



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA  
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

PRODUCCIÓ DE FUCULOSA-1-  
FOSFAT ALDOLASA  
RECOMBINANT EN *E.coli*

---

Memòria que per optar al grau de doctor per  
la *Universitat Autònoma de Barcelona* presenta

**Olga Durany Türk**

27 de Març de 2003

## AGRAÏMENTS

*En primer lloc vull agrair als meus “supervisors”, Josep Lopez Santín i Carles de Mas, tota la dedicació, l'interès i el temps que han invertit en aquest treball. Han estat quatre anys compartint aquest projecte i em queden un munt de records. Gràcies per tot: per tot el que he après al vostre costat i pel vostre recolzament sempre que ha estat necessari, a tots els nivells.*

*També al meu “supervisor” especialista en temes de Biologia Molecular, al Pau Ferrer. Moltes gràcies pel teu interès, assessorament i hores de dedicació a aquest treball.*

*Agrair també a la Glòria Caminal la seva més que activa col·laboració. Per a tu i per al Carles la FB-2, record d'una mítica i llarga nit d'experimental. Provablement, la nit més grata de totes les que s'han invertit en aquest treball i sense dubte, la més divertida i esperançadora. Gràcies.*

*A tota la resta del grup d'enzims: Glòria, Dolors, Goyo, Trini, Lluís i Jaume. Per compartir la ingratitud d'aquesta família d'aldolases que no ens porta més que mals de cap. I al Juan Carlos Hurtado, per la seva implicació en aquest projecte que ens ha deixat un programa d'addició fantàstic i moltes enrabiades a peu de fermentador per posar-lo en marxa. Gracias (vale por unas tapas).*

*A tota la gent d'aquest departament que d'alguna manera ha participat en aquest treball. A tots una mica, gràcies. Molt especialment a la Rosi: no només pel seu gran ajut a nivell experimental (cap dels experiments que recull aquest treball hagués estat possibles sense ella) sinó per ser tan maca, tan persona i tan amiga. Un besazo. Gracias.*

*A la Cristina, a la Claudia i al Chicho, al Julián i a l'Alicia, per fer que els primers anys d'aquesta tesi fossin inoblidables. Pocajontas, Cris i guapa... com us he trobat a faltar pels passadissos d'aquesta casa. Sense dubte el millor premi d'aquesta aventura ha estat la vostra amistat. No ha estat bé deixar-me sola... però ja us he perdonat ...*

*Many thanks to Liz (from Olga da Polga): just my angel in U.K. I have no words to thank you all the wonderful time spent together. For making me feel at home since the first moment in Occupation 47 and introduce me in “oatcake culture”. Thanks my duck!!!*

*Thanks very much Rocky, Amanda, Phil, Mathieu, Julian and all people at Cobra for all their support and help in this work but, overall, for making me feel extremely welcome during my stage in Keele. Thanks Phil for learning a “second English” for Olga's understanding and to make possible every fermentation experiment during my stage. Thanks Amanda for coming back work after guitar lessons, for all her support and interest in this project. And special thanks to Rocky, not only for all the successful work together but just for taking care of me during all my stage and being the best tourist guide in U.K.: no one else but us have ever made all the walk around Chester's city walls !!! I could not be more grateful.*

*No voldria fer-te sentir malament ara per protagonista... però sense dubte et mereixes un paràgraf exclusiu. Gràcies per tot Alicia: simplement perquè sé que si hagués volgut les tapes a punt de creu... tu haguessis estat disposada a aprendre a cosir. També gràcies a la teva família d'artistes per fer-me un racó. I pensar que em vas caure fatal quan et vaig conèixer...*

*Molt especialment, a la Martínez i a la Planes. Per la seva amistat, que no té res a veure amb aquest treball però que, indirectament, ha ajudat un munt a que hagi estat possible. I al Pérez, per participar tant activament de les meves il·lusions, compartir amb mi tantes coses i haver-me animat tant a seguir endavant i acabar aquest projecte.*

*No puc deixar d'agrair a la Fundació Durany-Türk la seva beca per la realització d'aquest treball: altruista, generosa i implicada, no es pot comparar amb cap dels altres ajuts econòmics que han fet possible aquest treball: sempre insuficients i fora de termini.*

*I arribo al final... a la meva família. Vull agrair als meus germans (y adjuntos) i als meus pares tot el seu suport i ànims sempre que ha estat necessari. Gràcies sobretot per intentar fer-me les coses fàcils quan s'han posat tant difícils per tots i jo no hi era. Molt especialment a la meva mare, que s'ha involucrat de tal forma en aquesta tesi que només li ha faltat encarregar-se d'escriure un capítol. A la Gemma... per estar aquí, amb aquests ulls tan verds i haver renovat la il·lusió de tots.*

*I "al más de los mases" (alias "Pep"). Un cop vas dir "primer acabar la tesi i després temps per nosaltres..." crec que en cap moment eres conscient del que això suposava i tot i així has sigut conseqüent. Gràcies per molt més que fer-me costat i posar-me les coses fàcils a nivell "d'activitat domèstica". Gràcies per fer-me feliç.*

Josep LÓPEZ SANTÍN, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i Carles DE MAS ROCABAYERA, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM :

Que la llicenciada Olga Durany Türk ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball que amb títol "**Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli***", presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per a què en prenguem coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem i apadrinem davant de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentat treball, signant aquesta certificació a Bellaterra, 27 de Març de 2003.

Josep López Santín

Carles de Mas Rocabayera

# ÍNDEX

## SUMARI

## ABREVIATURES

## INTRODUCCIÓ

1. Aplicació d'enzims com a catalitzadors en síntesi asimètrica.....	1
1.1. Noves estratègies en la síntesi de carbohidrats.....	2
2. Les liases	
2.1. Definició i classificació de liases.....	3
2.2. Les aldolases.....	6
2.2.1. La reacció d'addició aldòlica.....	6
2.2.2. Classificació de les aldolases.....	7
2.2.3. Aldolases dependents de DHAP.....	11
3. Objectius del projecte de recerca.....	14
4. Producció de Fuc-1-PA a partir de la soca recombinant d' <i>E.coli XL1 Blue MRF'</i> ( <i>pTrcfuc</i> ).....	19
4.1. Fuculosa-1-fosfat aldolasa d' <i>E.coli</i> . Obtenció i caracterització.....	19
4.2. Antecedents: cultiu d' <i>E.coli XL1 Blue MRF'</i> ( <i>pTrcfuc</i> ) en Erlenmeyer i medi LB.....	20
4.3. Planificació d'una estratègia semicontínua per al cultiu d' <i>E.coli XL1 Blue MRF'</i> ( <i>pTrcfuc</i> ).....	21
4.3.1 Elecció d'una estratègia d'alimentació.....	23
<b>OBJECTIUS</b> .....	25

## DESCRIPCIÓ I DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

<b>I. Assaig enzimàtic</b> .....	26
I.1. Assaig enzimàtic proposat per la quantificació de l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA.....	27
I.1.1. Elecció d'una presentació comercial de $\alpha$ -glicerofosfat deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) com enzim catalític a la reacció acoblada .....	29
I.1.2. Nivell de saturació del substrat específic Fuc-1-P a l'assaig d'activitat definit.....	31
I.2. Validació de l'assaig enzimàtic proposat per a la quantificació de Fuc-1-PA....	34
I.2.1. Validació del mètode de la sal disòdica.....	36
I.2.2. Validació del mètode de la sal de ciclohexilamina.....	38

<b>II. Síntesi enzimàtica de fuculosa-1-fosfat</b> .....	42
II.1. Síntesi Fuc-1-P (Na) <sub>2</sub> .....	44
II.2. Síntesi Fuc-1-P (CHA) <sub>2</sub> .....	47
<b>III. Millora del medi de cultiu d'<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) per la producció de Fuc-1-PA</b> .....	51
III.1. Producció de Fuc-1-PA en cultiu discontinu i medi complex LB.....	51
III.2. Disseny d'un medi semidefinit per al cultiu d' <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).....	54
III.3. Estudis preliminars del creixement d' <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en medi MSC per a la producció de Fuc-1-PA.....	58
III.3.1. Creixement d' <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) no induïda en medi MSC.....	59
III.3.1.1. Cultius discontinus en medi MSC.....	59
III.3.1.2. Cultius semicontinus ( <i>fed-batch</i> ) en medi MSC.....	62
III.3.2. Comparació dels nivells d'expressió de Fuc-1-PA en medi complex LB i medi semidefinit MSC.....	69
<b>CONCLUSIONS</b> .....	74
<b>MATERIALS I MÈTODES</b>	
<b>1. Equip general</b> .....	75
<b>2. Material Biològic</b> .....	76
2.1. Descripció de la soca <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).....	76
2.2. Conservació i manipulació de la soca <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).....	77
2.2.1. Revifament a partir de glicerinars.....	78
2.2.2. Preparació de glicerinars.....	78
<b>3. Medis de cultiu i suplementes</b> .....	78
3.1. Medi LB.....	78
3.2. Medi semidefinit MSC.....	79
3.3. Medi alimentat en cultius semicontinus.....	80
3.4. Solució estoc ampicil·lina.....	81
3.5. Solució estoc Vitamina B <sub>1</sub> .....	81
3.6. Solució estoc IPTG.....	81

<b>4. Sistemes de cultiu d'<i>E.coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcfuc)</b> .....	82
4.1. Creixement en Erlenmeyer.....	82
4.2. Creixement en fermentador.....	82
4.2.1. Equip.....	82
4.2.2. Operació en discontinu ( <i>batch</i> ).....	83
4.2.3. Operació en semicontinu ( <i>fed-batch</i> ).....	83
4.3. Presa de mostres.....	84
<b>5. Mètodes analítics per al seguiment dels cultius</b> .....	84
5.1. Avaluació de la biomassa.....	84
5.1.1. Determinació del pes sec.....	85
5.1.2. Lectura de densitat òptica.....	85
5.1.3. Correlació entre el pes sec i la densitat òptica a 600 nm en medi MSC.....	85
5.2. Determinació de la concentració de substrats i metabòlits.....	86
5.2.1. Anàlisi de glucosa.....	86
5.2.2. Anàlisi d'amoni.....	86
5.2.3. Anàlisi d'acetat i lactat.....	87
5.3. Anàlisi de Fuc-1-PA.....	88
5.3.1. Electroforesi discontinua en SDS (SDS-PAGE).....	88
5.3.1.1. Preparació de mostres.....	88
5.3.1.2. Protocol d'electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE.....	90
5.3.1.3. Mètodes de tinció dels gels.....	92
5.3.1.3.1. Tinció amb blau de Coomassie.....	92
5.3.1.3.2. Tinció amb nitrat de plata.....	93
5.3.1.3.3. Conservació dels gels.....	93
5.3.2. Mesura de l'activitat enzimàtica específica de Fuc-1-PA.....	93
5.3.2.1. Preparació de mostres.....	93
5.3.2.2. Protocol per l'assaig enzimàtic.....	95
<b>6. Síntesi Fuc-1-P</b> .....	97
6.1. Síntesi L-lactaldehid (L-lac).....	97
6.2. Síntesi Dihidroxiacetona fosfat (DHAP).....	99
6.3. Síntesi sal disòdica de L-fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P Na <sub>2</sub> ).....	99
6.4. Síntesi sal diciclohexilamina de L-fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> .....	100

<b>7. Mètodes analítics per al seguiment i valoració de la síntesi de substrats.....</b>	<b>102</b>
7.1. Determinació de la concentració de L-lac.....	102
7.2. Determinació de la concentració de DHAP.....	103
7.3. Caracterització i control de puresa en la síntesi de Fuc-1-P (CHA) <sub>2</sub> .....	104
7.4. Seguiment de síntesi per cromatografia de capa fina.....	105
<b>8. Purificació Fuc-1-PA.....</b>	<b>106</b>
8.1. Equip.....	106
8.2. Preparació de les mostres de cultiu a purificar.....	106
8.3. Protocol de purificació de Fuc-1-PA.....	107
<b>APÈNDIX</b>	
1. Dades experimentals en la validació de l'assaig enzimàtic de Fuc-1-PA.....	109
2. Caracterització per resonància magnètica nuclear del producte de síntesi Fuc-1-P(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> .....	113
3. Dades corrsponents a les fermentacions amb <i>E.coli XL1 Blue MRF'</i> ( <i>pTrcfuc</i> ).....	116
4. Correlació entre pes sec i lectura de densitat òptica a 600 nm .....	119
5. Recta de calibrat per la quantificació de 1,2-isopropanodiol per HPLC .....	120
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>121</b>



## SUMARI

En l'actualitat es coneix un gran ventall d'enzims naturals capaços de catalitzar la formació d'enllaços carboni-carboni amb estereoquímica definida que obren noves perspectives en el camp de la síntesi asimètrica aportant solucions sintètiques en camps difícils d'abordar des de la perspectiva de la síntesi orgànica convencional. Aquests enzims són bàsicament aldolases i transcetolases. En concret es coneix una família de quatre aldolases depenents de DHAP que catalitzen la formació d'un enllaç C-C amb generació de dos nous centres quirals amb estereoquímica definida i complementària: segons l'aldolasa utilitzada s'obindrà de forma específica un dels quatre diaestereoisòmers possibles. Aquesta família d'aldolases ha despertat un gran interès com a eina sintètica.

