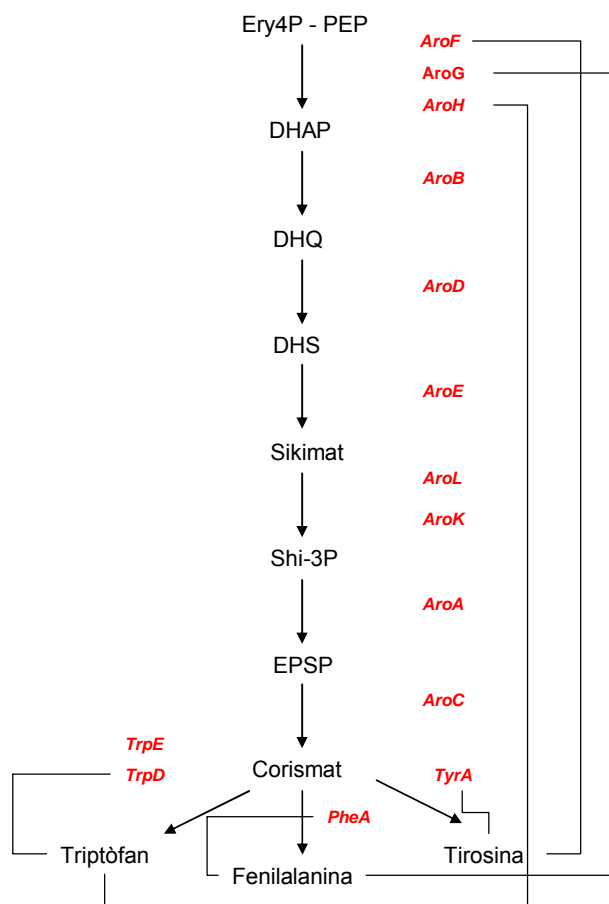


Fig. 7.1. Esquema simplificat de la ruta de síntesi de la família d'aminoàcids aromàtics [24]. Les fletxes mostren les successives etapes de síntesi, catalitzades pels enzims corresponents (en cursiva). Els connectors indiquen les inhibicions que provoca la presència dels productes finals de la ruta (fenilalanina, triptòfan i tirosina) sobre alguns dels enzims implicats.

Un altre bon exemple del grau d'interconnexió entre les rutes de síntesi dels diferents aminoàcids i de la importància d'implementar polítiques d'addició basades en addicions controlades de determinats aminoàcids per tal d'evitar inhibicions es pot observar a la figura 7.2 i taula 7.1. A partir d'aspartat (fig.7.2) se'n deriven les rutes de síntesi de Lisina, Treonina, Metionina, Glicina i Isoleucina [24]. A la taula 7.1 es descriuen quins metabòlits poden actuar com a inhibidors, tant a nivell d'activitat enzimàtica com a nivell d'expressió genètica. Es pot comprovar que l'excés de determinats aminoàcids influeix directament en determinades etapes de la ruta de síntesi pròpia i/o d'altres aminoàcids.

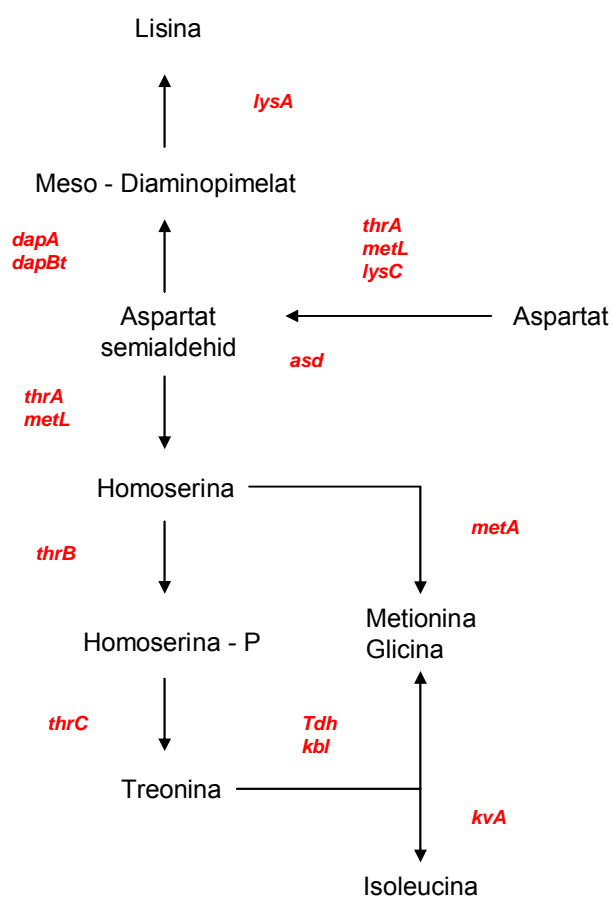


Fig. 7.2. Esquema simplificat de ruta de síntesi de treonina, metionina, glicina i lisina a partir d'aspartat [24].

Gen	Enzim	Lligands inhibitoris	Inhibició d'expressió
thrA	Aspartat quinasa + homoserina deshidrogenasa	Treonina	Treonina i Isoleucina
metL	Aspartat quinasa + homoserina deshidrogenasa	--	Metionina
lysC	Aspartat quinasa	Lisina i Isoleucina	Lisina
asd	Aspartat semialdehid deshidrogenasa	--	Lisina, Treonina i Metionina
thrB	Homoserina quinasa	Treonina, Homoserina i Lisina	Treonina i Isoleucina
thrC	Treonina sintasa	--	Treonina i Isoleucina

Taula 7.1.- . Relació de metabòlits que poden actuar com a inhibidors de certes activitats enzimàtiques o de l'expressió de gens implicats en la ruta de síntesi de Metionina, Treonina, Glicina, Isoleucina i Lisina [24].

En base a aquestes premisses, s'han desenvolupat treballs que plantegen un estudi de la proteïna recombinant en qüestió a nivell d'estructura primària per tal de determinar quina és la política d'alimentació d'aminoàcids que pot ser susceptible d'augmentar els rendiments de síntesi de proteïna recombinant [1, 2, 5, 25]. Així doncs, en el treball de Ramírez i Bentley [1, 5] on el sistema d'estudi és el de l'expressió de CAT (cloramfenicol acetil transferasa), l'anàlisi de la seva composició revela que és rica en aminoàcids de tipus aromàtic, bàsicament en fenilalanina (11.4%). A això se suma el fet que el percentatge d'aquest aminoàcid a la mitjana de les proteïnes d'*E. coli* és molt menor (4.2%), amb la qual cosa la sobreexpressió de CAT pot accentuar encara més la càrrega metabòlica sobre l'hoste. Tenint en compte que la fenilalanina pot actuar com a regulador de la seva pròpia síntesi i de la dels altres aminoàcids de la família dels aromàtics, la seva concentració en el medi de cultiu és un factor clau per tal d'evitar l'efecte contrari al que es busca amb aquesta estratègia. Quan es va addicionar al medi de cultiu el 20% dels requeriments de fenilalanina necessaris per a la síntesi de CAT a unes determinades condicions es va produir un augment en la qualitat de la proteïna recombinant (AU·mg<sup>-1</sup> prot) en un factor de 5. En treballar a addicions de fenilalanina més enllà del 20% dels requeriments per a la seva síntesi, els nivells d'activitat obtinguts, si bé van ser majors

que en cas de no addicionar fenilalanina al medi, van ser molt inferiors als detectats a l'afegir el 20% de la necessària.

### 7.2. Objectius

L'objectiu d'aquest estudi és l'augment dels rendiments de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* a partir de la implementació d'una política d'alimentació coordinada d'aminoàcids en base a l'estudi de la seva estructura primària. Amb aquesta estratègia es pretenen contrarestar els efectes de les respostes d'estrès cel·lular que experimenta el cultiu en induir la producció de la proteïna recombinant.

### 7.3. Materials i mètodes

#### 7.3.1. Soques i plasmidis

(Veure secció general de soques i plasmidis utilitzats: 3.1)

La soca *E. coli* M15ΔglyA [pREP4] portadora del vector pQEαβrham es va utilitzar per a la sobreexpressió, en cultius d'alta densitat cel·lular, de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

#### 7.3.2. Medis de cultiu

(Veure secció general de medis de cultiu emprats: 3.2)

Per al desenvolupament dels pre-cultius, a partir d'estocs de la soca conservats en glicerol a -80°C, es va utilitzar medi LB. Els cultius en Erlenmeyer (inòculs) i bioreactor, per altra banda, es van dur a terme partint de medi definit de composició detallada a la secció general de medis de cultiu.

#### 7.3.3. Equipament de procés (no analític) utilitzat

Per a dur a terme els cultius descrits en aquest estudi es va utilitzar el següent equipament:

- Fermentador Biostat B (Sartorius) amb capacitat total de 2L i volum útil d'1.5 L i unitat de control digital (DCU) per al desenvolupament dels cultius a escala laboratori.
- Centrifugadora Beckman J2-21 M/E, sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials) i disruptor cel·lular mecànic One Shot (Constant Systems LTD) per al processament del brou de cultiu.

### 7.3.4. Condicions de cultiu

El procés pren com a punt de partida el desenvolupament *overnight* d'un pre-cultiu en medi complex LB a un volum final de 15 mL. Assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1.5 – 2 unitats, s'inocula un Erlenmeyer carregat amb medi definit (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb un 5% d'inòcul a un volum total de 100 mL. Transcorregudes 4 hores, i assolida una densitat òptica a 600 nm al voltant d'1 unitat, s'inoculen 80 mL del contingut de l'Erlenmeyer a un reactor escala laboratori carregat amb medi definit fins a un volum total de 800 mL. Es fixa una consigna de 7 unitats per al pH i 50% de saturació per a la concentració d'oxigen dissolt a la unitat de control del procés (DCU).

Després de 12-14 hores de procés, s'esgota la font de carboni carregada inicialment i s'inicia una etapa en discontinu alimentat a partir de l'addició d'una solució concentrada de nutrients (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb l'objectiu de mantenir un creixement a velocitat constant de  $0.225 \text{ h}^{-1}$  a les mateixes condicions operacionals que durant l'etapa en discontinu. Es realitzen addicions puntuals de fosfats concentrats independentment del medi d'alimentació davant de la impossibilitat de mantenir-los en solució en aquest. El criteri d'addició de fosfats aplicat respon a valors experimentals de rendiments determinats al grup de recerca corresponents a  $0.05 \text{ g P}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ .

Assolida una densitat òptica d'aproximadament 60 unitats, i prèviament a la inducció del cultiu, s'addiciona mitjançant un impuls un cert volum d'una solució concentrada d'un determinat aminoàcid a raó del 20% dels requeriments d'aquest per a la producció estimada de proteïna a la relació inductor – biomassa de treball.

Posteriorment a l'addició de la solució concentrada de l'aminoàcid corresponent, s'indueix el cultiu a partir d'un impuls d'IPTG a raó de  $3\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  mantenint el ritme exponencial d'alimentació de nutrients fixat a l'etapa de creixement no induït.

Degut a l'efecte de la sobreexpressió de RhuA sobre el creixement del cultiu, es produeix una certa acumulació de font de carboni (glucosa) al medi de cultiu després d'un temps d'haver induït. A partir del moment en què se'n detecta presència al medi

(0.5 – 0.75 g·L<sup>-1</sup>), s'interromp periòdicament l'alimentació de nutrients al sistema per evitar-ne una major acumulació. El restabliment de l'alimentació es realitza en base a l'evolució del pH del medi, ja que en esgotar-se la font de carboni el pH augmenta notablement. El cultiu es dóna per finalitzat quan tot i no haver alimentat nutrients entre dos instants donats de temps, la concentració de glucosa, en excés al medi, no experimenta variacions.

### 7.3.5. Mètodes analítics

#### 7.3.5.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.1)

#### 7.3.5.2. Quantificació dels nivells de proteïna recombinant

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.2)

## 7.4. Resultats i discussió

### 7.4.1. Estudi de la composició de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa

Donat que l'estratègia a implementar es basa en l'addició coordinada de determinats aminoàcids al sistema just abans d'induir, s'ha de realitzar un estudi de quins són els candidats que, en principi, poden suposar un augment en la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada en cas que s'utilitzin com a suplementes en el medi de cultiu. Per això és necessari conèixer quina és la composició o estructura primària de la proteïna recombinant en qüestió i poder establir comparacions amb la composició mitjana de les proteïnes d'*E. coli*.

A partir de la base de dades de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) [26], es pot obtenir la seqüència d'aminoàcids que conformen una subunitat de la proteïna recombinant d'estudi (tetràmer):

1    *mqnitqswfv qgmikattda wlkgwderng gnltlridda diapyhdnfh qqpryiplsq*  
61   *pmpllantpf ivtgsqkffr nvqldpaanl givkvdsdga gyhilwgltn eavptselpa*

121 hflshcerik atngkdrvim hchatnlial tyvlendtav ftrqlwegst eclvvfpgdv

181 gilpwmvpgt deigqataqe mqkhsllwlp fhgvgsgpt ldetfglidt aeksaqvlvk

241 vysmggmkt isreelialg krfgvtplas alal

On A equival a Alanina, C a Cisteïna, D a Àcid Aspàrtic, E a Àcid Glutàmic, F a Fenilalanina, G a Glicina, H a Histidina, I a Isoleucina, K a Lisina, L a Leucina, M a Metionina, N a Asparagina, P a Prolina, Q a Glutamina, R a Arginina, S a Serina, T a Treonina, V a Valina, W a Triptòfan i Y a Tirosina.

A partir de la informació anterior, s'ha calculat la freqüència relativa (en termes percentuals) de cada aminoàcid en l'estructura primària de la Ramnulosa 1-fosfat aldolasa i s'ha comparat amb la seva freqüència en la mitjana de proteïnes del citoplasma d'*E. coli* [27] (fig. 7.3). Destaquen en aquesta comparativa determinats aminoàcids que es podrien dividir principalment en dos grups:

- Aminoàcids que presenten a l'estructura de RhuA una freqüència relativa molt major que a la mitjana de proteïnes d'*E. coli*. En aquest grup es poden incloure la Histidina, el Triptòfan i la Treonina.
- Aminoàcids amb presència important en la seqüència de RhuA. En aquest grup es pot incloure la Leucina, que a més, presenta diferències prou notables amb la seva freqüència a la mitjana de proteïnes d'*E. coli*. Si bé d'altres aminoàcids com ara Glutamina, Glutàmic, Aspàrtic i Asparagina també compten amb una freqüència notable a la seqüència de RhuA, es pot remarcar l'elevada presència de Glicina (pels motius que s'enumeraran a continuació) tot i que amb freqüència menor que els anteriors.