El projecte en que s'emmarca aquesta tesi aposta per l'estudi d'aquest grup de biocatalitzadors i pretén contribuir al desenvolupament pràctic de les aldolases centrant-se en els aspectes de producció dels enzims i en el desenvolupament de metodologia per a la seva utilització en síntesi quiral.

En aquesta memòria de tesi doctoral s'estudia la millora de producció de l'aldolasa Fuc-1-PA en *E.coli*, com enzim model d'aquesta família d'aldolases depenents de DHAP. L'objectiu és definir un procés optimitzat i reproduïble per a la seva obtenció a escala productiva. Amb aquest objectiu global, es consideren els principals aspectes que condicionen la sobreexpressió de proteïnes recombinants *E.coli*. Primer, s'estudia la influència de la composició del medi de cultiu en el creixement i sobreexpressió recombinant. Segon, es treballa en el desenvolupament d'una estratègia de cultiu semicontínua adequada per assolir cultius d'alta densitat cel.lular de forma reproduïble. Un cop fixades les condicions d'operació per al creixement segons aquesta estratègia semicontínua, és possible definir els criteris d'inducció per maximitzar la producció de Fuc-1-PA al procés. Finalment, s'aborda la millora genètica del procés provant un nou sistema d'expressió recombinant desenvolupat pensant en la seva aplicació a escala de producció.

## ABREVIATURES

- aa : aminoàcid
- AcOH : àcid acètic
- CADC : cultius d'alta densitat cel.lular
- CHA : ciclohexilamina
- Da : Dalton
- DAP : tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa
- *DapD* : gen codificant per DAP
- DHAP : dihidroxiacetonafosfat
- DNA : àcid desoxirribonucleic
- dsDNA : (de l'anglès *double strain*) DNA de doble cadena
- D.O. : densitat òptica
- *E. coli* : *Escherichia coli*
- EDTA : àcid etilendiaminotetracètic
- FDPA : fructosa-1,6-bifosfat aldolasa
- Fuc-1-P : fuculosa-1-fosfat
- Fuc-1-PA : fuculosa-1-fosfat aldolasa
- FucI : fucosa isomerasa
- FucK : fuculoquinasa
- G3P : D-gliceraldehid-3-fosfat
- $\alpha$ -GDH :  $\alpha$ -glicerofosfat deshidrogenasa
- IPTG : isopropil- $\beta$ -tiogalactopirànòsid
- kb : kilobasa
- kDa : kilodaltons
- LB : medi complex Luria Bertani
- L-Fuc-1-P : L-fuculosa-1-fosfat
- L-lac : L-lactaldehid
- MeOH : metanol
- MD: medi definit proposat en aquest treball per al cultiu d'*E.coli* a baixes densitats cel.lulars
- MD-FB: medi definit proposat en aquest treball per al cultiu d'*E.coli* a altes densitats cel.lulars en l'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa estudiada
- m-RNA : àcid ribonucleic missatger
- MSC : medi semidefinit proposat en aquest treball per al cultiu d'*E.coli* a baixes densitats cel.lulars
- $\beta$ -NAD :  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleòtid, forma oxidada
- $\beta$ -NADH :  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleòtid, forma reduïda
- ORT : (de l'anglès *Operator Repressor Titration Expression System*) sistema d'expressió per competència al repressor.
- PEP : fosfoenolpiruvat
- PK : piruvat quinasa
- PS : biomassa seca

## Abreviatures.

- p/v : pes /volum
- RAMA : FDPA de múscul de conill
- RhaI : rhamnosa isomerasa
- Rham-1-PA ; rhamnulosa-1-fosfat aldolasa
- RhuK : rhamnuloquinasa
- rpm : revolucions per minut
- SDS : (de l'anglès *sodium dodecil sulfate*) lauril sulfat sòdic
- SDS-PAGE : electroforesi discontinua desnaturalitzant en gel de poliacrilamida-SDS
- TDPA : tagatosa-1,6-bifosfat aldolasa
- TEMED : N,N-N',N'-tetrametilendiamina
- TPI : triosafosfat isomerasa
- TPP : tiamina pirofosfat
- Tris : Tris(hidroximetil)-aminometà
- UA : unitat d'activitat
- UDO : unitats de densitat òptica
- UFC : unitats formadores de colònies
- UV : ultraviolat
- $Y_{ap\ x/glucosa}$  : rendiment aparent de glucosa a biomassa (g biomassa seca per g glucosa)
- $Y_{x/glucosa}$  : rendiment de glucosa a biomassa (g biomassa seca per g glucosa)
- $Y_{i/j}$  : coeficient de consum relatiu de i respecte a j (g i per g de j)
- $\mu$  : velocitat de creixement ( $h^{-1}$ )
- $\mu_{m\grave{a}x}$  : velocitat de creixement ( $h^{-1}$ )

## I. PRÒLEG

Aquesta memòria de tesi doctoral s'ha estructurat al voltant de tres capítols centrals en que s'estudien els principals aspectes que influencien la sobreexpressió recombinant de proteïnes en *E.coli*. A més de la Introducció General (Capítol II) en que es presenten aspectes globals en relació al treball realitzat, cada un d'aquests capítols consta d'una introducció específica sobre el tema en que es centra, la presentació i discussió de resultats obtinguts i un apartat de conclusions parcials enfocat al tema estudiat. Finalment, amb l'objectiu de relacionar els resultats obtinguts en els diferents capítols, es presenta un capítol de conclusions globals (Capítol VIII).

Tot i que part del treball de recerca s'ha realitzat als laboratoris del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i part als laboratoris de l'empresa Cobra Bio-manufacturing (Keele, U.K.), la memòria inclou un únic apartat de Materials i Mètodes (Capítol IV). Només quan es necessari, es detallen els diferents procediments segons el laboratori on s'ha realitzat l'experiència.

L'acció d'un agent terapèutic als organismes vius, ja sigui com inhibidor enzimàtic o per unió a receptor, depèn, en la majoria de casos, de la seva estereoquímica (Ariens, 1989; Ariens, 1992). Està àmpliament demostrat que l'activitat biològica, la toxicitat i el metabolisme poden variar dràsticament per als enantiòmers o epímers d'una mateixa substància (Baillie i Schultz, 1997). Existeixen molts exemples en que un enantiòmer d'un compost quiral és terapèuticament útil mentre que l'altre no, o que un té caràcter agonista mentre que l'altre és antagonista (Ariens, 1989; Ariens 1992). En determinades ocasions, l'ús de mescles racèmiques augmenta els efectes secundaris i la toxicitat potencial d'un determinat fàrmac.

Des del punt de vista legal, la reglamentació actual per al registre de productes racèmics és molt més rigorosa que per als productes enantiomèrics purs (Stinson, 1992; Stinson, 1998). La mescla racèmica d'un fàrmac quiral és considerada com combinació de fàrmacs i, conseqüentment, les proves clíniques i de toxicologia han de realitzar-se per a cada enantiòmer per separat. L'interès per a l'obtenció de substàncies enantiomèricament pures està en auge des de començament dels anys 90 sent una àrea prioritària de la indústria de química fina i en la que constantment es treballa en la recerca i desenvolupament de noves metodologies que facilitin l'obtenció d'aquests compostos òpticament purs (Stinson, 2001).

S'han produït grans avenços en tècniques per a l'obtenció de substàncies òpticament actives en el camp de la síntesi orgànica convencional per a la seva aplicació a nivell productiu per a la indústria farmacèutica. Aquestes tècniques són bàsicament: síntesi asimètrica, mètodes de resolució catalítica, cristal·lització estereoselectiva i cromatografia quiral. Però l'aproximació racional al desenvolupament de nous agents terapèutics requereix del disseny, la síntesi i l'estudi d'un rang de molècules que poden ser difícilment assequibles amb la metodologia de la química de síntesi clàssica.

De les eines de que es disposa per afrontar la síntesi asimètrica de compostos amb interès terapèutic destaca la utilització de biocatalitzadors (Margolin, 1993; Carrea i Ottolina, 2000; Bornscheuer, 1999). Els biocatalitzadors, entenent enzims purificats o

microorganismes, presenten com a principal avantatge la seva selectivitat a quatre nivells: selectivitat per substrat, quimioselectivitat, regioselectivitat i estereoselectivitat. Això fa que en moltes ocasions el seu ús eviti la necessitat d'etapes de protecció i desprotecció selectiva de grup funcionals típics de la via sintètica convencional. Per altra banda, també posseeixen una alta reactivitat en condicions de reacció suaus: els processos són més nets, més respectuosos amb el medi ambient (química verda, (Ritter, 2001)) i de menor consum energètic. Són catalitzadors completament biodegradables. Per tots aquests motius, cada cop es valora més el gran potencial dels biocatalitzadors per solucionar problemes en la síntesi quiral.

La biocatàlisi, com a camp emergent en síntesi asimètrica, precisa de la recerca bàsica i del desenvolupament multidisciplinar per a la seva aplicació com eina versàtil del químic sintètic (Rozzell, 1999). Generalment, l'èxit en el disseny d'una síntesi queda determinat pel nombre d'opcions de que es disposa per abordar un pas de síntesi específic. En aquest context, els grups de recerca capaços de desenvolupar i d'utilitzar nous biocatalitzadors específics per a les seves necessitats tindran un clar avantatge per afrontar els nous reptes sintètics cada cop més freqüents a mida que avança el coneixement en l'àrea d'interacció química-biologia.

Però per què no s'arriba a desenvolupar aquest gran potencial dels biocatalitzadors com alternativa a la química convencional quiral? Per què només en molts poc casos es consideren realment una alternativa a nivell de producció industrial (Rozzell, 1999)?. El principal problema al que s'enfronta la biocatàlisi com alternativa d'aplicació industrial (tant en línies de producció, com a nivell de recerca i millora de vies sintètiques en laboratori o planta pilot) és la disponibilitat dels enzims necessaris, el seu cost elevat si hi ha cap firma que els produeixi i la gran labilitat d'aquestes biocatalitzadors a les condicions de reacció habituals dels processos de química convencional amb els que es volen fer compatibles. Per poder disposar realment d'aquesta alternativa de síntesi es fa necessari invertir esforços en el desenvolupament de processos eficaços i barats per a la producció d'enzims que permetin disposar de quantitats suficients per poder estudiar i optimitzar aspectes relacionats amb la seva utilització: condicions de reacció adequades i vies que

permetin allargar la seva vida operacional, com és la immobilització, per estabilitzar-los i reutilitzar-los (Guisán i col, 1993).

### **II.1. ALDOLASES: BIOCATALITZADORS D'INTERÈS EN SÍNTESI QUIRAL**

Un tipus d'enzims que han despertat un gran interès en síntesi orgànica són les liases (van der Werf i col., 1994). Les liases són enzims capaços de catalitzar la formació o lisi selectiva d'enllaços carboni-carboni, carboni-oxigen o carboni-nitrogen. Entre elles destaquen les aldolases, que catalitzen reaccions de condensació aldòlica entre un aldehyd i una cetona de forma estereoselectiva (Fessner i Walter, 1997; Fessner, 2000; Machajewski, 2000).

Les aldolases varen ser descobertes com enzims que catalitzen la interconversió entre hexoses i els seus components de tres carbonis cap a començament de segle. Actualment, es sap que la mateixa activitat catalítica es dona sobre un marge de substrats molt més ampli i integren aquest grup tot un conjunt d'enzims capaços de catalitzar l'addició estereoespecífica d'un donador cetònic a un acceptor aldehyd (addició aldòlica) amb la conseqüent integració d'un fragment de 1, 2 o 3 carbonis (Toone i col., 1989).

La formació estereoselectiva d'enllaços carboni-carboni és un objectiu de màxim interès en síntesi orgànica. La majoria dels mètodes químics convencionals presenten inconvenients derivats de l'ús de reactius que requereixen condicions de reacció estrictament anhidres en medis de reacció orgànics. En moltes ocasions, això comporta la necessitat de dissolvents tòxics i/o inflamables i l'escalat industrial del procés resulta inviable. Front aquesta problemàtica, es fa especialment atractiva l'alternativa de la biocatàlisi: l'ús d'aldolases pot fer viables les mateixes reaccions en medis d'alt contingut en aigua i en condicions suaus de reacció.

## II.1.1. LA REACCIÓ D'ADDICIÓ ALDÒLICA

Al marge de la problemàtica associada als medis de reacció anhidres, l'interès dels químics orgànics en aquests enzims es pot entendre si s'analitza la reacció d'addició aldòlica des del punt de vista de la química convencional. Químicament, aquesta reacció progressa en medi bàsic quan es potencia el caràcter àcid dels hidrògens en posició  $\alpha$  al grup carbonil de cetones i aldehids. La reacció comprèn l'atac del carboni desprotonat en posició  $\alpha$  de l'aldehid o cetona donador al carboni del grup carbonil del aldehid o cetona acceptor amb la conseqüent formació d'un  $\beta$ -hidroxialdehid o un  $\beta$ -cetoaldehid, segons el següent mecanisme de reacció (Fig. II. 1.):

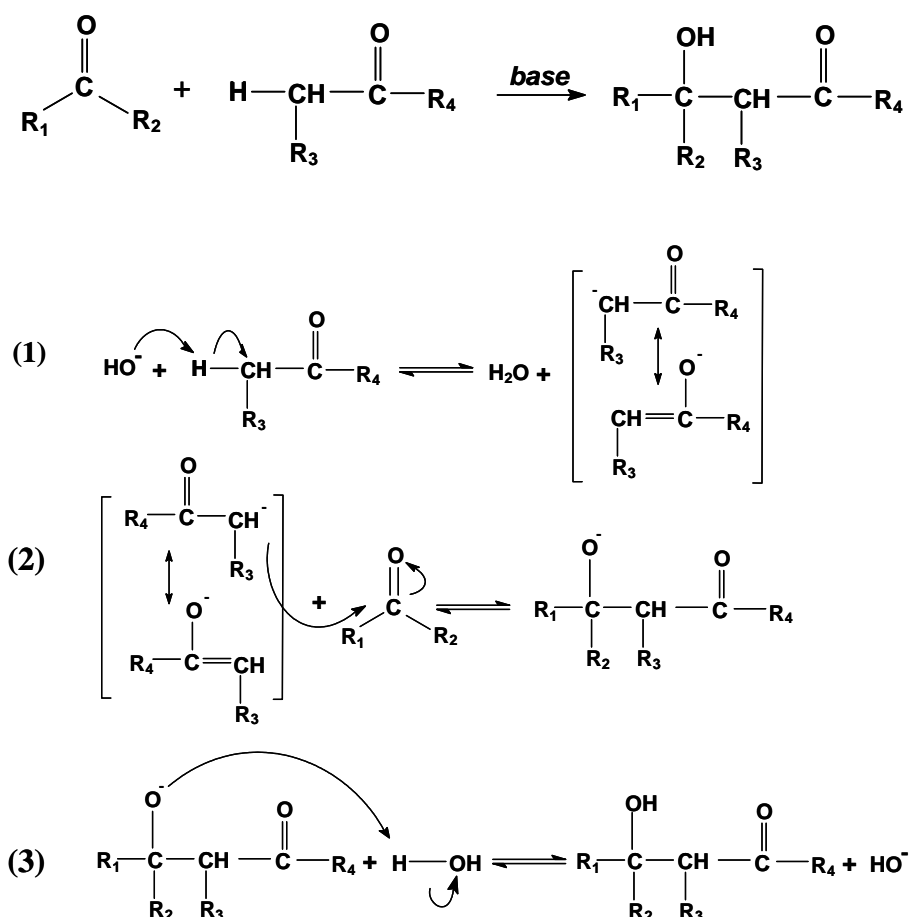
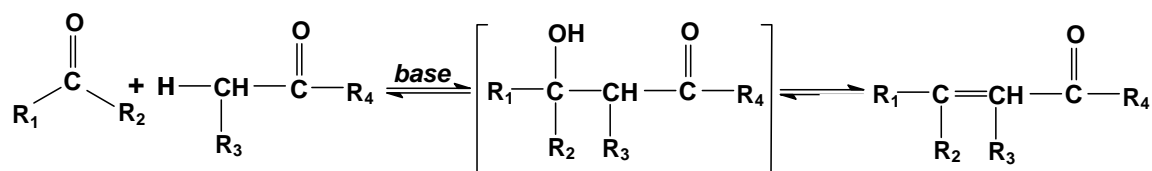


Figura II.1. Mecanisme de la reacció d'addició aldòlica



Aquesta addició pot convertir-se en condensació per escalfament de la barreja de reacció i, en molts casos, aquesta segona reacció és tan ràpida que no s'arriba a obtenir el producte d'addició (Solomons, 1982) (Figura.II.2.).



**Figura II.2.** Condensació aldòlica a partir del producte d'addició aldòlica.

En principi, hi ha cinc possibles combinacions per a aquesta reacció: 1) dos aldehyds idèntics, 2) dos cetones idèntiques, 3) dos aldehyds diferents, 4) dos cetones diferents i 5) un alhèid i una cetona. La combinació 1) té un equilibri favorable, al contrari que la 2). La combinació 4) és difícil d'aplicar. La combinació 3) pot rendir fins a quatre productes diferents quan ambdós aldehyds tenen un hidrogen en posició  $\alpha$ . L'última combinació, 5), també anomenada reacció de Claisen-Schmidt, porta a un únic producte quan l'alhèid no té un hidrogen en posició  $\alpha$ .

Així, l'aplicació de la reacció d'addició aldòlica en síntesi orgànica queda limitada bàsicament per dos problemes:

- A excepció de determinats casos d'impediment estèric, la reacció no és estereoespecífica obtenint-se el producte racèmic pel carboni quiral format en la reacció.
- És evident que la reacció entre aldehyds o cetones de partida diferents no té interès, ja que per cada parell inicial és possible obtenir fins a quatre possibles productes d'addició de difícil separació.



A més, depenent dels reactants, la reacció aldòlica pot crear dos centres estereogènics contigus i, en conseqüència, quatre esteroisòmers. Una via per poder controlar l'estereoselectivitat en la reacció catalitzada en medi bàsic és partir dels corresponents enolats amb metalls (Arnett i col., 1990). L'enantioselectivitat només es pot controlar utilitzant derivats enòlics quirals, aldehids o cetones quirals, o ambdós.

L'addició aldòlica catalitzada per aldolases progressa en base al mateix esquema (Figura.II.1.) però permet obtenir el producte d'addició desitjat donada la gran especificitat de l'enzim pel donador aldol i amb una estereoquímica definida segons l'estereoespecificitat que caracteritzi l'aldolasa escollida.

Mentre que la reacció catalitzada en medi bàsic és només enantioselectiva quan es treballa amb quantitats estequiomètriques de substrats quirals purs, l'aplicació d'aldolases com a biocatalitzadors de la mateixa reacció pot rendir productes enantiomèricament purs a partir de substrats no quirals. També, quan la reacció aldòlica es catalitza en medi bàsic, es fa complicat treballar amb aldehids o cetones amb grups hidroxils o altres grups actius per a la reacció fent necessari recórrer a passos de protecció i desprotecció selectius. Les aldolases poden ser totalment regioselectives, reduint la química de protecció al mínim.

Un aspecte molt atractiu és la bona activitat de les aldolases amb compostos hidroxilats donat el seu paper natural en el metabolisme de carbohidrats. Per aquest mateix motiu, el seu medi natural de reacció és aquós i les condicions de reacció òptimes suaus (aigua, pH al voltant de 7,0) i no són necessaris l'ús de bases fortes ni solvents orgànics. La seva estereoespecificitat i tots aquests aspectes en relació a les condicions de reacció les fan especialment atractives per a la síntesi de carbohidrats: camp en que el químic orgànic es troba especialment limitat amb les eines de síntesi convencionals.

### II.1.2. CLASSIFICACIÓ DE LES ALDOLASES

Com ja s'ha comentat, les aldolases estan majoritàriament implicades en el metabolisme de carbohidrats encara que també en el d'aminoàcids i hidroxidàcids. Els carbohidrats juguen un paper clau en molts processos biològics. Cada cop és més evident la seva importància en l'enteniment de la comunicació intra i extra cel·lular ja que són elements claus en el reconeixement intermolecular. Serveixen com a llocs d'unió d'anticossos, enzims, hormones, toxines, bacteris, drogues i virus i és coneguda la seva implicació en els processos de creixement, resposta immunològica, inflamació i metàstasi entre d'altres de reconeixement cel·lular. També tenen funcions estructurals dins la cèl·lula: com a reserva d'energia i com a components claus de superfície cel·lular entre d'altres. (Toone i col., 1989).

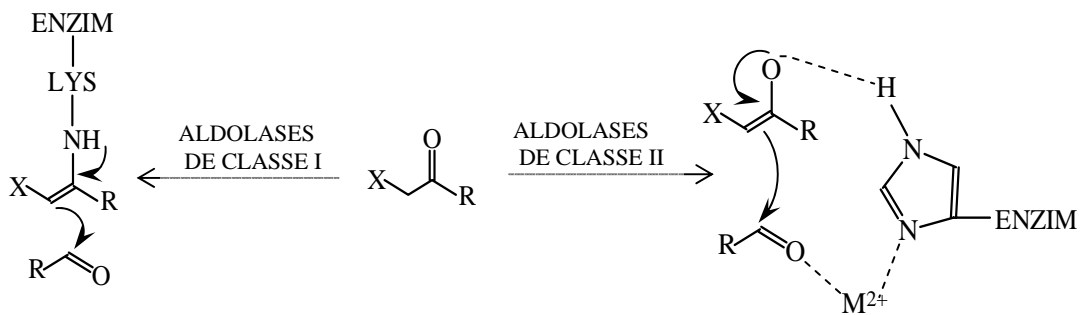
Tot aquest ventall de funcions biològiques ha despertat un interès creixent en disposar de tècniques sintètiques que permetin accedir tant a l'estructura dels carbohidrats naturals com a la d'anàlegs estructurals que puguin funcionar com agonistes o antagonistes en el seu paper biològic o que simplement permetin estudiar aquest paper biològic a nivell de coneixement bàsic. Altres àrees d'interès per a la seva síntesi són l'obtenció de polímers biodegradables a utilitzar en el direccionament i dossificació en l'acció de fàrmacs i accedir a noves formes no metabolitzables de substitutius alimentaris i edulcorants de baix valor calòric. (Toone i col., 1989).