## 7.- Addició coordinada d'aminoàcids per a la millora de la qualitat de RhuA

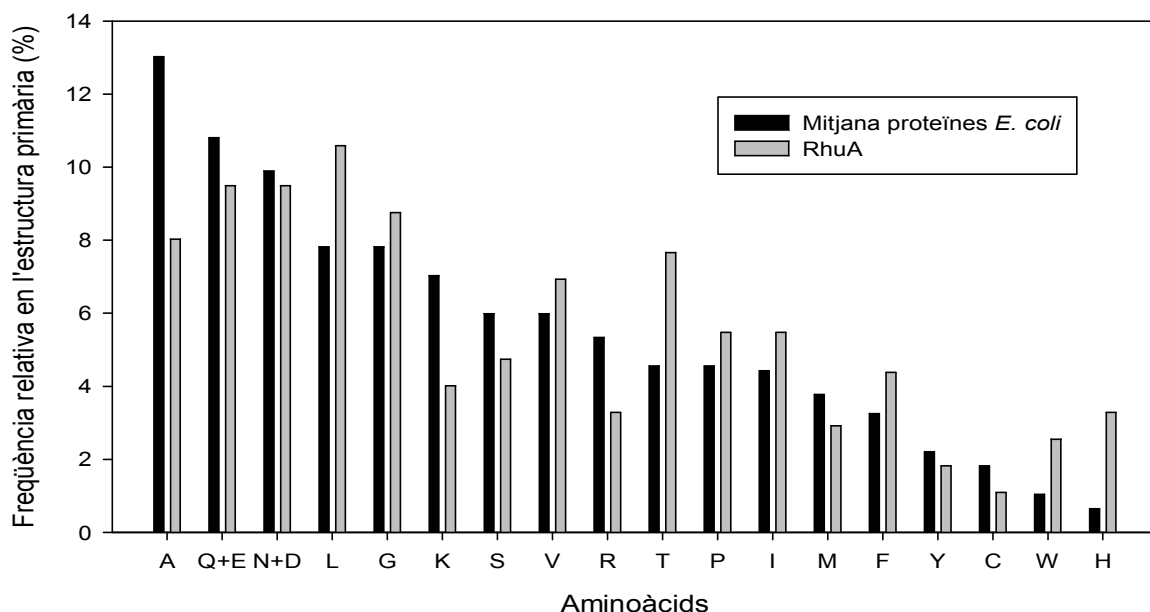


Fig. 7.3. Comparativa de la freqüència relativa de cada aminoàcid (en termes percentuals) entre les estructures primàries de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa i la mitjana de proteïnes del citoplasma d'*E. coli*.

La Glicina és un aminoàcid per al qual la soca d'estudi (*E. coli* M15  $\Delta$ glyA pQE $\alpha$  $\beta$ rham [pREP4]) presenta una auxotròfia [28] (veure secció general de soques i plasmidis utilitzats: 3.1). Així doncs, a priori es podria pensar que la seva utilització com a suplement del medi de cultiu a l'etapa de producció podria suposar un alleujament de l'estrès donat que la síntesi de SHMT (serin hidroximetil Transferasa) es podria veure reduïda.

Per altra banda però, s'ha de tenir en compte que en aquesta soca l'auxotròfia i la seva complementació al plasmidi pQE $\alpha$  $\beta$ rham són els que exerceixen una pressió selectiva sobre el cultiu. És a dir, en un medi definit sense aportació de Glicina, només són capaces de desenvolupar-se les cèl·lules portadores del plasmidi, ara bé, en cas d'afegir Glicina al medi, una de les possibilitats és que part de la població bacteriana pugui perdre el plasmidi ja que no li resulta necessari. En aquest cas també es perdria la capacitat de produir Ramnulosa 1 – fosfat aldolasa ja que la seva síntesi es troba codificada al mateix plasmidi. Així doncs, pot resultar interessant plantejar un experiment amb addició de Glicina al medi de cultiu per tal de determinar quin dels dos fenòmens té un pes relatiu més important, si la disminució de l'estrès cel·lular o la pèrdua de capacitat productiva.



7.4.2. Determinació de les quantitats necessàries de cada aminoàcid

A la bibliografia hi ha treballs publicats en els quals s'han dut a terme experiències semblants [1, 5]. En aquests treballs s'ha determinat que realitzar addicions d'aminoàcids al voltant del 20% del valor necessari per a fer front a la síntesi d'una proteïna recombinant a unes determinades condicions d'inducció condueix a resultats òptims. Addicions de major quantia poden donar lloc a inhibicions de les rutes de síntesi d'altres aminoàcids. Així doncs, partint dels nivells de RhuA que es produeixen en cultius induïts a una relació inductor – biomassa de 3  $\mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  i les condicions de cultiu detallades a la taula 7.2 es pot dissenyar una sèrie d'experiments detallats a la taula 7.3.

<b>Nivells específics de RhuA habituals (<math>\text{mg}_{\text{RhuA}}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}</math>)</b>	100 - 120
<b>X inicial a la inducció (<math>\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	18
<b>X final a la inducció (<math>\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	27
<b>Volum final d'operació (L)</b>	1
<b>RhuA total sintetitzada (g)</b>	2.70 – 3.20

Taula 7.2. Condicions de cultiu estàndard a partir de les quals s'estimen les quantitats necessàries de cada aminoàcid a addicionar prèviament a la inducció segons cada experiment.

<b>Experiment</b>	<b>% en RhuA</b>	<b>Quantitat total afegida (mg)</b>
Addició d'Histidina	3.28	22
Addició de Leucina	10.58	70
Addició de Treonina	7.66	50
Addició de Triptòfan	2.55	17
Addició de Glicina	8.76	60

Taula 7.3. Disseny d'experiments per a l'avaluació de l'efecte de l'addició de determinats aminoàcids en cultius recombinants d'*E. coli* a les condicions d'operació descrites a la taula 7.2. Les quantitats afegides de cada aminoàcid corresponen al 20% dels requeriments totals de l'aminoàcid en concret segons la producció estimada de RhuA al cultiu (Taula 7.1).

## 7.4.3. Produccions totals i evolució de la biomassa al sistema

Si s'analitza la producció total de RhuA ( $\text{g}_{\text{RhuA}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dels diferents cultius realitzats, en termes relatius (%) als resultats obtinguts en cultius de tipus estàndard, (Fig. 7.4) es pot observar que en determinats casos, l'addició de l'aminoàcid corresponent al medi, ha suposat un augment considerable en la quantitat de RhuA total sintetitzada.

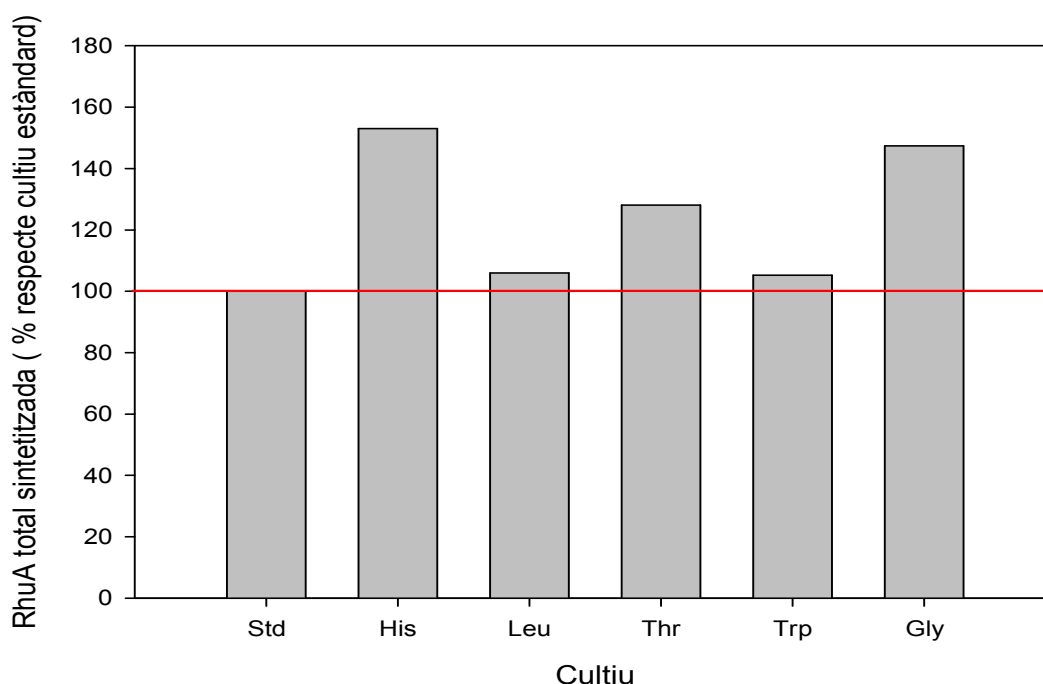


Fig. 7.4. Comparativa percentual entre la producció total de RhuA (en  $\text{g}_{\text{RhuA}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{cultiu}}$ ) per a les diferents estratègies implementades. La línia horitzontal sòlida marca la referència establerta per un cultiu conduït amb una estratègia de tipus estàndard.

En alguns estudis a la bibliografia [23] s'atribueix la causa de l'augment de la quantitat de proteïna recombinant sintetitzada a un augment en la concentració de biomassa pel fet d'haver suplementat el medi amb un determinat aminoàcid i no a un increment en nivell d'expressió de proteïna recombinant. En aquest cas, si s'estableix una comparació entre les concentracions de biomassa assolides al final de l'etapa d'inducció de cada cultiu (Fig. 7.5), es pot comprovar que aquesta no sembla justificar l'augment de la proteïna sintetitzada que, per exemple, al cas del cultiu suplementat amb Histidina suposa un increment de fins un 50% del nivell assolit amb un cultiu no suplementat.

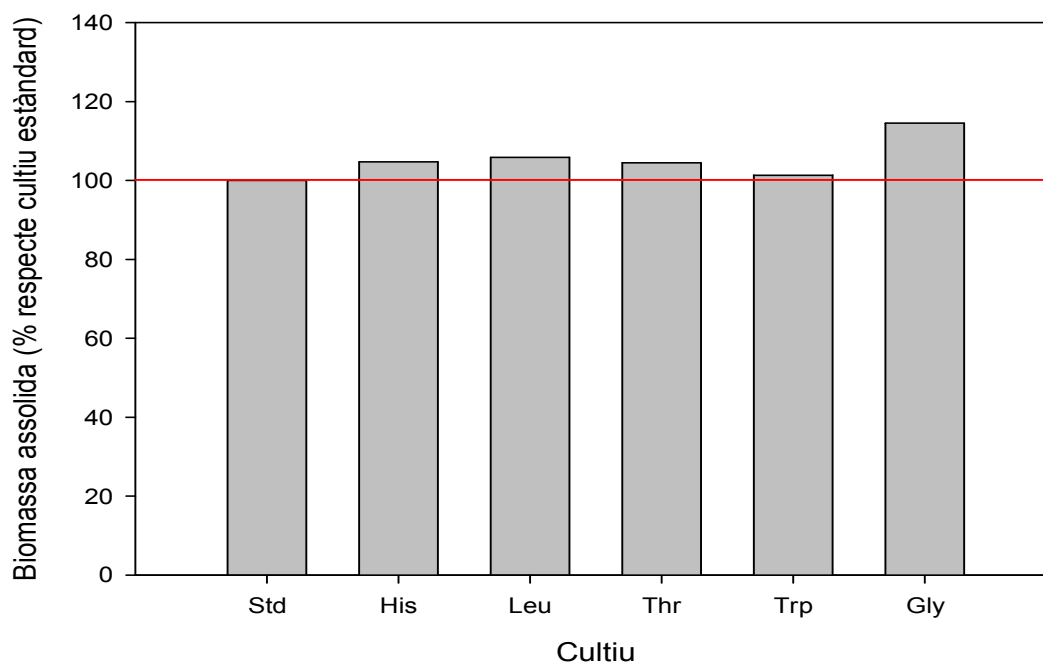


Fig. 7.5. Comparativa percentual entre la concentració de biomassa final assolida per a les diferents estratègies implementades. La línia horitzontal sòlida marca la referència establerta per un cultiu conduït amb una estratègia de tipus estàndard.

La comparativa entre la concentració de biomassa final a cada cas, per altra banda, permet destacar-ne els nivells assolits quan s'utilitza Glicina com a suplement del medi de cultiu estàndard. En aquest cas, tot i partir de la mateixa concentració de biomassa a l'inici de l'etapa d'inducció, la concentració final és gairebé un 15 % superior al valor d'un cultiu estàndard. En aquest punt es podrien valorar les següents hipòtesis:

- En primer lloc, el fet que la concentració de biomassa al final de l'etapa d'inducció sigui notablement superior a la que s'assoleix tant en un cultiu estàndard com en els cultius suplementats per altres aminoàcids pot fer pensar en un possible fenomen de segregació de la població bacteriana del cultiu. És a dir, el fet d'addicionar Glicina pot trencar la pressió selectiva que s'exerceix al cultiu per l'auxotròfia que presenta la soca. D'aquesta manera, en presència de Glicina al medi, es pot haver desenvolupat una subpoblació que presenti una pèrdua plasmídica parcial i que per tant, destini els nutrients que li arriben a creixement i manteniment cel·lular en detriment de producció de RhuA.

- En segon lloc, i relacionat amb el punt anterior, l'addició d'IPTG en un cultiu que presenta un possible estat de segregació (per exemple, diferent nombre de còpies de plasmidi) pot suposar que a les diferents poblacions la sobrecàrrega metabòlica que implica la sobreexpressió de RhuA tingui diferent intensitat. D'aquesta manera es podria explicar aquest increment en la concentració de biomassa al final de l'etapa de producció. En qualsevol cas però, el fet que el creixement al final de l'etapa de producció s'aturi a una densitat òptica al voltant de 100 unitats, lluny de les 200 – 250 assolibles en cultius no induïts abans no hi hagi limitació en la transferència d'oxigen al cultiu, indica que la pèrdua plasmídica ha estat parcial i que l'efecte de la inducció ha tingut lloc en tota la població.
- Per altra banda, l'augment observat en la quantitat de proteïna recombinant produïda respecte un cultiu de tipus estàndard podria ser compatible amb un fenomen de pèrdua parcial de plasmidi en part de la població. És a dir, que el balanç entre la menor sobrecàrrega metabòlica que suporta part de la població i l'augment de la concentració de biomassa resultin en un augment de la producció global de proteïna.

En analitzar els nivells d'activitat total ( $\text{UA}\cdot\text{L}^{-1}$ ) assolits a cada cultiu en termes relatius (%) als resultats obtinguts en cultius estàndard ( Fig. 7.6 ) la situació canvia. L'addició d'aminoàcids com la Leucina i el Triptòfan, que no han portat a increments apreciables en els nivells de RhuA sintetitzada, sí suposen augments en l'activitat total del cultiu d'un 37 i un 17 % respectivament. Per altra banda però, l'addició de Treonina i Glicina al medi de cultiu han suposat augments tant en l'activitat total com en els nivells de RhuA sintetitzada. L'addició d'Histidina però, que ha portat a un increment considerable de la quantitat de RhuA total sintetitzada, suposa un increment gairebé nul en els nivells d'activitat total respecte els cultius de tipus estàndard.

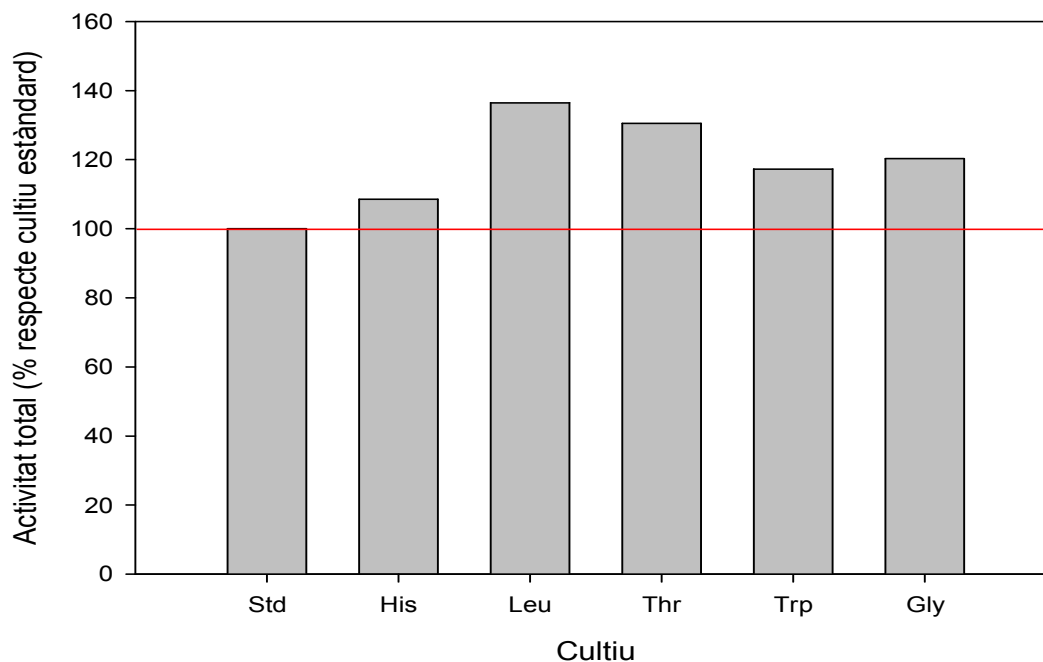


Fig. 7.6. Comparativa percentual entre l'activitat total per a les diferents estratègies implementades. La línia horitzontal sòlida marca la referència establerta per un cultiu conduït amb una estratègia de tipus estàndard.