Els carbohidrats són sintèticament abordables mitjançant l'aplicació d'aldolases. Tot i que el paper biològic d'aquests enzims està generalment relacionat amb la seva degradació, les reaccions són reversibles i escollint les condicions de reacció adequades s'afavoreix la síntesi.

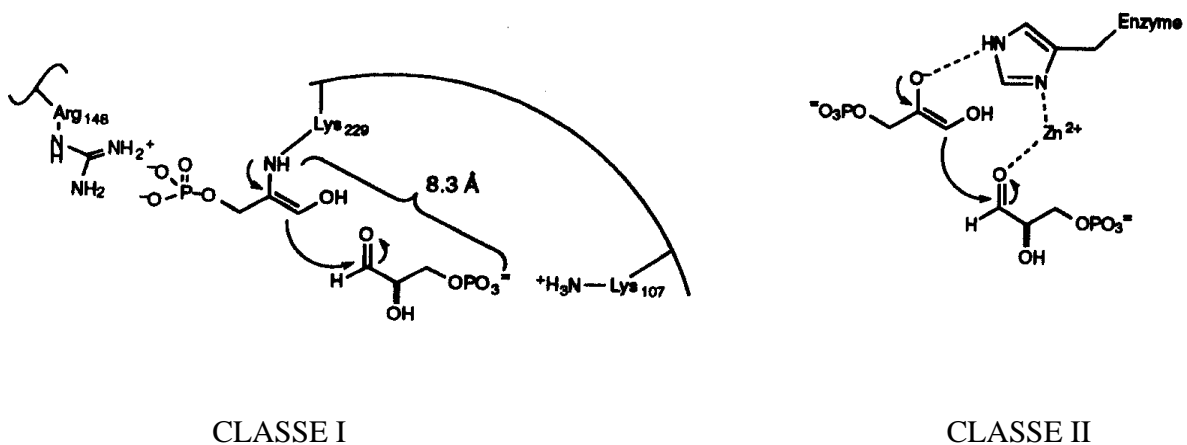
S'han descrit més de 30 tipus d'aldolases (Henderson i Toone, 1999) de diferents fonts biològiques (en eucariotes i en procariotes) que es poden classificar en base a dos criteris: el seu mecanisme d'actuació i l'especificitat pel grup donador.

Mecanísticament, es poden distingir dos tipus segons la manera en que s'activa el donador per a la reacció d'addició. Es parla d'aldolases de classe I i de classe II. A la Figura II.3.(a) es mostra l'esquema general d'activació en ambdós casos (Rasor, 1995). A la Figura II.3.(b) es mostra l'aproximació del grup de recerca del Dr. Wong (Scripps Ins.) als dos mecanismes d'actuació en base als seus estudis amb fructosa-1,6-bifosfat aldolasa (Henderson i col., 1994). Aquests mecanismes s'han confirmat posteriorment per anàlisi estructural per cristal·lografia de raig X (Blom i col., 1997; Dreyer and Schulz, 1996).

(a).



(b).



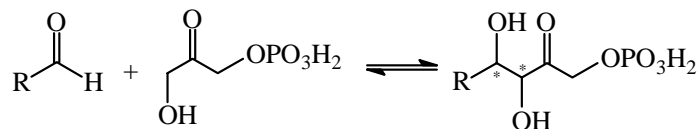
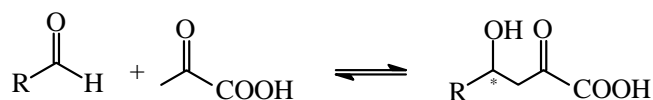
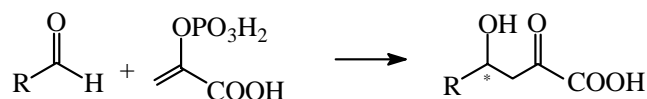
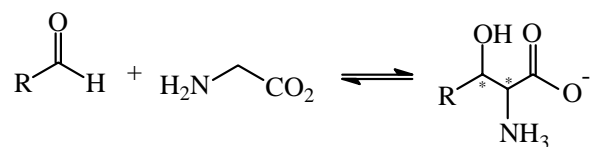
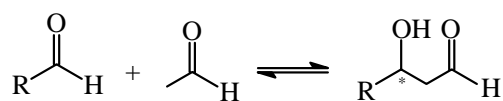
**Figura II.3.** Classificació d'aldolases segons el mecanisme d'actuació. (a). Esquema general (Rasor i col., 1995) (b) Aproximació en el cas concret de la fructosa-1,6-bifosfat aldolasa (Henderson i col., 1994).

Les aldolases de classe I aconsegueixen la desprotonització del substrat per formació d'una base covalent de Schiff entre el substrat i un residu lisina, essencial catalíticament, localitzat en el centre actiu, que serveix per estabilitzar el carbanió intermedi. Es troben generalment en plantes i animals superiors.

Les aldolases de classe II requereixen com a cofactor un catió divalent, generalment  $Zn^{2+}$ , que actua com a àcid de Lewis per facilitar la desprotonització. Es troben en bacteris i fongs.

En general, les aldolases de classe II són més estables que les de classe I. Els dos tipus es caracteritzen per una alta especificitat pel substrat donador però, en canvi, la seva especificitat pel substrat acceptor és molt més relaxada. L'estereoespecificitat de la reacció queda en general controlada per l'enzim i no per l'estructura o estereoquímica del substrat, característica que fa molt predictable l'estereoquímica del producte. La predictivitat de l'estereoquímica del producte de reacció, junt amb la possibilitat d'actuar sobre un nombre considerable de substrats ha fomentat l'interès en aquests enzims pel seu ús en síntesi quiral (Takayama i col., 1997).

Independentment de la classificació mecanística, les aldolases que han estat estudiades per al seu ús en síntesi poden dividir-se en quatre grups segons la seva especificitat pel grup donador: (a) aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP), (b) les dependents de piruvat o fosfoenolpiruvat (PEP), (c) les dependents de glicina i (d) les dependents d'acetaldehid (amb DERA, 2-deoxiribosa-5-fosfat aldolasa, com a únic membre conegut). Al marge d'aquests grups es coneixen altres aldolases però no s'han estudiat pel que fa a la seva aplicació en síntesi o a la seva especificitat per substrat (Takayama i col., 1997). A la Figura II.4. es mostra la classificació d'aldolases segons l'especificitat per al grup donador.

**(a). ALDOLASES DEPENDENTS DE DHAP.****(b). ALDOLASES DEPENDENTS DE PIRUVAT.****ALDOLASES DEPENDENTS DE PEP****(c). ALDOLASES DEPENDENTS DE GLICINA****(d). ALDOLASES DEPENDENTS D'ACETALDEHID.**

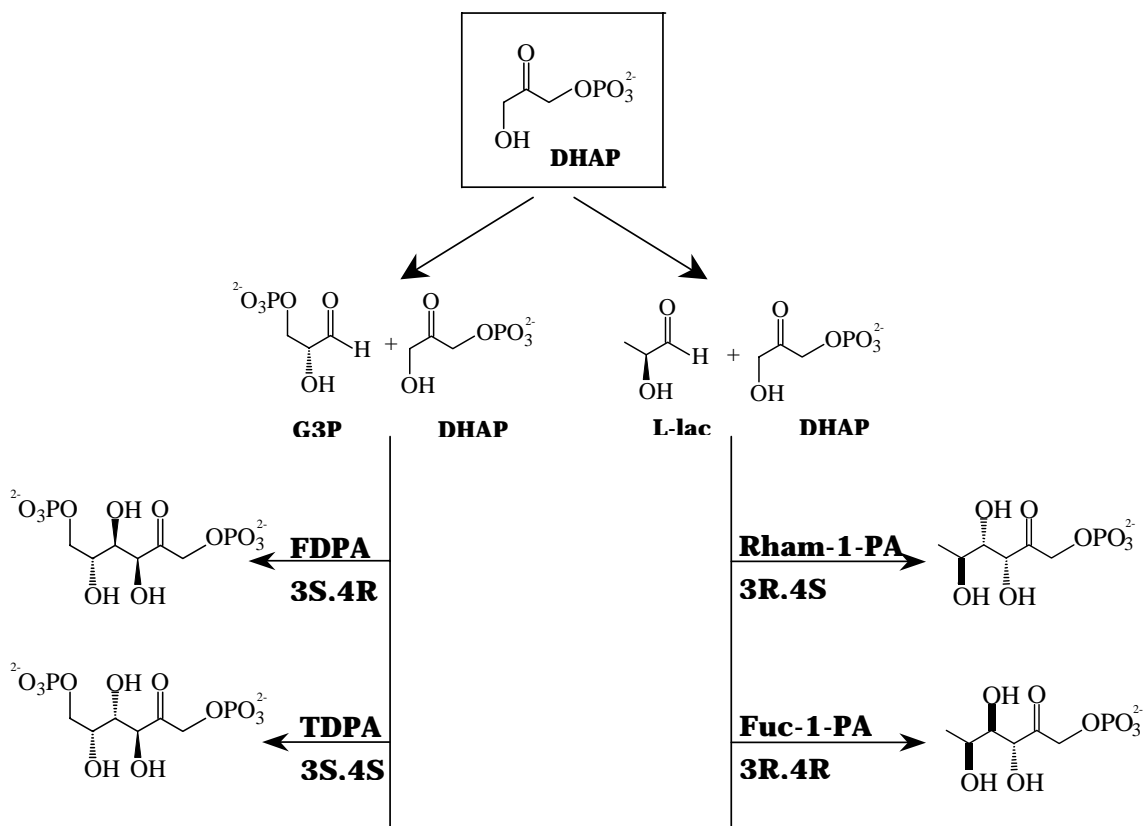
**Figura. II.4.** Classificació de les aldolases segons especificitat pel nucleòfil en la reacció d'addició.

Durant l'última dècada, l'aplicació d'aquests quatre tipus d'aldolases en la síntesi de sucres no usuals d'interès metabòlic, dels seus anàlegs estructurals i de certs aminoàcids per a la seva aplicació en la indústria alimentària i farmacèutica ha fet patent el seu interès com a biocatalitzadors específics en síntesi quirals. S'han publicat molt treballs revisant les principals característiques de les diferents aldolases de cara a la seva aplicació en síntesi quirals, els avenços sintètics amb la seva utilització i les possibilitats sintètiques dels nous enzims caracteritzats. Al respecte, cal ressaltar els treballs més recents i complets del grup del Dr. Wong (Scripps Ins.) i del Dr. Toone (Duke Uni.) (Takayama i col., 1997; Henderson, D.F. and Toone, E.J., 1999; Wymer, N. and Toone, E.J., 2000).

Comparant les aldolases depenents de DHAP amb la resta de grups d'aldolases descrits per a la seva aplicació en síntesi de sintons quirals, aquest grup genera no un sinó dos centres quirals allargant en tres carbonis l'estructura carbonada base. Aquest fet les fa especialment atractives per a la síntesi de sucres i explica que hagin estat les més emprades en l'estudi de noves vies sintètiques (Machajewski, 2000, Henderson i Toone, 1999, Wong i Whitesides, 1994).