#### 7.4.4. Qualitat de la proteïna sintetitzada

L'addició dels diferents aminoàcids emprats en aquesta sèrie experimental han conduït a canvis notables en la producció de Rhamnulosa 1 – fosfat aldolasa. Aquests canvis però, han suposat en alguns casos augments en la producció en termes màssics de la proteïna, mentre que en d'altres ha estat l'activitat enzimàtica la que ha experimentat augments importants. No obstant però, aquestes dues mesures han de tenir-se en compte de manera conjunta a partir de l'activitat específica per mg de proteïna, paràmetre que s'ha denominat aquí com qualitat proteica ( $\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). La figura 7.7 mostra en termes relatius (%) la qualitat de la proteïna sintetitzada per a cada estratègia de treball. En aquest cas es pot apreciar com determinades estratègies condueixen a un augment en la qualitat de la proteïna recombinant (addició de Leucina, Treonina i Triptòfan), mentre que d'altres condueixen a l'obtenció d'una proteïna de pitjor qualitat.

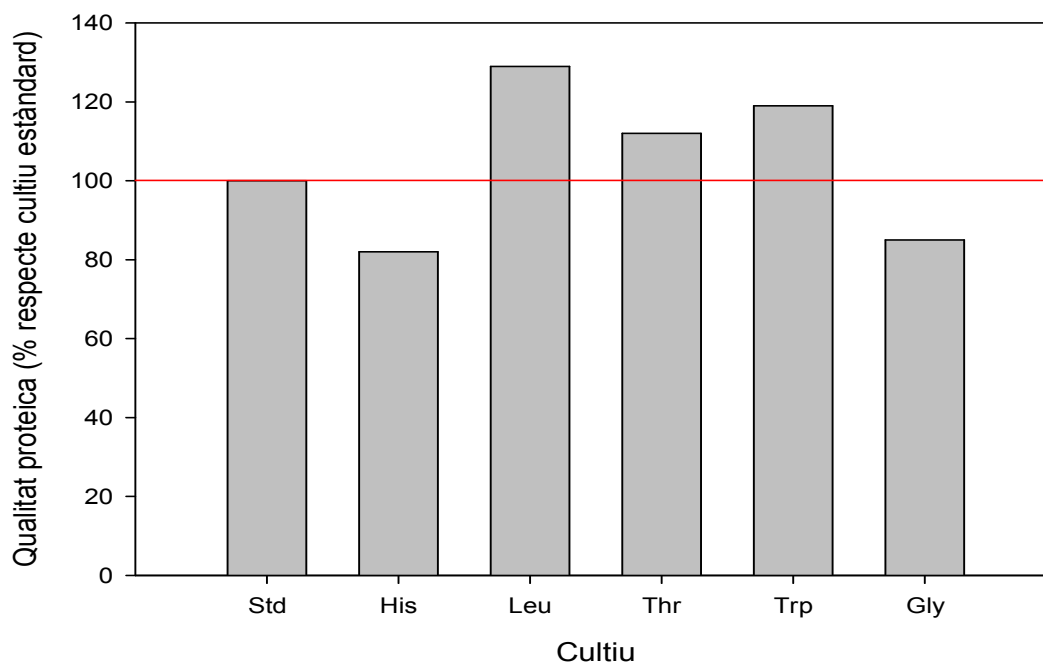


Fig. 7.7. Comparativa percentual entre la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada a les diferents estratègies implementades. La línia horitzontal sòlida marca la referència establerta per un cultiu conduït a partir d'una estratègia de tipus estàndard.

Quan s'analitzen en conjunt aquestes tres variables (RhuA total sintetitzada, Activitat total produïda i qualitat de la proteïna recombinant) es pot arribar al següent:

- En primer lloc, donat que l'objectiu del procés de producció de proteïna recombinant és l'obtenció de proteïna activa, es podria pensar que el nivell d'activitat total per litre de cultiu és el paràmetre clau a l'hora de determinar quina és la millor estratègia de conducció del procés. Atenent a aquest criteri, els principals candidats a millor estratègia (de la sèrie d'aminoàcids que s'han utilitzat) podrien ser la Leucina i la Treonina.
- Si es tenen en compte els nivells màssics de proteïna sintetitzada, tot sembla indicar que els candidats perfectes podrien ser la Histidina i la Glicina, els quals però, han suposat un augment més discret en l'activitat produïda respecte els cultius suplementats amb Leucina i Treonina.. No obstant però s'ha de reflexionar entorn a aquest tema. I és que el fet que augmenti la quantitat de proteïna recombinant en termes màssics però no en activitat indica que l'addició d'aquests aminoàcids sembla permetre superar determinades

limitacions en la síntesi de proteïna per part de la maquinària cel·lular. Aquest augment important en la proteïna sintetitzada pot ser per altra banda, el responsable de plegaments incorrectes que desemboquin en respostes cel·lulars de degradació (si els plegaments no es poden assistir correctament amb activitats tipus xaperona), que acabin amb disminucions de l'activitat enzimàtica. Per tant aquesta opció quedaria descartada.

- Si es para atenció al cas de la Treonina, si bé hi ha hagut un augment en l'activitat produïda, també s'ha produït en la quantitat de RhuA sintetitzada, amb la qual cosa la qualitat d'aquesta és menor que per al cultiu suplementat amb Leucina. A més, donada la complexitat dels fenòmens proteolític i el seu caràcter imprevisible en molts casos en cultius d'aquest tipus, els nivells d'activitat haguessin pogut disminuir per efecte de respostes a l'augment del nivell de proteïna intracel·lular. Aquestes també són situacions a evitar, ja que interessa un procés reproduïble sense imprevistos que puguin portar a disminucions notables del rendiment.
- Per tant, les addicions de Leucina o Triptòfan es podrien considerar com les principals opcions ja que permeten l'obtenció d'una proteïna recombinant de major qualitat i no porten a un augment de la quantitat de proteïna intracel·lular que podria donar lloc a respostes de degradació no desitjades.

### 7.4.5. Possible relació amb la seqüència d'aminoàcids de RhuA

Les rutes de síntesi dels aminoàcids constitueixen una xarxa molt complexa de reaccions enzimàtiques altament relacionades i connectades entre elles. Una breu anàlisi d'aquestes rutes podria ajudar a clarificar o raonar la causa dels augments d'activitat específica o proteïna recombinant en cada un dels casos plantejats. La taula 7.4 mostra una relació dels precursors emprats a les rutes de síntesi dels diferents grups d'aminoàcids [29].

## 7.- Addició coordinada d'aminoàcids per a la millora de la qualitat de RhuA

Precursor	Aminoàcid
Piruvat	Alanina
	Valina
	Leucina
Oxaloacetat	Aspartat
	Asparagina
	Metionina
	Lisina
	Treonina
	Isoleucina
$\alpha$ -oxoglutarat	Glutamat
	Glutamina
	Arginina
	Prolina
3 - Fosfoglicerat	Serina
	Glicina
	Cisteïna
Fosfoenolpiruvat (PEP) + Eritrosa - 4 -fosfat	Fenilalanina
	Tirosina
	Triptòfan
5 fosforibosil 1 - pirofosfat + ATP	Histidina

Taula 7.4. Precursors de les rutes biosintètiques dels 20 aminoàcids [29]

Si es para atenció al cas de la Histidina es pot observar que la seva ruta sintètica és completament independent de la dels altres aminoàcids. Donat que la seva síntesi consta de 9 – 10 processos enzimàtics diferents (segons la font consultada) [29, 30] i cap d'ells és comú al de cap altre aminoàcid, el cost metabòlic de la seva producció és molt alt. Per tant, el fet de suplementar el medi de cultiu amb un 20% de la histidina necessària per als requeriments totals a les condicions de procés pot alleujar la sobrecàrrega que suposa en el metabolisme cel·lular. D'aquesta manera els nivells de RhuA sintetitzada poden augmentar i a més, pot evitar la disminució dels rendiments d'immobilització posterior per cromatografia d'afinitat, que recordem, es basa en la interacció dels 6 residus d'Histidina amb que es troba fusionada la proteïna recombinant amb un suport carregat amb un ió metàl·lic.

Quan el medi de cultiu s'ha suplementat amb Treonina, s'ha produït un augment tant de la quantitat de proteïna recombinant sintetitzada com de l'activitat total produïda. La figura 7.8, que mostra les connexions que existeixen entre les rutes de síntesi dels



## 7.- Addició coordinada d'aminoàcids per a la millora de la qualitat de RhuA

aminoàcids derivats d'oxalacetat i els derivats de piruvat [29], permet observar que la Treonina no només es destina directament a la síntesi de proteïnes sinó que parcialment pot transformar-se a  $\alpha$ -oxobutirat, el qual resulta ser precursor per a la ruta de síntesi d'Isoleucina. Per mitjà d'un mateix grups d'enzims, els productes intermedis de la ruta poden arribar a transformar-se en Valina i Leucina. D'aquesta manera doncs, el fet de suplementar el medi de cultiu amb Treonina a la fase d'inducció, no només suposa un estalvi important de recursos en la seva síntesi ja que es troba en un elevat percentatge en la seqüència de RhuA, sinó que a més, serveix de precursor d'altres aminoàcids amb una presència important en la seqüència de la proteïna recombinant; Isoleucina (5.47%), Valina (6.93%) i Leucina (10.58%).

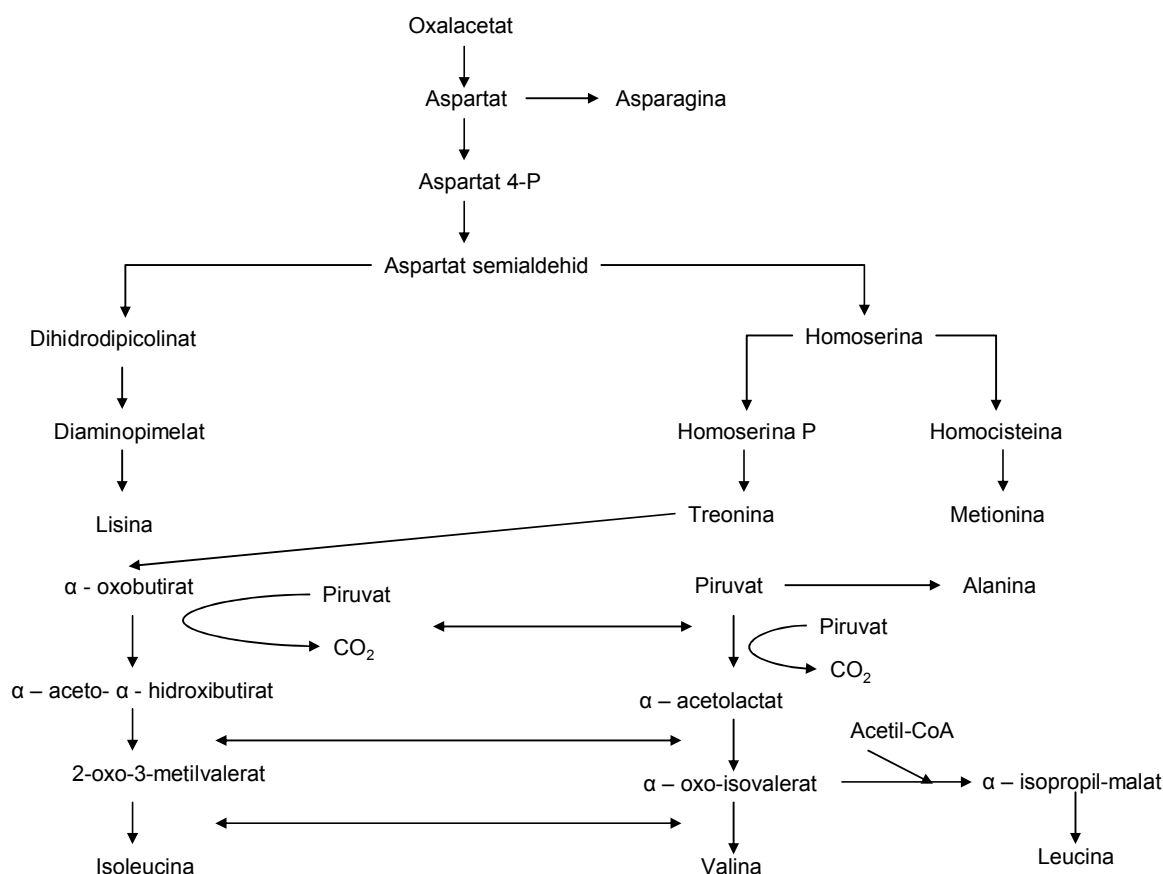


Fig. 7.8.- Ruta de síntesi dels aminoàcids derivats de l'oxalacetat i piruvat [29].

El cas del Triptòfan i la Leucina és potser menys obvi que la resta. L'addició de Triptòfan al medi de cultiu suposa un augment considerable en la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada. Les figures 7.9a i 7.9b mostren la ruta de síntesi dels aminoàcids de la família dels aromàtics [24], des de Fosfonelopiruvat (PEP) i

## 7.- Addició coordinada d'aminoàcids per a la millora de la qualitat de RhuA

Eritrosa 4 – Fosfat fins a Corismat, que representa el punt de partida per a la síntesi de Tirosina, Fenilalanina i Triptòfan. Així com les síntesis de Fenilalanina i Tirosina es duen a terme en dues i tres etapes respectivament i sense consum energètic, la síntesi de Triptòfan a partir de Corismat es du a terme en cinc passos enzimàtics amb consum d'energia. El fet de suplementar Triptòfan al medi de cultiu pot arribar a contrarestar el cost metabòlic d'aquest procés, ja que evita parcialment la síntesi dels enzims implicats en aquest. En aquest cas això es pot traduir en un augment de l'activitat específica.

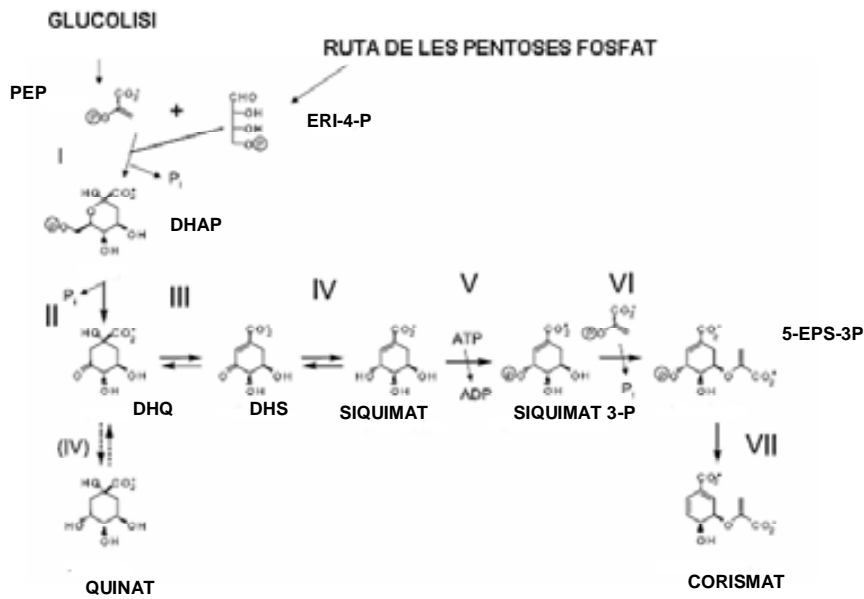


Fig. 7.9a.- Ruta de síntesi de Corismat, precursor dels 3 aminoàcids de la branca dels aromàtics [24].

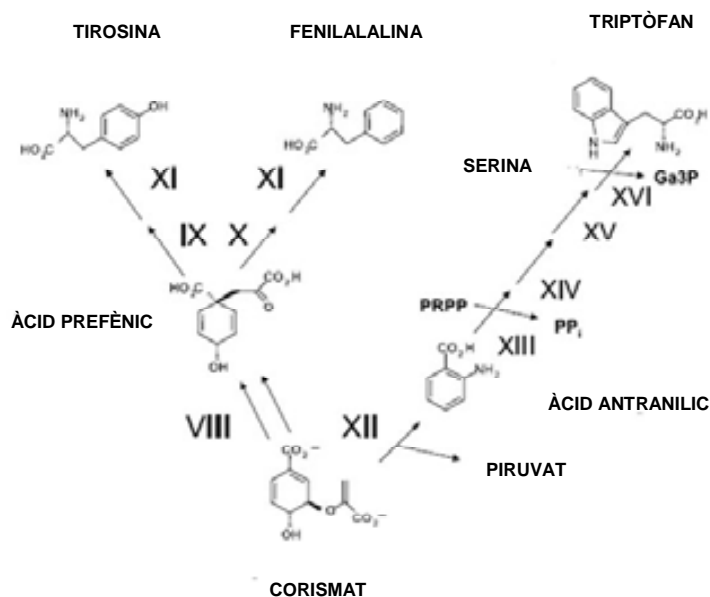


Fig. 7.9b.- Ruta de síntesi dels aminoàcids aromàtics a partir del seu precursor, corismat [24]

Per altra banda, el fet d'afegir Leucina al medi de cultiu contribueix també a un augment de la qualitat de la proteïna recombinant. La principal diferència amb la resta d'aminoàcids estudiats es troba en què aquest és present en major proporció en la seqüència de RhuA. L'addició per tant del 20 % dels requeriments de Leucina per a la producció de RhuA poden haver significat una reducció important en la utilització de recursos per a la seva síntesi.

En últim lloc, l'addició de Glicina al medi de cultiu ha suposat un augment en ambdues, la quantitat de proteïna sintetitzada i l'activitat enzimàtica produïda, ara bé, en termes globals la qualitat de la proteïna recombinant ha disminuït. La seva anàlisi és complexa, ja que hi poden intervenir factors com ara la possible pèrdua de la capacitat productiva per part d'una fracció de la població bacteriana. No obstant però, el fet que l'augment en la quantitat de proteïna recombinant sintetitzada no vagi acompanyat per un augment proporcional en l'activitat enzimàtica produïda, pot ser degut als fenòmens proteolítics com a resposta a una excessiva acumulació de proteïna recombinant al citoplasma..Si s'analiza la velocitat inicial de producció de proteïna recombinant (Taula 7.5) per als diferents cultius duts a terme en aquest estudi, en termes percentuals respecte la velocitat inicial de producció en un cultiu sense cap suplement d'aminoàcid, es pot comprovar que la velocitat inicial de producció de proteïna

recombinant pren el valor més alt quan s'addiciona Glicina al medi de cultiu prèviament a la inducció. Està àmpliament descrit que l'operació a elevats valors de  $q_p$ , amb l'elevada demanda de recursos cel·lulars que això suposa, juntament amb la limitació de nutrients amb què està basada l'estratègia de procés implementada, contribueixen a una sobrecàrrega metabòlica que compromet les funcions cel·lulars. Aquesta situació es pot traduir, en termes de procés, en disminucions importants de rendiment, degradació del producte recombinant i disminució dels temps de producció. L'augment en la velocitat de producció respecte els cultius de tipus estàndard podria explicar la disminució en la qualitat del producte recombinant sintetitzat (Figura 7.7) tant quan es suplementa el cultiu amb Glicina com quan es fa amb Histidina, que condueix al segon valor més alt de la velocitat inicial de síntesi de proteïna recombinant. Sembla doncs, que l'addició tant de Glicina com d'Histidina al medi podrien contribuir a superar un coll d'ampolla en la producció de RhuA, resultant-ne un augment de la velocitat inicial de síntesi que al seu torn introduiria una sobrecàrrega metabòlica al sistema.

Cultiu	$q_{p0}$ (% respecte un cultiu sense suplement d'aminoàcid)
Estàndard	100
Addició de Leucina	86
Addició de Triptòfan	133
Addició de Treonina	134
Addició d'Histidina	225
Addició de Glicina	287

Taula 7.5.- Valors de  $q_{p0}$  en termes percentuals respecte un cultiu conduït segons una estratègia de tipus estàndard per als diferents cultius suplementats amb aminoàcids.

## 7.5. Conclusions

La implementació d'una política d'addició coordinada d'aminoàcids en un cultiu recombinant d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* amb producció de Rhamnulosa 1-fosfat aldolasa pot introduir millores considerables en els rendiments globals de procés front els obtinguts en cultius duts a terme segons estratègies estàndard de producció. Els resultats són altament dependents de la naturalesa dels aminoàcids suplementats al cultiu, i és que no tots els aminoàcids estudiats condueixen a millores del mateix grau i tipus. L'addició de certs aminoàcids, com ara la Leucina (Leu) i la Treonina (Thr) donen lloc a augments considerables en l'activitat enzimàtica total produïda respecte la

del cultiu dut a terme amb estratègies estàndard, mentre que l'addició d'Histidina condueix a millores en termes màssics de proteïna recombinant sintetitzada.

S'ha comprovat que les millores en els rendiments de producció deguts a la implementació de la política d'addició coordinada d'aminoàcids no tenen lloc, en general, per efecte d'un augment en la concentració de biomassa al final de l'etapa de producció sinó per la superació de certs colls d'ampolla en les rutes de síntesi dels aminoàcids. La introducció de certs aminoàcids en el medi de cultiu, a nivells no inhibitoris, ajuden a disminuir els nivells d'expressió de determinats enzims involucrats en la seva síntesi i en la d'altres aminoàcids donat el seu elevat grau d'interconnexió. En particular, per al cas de la Glicina, sí es produeix un augment en la concentració de biomassa al final de l'etapa d'inducció respecte els altres cultius duts a terme. Ara bé, en aquest cas hi juguen un paper important les modificacions genètiques de la soca d'estudi.

Les millores introduïdes en els rendiments de producció de proteïna recombinant s'han de tenir en compte no només a partir de paràmetres individuals com la concentració de proteïna o activitat enzimàtica per unitat de volum de reactor sinó en conjunt. En capítols anteriors s'ha definit la qualitat de la proteïna recombinant com un paràmetre clau a l'hora de determinar la viabilitat d'una estratègia de cultiu. En principi, en el cas d'estudi tot sembla indicar que els millors candidats per tal d'iniciar un estudi més rigorós de l'efecte de la seva addició en la producció de RhuA, són la Leucina i el Triptòfan. En ambdós casos els nivells de qualitat de la proteïna recombinant representen un augment considerable front els cultius de tipus estàndard. A més, en termes màssics, els nivells de RhuA produïts no augmenten significativament, la qual cosa pot evitar l'activació de respostes a plegaments incorrectes, degradacions, que sembla que sí tenen lloc per exemple amb addició d'Histidina. No obstant però, aquest estudi significa només un punt de partida. Poden existir certes combinacions d'aminoàcids (de composició clara i definida), a mode de còctels (inclús alguns no contemplats aquí), que addicionats en els nivells correctes condueixin a resultats millors que els obtinguts en aquest treball. Aquest estudi per tant, obre les portes a la definició de possibles estratègies en aquest camí per tal de millorar encara més la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada.

## 7.6. Referències

1. Ramírez, D.M. and W.E. Bentley, Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993. 41(5): p. 557-565.
2. Harcum, S.W., D.M. Ramirez, and W.E. Bentley, Optimal nutrient feed policies for heterologous protein production *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992. 34-35(1): p. 161-173.
3. Traxler, M.F., et al., The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2008. 68(5): p. 1128-1148.
4. Dong, H., L. Nilsson, and G.C. Kurland, Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, 1995. 177(6): p. 1497-1504.
5. Ramírez, D.M. and W.E. Bentley, Fed-batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress responses. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995. 47(5): p. 596-608.
6. Jordan, G.L. and S.W. Harcum, Characterization of up-regulated proteases in an industrial recombinant *Escherichia coli* fermentation *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002. 28(2): p. 74-80.
7. Rozkov, A., et al., Dynamics of proteolysis and its influence on the accumulation of intracellular recombinant proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000. 27: p. 743-748.
8. Chatterji, D. and A.K. Ojha, Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 2001. 4(2): p. 160-165.
9. Ferullo, D.J. and S.T. Lovett, The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2008. 4(12).
10. Chung, H.J., W. Bang, and M.A. Drake, Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006. 5(3): p. 52-64.
11. Sandén, A.M., et al., Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. 81(2): p. 158-166.
12. Rinas, U. and F. Hoffmann, Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. 89: p. 73-92.

13. Schweder, T., et al., Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002. 58(3): p. 330-337.
14. Wick, L.M. and T. Egli, Molecular Components of Physiological Stress Responses in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2004. 89: p. 1-45.
15. Arsène, F., T. Tomoyasu, and B. Bukau, The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000. 55(1-3): p. 3-9.
16. Bukau, B., Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Molecular Microbiology*, 1993. 9(4): p. 671-680.
17. Yura, T. and K. Nakahigashi, Regulation of the heat-shock response. *Current Opinion in Microbiology*, 1999. 2(2): p. 153-158.
18. Rozkov, A. and S. Enfors, Analysis and Control of Proteolysis of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2004. 89: p. 163-195.
19. Baneyx, F., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999. 10(5): p. 411-421.
20. Yee, L. and H.W. Blanch, Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1992. 10(12): p. 1550-1556.
21. Makrides, S.C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 1996. 60(3): p. 512-538.
22. Nancib, N., C. Branlant, and J. Boudrant, Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1991. 8(3): p. 165-169.
23. Whitney, G.K., B.R. Glick, and C.W. Robinson, Induction of T4 DNA ligase in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989. 33(8): p. 991-998.
24. Wendisch, V.F., Amino acid biosynthesis: pathways, regulation, and metabolic engineering. 1st ed, ed. A. Steinbüchel. 2007: Springer.
25. Paul, A., et al., Effect of coordinated addition of specific amino acids on the synthesis of recombinant glucose isomerase - Differential roles of magnesium and cobalt ions. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998. 23(7): p. 506-510.
26. National Center for Biotechnology Information. [cited 2012 25-03]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

27. Bailey, J.E. and D.F. Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals. 1988, McGraw Hill Higher Education.
28. Vidal, L., et al., Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2008. 134((1-2)): p. 127-136.
29. Gottschalk, G., Bacterial Metabolism. 2nd ed, ed. M.P. Starr. 1985: Springer Verlag.
30. Alifano, P., et al., Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. Microbiological Reviews, 1996. 60(1): p. 44-69.



## 8. PRODUCCIÓ DE RAMNULOSA 1-FOSFAT ALDOLASA EN PLANTA PILOT

### Resum

L'estudi del procés de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli* a escala laboratori ha permès seleccionar les millors estratègies d'operació des del punt de vista de producció de proteïna recombinant, que implementades en un cultiu en planta pilot, han conduït als millors resultats obtinguts fins al moment al grup de recerca on s'emmarca aquest treball.

L'addició de Leucina al medi de cultiu instants abans d'iniciar l'etapa d'inducció i la implementació d'un perfil d'addició de nutrients híbrid entre un perfil lineal i l'aplicació de períodes d'interrupció puntual del flux de nutrients al bioreactor han permès l'obtenció de nivells de proteïna recombinant per sobre dels obtinguts en cultius estàndard a la mateixa relació inductor – biomassa, d'una elevada qualitat (equivalents als màxims obtinguts a escala laboratori) i amb un excel·lent rendiment d'immobilització a partir de cromatografia d'afinitat a metalls (IMAC).

### 8.1. Introducció i antecedents

L'escalat d'un procés de tipus biotecnològic no és una qüestió trivial. Un procés amb excel·lents resultats a escala laboratori pot comportar-se de manera completament diferent a mesura que les dimensions dels reactors emprats augmenten. És per aquesta raó, que s'han desenvolupat una sèrie de metodologies de disseny per tal d'assegurar que un determinat sistema es comporti de la mateixa manera independentment de les seves dimensions [1-6].

Un reactor a escala laboratori, degut a la seva geometria, distribució dels seus diferents elements mecànics i grau d'agitació aplicat permet uns nivells de mescla gairebé complets, de manera que la transferència de nutrients del medi de cultiu a les cèl·lules en creixement, i la transferència d'oxigen des de la fase gas poden no representar cap problema operacional.

En reactors de major escala, no obstant, per la pròpia geometria i la potència relativa del sistema d'agitació, es poden assolir nivells de transferència d'oxigen i nutrients

insuficients cap a la cèl·lula [7]. Fenòmens d'aquest tipus, poden conduir a l'estratificació o formació de zones operacionals de característiques prou diferents. Un clar exemple derivat d'una transferència d'oxigen insuficient, és la formació de regions de tipus anaerobi al reactor. En aquestes zones, el metabolisme cel·lular pot canviar radicalment i pot tenir lloc la formació de subproductes [8-12], no només no desitjats, sinó que a més poden conduir a inhibicions, tant del creixement microbiològic com de la producció del compost d'interès.

Per altra banda, de forma més particular per al present cas d'estudi, la pròpia estratègia de procés pot conduir a situacions no desitjades des del punt de vista operacional. Després d'una primera etapa de creixement en discontinu, el procés entra en una fase de discontinu alimentat basada en l'addició d'una solució de nutrients concentrada a un ritme tal que permeti un creixement determinat del cultiu. El fet d'alimentar una solució concentrada de nutrients representa per una banda no diluir el cultiu excessivament, la qual cosa pot beneficiar posteriors etapes de processament del brou. Per altra banda però, si el grau de mescla no és complet, es poden formar zones on la concentració de nutrients és major que en d'altres, la qual cosa podria originar fenòmens de segregació de la població microbiològica. En determinades àrees del bioreactor doncs, el cultiu podria experimentar velocitats de creixement superiors que en d'altres amb les següents casuístiques:

- Saturació del metabolisme d'hidrats de carboni per un aport excessiu de glucosa i generació de subproductes (acetat) [8, 9, 12-18] amb possible inhibició del creixement i de la producció de proteïna recombinant.
- Creació d'una subpoblació que degut al baix ritme de recepció de nutrients pot presentar deficiències en la maquinària sintètica (ARN ribosòmic i *building blocks*) necessària per a la síntesi de proteïna recombinant en l'etapa de producció [17, 19-21].

La mateixa problemàtica associada a la mescla al bioreactor, pot tenir efectes no desitjats durant l'etapa de creixement induït del cultiu. Donat que es treballa amb addicions discretes d'inductor (en aquest cas d'IPTG) de baix volum, una transferència deficient d'aquest cap a les cèl·lules en creixement, pot donar lloc a la formació de poblacions induïdes i no induïdes, observant globalment una menor producció de proteïna recombinant.

Paral·lelament a l'homogeneïtzació espacial al reactor, tal com s'ha observat al capítol 6, la políptica d'addició de nutrients al medi de cultiu durant l'etapa d'inducció pot incidir en l'homogeneïtzació temporal en aquest. La implementació de perfils exponencials

pre-programats d'addició de nutrients amb períodes d'interrupció en una etapa on el creixement cel·lular en termes de replicació és gairebé nul, pot portar a constants cicles d'adaptació dels microorganismes a noves condicions ambientals en quant a disponibilitat i concentració de nutrients. En contraposició, la implementació de perfils lineals d'addició de nutrients pot contribuir a ambients menys canviants i afavorir el funcionament del cultiu.