### II.1.3. ALDOLASES DEPENENTS DE DHAP

Una limitació generalitzada de l'ús de biocatalitzadors en la producció de compostos òpticament actius és que, normalment, es disposa d'un enzim amb estereoespecificitat cap a una de les formes quirals i no és possible accedir a la forma complementària. Hi ha però alguns exemples d'estereoquímica complementària en liases (van der Werf i col., 1994). En concret es coneixen 4 aldolases depenents de DHAP que catalitzen amb estereoespecificitat ben definida els quatre diaestereoisòmers possibles dels dos centres quirals generats en la reacció (Fessner i col., 1991). A la Figura II.5. es presenten aquestes quatre aldolases depenents de DHAP i la seva estereoespecificitat complementària.



**Fig.II.5.** Aldolases dependents de DHAP i la seva estereoquímica complementària mostrada en base a les reaccions catalitzades *in vivo* .

*In vivo*, la fructosa-1,6-bifosfat aldolasa (FDPA) i la tagatosa-1,6-bifosfat aldolasa (TDPA) catalitzen l'addició asimètrica reversible de la DHAP a D-gliceraldehid-3-fosfat (G3P) per donar D-fructosa-1,6-bifosfat i D-tagatosa-1,6-bifosfat respectivament. La ramnulosa-1-fosfat aldolasa (Rham-1-PA) i la fuculosa-1-fosfat aldolasa (Fuc-1-PA) catalitzen l'addició reversible de DHAP a L-lactaldehid (L-lac) per donar L-ramnulosa-1-fosfat i L-fuculosa-1-fosfat respectivament. Com s'esquematitza a la Figura II.5., amb cada una d'aquestes reaccions s'obté un producte d'estereoquímica complementària als altres quatre en C3 i C4.

Aquestes quatre aldolases complementàries dependents de DHAP s'han aïllat de diferents fonts microbianes i d'animals superiors, s'han analitzat les seves seqüències i s'han clonat i sobreexpressat en *E.coli* (Ozaki i col., 1990; Fessner i col., 1991; Henderson i col., 1994;



Garcia-Junceda *i col.*, 1995). També han estat àmpliament estudiades pel que fa a la seva especificitat per substrat i la seva aplicació en síntesi quirals. Una descripció detallada de la seva especificitat per substrat l'aporta el grup de recerca de Dr. Wong (Scripps Ins.) (Wong *i col.*, 1995). En processos de síntesi per control cinètic de reacció, la selectivitat de la reacció depèn completament de l'enzim emprat i no de la naturalesa del substrat i això implica que, en principi, és possible obtenir qualsevol de les quatre formes estereoisòmers en C3,C4 a partir d'aldehids no naturals i aquest conjunt d'enzims complementaris.

La bibliografia sobre l'aplicació d'aquest grup d'enzims en síntesi de sucres és molt extensa. Una bona recopilació és el treball publicat al respecte pel grup de recerca del Dr. Wong (Scripps Ins.) (Takamaya *i col.*, 1997). Entre les reaccions descrites per a aquests enzims cal destacar la síntesi estereoselectiva de mimètics de sucres d'interès pel seu potencial terapèutic. S'han utilitzat per a la síntesi, a partir de precursors simples, d'un gran nombre de monosacàrids: sucres heterosubstituïts, deoxisucres, fluorosucres, sucres d'un nombre elevat de carbonis i dels corresponents derivats d'aquests monosacàrids a azosucres o tiosucres. Es citen únicament alguns exemples:

- S'han utilitzat més de 100 aldehids diferents com a substrats acceptors per a la preparació de monosacàrids no usuals d'interès com a sintons quirals en síntesi de fàrmacs: (Fessner, *i col.*, 1992), (Alajarín *i col.*, 1995).
- S'han obtingut bons resultats utilitzant aquests biocatalitzadors en l'addició aldòlica de pentoses i hexoses amb DHAP extenent la cadena carbonada d'aquests sucres en tres unitats i amb dos centres quirals estereoespecífics (Eyrisch *i col.*, 1994). Cal remarcar l'interès d'aquesta estratègia sintètica en l'obtenció d'anàlegs estructurals de l'àcid siàlic i derivats. Aquests àcids es troben al final dels glicoconjugats de les cèl·lules de mamífer i juguen un paper crucial en el camp de reconeixement bioquímic.
- L'aplicació de l'estratègia aldolàsica a la síntesi d'azosucres ha resultat en una de les vies més efectiva i pràctica per a la seva síntesi (von der Osten *i col.*, 1989). Els

azosucres desperten cada cop major interès atenent al seu valor potencial com a inhibidors de l'activitat enzimàtica i com agents terapèutics.

- S'han utilitzat amb èxit en la síntesi d'iminociclitols, compostos amb gran potencial terapèutic (Koeller i Wong, 2000; Fechter i col., 1999; Wong, 1992).

La majoria d'aquests treballs però s'han centrat en provar el gran potencial d'aquest grup d'enzims com a biocatalitzadors quirals a petita escala, però no en el desenvolupament de processos per a la seva obtenció i aplicació a escala productiva. No s'han descrit processos per a la seva obtenció superant la desena de mil·ligrams (Garcia-Junceda i col., 1995; Henderson i col., 1994) i només la FDPA és comercial però la seva utilització a escala productiva queda completament limitada pel seu elevat cost.

#### **II.1.4. OBJECTIUS DEL PROJECTE DE RECERCA**

El projecte en que s'emmarca aquesta tesi aposta per l'estudi d'aquest grup de biocatalitzadors i pretén contribuir al desenvolupament pràctic de les aldolases centrant-se en els aspectes de producció dels enzims i en el desenvolupament de metodologia per a la seva utilització en síntesi quiral: especificitat per substrat, medis de reacció, condicions de reacció, processos d'immobilització, etc. Es pretén poder presentar les aldolases com una veritable alternativa, factible i econòmicament competitiva, a la síntesi orgànica convencional que en molts casos és incapaç d'aportar solucions en la producció de molts mimètics de sucres d'interès terapèutic.

En concret, aquesta tesi s'ha centrat en l'obtenció d'un procés fiable i reproduïble per a la producció de Fuc-1-PA, com enzim model d'aquest família, a escala de gram. Això ha de permetre disposar de quantitats d'enzim per dur a terme tots els estudis relacionats amb la seva aplicació com a biocatalitzador: purificació, immobilització, condicions de reacció.

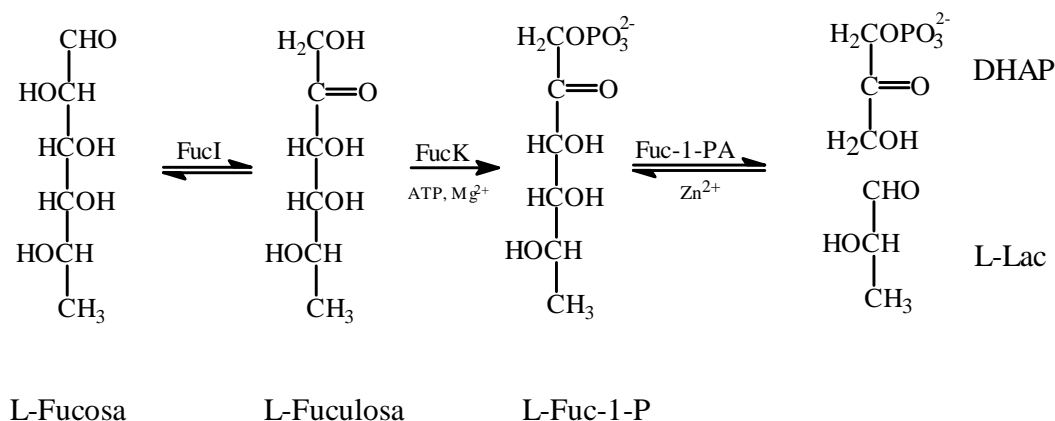
## II.2. FUCULOSA-1-FOSFAT ALDOLASA d'*E. coli* (Fuc-1-PA).

Per a la realització d'aquest treball es disposa de la soca recombinant *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrc*ful*) per a la producció de Fuc-1-PA (E.C. 4.1.2.17) d'*E. coli* K12 (ATCC 10798). Aquesta soca fou cedida pel Dr. García-Junceda i obtinguda a partir dels seus treballs de col·laboració amb el grup de recerca del Dr. Wong a l'Institut Scripps (La Jolla, USA.) (Garcia-Junceda *i col.*, 1995; Henderson *i col.*, 1994). A continuació se'n detallen les principals característiques:

- el sistema d'expressió pTrcHis (Invitrogen; San Diego, CA) permet l'expressió de proteïnes recombinants sota el control del promotor Trc, derivat del promotor *lac* induïble per lactosa o el seu anàleg estructural IPTG.
- L'enzim recombinant s'expressa com a proteïna de fusió amb una cua de sis histidines al seu extrem N-terminal. Aquest sistema d'expressió està pensat per facilitar la purificació de l'enzim sobreexpressat en un únic pas a partir d'extractes cel·lulars per cromatografia d'afinitat a ions metàl·lics ja que la cua d'histidines actua com un domini d'unió a metalls (Gibert *i col.*, 2000). Posteriorment, una seqüència de trencament per a una enteroquinasa permet separar fàcilment l'extrem fusionat.

### II.2.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ

La Fuc-1PA d'*E. coli* es va aïllar i purificar per primer cop a partir de la soca 0-111 B<sub>4</sub> (Ghalambor i Heath, 1962). A partir d'aquests treballs es va caracteritzar l'enzim i es va determinar el seu paper essencial en el metabolisme bacterià de L-fucosa. Quan *E. coli* creix utilitzant aquest sucre com a font de carboni es proposa la següent ruta metabòlica:

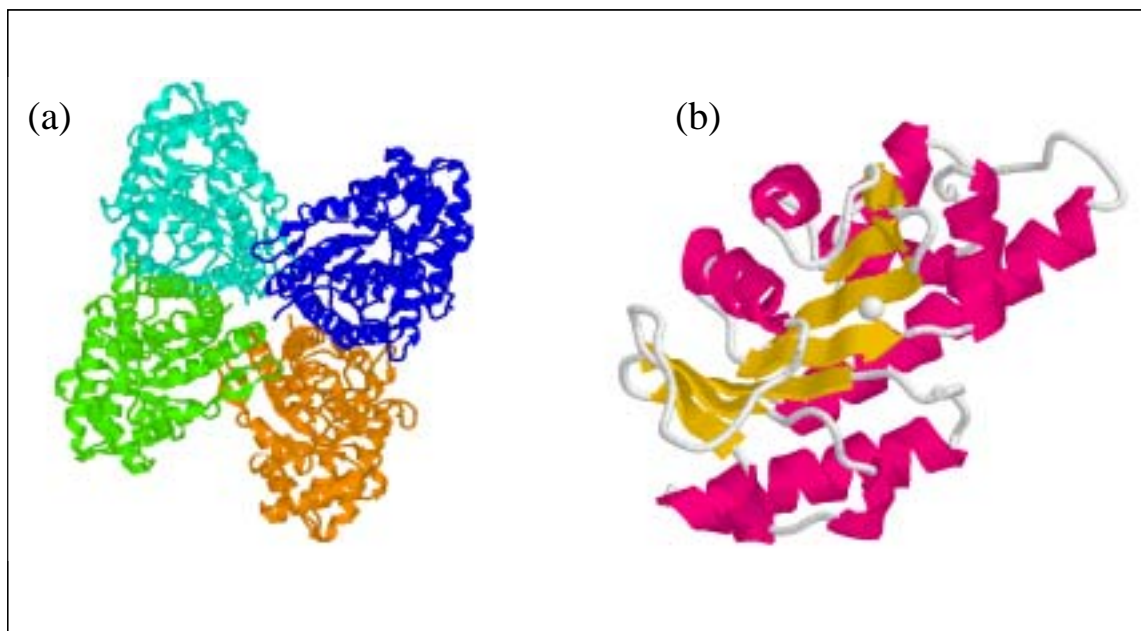


La Fuc-1-PA (E.C. 4.1.2.17) és un enzim homotetramèric. Cada subunitat consta de 215 aa amb un pes molecular de 23,78 kDa i un lloc d'unió a  $\text{Zn}^{2+}$ . Té un marge de pH d'actuació ampli entre 6 i 9 essent el pH òptim de 7.2 i registrant-se el 50% de l'activitat màxima a pH 6.5 i 8. La temperatura de màxima activitat a pH 7.2 és 37°C per al seu substrat natural fuculosa-1-fosfat. El seu punt isoelèctric és de 6.12.