És per això doncs, que tot i que un determinat procés presenti uns bons resultats a escala laboratori, és estrictament necessari que s'avaluï la seva viabilitat i les millors condicions amb què ha de ser conduït a majors escales per tal d'evitar fracassos des del punt de vista industrial i econòmic. Per aquest motiu doncs, es decideix escalar el procés productiu en un factor de 20 – 25X en reactors de planta pilot.

Donat l'elevat cost que representa un cicle de producció a planta pilot, tant en termes de materials, reactius, serveis i temps, s'ha de fer ús de les dades experimentals recollides al llarg de tot l'estudi realitzat a escala laboratori. D'aquesta manera doncs, un primer punt de partida com a possible estratègia de procés podria venir donada per una combinació de les estratègies que individualment han permès l'obtenció dels millors resultats dintre del grup d'experiments on s'emmarcaven. Així doncs, es proposa el següent:

- Donada la dependència de la producció de proteïna recombinant respecte la relació inductor – biomassa utilitzada a la fase d'inducció, es treballarà a una relació I/X de  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}\text{DCW}$ , ja que s'ha pogut comprovar que és la que permet millors resultats en termes de qualitat de proteïna recombinant ( $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}\text{RhuA}$ ).
- S'ha demostrat que un punt clau en la quantitat de proteïna activa recuperada d'un procés de producció (UA totals) es troba estretament relacionada amb l'acumulació o no de font de carboni al medi de cultiu durant l'etapa d'inducció. La formulació d'un model matemàtic de descripció del creixement i la producció de proteïna recombinant i la seva aplicació en tasques de control [22], ha permès minimitzar l'acumulació de glucosa al medi durant el cultiu i evitar la degradació de la proteïna sintetitzada presumiblement atribuïda a fenòmens de tipus proteolític. Per altra banda, una política correcta d'addició lineal de nutrients al medi de cultiu pot arribar a incrementar considerablement la quantitat de RhuA intracel·lular acumulada. Per tant doncs, durant l'etapa d'inducció s'implementaran perfils híbrids d'alimentació de nutrients.

- L'estudi de l'estructura primària de la Ramnulosa 1-fosfat aldolasa [23, 24] ha portat a identificar l'aminoàcid Leucina com el de major pes específic dintre de la composició de la proteïna recombinant amb una notable diferència amb la mitjana de proteïnes d'*E. coli*. L'addició d'una determinada quantitat de Leucina durant l'etapa d'inducció ha portat a un augment al voltant del 30 – 35 % de la qualitat de la proteïna a escala laboratori respecte estratègies estàndard de cultiu. Per tant doncs, també s'implementarà a escala pilot.

### 8.2. Objectius

L'objectiu d'aquest estudi és l'avaluació de la viabilitat del procés de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a escala pilot, prenent com a punt de partida una estratègia de procés basada en una combinació de les estratègies que han proporcionat els millors resultats a escala laboratori.

### 8.3. Materials i mètodes

#### 8.3.1. Soques i plasmidis

(Veure secció general de soques i plasmidis utilitzats: 3.1)

La soca *E. coli* M15ΔglyA [pREP4] portadora del vector pQEαβrham es va utilitzar per a la sobreexpressió, en cultius d'alta densitat cel·lular, de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa.

#### 8.3.2. Medis de cultiu

(Veure secció general de medis de cultiu emprats: 3.2)

Per al desenvolupament dels pre-cultius, a partir d'estocs de la soca conservats en glicerol a -80°C, es va utilitzar medi LB. Els cultius en Erlenmeyer (inòculs) i bioreactor, per altra banda, es van dur a terme partint de medi definit de composició detallada a la secció general de medis de cultiu.

### 8.3.3. Equipament de procés (no analític) utilitzat

Per a les diferents etapes del procés global descrit en aquest estudi, es va utilitzar el següent equipament:

- Fermentador Biostat B (Sartorius) amb capacitat total de 2L i volum útil d'1.5 L i unitat de control digital (DCU) per al desenvolupament de l'inòcul del reactor de planta pilot.
- Fermentador Biostat UD50 (Sartorius) amb capacitat total de 50L, unitat de control digital i registre validable de dades MFCSwin (Sartorius) per al desenvolupament de les etapes de creixement i producció de proteïna recombinant a escala pilot.
- Centrifugadora CSA-1 (Gea Westfalia Separator) per a la primera etapa de processament del brou de cultiu resultant de les etapes de creixement i producció de proteïna recombinant en planta pilot.
- Centrifugadora Beckman J2-21 M/E, sonicador Vibracell VC50 (Sonics & materials) i disruptor cel·lular mecànic One Shot (Constant Systems LTD) per a la segona etapa de processament del brou de cultiu prèvia a la immobilització – purificació en un sol pas de la proteïna recombinant obtinguda.

### 8.3.4. Condicions de cultiu

Donades les dimensions del reactor utilitzat a la planta pilot, les etapes i condicions de cultiu presenten certes variacions respecte les utilitzades fins al moment (Fig. 8.1). El procés pren com a punt de partida el desenvolupament overnight d'un pre-cultiu en medi complex LB a un volum final de 15 mL. Assolida una densitat òptica al voltant d'1.5 – 2 unitats, s'inocula un Erlenmeyer carregat amb medi definit (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes) amb un 5% d'inòcul a un volum total de 200 mL.

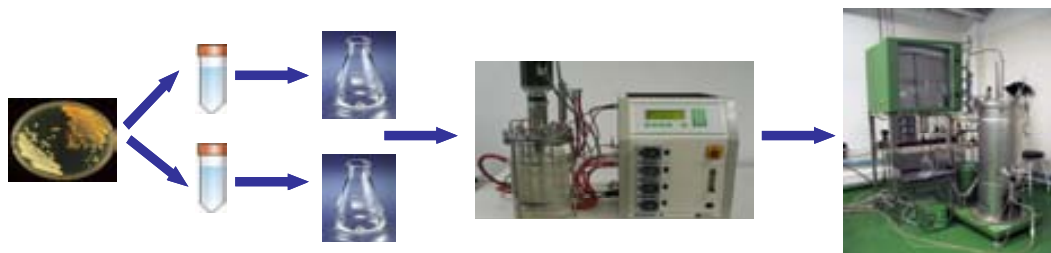


Fig. 8.1.- Etapes del desenvolupament de l'inòcul fins al procés de producció en planta pilot.

Transcorregudes 4 hores, i assolida una densitat òptica d'1 unitat a 600 nm, s'inoculen els 200 mL a un reactor escala laboratori carregat amb medi definit fins a un volum total d'1.5L.

Després de 15 hores de procés, s'esgota la font de carboni i s'inocula part del contingut del reactor (200 mL) en un reactor a escala pilot (Biostat UD50 – Sartorius ) carregat amb 30 L de medi definit, on es treballarà en discontinu fins a esgotament total de la font de carboni utilitzada, mantenint un pH de 7 unitats i un nivell d'oxigen dissolt al voltant del 50 – 60 % de la saturació a partir de la variació de la velocitat d'agitació del sistema i de la proporció aire / oxigen mitjançant una estació de mescla de gasos. En aquest moment s'inicia una etapa en discontinu alimentat a partir de l'addició d'una solució concentrada de nutrients diferent de la utilitzada per als estudis a escala laboratori (de composició descrita a la secció general de materials i mètodes 3.2, taula 3.5) mitjançant una bomba dosificadora programable, amb l'objectiu de mantenir un creixement a velocitat constant de  $0.225 \text{ h}^{-1}$  a les mateixes condicions operacionals que durant l'etapa en discontinu. El ritme d'alimentació de nutrients al reactor de planta pilot es una aproximació del perfil exponencial, basat en un augment progressiu del ritme d'alimentació a mode d'esglaons (veure 8.4.2.- Evolució del procés a escala pilot).

De la mateixa manera que a escala laboratori, es realitzen addicions puntuals de fosfats concentrats independentment del medi d'alimentació davant de la impossibilitat de mantenir-los en solució en aquest. El criteri d'addició de fosfats aplicat respon a valors experimentals de rendiments determinats al grup de recerca corresponents a  $0.05 \text{ g}_P \cdot \text{g}^{-1}_{DCW}$ .

Assolida una densitat òptica de 60 unitats, s'addiciona al reactor, en un impuls, un 20% de la quantitat de Leucina necessària per a la síntesi dels nivells esperats de RhuA al final del procés. S'addicionen 2.7 g de Leucina en solució com a resultat del següent càlcul:

$$L(\text{mg}_{Leucina}) = V_{final} (L) \cdot X_{final} \left( \frac{\text{g}_{DCW}}{L} \right) \cdot P_{final} \left( \frac{\text{mg}_{RhuA}}{\text{g}_{DCW}} \right) \cdot \frac{L}{T} (\%) \cdot f (\%)$$

On:

- $V_{final}$  és el volum estimat al final del procés (38L).
- $X_{final}$  és la concentració de biomassa estimada al final del procés ( $27 \text{ g}_{DCW} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

- $P_{\text{final}}$  és el nivell produït de RhuA estimat ( $120 \text{ mg}_{\text{RhuA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ).
- L/T és el percentatge de Leucina en la composició de RhuA (11% aproximadament).
- f és un factor de dosificació, que tal i com s'ha descrit al capítol dedicat a l'addició de determinats aminoàcids al medi de cultiu prèviament a la inducció, es fixa en el 20 %, del total necessari teòric a fi d'evitar alteracions en les rutes de síntesi d'altres aminoàcids.

Posteriorment a aquesta addició, s'indueix el cultiu amb un impuls d'IPTG a raó de  $3 \mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ , per tant,  $476 \text{ mg d'IPTG}$  per a induir  $18 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ . A partir d'aquest moment, s'implementa una estratègia híbrida d'alimentació de nutrients, amb períodes d'addició lineal a ritmes al voltant de  $0.5 - 0.6 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  i cicles d'interrupció manuals per tal de prevenir possibles acumulacions de glucosa al medi.

### 8.3.5. Mètodes analítics

#### 8.3.5.1. Monitorització del creixement bacterià als cultius

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.1)

#### 8.3.5.2. Quantificació dels nivells de proteïna recombinant

(Veure secció general de mètodes analítics utilitzats: 3.5.2)

### 8.3.6. Immobilització de RhuA sobre suports IMAC

Per a determinar el rendiment de recuperació de RhuA respecte la resta de proteïnes de l'extracte cel·lular, es pren una determinada quantitat de brou final de cultiu i es precedeix com es descriu a continuació:

#### 8.3.6.1. Primera etapa de processament del brou de cultiu

A partir de la utilització d'una centrifugadora CSA-1 (Gea Westfalia separator), en línia amb el fermentador de procés, es realitza una primera etapa de separació de la massa cel·lular respecte del medi de cultiu. Si bé aquesta etapa de processament permet una reducció important del volum de material a processar en següents etapes, i a més en

facilita el seu emmagatzematge, el contingut de líquid continua essent massa elevat, de manera que són necessàries posteriors etapes de processament.

### 8.3.6.2. Següents etapes de processament del brou de cultiu

(Veure secció general de mètodes de processament del brou de cultiu 3.4.1)

### 8.3.6.3. Immobilització sobre suports IMAC

(Veure secció general de procediment de purificació i immobilització de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa 3.4.2)

## 8.4. Resultats i discussió

### 8.4.1. *Etapes prèvies al creixement i producció en planta pilot (desenvolupament de l'inòcul)*

Les etapes de creixement a escala laboratori prèvies a la producció en planta pilot transcorren segons els temps previstos, la qual cosa confirma la reproductibilitat i fiabilitat del procés.

Quan el procés es contempla a escala productiva, aquest és un punt de vital importància, ja que tot i que sempre s'ha de tenir en compte que un cert percentatge dels lots de producció poden patir algun tipus d'incident que faci que no superin certs estàndards de qualitat i per tant ser rebutjats, certes etapes no poden resultar limitants en el procés global. Aquestes etapes han d'estar optimitzades i previstes al 100% ja que els temps assignats a la resta d'operacions del procés global poden no ser flexibles en quant a la seva mobilitat en el temps. A nivell d'investigació, aquesta problemàtica és assumible, però una vegada el procés passa a escala productiva deixa de ser-ho.

Les etapes prèvies a la producció en planta pilot culminen amb un creixement en reactor d'1.5 L a una concentració inicial de font de carboni (glucosa) de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  on s'assoleix una densitat òptica de 20 – 25 unitats a 600 nm.



8.4.2. Evolució del procés

En aquesta secció es farà referència principalment a l'etapa de producció en planta pilot, ja que és estrictament la que s'ha monitoritzat amb el temps. De les etapes prèvies de desenvolupament de l'inòcul a escala laboratori, degut als temps que se'ls ha assignat en la seqüència d'operació, només es disposa dels estats inicials i finals (taula 8.1):

	Inici Etapa		Final Etapa	
	DO <sub>600</sub>	S(g·L <sup>-1</sup> )	DO <sub>600</sub>	S(g·L <sup>-1</sup> )
<b>Creixement en Erlenmeyer</b>	0,105	5,1	0,865	--
<b>Creixement en Bioreactor (1.5 L)</b>	0,115	21,3	19,05	0,21

Taula 8.1.- Resultats de les etapes prèvies de desenvolupament de l'inòcul per al reactor de planta pilot; creixement en Erlenmeyer (200 mL) i creixement en Bioreactor (1.5 L)

La figura 8.2A mostra l'evolució de biomassa en termes de densitat òptica i concentració de glucosa al reactor a escala pilot en les tres etapes del procés:

- Creixement en discontinu (batch)
- Creixement en discontinu alimentat.
- Producció de proteïna recombinant (inducció)

La línia vertical sòlida mostra l'inici de la fase discontinua alimentada a velocitat específica de creixement de 0.225 h<sup>-1</sup>. Per altra banda, la línia vertical discontinua mostra l'inici de l'etapa d'inducció.

La fletxa vertical, prèviament a l'inici de la fase d'inducció, mostra l'instant on es du a terme l'addició de Leucina corresponent al 20% de la quantitat estimada necessària per a la producció de RhuA considerada.

La figura 8.2B, per altra banda, mostra el perfil pre-programat d'addició de solució de nutrients al sistema (en L·h<sup>-1</sup>) a partir del sistema de control MFCSwin durant la fase d'alimentació no induïda del cultiu. S'introdueixen en el programa una sèrie d'esglaons (a valor constant de flux de nutrients al sistema), i tal i com es pot observar a la figura, el propi sistema de control s'encarrega de fer una progressió gradual entre dos valors de cabal d'addició.

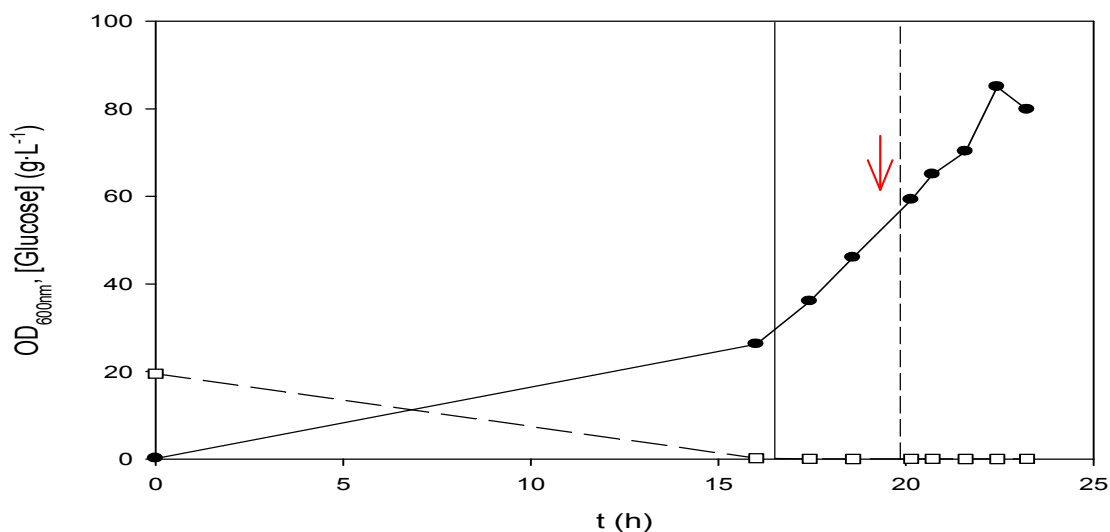


Fig. 8.2A.- Evolució de la concentració de substrat (---□---), i biomassa (---●---) en termes de densitat òptica per a l'etapa en planta pilot del procés. La línia vertical contínua mostra l'inici de l'etapa d'alimentació en discontinu a velocitat de creixement constant. La línia vertical discontinua mostra l'inici de l'etapa d'inducció. La fletxa vertical mostra l'instant on es realitza un impuls de Leucina al bioreactor.

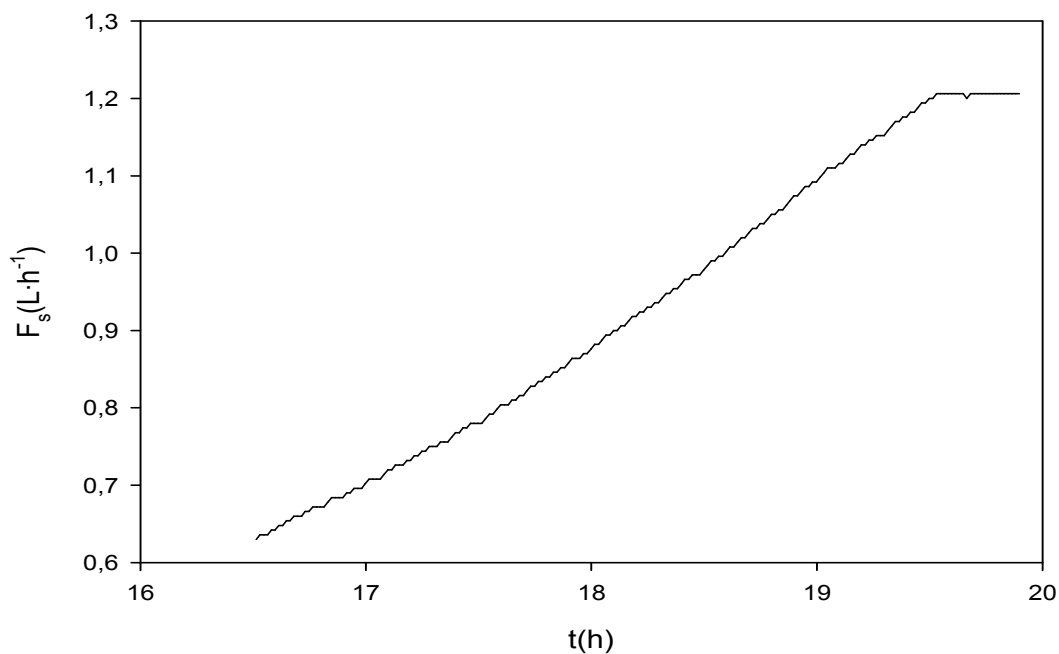


Fig. 8.2B.- Perfil d'addició de nutrients pre-programat per a la fase d'alimentació no induïda del procés en planta pilot.

És a l'inici de l'etapa d'inducció on s'implementa el perfil híbrid d'alimentació de nutrients, com a combinació de cicles lineals d'addició i interrupcions puntuals del flux

cap al reactor. La figura 8.3 permet observar la comparació entre el perfil híbrid implementat i el perfil que teòricament descriuria el model matemàtic de creixement i producció proposat amb l'objectiu de mantenir els nivells de glucosa per sota de  $0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El perfil d'alimentació proposat pel model, és el resultat de la integració de les equacions diferencials que el formen prenent com a condicions inicials d'integració els següents valors:

- $X_0$ , concentració inicial de biomassa,  $18 \text{ g}_{\text{DCW}}\cdot\text{L}^{-1}$
- $S_0$ , concentració inicial de substrat,  $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- $P_0$ , concentració inicial de proteïna per litre de reactor (corresponent al nivell basal de producció),  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- $q_{p0}$ , velocitat específica inicial de producció corresponent al nivell d'inducció aplicat,  $0.126 \text{ g}_{\text{RhuA}}\cdot(\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h})^{-1}$ .
- $g_{s0}$ , valor inicial de la funció de shock deguda a la sobreexpressió de RhuA al sistema, 1.
- $(I/X)_0$ , nivell d'inducció aplicat,  $3 \mu\text{mol IPTG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ .

El resultat de la simulació però, no contempla les addicions d'amoniac per al control del pH (<4 % respecte el volum total d'operació) ni el volum extret de mostra (<1 % respecte el volum total d'operació) per al seu anàlisi off-line.

Tal i com s'observa a la figura 8.3, durant més de 30 minuts després de la inducció, la simulació determina que l'alimentació es realitzi de forma contínua, sense interrupcions. Això és degut a que el creixement no s'ha vist substancialment afectat per la inducció de la producció de RhuA com per a provocar una acumulació de glucosa al sistema de  $0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , establerts com a màxim admissible. A partir de 40 minuts, matemàticament es determina que la concentració de glucosa podria assolir aquest valor, de manera que com a acció de control s'interromp el flux de nutrients al sistema durant un breu període de temps per a posteriorment restablir-se durant un cert interval. Com a conseqüència de l'afectació del creixement, a mesura que avança el temps, el perfil calculat determina que la freqüència de les interrupcions és major i l'interval durant el qual es restableix el flux de nutrients és menor.

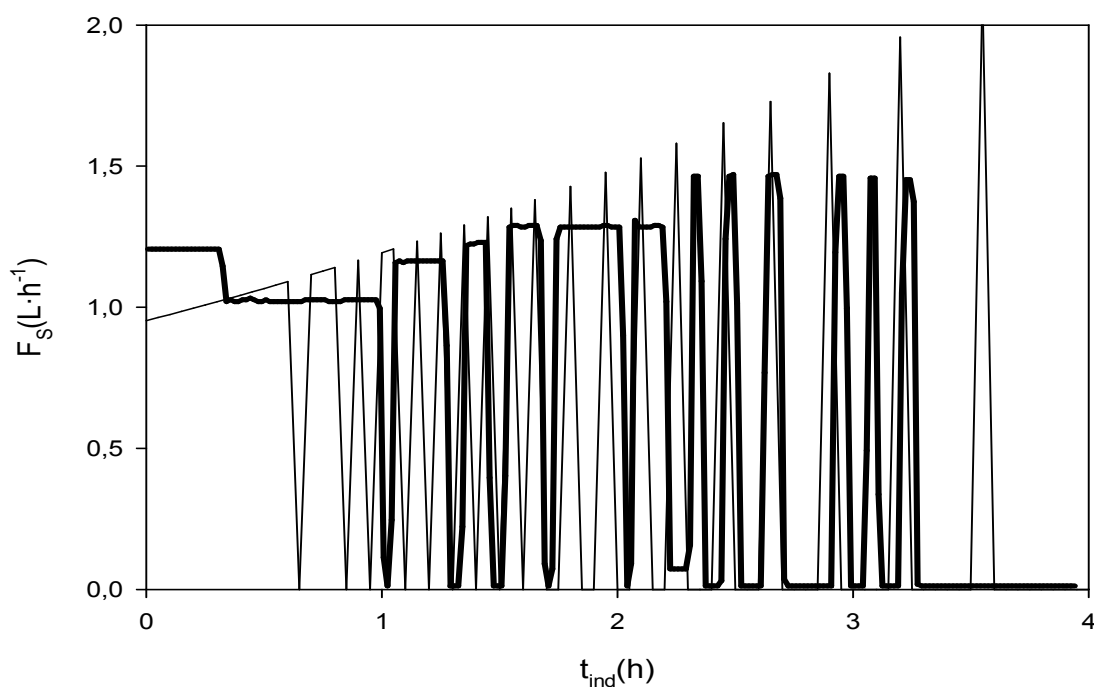


Fig. 8.3.- Comparació entre els programes d'addició de nutrients al sistema durant l'etapa d'inducció. En línia contínua fina; programa d'addició resultant de la integració de les equacions diferencials del model matemàtic de producció. En línia contínua gruixuda; programa d'addició de nutrients implementat.

A la pràctica però, el programa híbrid d'addició de nutrients implementat al sistema presenta certes diferències respecte del programa simulat a partir del model proposat. Inicialment, i degut a la pròpia operativa del reactor, el procés d'inducció és considerablement més lent que a escala laboratori, d'aquí que durant gairebé 15 minuts el perfil d'alimentació de nutrients es mantingui al mateix valor que al final de l'etapa de creixement no induït. Una vegada corregit el flux de nutrients, es manté un perfil lineal d'addició de nutrients omitint les interrupcions simulades pel model proposat. D'aquesta manera es pretén atorgar certa continuïtat i homogeneïtat temporal al cultiu durant les primeres fases de l'inducció, ja que aquestes poden condicionar completament l'evolució del procés. Amb l'avanç de la fase d'inducció es duen a terme certs cicles d'interrupció del flux de nutrients, ara bé, els períodes d'alimentació es mantenen durant major temps que els simulats pel model, però amb valors de flux menors. Globalment, la simulació, calcula una addició de glucosa durant l'etapa d'inducció propera a 500 g, mentre que el perfil implementat n'addiciona realment al voltant de 700.

Si es comparen els perfils de concentració de biomassa experimental i el simulat a partir del model matemàtic considerant el perfil d'alimentació de nutrients implementat a la realitat durant la fase d'inducció (figura 8.4), es pot observar que existeix una diferència notable entre ambdós. Es pot comprovar que el model matemàtic de descripció del creixement de la soca i producció de RhuA no s'acaba d'ajustar a les dades experimentals tal i com ho feia en els estudis a escala laboratori.

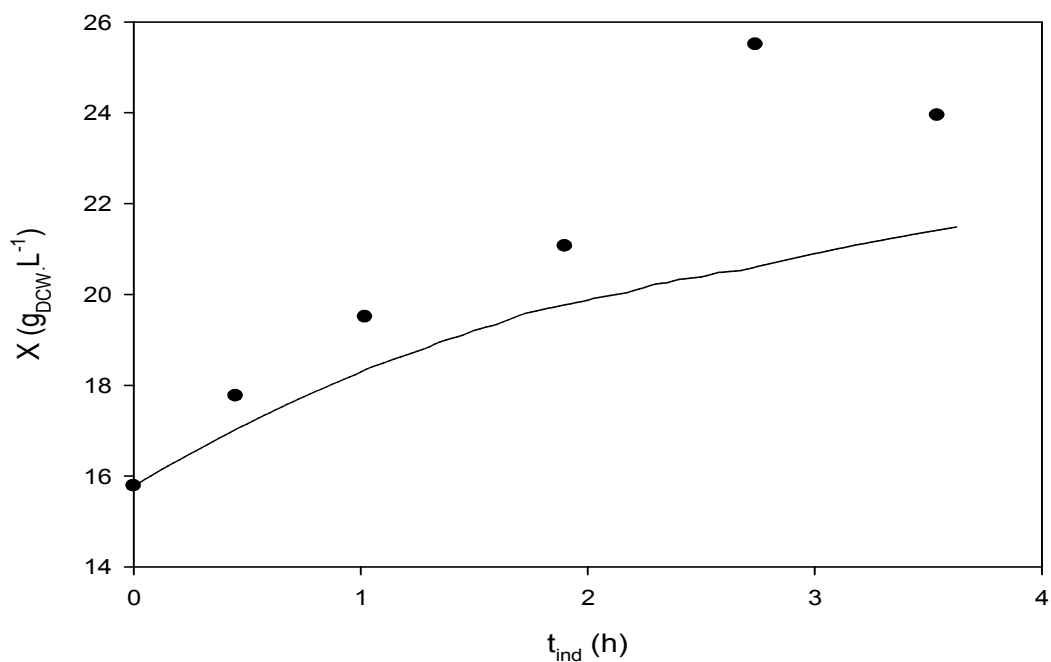


Fig. 8.4.- Concentració de biomassa durant l'etapa d'inducció del procés en planta pilot. (-) prevista a partir de la integració de les equacions del model matemàtic i el perfil de nutrients implementat realment, (●) determinada experimentalment.

Donat que únicament es disposa d'un estudi en planta pilot, resulta complicat poder justificar de manera absoluta les diferències observades entre els dos perfils. Ara bé, les possibles explicacions podrien ser les següents:

- En primer lloc s'ha de destacar que el model matemàtic únicament contempla com a font de carboni, i per tant, responsable tant del creixement com de la producció, a la glucosa. En aquest estudi però, s'ha addicionat una quantitat important de Leucina al medi de cultiu instants abans de la inducció, que de ben segur ha tingut una certa influència en el creixement de la soca i probablement podria explicar parcialment aquestes diferències.

- Per altra banda, el calibratge del model s'ha dut a terme a partir d'estratègies d'alimentació basades en perfils exponencials pre-programats amb cicles puntuals d'interrupció del flux de nutrients. Aquests perfils, que combinen la introducció de quantitats creixents de nutrients al sistema amb períodes d'interrupció poden portar al cultiu a situacions d'estrès per la necessitat de readaptació contínua a les condicions ambientals. Per aquest motiu, un perfil d'alimentació de caire més continu pot canviar la dinàmica del cultiu i portar a resultats no previstos pel model.

Cal destacar també que durant la fase d'inducció, el règim d'alimentació de nutrients implementat al sistema evita l'acumulació de glucosa al medi. La simulació del procés amb el perfil real d'alimentació de nutrients (figura no inclosa), determina però, que sí existiria una certa acumulació de font de carboni al sistema. És més, tot i que en global s'ha alimentat més glucosa que la prevista inicialment pel model per tal de mantenir concentracions per sota de  $0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , l'acumulació no s'ha donat, motiu per al qual resulta necessària una investigació més exhaustiva de les polítiques d'alimentació de nutrients ja que poden modificar considerablement la dinàmica del sistema.

### 8.4.3. Nivells de proteïna

La figura 8.5 mostra els nivells de proteïna recombinant obtinguts en el cultiu en planta pilot, tant en termes d'activitat específica com en contingut màssic intracel·lular.

En ambdós casos s'observa un creixement continu. Tot i que al voltant de les 3,5 hores després d'haver induït el cultiu s'observa una disminució de la densitat òptica del cultiu, no passa el mateix amb la producció de proteïna recombinant, que ni tan sols sembla estancar-se. No obstant però, disposar d'un major nombre de dades experimentals entre les 22 i 23 hores de cultiu permetrien determinar si la producció de proteïna ja s'estava estancant o si per contra seguia augmentant. Normalment, en produccions a escala laboratori, l'experiència assolida amb processos d'aquest tipus indicava que una vegada s'observava un retrocés en el creixement del cultiu, la síntesi de proteïna recombinant disminuïa considerablement. Un altre factor que s'ha pogut identificar com a íntimament relacionat amb una disminució de la velocitat, i més enllà, amb una degradació de la proteïna recombinant sintetitzada, és l'acumulació de font de carboni al cultiu. En aquest cas, tal i com s'ha comentat anteriorment, el flux de nutrients programat i el creixement que ha experimentat el cultiu han evitat aquest fenomen.

Donat que les mesures d'activitat específica i contingut màssic de proteïna recombinant intracel·lular són off-line i requereixen un cert temps de processament de les mostres, no es disposa de més dades sobre l'evolució del procés. En cas d'haver disposat d'aquestes dades en temps real, s'hagués augmentat la duració de la fase d'inducció per tal de poder extreure més informació del comportament del procés a escala pilot i avaluar possibles canvis de dinàmica respecte els processos duts a terme a escala laboratori.