L'activitat específica de Fuc-1-PA expressada com a proteïna de fusió a una cua de sis histidines (tal com s'obté emprant el sistema d'expressió per a *E.coli* pTrcHis (Invitrogen; San Diego, CA) és de 13 UA/mg Fuc-1-PA segons s'ha determinat en treballs paral·lels al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) per a la seva purificació (Suau, 2001).

Es disposa de l'estructura tridimensional de l'enzim determinada per cristal·lografia de raigs X amb una resolució de 2.4 Å (Dreyer and Schutz, 1996; Dreyer and Schutz, 1993). De l'el·lucidació d'estructura es pot extreure que en la seva configuració activa l'enzim homotetramèric presenta una simetria inusual tipus  $C_4$  entre les quatre unitats monomèriques. Cada subunitat monomèrica té un centre actiu a la interfase de la subunitat que s'obre cap a la part externa del tetràmer en  $C_4$  i amb unió a un ió  $\text{Zn}^{2+}$ . S'han contabilitzat quatre residus cisteïna per subunitat però cap d'aquests es troba implicat en l'esfera de coordinació a l'ió  $\text{Zn}^{2+}$  ni en la formació de ponts disulfur. No es coneixen ponts

disulfur en l'estructura. Pel que fa a la comparació estructural i de seqüència primària amb aldolases de classe I no s'ha trobat cap tipus d'homologia.



**Figura II.6.** Estructures cristal·logràfiques d'aldolases dependents de DHAP. **(a)** Tetràmer de D-fructosa-1,6-difosfat aldolasa (Blom i Sygusch, 1997). **(b)** Monòmer de Fuculosa-1-fosfat aldolasa (Dreyer i Sculz, 1996).

En els primers treballs publicats sobre la caracterització de Fuc-1-PA es van realitzar estudis per avaluar l'efecte dels ions divalents sobre l'activitat Fuc-1-PA (Ghalambor i Heath, 1962). L'addició de cations divalents a les preparacions de Fuc-1-PA purificat no van suposar estimulacions en l'activitat de l'enzim. La diàlisi de l'enzim en aigua tampoc es va traduir en una pèrdua d'activitat. En canvi, la seva diàlisi en dissolucions 0,005M d'EDTA a pH 7.0 va provocar pèrdues de més del 90% de l'activitat inicial de les preparacions. L'activitat es va recuperar fins a un 80% amb l'addició d'ions divalents fins a una concentració de 0.01M a les mateixes preparacions dialitzades.

Posteriorment, d'estudis similars realitzats pel grup del Dr. Wong per determinar la concentració òptima de  $Zn^{2+}$  per a l'activitat Fuc-1-PA, s'extreu que a concentracions molt

baixes de l'ió s'assoleix un màxim en l'activitat aldolàsica i a mida que s'augmenta la concentració es redueix proporcionalment l'activitat (Garcia-Junceda i col., 1995).

### II.2.2. ANTECEDENTS EN LA SOBREEXPRESSIÓ DE FUC-1-PA D'*E. coli*

En els primers treballs realitzats pel Dr. Garcia-Junceda (Institut Scripps, La Jolla) amb la soca recombinant *E.coli* XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) es va comprovar l'expressió de l'enzim realitzant un estudi en cultius discontinus en Erlenmeyer (Garcia-Junceda i col., 1995). Es va utilitzar un medi de cultiu complex ric, LB, i es va fixar el moment d'inducció a la fase inicial del creixement. Treballant a 37°C, temperatura òptima pel creixement d'*E.coli*, es va descriure l'acumulació de Fuc-1-PA majoritàriament en forma de cossos d'inclusió al citoplasma i no es va detectar pràcticament activitat aldolàsica Fuc-1-PA a la fracció soluble del lisat cel·lular.

Un mètode habitual per minimitzar la formació de cossos d'inclusió és reduir la temperatura de cultiu després de la inducció. Es van assajar diverses temperatures de creixement i es va concloure que el creixement de la soca a 30°C, un cop induïda l'expressió de Fuc-1-PA, permet recuperar l'enzim majoritàriament en forma soluble activa sense allargar excessivament el temps de cultiu.

En aquestes condicions, els mateixos autors estudien la concentració d'inductor òptima al medi de cultiu per maximitzar l'expressió de l'enzim recombinant (Garcia-Junceda i col., 1995). Dels resultats obtinguts en aquest treball s'extreu que a mida que es disminueix la concentració d'inductor al medi la concentració d'activitat Fuc-1-PA detectada és superior. La concentració mínima assajada fou 50 µM d'IPTG i és la que es considerà òptima per a l'expressió de l'enzim. Els autors justifiquen aquest resultat en base a que quan més lenta és l'expressió de l'enzim recombinant més eficaç és el seu plegament cap a la forma activa.

Havent comprovat l'expressió i possible recuperació en forma activa de Fuc-1-PA recombinant en aquestes condicions de cultiu, el grup del Dr. Wong centrà els seus estudis

en l'aplicabilitat d'aquest enzim en síntesi d'anàlegs estructurals de sucres. (Garcia-Junceda *i col.*, 1995).

No s'ha trobat publicat cap treball posterior en relació a l'estudi de sobreexpressió d'aquest enzim Fuc-1-PA en aquest o altres sistemes d'expressió recombinant ni a nivell de caracterització en Erlenmeyer ni de cultius en fermentador .

### **II.2.3. ANTECEDENTS EN L'ESTUDI DE FUC-1-PA d'*E. coli* AL DEPARTAMENT D'ENYINYERIA QUÍMICA DE LA UAB.**

En anteriors treballs al Departament d'Enginyeria Química de la UAB ha estat necessari posar a punt les eines bàsiques per al seguiment d'expressió d'aquest enzim Fuc-1-PA. Es treballa amb un assaig enzimàtic per a la quantificació d'activitat aldolàsica modificació del proposat prèviament pel grup del Dr. Wong (Durany, 2000). Aquest assaig es basa en la reacció natural catalitzada per l'enzim acoblada a una reacció general d'oxidació del DHAP que permet el seu seguiment espectrofotomètric a 340nm. El problema principal que es presenta en el desenvolupament d'aquest assaig , és el fet que el substrat natural de l'enzim no és comercial. Això ha fet necessari desenvolupar i validar una metòdica reproducible i en escala de gram per a la seva síntesi que permeti disposar de la mateixa qualitat de substrat en totes les determinacions (Durany, 2000).

## **II.3. PRODUCCIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS EN *E. coli***

### **II.3.1. *E. coli* FRONT ALTRES ALTERNATIVES PER A L'EXPRESSIÓ RECOMBINANT**

*E. coli* és l'hoste més àmpliament utilitzat per a l'expressió recombinant de proteïnes heteròlogues tant en treballs de recerca bàsica com en la producció industrial de proteïnes. La indústria de proteïnes terapèutiques i d'enzims per a la seva aplicació en biotransformacions es troba en plena expansió (Walsh, 2003). D'altra banda, Genòmica i

Proteòmica són camps de recerca en ple desenvolupament que requereixen de quantitats suficients de grans quantitats de polipèptids per al seu anàlisi funcional i estructural (Wang i col., 1999). En tots aquest camps, els bacteris i molt especialment *E. coli*, són la primera elecció per provar de clonar el gen heteròleg i produir els polipèptids en estudi. Altres hostes: llevats, cèl.lules animals o cèl.lules d'insecte, s'utilitzen únicament quan *E. coli* no resulta ser una bona alternativa per a l'expressió de la proteïna clonada d'interès: quan els nivells d'expressió són molt baixos o inapreciables, o quan no s'expressa en la seva forma activa degut a plegaments incorrectes no funcionals o a que són necessàries modificacions post-traduccionals com ara glicosidacions que no es poden dur a terme en organismes procariotes.

Els principals avantatges d'*E. coli* front altres hostes són el fet que sigui el microorganisme millor caracteritzat a nivell fisiològic, que s'hagi desenvolupat un bon coneixement de tecnologia de procés per al seu cultiu que permet obtenir grans quantitats de l'enzim sobreexpressat i que es disposi d'un gran nombre d'eines de genètica molecular que han permès desenvolupar un gran nombre de soques i plàsmids especialment dissenyats/modificats per a la seva aplicació en aquest camp (Neubauer i Winter, 2001).

D'altra banda, també cal citar alguns aspectes desavantajosos en relació a la sobreexpressió recombinant en *E. coli* com són els derivats de la paret cel.lular externa, pròpia de bacteris Gram negatives. La paret cel.lular limita l'excreció al medi de cultiu de les proteïnes sobreexpressades i conté lipopolisacàrids (LPS) que són pirogènics en humans i altres animals. Ambdós aspectes dificulten i encareixen els processos de purificació. Sovint es proposen, com alternativa a *E. coli*, la utilització de bacteris Gram positius com és *Bacillus subtilis*, i llevats com ara *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*; tots ells amb una àmplia activitat secretora natural i classificat com microorganisme GRAS (*generally regarded as safe*) (Ferrer, 2002).

No es descarta que, per a la sobreexpressió recombinant de moltes proteïnes produïdes en *E. coli*, es puguin trobar hostes alternatius que rendeixin productivitats molt superiors però la comparació de sistemes ha de passar per l'optimització de les condicions de treball en



cada cas i això suposa una inversió de temps molt considerable (Volk i col., 2001). Quan es planteja trobar l'hoste de sobreexpressió recombinant més adequat per a una proteïna d'interès, una estratègia utilitzada tan a nivell de recerca com a la indústria (Hohenblum i col., 2001; Hodgson, 1993) és provar la capacitat d'expressió en un hoste bacterià (generalment *E. coli*), en un llevat (*Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*) i una línia de cèl.lules animals (majoritàriament cèl.lules CHO). No es poden treure regles d'elecció generals però sí suggerir algunes pautes per a l'elecció del hoste segons s'extreu de les comparacions publicades: *E.coli* permet sobreexpressions molt fortes de proteïnes acumulables al citoplasma cel.lular. En molts casos, proteïnes eucariotes, incloent humanes, han estat produïdes en forma activa i amb altes productivitats específiques a *E.coli*. Això sol ser veritat quan es tracta de proteïnes petites que s'acumulaven de forma natural al citoplasma de l'organisme d'on han estat aïllades. En canvi, proteïnes que s'excreten en el seu ambient natural (especialment aquelles que contenen enllaços disulfur) solen formar agregats en forma de cossos d'inclusió al citoplasma d'*E.coli*. El procés de desnaturalització i replegament de proteïnes *in vitro* pot ser molt costós o portar a rendiments de recuperació baixos i la tendència general és evitar aquesta via de recuperació de producte. Tot i així, hi ha exemples en que s'ha seguit aquesta via amb molts bons rendiments a nivells industrial (Lilie i col., 1998) i hi ha grups que treballen activament en aquesta àrea (Vallejo i Rinas, 2002; Ferrao-Gonzales i col., 2002). Si una proteïna de secreció s'acumula en forma de cossos d'inclusió al citoplasma d'*E. coli*, es recomana, com una bona opció, utilitzar un sistema per a la sobreexpressió recombinant extracel.lular en llevats. Generalment, la utilització de línies cel.lulars animals o d'insecte es reserva a proteïnes molt més complexes, majoritàriament en contextos de glicosidació, i sempre que el valor afegit del producte obtingut ho justifiqui ja que són processos de cost molt més elevat. Encara que els llevats glicosiden les mateixes posicions en una proteïna que les cèl.lules eucariotes superiors, el patró de glicosidació és significativament diferent i, generalment, es presenten problemes en relació a l'activitat de proteïnes terapèutiques.