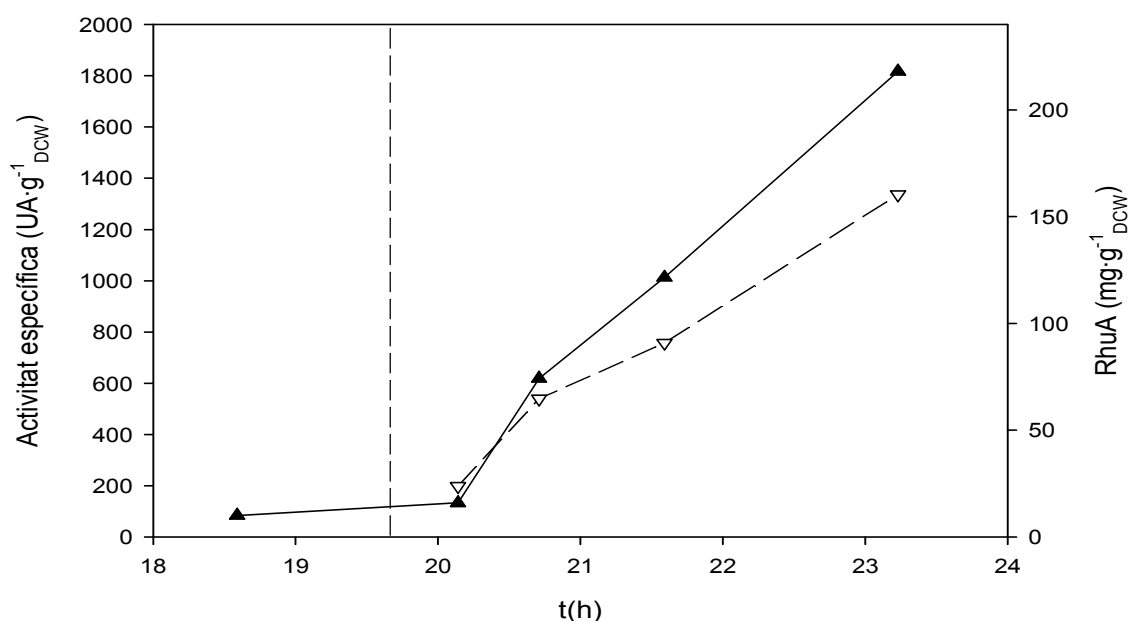


Fig. 8.5.- Evolució de l'activitat específica (-▲-) i del contingut màssic intracel·lular (--▽--) de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa durant la fase d'inducció del cultiu en planta pilot. La línia vertical discontinua mostra l'inici de l'etapa d'inducció.

Tal i com s'observa a la figura 8.5, la producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa per al cultiu es pot resumir en els següents resultats:

- Proteïna intracel·lular acumulada:  $160 \text{ mg}_{\text{RhuA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .
- Activitat específica:  $1800 \text{ AU} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ .
- Qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada:  $11.3 \text{ UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ .

### 8.4.4. Comparació amb altres estratègies

La figura 8.6 mostra una comparativa, en termes percentuals, dels nivells de qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada per a diferents estratègies a escala laboratori i la seva combinació a escala pilot .

Es representen les següents estratègies:

- Estratègia de cultiu estàndard, duta a terme a una relació inductor – biomassa (I/X) de  $3 \mu\text{mol ITPG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  amb un control manual sobre el flux de nutrients basat en la determinació off-line de la concentració de glucosa al medi de cultiu.
- Estratègia de cultiu duta a terme a una relació inductor – biomassa (I/X) de  $3 \mu\text{mol ITPG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ , amb un control del flux de nutrients basat en les prediccions del model matemàtic de creixement i producció descrit amb la finalitat d'evitar l'acumulació de glucosa al medi de cultiu per sobre de  $0.75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Estratègia de cultiu duta a terme a una relació inductor – biomassa (I/X) de  $3 \mu\text{mol ITPG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$  amb addició de Leucina (20% del necessari segons la producció prevista).
- Combinació d'estratègies; relació inductor - biomassa (I/X) de  $3 \mu\text{mol ITPG}\cdot\text{g}^{-1}\text{DCW}$ , amb una política d'alimentació de nutrients híbrida (lineal amb interrupcions) i amb addició de Leucina (20% del necessari segons la producció prevista).



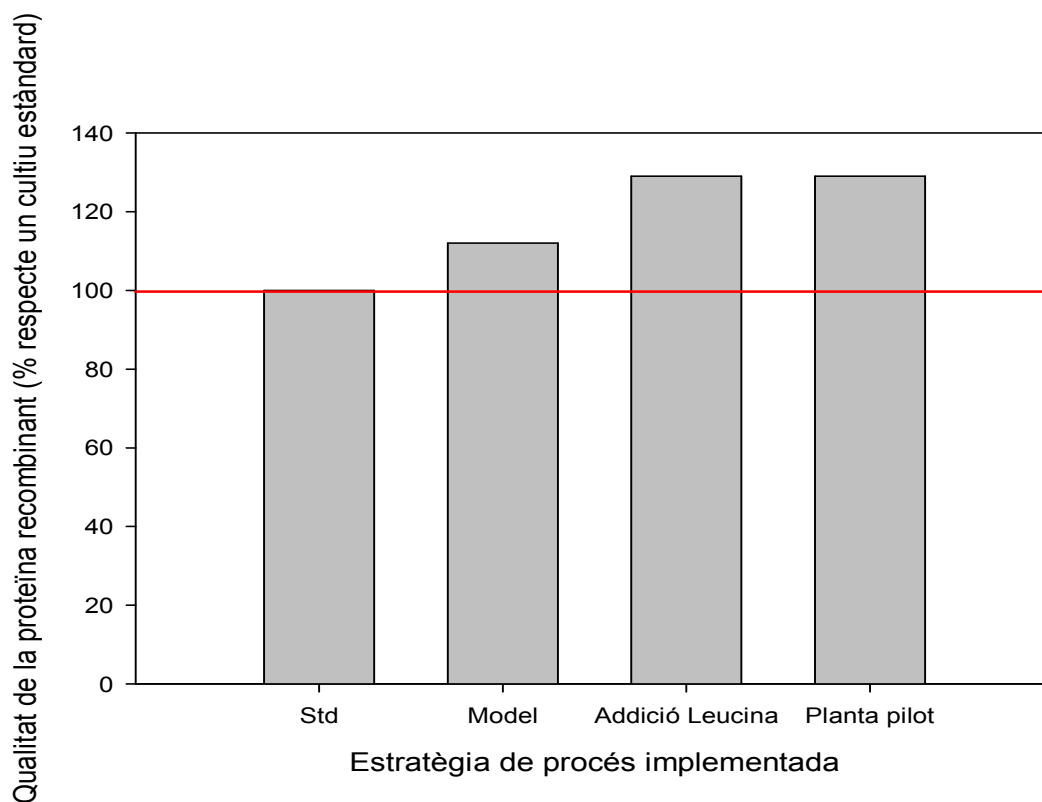


Fig. 8.6.- Comparativa percentual en termes de qualitat de proteïna recombinant per a diferents estratègies implementades

Les estratègies que es presenten a la figura 8.6, són les més representatives de tot l'estudi realitzat. Si es pren com a referència l'estratègia estàndard de partida d'aquest estudi, veiem que la implementació d'estratègies alternatives suposen certes millores en la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada.

Si atenem únicament a criteris de qualitat de la proteïna recombinant, veiem que els resultats obtinguts en el cultiu amb planta pilot són pràcticament idèntics als resultats que s'obtenen a escala laboratori quan es treballa amb addició de Leucina (aproximadament  $11.3 \text{ UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ).

Val la pena comparar també les estratègies, no només a nivell de qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada sinó també en termes d'activitat específica i RhuA intracel·lular acumulada, ja que s'observen certes diferències entre elles. La valoració de la producció únicament en termes de qualitat de la proteïna recombinant pot portar a pensar que el cultiu en planta pilot és pràcticament equivalent al cultiu amb addició de Leucina. Les figures 8.7 i 8.8 demostren el contrari.

## 8.- Producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa en planta pilot

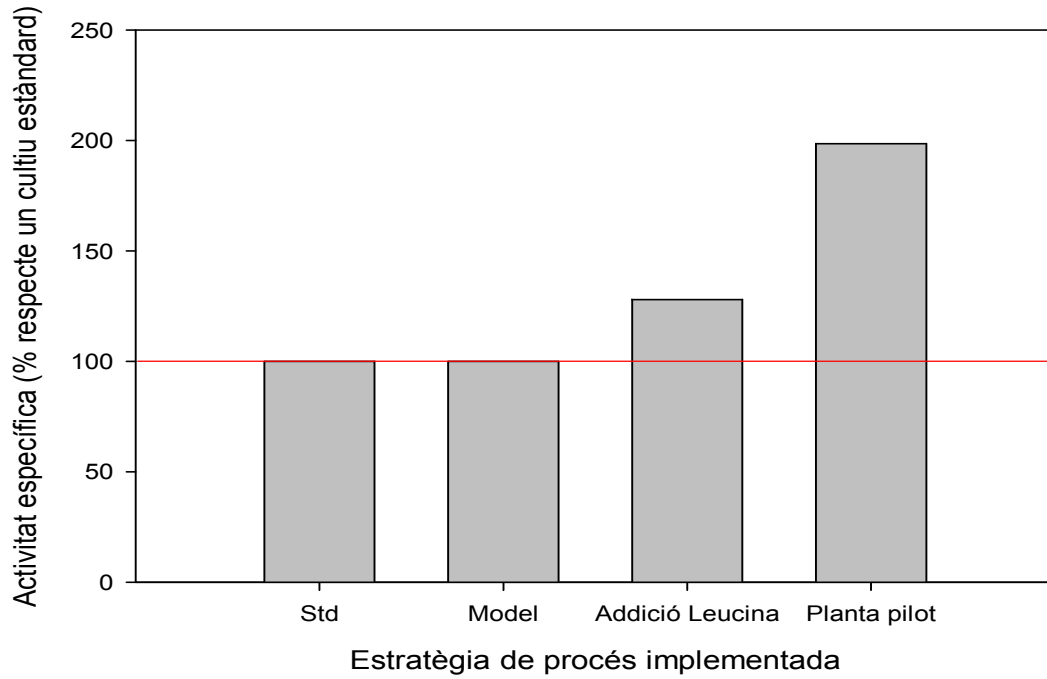


Fig. 8.7.- Comparativa percentual en termes d'activitat específica ( $\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) per a diferents estratègies implementades.

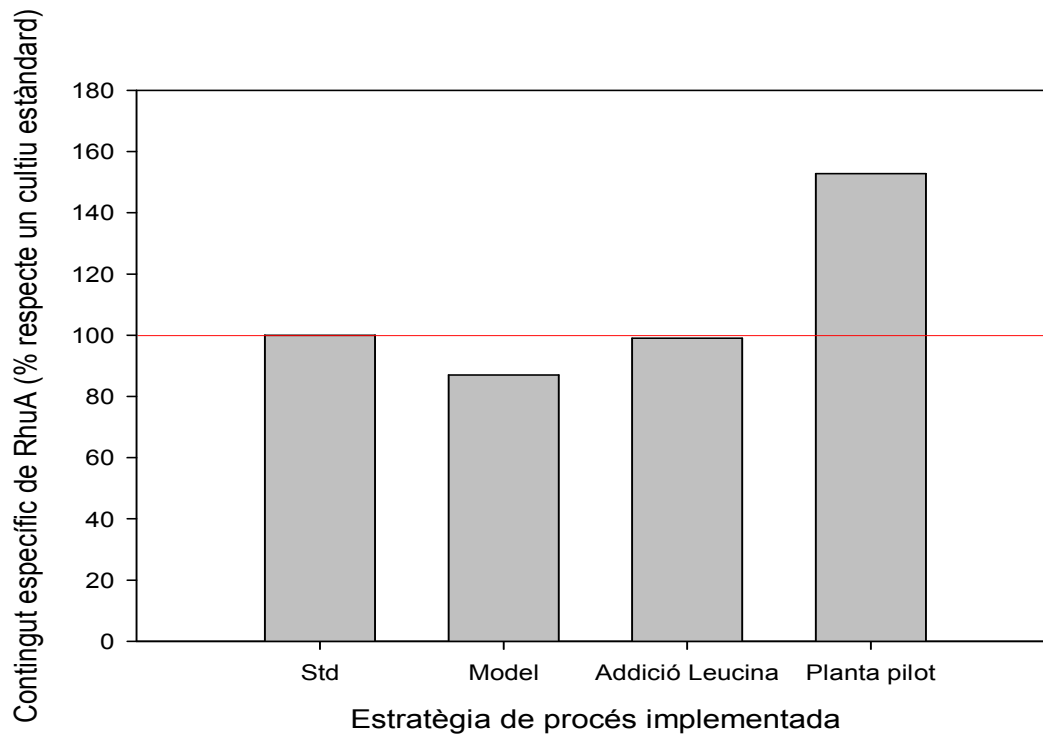


Fig. 8.8.- Comparativa percentual en termes de RhuA intracel·lular acumulada ( $\text{mg}_{\text{RhuA}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ) per a diferents estratègies implementades

Si bé per a les diferents estratègies implementades a escala laboratori representades a les figures 8.7 i 8.8 els nivells de RhuA intracel·lular acumulada no presenten variacions notables entre elles, els nivells assolits en planta pilot els sobrepassen en un 50 %. Els nivells obtinguts en planta pilot, tot i ser inferiors als màxims obtinguts a escala laboratori (al voltant de  $210 - 230 \text{ mg}_{\text{RhuA}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ), són superiors als que s'obtenen en cultius estàndard a escala laboratori per a la mateixa relació inductor – biomassa ( $3 \text{ } \mu\text{mol ITPG} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ ). En aquest sentit, la política d'alimentació de nutrients implementada hi pot tenir molt a dir, ja que a escala laboratori, addicions lineals de nutrients a ritmes al voltant de  $0.55 \text{ g}_{\text{glucosa}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$  han portat increments considerables de la quantitat de proteïna intracel·lular acumulada.

Pel que fa als nivells d'activitat específica, els cultius que es comparen a la figura 8.7 presenten major variabilitat. Per als cultius duts a terme a escala laboratori, els nivells d'activitat específica assolits en cultius suplementats amb Leucina prèviament a la inducció arriben a ser un 30% superiors als obtinguts en cultius estàndards. Ara bé, en planta pilot, l'augment que experimenta l'activitat específica és gairebé del 100% respecte a cultius estàndard.

Donat que només es disposa d'un sol cultiu en planta pilot, és difícil poder justificar els resultats obtinguts. En principi, aquests es poden atribuir a la sinèrgia en la combinació de les estratègies de procés implementades. Per una banda l'addició de Leucina al medi de cultiu prèviament a la inducció pot reduir els fenòmens de proteòlisi associats a la sobreexpressió d'una proteïna recombinant i per tant, evitar les pèrdues d'activitat de la proteïna sintetitzada. Per altra banda, el fet de mantenir una homogeneïtat temporal en les condicions del cultiu a partir de polítiques d'alimentació de nutrients lineals, pot reduir l'estrès cel·lular al canvi continu, de manera que la maquinària sintètica es trobi en millors condicions per a la producció de proteïna recombinant.

En anteriors capítols s'ha fet referència a que des del punt de vista d'estabilitat del procés, és més convenient que els nivells de proteïna acumulada intracel·lular no siguin massa elevats, ja que una producció excessiva de proteïna recombinant pot donar lloc a una elevada demanda d'aminoàcids i desembocar en situacions d'estrès cel·lular que poden conduir a degradacions de la pròpia proteïna sintetitzada. És en les situacions d'acumulació de nivells moderats de proteïna on s'ha observat una major qualitat d'aquesta. No obstant però, a nivell industrial potser té més interès les unitats d'activitat produïdes per litre de reactor, tot i que la proteïna no sigui de la màxima qualitat. En aquest sentit per tant, el procés que ha conduït a una relació UA/L major és el procés dut a terme en planta pilot (Figura 8.9).