L'enzim Fuc-1-PA a sobreexpressar en aquest treball és un enzim citoplasmàtic natural d'*E.coli* que no conté enllaços disulfur en la seva estructura i que s'expressa en la soca recombinant de partida d'aquest treball, XL1 Blue MRF'(pTrc*fuc*), com a proteïna de fusió a

una cua d'histidines per a la seva purificació específica en columnes d'afinitat en un sol pas. L'aplicació final de l'enzim no és terapèutica sinó biocatalítica. Amb aquestes característiques, sembla que no hi ha cap criteri per deixar d'estudiar en primera instància l'expressió de Fuc-1-PA en *E. coli*. Tot el contrari, el fet que s'estigui sobreexpressant una proteïna citoplasmàtica endògena d'*E. coli* fa pensar que aquesta pot ser l'opció òptima en el cas en estudi.

### **II.3.2. PROBLEMES ASSOCIATS AL CREIXEMENT I METABOLISME EN CULTIUS D'*E. coli*: LA PRODUCCIÓ D'ÀCID ACÈTIC**

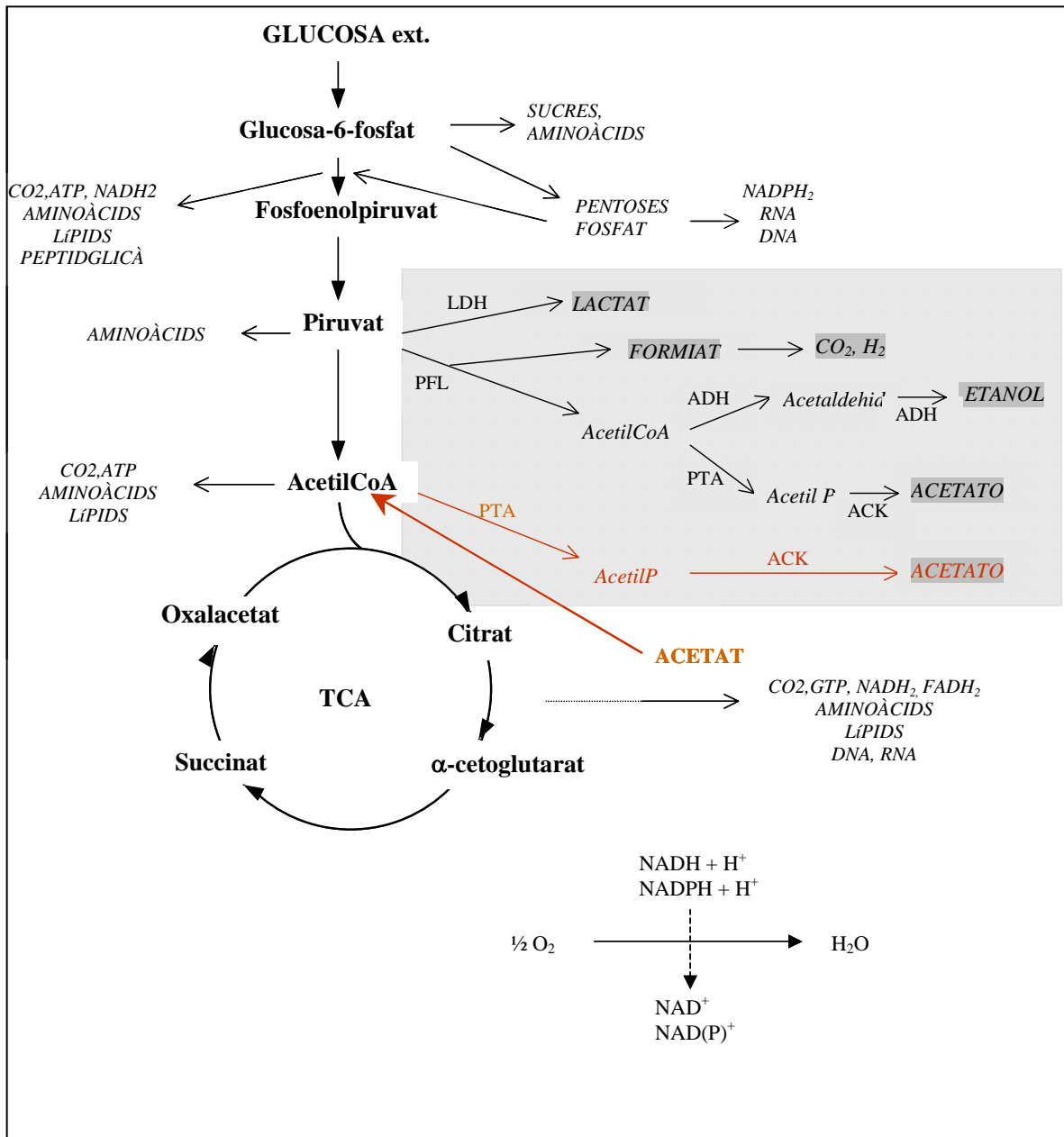
Un dels problemes més importants associats al cultiu d'*E. coli* a altes densitats cel·lulars és la producció d'àcid acètic. Està àmpliament provat que la producció d'acètic durant el cultiu d'*E. coli* inhibeix el creixement cel·lular (Sakamoto i col., 1994; Yee and Blanch, 1993a; Kwon i col., 1996; Lui and strohl, 1990; Shimizu i col., 1988) i afecta l'expressió recombinant un cop induït el cultiu (Sakamoto i col., 1994; Shimizu i col., 1992; Maçdonald and Neway, 1990). En fermentacions aeròbiques, concentracions d'àcid acètic entre 5 i 10 g/l tenen un clar efecte inhibitori sobre la màxima velocitat de creixement específica i la densitat cel·lular (Yee i Blanch, 1993a) mentre que només superant els 1 – 1,5 g/l ja s'observen efectes sobre l'expressió recombinant (Jersen i Carlsen, 1990; San i col., 1994). És per això que s'han invertit molts esforços per entendre els mecanismes per a la seva producció i en diferents estratègies per frenar la seva acumulació en cultius d'alta densitat cel·lular.

La formació d'àcid acètic depèn estretament de la font de carboni emprada per al creixement ( Lee, 1996; Kwon i col., 1996; Korz i col., 1995). Aquest problema s'accentua quan s'utilitza glucosa com a font de carboni i, en canvi, amb fonts alternatives com glicerol o fructosa, caracteritzades per una assimilació i utilització estretament regulades a diferència de la glucosa, s'observen reduccions considerables en la seva formació (en relació a fructosa: Aristidou i col., 1999; en relació a glicerol: Korz i col., 1995, Tsuji i col., 1997; Zhang i col, 1998; Zhang i col, 1999). Tot i així, la glucosa és la font de carboni més

àmpliament emprada per al cultiu d'*E. coli* a altes densitats cel.lulars i amb la que s'han obtingut millors resultats. El glicerol és la principal font de carboni alternativa a la glucosa i s'han obtingut molt bons resultats en cultius d'alta densitat cel.lular amb concentracions de 148 g PS/l (Korz i col., 1995). Però quan es planteja com alternativa industrial, el glicerol és considerablement més car que la glucosa, les cèl.lules creixen més lentament en glicerol i els rendiments de glicerol a biomassa són inferiors.

També en relació a l'efecte de la composició del medi de cultiu sobre la producció d'acètic hi ha treballs que suggereixen que la inhibició per acètic s'accentua en medis de composició complexa front els de composició definida (Pan i col., 1987).

*E. coli* excreta en forma d'acètic entre un 10 i un 30 % de la glucosa assimilada tot i mantenir condicions perfectament aeròbiques durant el creixement. La formació de l'àcid acètic s'explica a nivell fisiològic com la conseqüència d'un desequilibri entre la quantitat de la font de carboni assimilada per la cèl.lula i dirigida cap al metabolisme central, glicòlisi i circle dels àcids tricarboxílics (veure Figura II.7.), i les demandes biosintètica i/o energètica reals de la cèl.lula (Lee, 1996).



**Figura II.7.** Esquema de les vies centrals del metabolisme de la glucosa i de l'àcid acètic durant el creixement aeròbic d'*Escherichia coli*: glicòlisi i cycle dels àcids tricarbòxílics (TCA). En fons gris s'indiquen les vies de metabolisme corresponents a la saturació del TCA i marcats amb gris fosc els subproductes metabòlics de l'oxidació parcial de la glucosa. En vermell, formació i degradació, com a font secundària de carboni, de l'àcid acètic. (Xu i col., 1999).

Es considera que l'àcid acètic es produeix a velocitats de creixement altes, front a un excés de la font de carboni al medi de cultiu o quan la transferència d'oxigen limita el creixement (Sakamoto i col., 1994; Konstantinov i col., 1990; Korz i col., 1995; Shimitzu i col., 1988, Yoon i col., 1994). A velocitats de creixement baixes, és possible satisfer els requeriments catabòlics i anabòlics de la cèl.lula amb el metabolisme central oxidatiu. Però a velocitats de creixement altes ambdues demandes deuen excedir la capacitat del metabolisme oxidatiu i aleshores canvia la regulació del metabolisme de forma que, amb l'oxidatiu, es garanteix cobrir les necessitats anabòliques mentre que l'energia necessària s'obté, en part, del metabolisme oxidatiu de la glucosa i, en part, de la formació d'àcid acètic. *E. coli* deu triar la formació d'àcid acètic com a font d'energia perquè després del metabolisme oxidatiu de la glucosa és la que li permet obtenir més quantitat de ATP i NADH<sub>2</sub> a partir d'aquesta font (Han i col., 1991).

Molts grups han dedicat esforços a trobar la velocitat de creixement crítica per sobre la qual una determinada soca produeix acètic a determinades condicions de cultiu. En estudis en quimiostat i per al cultiu de *E. coli* K12D1 s'obtenen formacions d'acètic a 0,2 i 0,3 h<sup>-1</sup> en medis complex i definit respectivament (Meyer i col., 1984). En canvi, el mateix grup de treball, observa un comportament oposat en estudis similars de la soca *E. coli* B/r amb producció d'acètic a velocitats específiques de creixement relativament altes en medi complex, 1,0 h<sup>-1</sup>, i molt més baixes en medi definit, 0,47 h<sup>-1</sup> (Reiling i col., 1985). En general, diferents autors situen les velocitats de creixement crítiques per a la producció d'acètic al voltant de 0,35 h<sup>-1</sup> i 0,2 h<sup>-1</sup> per a medis definits i complexos respectivament (El-Mansi i col., 1989; Paalme i col., 1990), hi ha qui descriu acumulacions treballant en medi definit a velocitats de creixement molt baixes, 0,14 h<sup>-1</sup> (Fieschko, 1989) i, en treballs molt més recents en quimiostat i la soca d'*E. coli* BL21, s'extreu com a conclusió que fins i tot fixant velocitats de creixement extremadament baixes, 0,05 h<sup>-1</sup>, hi ha acumulació d'acètic perquè la ruta metabòlica per a la seva formació roman activa (Suárez i Kilikan, 2000). D'aquests mateixos darrers estudis s'extreu que, tot i així, és per sobre de 0,3 h<sup>-1</sup> quan augmenta substancialment la velocitat de formació d'aquest subproducte.