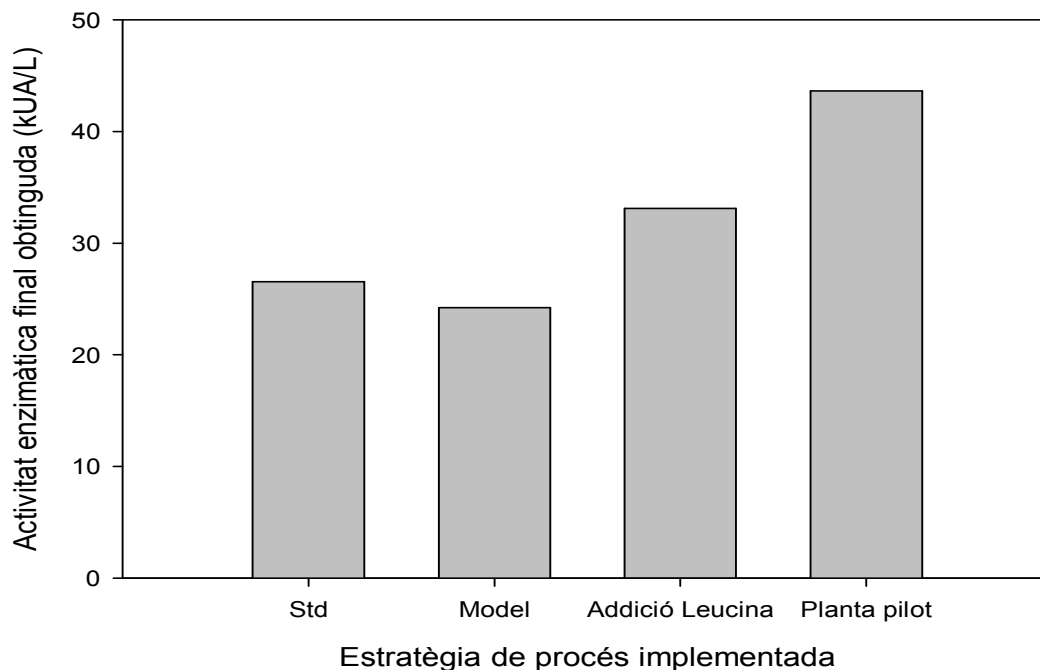


Fig. 8.9.- Resultats en kUA/L per a les diferents estratègies de procés descrites en aquest estudi.

### 8.4.5. Immobilització

El procés de purificació i immobilització en un sol pas de RhuA per mitjà de cromatografia d'afinitat a metalls [25] va conduir a rendiments d'immobilització del 90 % per a temps de contacte de 70 minuts entre l'extracte cel·lular a purificar i els suport d'agarosa amb cobalt quelat.

A la primera part d'aquest estudi es va determinar la dependència dels rendiments d'immobilització de la proteïna en suports tipus IMAC respecte l'estratègia del procés a través de la qual es condueix la producció de la proteïna recombinant en cultius d'elevada densitat cel·lular. L'anàlisi de l'activitat específica per sí sola, revela únicament que en cas d'existir degradació, aquesta no hauria afectat l'activitat enzimàtica, ara bé, es desconixeria si hi ha hagut afecció de la regió proteica responsable de la immobilització sobre suports tipus IMAC.

El procés de purificació de l'extracte cel·lular obtingut en planta pilot, confirma gràcies a l'elevat rendiment assolit, l'absència de fenòmens de degradació dels residus d'histidina responsables de la immobilització en suports IMAC. Així doncs, tot i que els resultats obtinguts en termes de producció de proteïna recombinant en aquest procés superen els previstos gràcies a les variacions operacionals implementades, el que sí

es conserva són els rendiments de purificació, paràmetres bàsics per a l'aïllament de la proteïna sintetitzada per al seu ús en aplicacions concretes.

### 8.5. Conclusions

L'experiència assolida en processos a escala laboratori i la investigació de possibles estratègies de millora a nivell de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa, han conduït al plantejament d'una estratègia de producció en planta pilot com a punt de partida de posteriors treballs. Els resultats obtinguts, com a conseqüència de les variacions operacionals implementades demostren que el procés té una potencialitat que encara no ha estat completament explotada ja que els nivells de proteïna i activitat específica obtinguts superen amb escreix les millors previsions que es podien tenir abans de dur a terme l'estudi.

Els resultats obtinguts a més, obliguen a fer certs replantejaments del model de creixement de la soca en medi definit i producció de RhuA. En aquest sentit seria convenient incloure l'efecte de l'addició de Leucina al medi de cultiu instants abans de la inducció així com l'efecte de polítiques d'alimentació de nutrients diferents a les que es van utilitzar per al calibratge del model. Així doncs, es podria dur un pas més enllà l'optimització del procés i definir noves estratègies de major impacte sobre el procés.

Si més no, i deixant de banda que els resultats superen les previsions fetes, els nivells de producció assolits en termes d'unitats d'activitat per unitat de volum són els majors que s'han obtingut en tot l'estudi realitzat, amb una qualitat de la proteïna recombinant que iguala els millors valors obtinguts a escala laboratori. No obstant però, el mateix fet que la producció hagi superat les expectatives amb escreix, també pot introduir una certa desconfiança amb la possibilitat d'una situació a la inversa. És per tant que considerem important un estudi més exhaustiu a escala pilot, potser incloent també en algun moment temes més de caire físic – mecànics (CFD) com a possibles influències en el procés.

### 8.6. Referències

1. García-Ochoa, F. and E. Gómez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology advances*, 2009. **27**: p. 153-176.
2. Bailey, J. and O. Ollis, eds. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. 1986, Mc Graw-Hill.
3. Díaz, A. and F. Acevedo, Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1999. **21**(1): p. 21-23.
4. Stanbury, P.F., S. Hall, and A. Whitaker, eds. *Principles of Fermentation Technology*. 2 ed. 1984, Butterworth Heinemann.
5. J.M.T., V., et al., Scale-up of mixing in gassed multiturbine agitate vessels. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 1998. **76**: p. 398-403.
6. Junker, B.H., Scale-up Methodologies for *Escherichia coli* and Yeast Fermentation Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004. **97**(6): p. 347-364.
7. Reisman, H.B., Problems in Scale-up Biotechnology Production Processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1993. **13**(3): p. 195-253.
8. Clark, D.P., The Fermentation Pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1989. **63**(3): p. 223-234.
9. White, D., *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. 2 ed. 2000: Oxford University Press.
10. Bhattacharya, S.K. and A.K. Dubey, Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997. **20**: p. 335-360.
11. Shiloach, J., et al., Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth, and Recombinant Protein Production by *Escherichia coli* BL21(vDE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. **49**: p. 421-428.
12. Lee, S.Y., High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 1996. **16**(3): p. 98-105.
13. Eiteman, M.A. and E. Altman, Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, 2006. **24**(11): p. 530-536.

14. Akesson, M., P. Hagander, and J.P. Axelsson, Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001. **73**(3): p. 223-230.
15. Wolfe, A.J., The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005. **69**: p. 12-50.
16. De Mey, M., et al., Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007(34): p. 689-700.
17. Blanch, H.W. and L. Yee, Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia Coli*. *Biotechnology*, 1992. **10**: p. 1550-1556.
18. Shiloach, J. and R. Fass, Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 2005. **23**: p. 345-357.
19. Sanden, A.M., et al., Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003. **81**(2): p. 158-166.
20. Andersson, L., L. Strandberg, and S.O. Enfors, Cell segregation and lysis have profound effects on the growth of *Escherichia coli* in high cell density fed batch cultures. *Biotechnology Progress*, 1996. **12**(2): p. 190-195.
21. Egli, T. and L.M. Wick, Molecular Components of Physiological Stress Responses in *Escherichia Coli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. **89**: p. 1-45.
22. Ruiz, J., et al., A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 2011. **55**(2): p. 82-91.
23. Kroemer, M. and G.E. Schulz, The structure of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (class II) solved by low-resolution SIR phasing and 20-fold NCS averaging. *Acta Crystallographica*, 2002. **D58**(5): p. 824-832.
24. Kroemer, M., I. Merkel, and G.E. Schulz, Structure and catalytic mechanism of L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Biochemistry*, 2003. **42**: p. 10560-10568.
25. Ardao, I., et al., One step purification-immobilization of fuculose-1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependent aldolase, by using metal-chelate supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006. **39**: p. 22-27.

## 9. CONCLUSIONS GENERALS I TREBALL FUTUR

En aquest treball, s'ha definit un paràmetre en base al qual s'han avaluat les diferents estratègies de cultiu implementades en el procés de producció de Ramnulosa 1-fosfat aldolasa a partir de la soca d'*E. coli* M15ΔglyA [pREP-4] pQEαβrham; la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada ( $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{RhuA}}$ ).

Per una banda, i com a punt de partida de l'estudi, s'ha determinat la influència de l'estratègia del procés de producció en bioreactor no només sobre la qualitat de la proteïna recombinant sinó també sobre els rendiments de purificació d'aquesta sobre suports de tipus IMAC. És per això que un procés d'aquest tipus s'ha d'analitzar globalment a partir de la integració de les etapes de producció i purificació. Les estratègies de producció a implementar han de respondre a un compromís entre l'obtenció d'elevats nivells de proteïna intracel·lular amb una expressió relaxada que permeti el plegament correcte de la proteïna i eviti o redueixi les respostes d'estrès cel·lular que condueixen a processos proteolítics amb afecció no només de l'activitat enzimàtica sinó també dels rendiments de purificació respecte de la resta de proteïnes expressades pel microorganisme hoste.

A partir dels esquemes operacionals de partida (cultius induïts a partir d'un sol impuls d'inductor i alimentats en base a perfils exponencials pre-programats d'addició de nutrients durant la fase d'inducció), s'ha identificat l'acumulació de glucosa com a responsable de la materialització o acceleració dels mecanismes proteolítics de resposta cel·lular a la sobreexpressió de proteïna recombinant. A partir de tècniques de modelització, s'ha desenvolupat un model matemàtic semiempíric que permet dissenyar una trajectòria d'addició de nutrients a la fase d'inducció tal que eviti l'acumulació de glucosa al final d'aquesta etapa. El model descriu correctament l'evolució de la concentració de biomassa, glucosa i proteïna recombinant al sistema tant a la fase de creixement no induït com a la pròpia inducció. No s'inclou però l'evolució de l'activitat enzimàtica, que pot respondre a mecanismes de tipus no tant macroscòpics.

Per altra banda, l'observació de la dinàmica del procés durant l'etapa d'inducció ha permès observar que tot i l'augment de densitat òptica una vegada el cultiu ha estat induït, el creixement en termes de replicació és gairebé nul. En aquest sentit, el replantejament de les estratègies d'addició de nutrients a l'etapa d'inducció per d'altres



de més coherents amb el creixement observat (esquemes d'alimentació lineal en lloc de perfils exponencials pre-programats) ha portat a increments considerables de la quantitat de proteïna intracel·lular acumulada. Els resultats podrien explicar-se a partir d'una major homogeneïtat temporal de les condicions del cultiu evitant la necessitat de contínues readaptacions del microorganisme hoste a ambients canviants. Aquests perfils d'alimentació obren una via prometedora d'investigació que podria trencar amb els esquemes tradicionals d'alimentació de nutrients als cultius recombinants durant l'etapa d'inducció. Si més no però, degut a la dinàmica observada en el creixement del cultiu en termes de replicació durant l'etapa d'inducció, resulta necessari reformular el model proposat substituint el pes sec o la densitat òptica per la concentració cel·lular al medi ( $\text{cel}\cdot\text{L}^{-1}$ ) per tal de descriure l'evolució de la biomassa (X) al sistema.

L'addició de certs aminoàcids (principalment Leucina) al cultiu prèviament a la inducció ha portat a augments significatius de la qualitat de la proteïna recombinant sintetitzada respecte els esquemes de producció estàndard. Aquesta co-estratègia pot incidir en la resposta restrictiva cel·lular, que es manifesta típicament en forma de processos proteolítics, i pot assistir parcialment a l'elevada demanda d'aminoàcids com a conseqüència de la sobreexpressió de la proteïna recombinant. No obstant però, una política d'addició d'aminoàcids en un cultiu recombinant no es pot implementar aleatòriament, ja que l'addició de certs aminoàcids així com dosis relativament elevades d'aquests poden conduir a inhibicions en la síntesi d'altres aminoàcids ja que les rutes sintètiques es troben molt relacionades. En aquest treball s'ha estudiat l'efecte de determinats aminoàcids individualment en els rendiments del procés, ara bé, es creu convenient que l'estudi es porti un pas endavant i s'avaluï l'efecte de còctels o combinacions d'aminoàcids al sistema. A més, es considera oportú que l'addició d'aminoàcids al medi es pugui incloure en el model de creixement i producció proposat ja que permetria un nivell més d'optimització. Per altra banda, es creu que s'hauria d'avaluar en termes econòmics fins a quin punt és justificable l'encariment d'un procés productiu suplementat amb aminoàcids per l'increment de rendiments que pot proporcionar tenint en compte un hipotètic preu de mercat de l'aldolasa sintetitzada.

En últim lloc, s'ha comprovat que el procés estudiat a escala laboratori és viable a escala pilot. Els resultats obtinguts en aquesta plataforma com a conseqüència de la combinació d'estratègies implementades ha portat a resultats que han superat les previsions inicials. L'addició de Leucina així com la implementació de perfils lineals d'alimentació de nutrients a la fase d'inducció han conduït a millores importants tant de

la quantitat de proteïna intracel·lular acumulada com de l'activitat enzimàtica. No obstant però, només es disposa d'un estudi en planta pilot, de manera que es considera oportú un estudi més exhaustiu en aquesta escala implementant les millores que es puguin anar realitzant a escala laboratori.

Es creu que no s'ha explotat tot el potencial del procés, de manera que eines com la reformulació del model matemàtic, un estudi més rigorós de les estratègies d'alimentació de nutrients durant la fase d'inducció així com de la política d'alimentació d'aminoàcids i l'estudi del transport d'inductor a l'interior de la cèl·lula poden resultar de gran utilitat no només al procés d'estudi sinó també per a generalitzar a altres processos similars inclús amb diferents sistemes d'expressió.

## 10. LLISTAT DE PUBLICACIONS

### Articles procedents directament de la tesi

J. Ruiz, J. Pinsach, G. Álvaro, G. González, C. de Mas, D. Resina, J. López-Santín (2009). "Alternative production process strategies in E.coli improving protein quality and downstream yields". *Process Biochemistry*, 44:1039-1045.

J. Ruiz, G. González, C. de Mas, J. López-Santín (2011) "A semiempirical model to control the production of a recombinant aldolase in high cell density cultures of *Escherichia coli*" *Biochemical Engineering Journal*, 55:82-91.

J.Ruiz, C. de Mas, G. González, J. López-Santín (2012) "From laboratory to pilot plant *E. coli* fed-batch cultures: optimizing the cellular environment for protein maximization". En preparació.

### Articles relacionats amb experteses adquirides amb la tesi

A. Fernández, J. Ruiz, G. Caminal, J. López-Santín (2010) "Development and validation of a Liquid Chromatography-Mass Spectrometry assay for the quantitation of IPTG in *E. coli* fed-batch cultures". *Analytical Chemistry*, 82:5728-5734.

N. Bozic, J. Ruiz, J. López-Santín, Z. Vujcic (2011) "Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a" *Biochemical Engineering Journal*, 53:203-209.

N. Bozic, J. Ruiz, J. López-Santín, Z. Vujcic (2011) "Optimization of the growth and  $\alpha$ -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flasks and laboratory fermenter batch cultures" *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76:965-972