D'una forma molt més funcional, Blanch i col.laboradors descriuen a partir dels seus resultats experimentals en cultius semicontinus i sense pretendre explicar les bases metabòliques per a la seva formació, que la producció d'acètic es dona quan es treballa sota una de les següents condicions (Yee i Blanch, 1993b):

- limitació d'oxigen,
- excés de nutrients, especialment de la font de carboni de forma que la velocitat de creixement superi la velocitat crítica de formació d'acètic,
- pressió parcial alta de CO<sub>2</sub> al vas de fermentació.

Per evitar la formació d'àcid acètic s'han proposat tant estratègies operacionals com de modificació genètica (enginyeria metabòlica) Una estratègia a nivell operacional que ha donat molt bons resultats és mantenir concentracions mínimes de la font de carboni dissolta al medi. Per assolir aquest objectiu s'han desenvolupat estratègies de control d'addició intentant seguir el creixement del microorganisme per evitar l'acumulació de l'aliment al medi: perfils exponencials d'addició (Yoon i col., 1994), control dels nivells d'oxigen dissolt (Konstantinov i col., 1990) o, directament, mitjançant sistemes de mesura en línia de la font de carboni (Sakamoto i col., 1994; Lui i strohl, 1990; Shimizu i col., 1988) o de l'àcid acètic (Sakamoto i col., 1994; Turner i col., 1994; Shimizu i col., 1988). S'ha observat que quan es manté el creixement limitant la concentració de la font de carboni, no només s'evita la formació d'àcid acètic sinó que les cèl.lules assimilen l'àcid acètic acumulat al medi i l'utilitzen com a font de carboni minimitzant la seva concentració (Turner i col., 1994; Shimizu i col., 1992, 1988). Amb un enfoc genètic del problema, donat que la producció d'acetat és conseqüència de l'acció de l'enzim fosfotransacetilasa (codificada per *pta*) i l'acetat quinasa (codificat per *ack*) (veure Figura II.7), s'han aplicat tècniques de modificació genètica per l'obtenció de mutants *pta*<sup>-</sup> amb reduccions considerables en la producció d'acètic (Bauer i col., 1990). Però, en moltes ocasions, eliminar el gen *pta* ha portat a acumulacions importants de piruvat que també han resultat indesitjables ( Diaz-Ricci i col., 1991). Una altra estratègia ha estat la construcció de mutants en els que es redueix la capacitat d'assimilació de glucosa o s'evita la formació d'acètic canalitzant el consum de l'excés de glucosa cap a altres productes de metabolisme

alternatius (Farmer i Liao, 1997; Aristidou i col., 1994; Bauer i col., 1990; Dedhia i col., 1994; Diaz-Ricci i col., 1991).

### **II.3.3. PROBLEMES ASSOCIATS A L'EXPRESSION DE PROTEÏNES RECOMBINANT EN *E. COLI***

Depenent de la seva velocitat de síntesi, la producció de proteïnes recombinants en un hoste bacterià requereix de gran part dels recursos energètics i anabòlics de la cèl.lula i altera substancialment el metabolisme cel.lular (Bailey, 1993). Aquest fenomen és anomenat estrès o càrrega metabòlica per expressió recombinant (*metabolic burden*). D'entrada no és possible preveure com alterarà el metabolisme cel.lular la sobreexpressió recombinant d'una proteïna concreta però cada cop s'aprofundeix més en el coneixement de les reaccions competitives de metabolisme després de la inducció.

En aquest apartat es citen i comenten breument els diferents aspectes del metabolisme cel.lular que cal esperar s'afectin de la inducció de la sobreexpressió recombinant.

#### **Alteracions en el metabolisme del carboni**

La síntesi elevada de proteïnes recombinants modifica i colapsa el metabolisme central del carboni (George i col., 1992), típicament portant a una acumulació important d'àcid acètic al medi (Chou i col., 1994a; George i col., 1992; Harder i col., 1994; Ko i col., 1995). Els principals efectes de l'acumulació d'acetat sobre el creixement i l'expressió recombinant i les diferents estratègies desenvolupades per intentar controlar la seva formació s'han comentat a l'apartat anterior d'aquesta introducció (*veure* I.3.2.).

#### **Alteracions en els aparells de producció de proteïnes**

Generalment la traducció deficient d'un mRNA recombinant no és un problema quan es clona associat a un punt d'unió a ribosoma òptim (RBS) però la cèl.lula molt sovint no pot

tolerar la síntesi continuada i en quantitat d'un mateix producte per un temps elevat. Després de la inducció, l'alt número de còpies dels gen recombinants i/o les altes quantitats de mRNA recombinant han de competir amb els gens i mRNA de l'hoste pels factors de que disposa la cèl.lula per a transcripció i traducció. Alguns articles recents mostren que després de la inducció es produeix una modificació important en els patrons per a la síntesi de proteïnes amb una reducció important de les proteïnes pròpies de l'hoste i amb la conseqüent dificultat per mantenir el creixement cel.lular (Lin i col., 2001; Jürgen i col., 2000; Dong i col., 1995; Rinas i col., 1996; Vind i col., 1993). En alguns casos això s'ha associat al fet que les proteïnes recombinants expressades eren de seqüències llargues i això reduïa el número de ribosomes lliures per dur a terme la resta de traduccions (Vind i col., 1993) però el mateix efecte s'ha observat amb la sobreexpressió de gens recombinants més curts (Rinas i col., 1996). En general, els resultats d'aquests experiments mostren que la traducció és un dels processos cel.lulars més sensibles a l'efecte de la sobreexpressió recombinant.

Estudis en relació a la sobreexpressió de  $\alpha$ -glucosidasa han mostrat que, a més de la inhibició en la traducció, altres processos cel.lulars es veuen greument afectats per l'expressió recombinant, entre ells la replicació cromosòmica i transcripció (Teich i col., 1998; Lin i col., 2001).

### **Respostes d'estrès cel.lular associades a la sobreexpressió de proteïnes recombinants**

La sobreexpressió d'un gen recombinant pot alterar el metabolisme cel.lular de forma similar a l'observada front un xoc tèrmic (*heat shock response*) (Bahl i col., 1987; Dong i col., 1995; Ito i col., 1986; Parsell i Sauer, 1989), principalment, augmentant l'activitat proteolítica citoplasmàtica (proteasas: Ion i Clp entre les més importants) i periplasmàtica (proteasa DegP) (Goff i Goldberg, 1985; Kosinski i col., 1992b; Kosinski i Bailey, 1991 i 1992) i l'expressió de determinades chaperones: DnaK, GrpE, GroEL (Dong i col., 1995; Gill i col., 2000, 2001; Rinas, 1996; Snow i Hipkiss, 1987). La resposta per xoc tèrmic pròpiament dita s'indueix quan un promotor sensible a la temperatura, com són els promotors  $\lambda P_L$  i  $\lambda P_R$  amb el repressor termosensible cI857, s'utilitza per induir l'expressió



(Rinas, 1996). Però, sense un augment de temperatura, una resposta similar s'observa quan, per altres causes, s'acumulen proteïnes incorrectament plegades o amb sistemes d'excreció deficients (Parsell i col., 1989; Kosinski i col., 1992b; Wild i col., 1993) o directament, per l'ús d'IPTG com inductor (Kosinski i col., 1992a). En conseqüència, mètodes per disminuir aquesta resposta de xoc tèrmic i/o de l'activitat proteolítica que se'n deriva, poden millorar la sobreexpressió recombinant. S'han descrit bons resultats disminuint la temperatura de creixement induït (Kosinski i col., 1992b; Surek i col., 1991) i treballant amb soques mutades per disminuir la seva activitat proteolítica (Surek i col., 1991). Un altra solució passa per optimitzar l'estratègia d'inducció: s'observen disminucions en l'activitat proteolítica quan, en lloc de fer un sol pols d'inducció afegint la quantitat d'IPTG necessària de cop com és més habitual, es tria una estratègia d'inducció lenta afegint l'inductor a mida que creix el cultiu i augmenta la densitat cel.lular (Ramirez i Bentley, 1995).

S'han associat altres respostes d'estrès cel.lular a la inducció de l'expressió recombinant (Chou i col., 1996; Dedhia i col., 1997; Hoffmann i col., 1999; Gill i col., 2000) però, sense dubte, la de xoc tèrmic és la més generalitzada.

Tot i que encara no està clar quins són exactament els efectes sobre el metabolisme cel.lular lligats a la inducció forta d'un gen recombinant, de l'estudi d'inducció de diferents sistemes d'expressió i per a la sobreexpressió de diferents proteïnes, tant proteïnes pròpies d' *E. coli* com de proteïnes heteròlogues, s'extreu que l'expressió forta de proteïnes recombinants afecta el metabolisme cel.lular perquè competeix i altera la síntesi de proteïnes pròpies de l'hoste necessàries per mantenir la seva viabilitat. En els pitjors casos, això porta a la mort cel.lular poques hores després de la inducció. Com a conseqüència, tots els mètodes que permetin modular la velocitat específica de síntesi no només poden millorar el plegament de les proteïnes i disminuir la resposta d'estrès de xoc tèrmic després de la inducció sinó que també han de contribuir a millorar la viabilitat cel.lular després de la inducció i derivar

en un allargament considerable del temps de creixement induït per rendir concentracions de producte finals superiors i, provablement, millorar la seva qualitat.

#### II.3.4. ASPECTES PER OPTIMITZAR L'EXPRESSIÓ RECOMBINANT EN *E.coli*

Per l'optimització d'un procés d'expressió recombinant s'entén maximitzar la concentració final del producte d'interès i la seva productivitat volumètrica, és a dir, no només obtenir el màxim de producte per unitat de volum sinó també en el menor temps possible. Aquest objectiu passa per assolir densitats cel·lulars de cultiu el més altes possibles i, simultàniament, optimitzar la productivitat específica de l'hoste en les condicions de cultiu: garantir que estem explotant al màxim la seva capacitat productiva (acumulació màxima de producte per unitat de biomassa) i optimitzant les condicions de cultiu per tal que això sigui possible reduint al màxim el temps necessari i en conseqüència, els costos del procés.

Els principals aspectes que cal considerar per a l'optimització d'un procés de producció de proteïnes recombinants en *E.coli* s'han recollit en nombrosos articles de revisió sobre el tema (Weickert i col., 1996; Makrides, 1996; Hannig and Makrides, 1998; Baneyx, 1999, Neubauer i Winter, 2001, Ferrer, 2002). Principalment, aquests aspectes són:

- a) la tria de vectors i sistemes d'expressió recombinant i
- b) l'estratègia de cultiu.

Caldrà triar entre les diferents possibilitats en relació a ambdós aspectes per minimitzar els problemes associats a l'expressió recombinant en *E.coli* com són, principalment, la formació d'agregats insolubles de proteïna (cossos de inclusió), la degradació de proteïnes sobreexpressades per proteases i l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant. La majoria d'autors descriuen les diferents alternatives però coincideixen en l'opinió que no és possible generalitzar l'optimització d'un procés: cada proteïna és diferent i en cada cas és necessari valorar la importància de cada aspecte per optimitzar el procés per a la seva sobreexpressió.

### II.3.4.1. Vectors i sistemes per a l'expressió recombinant en *E. coli*

Un sistema d'expressió procariota ben dissenyat conté un seguit d'elements genètics òptimament configurats per al control de transcripció i traducció de les seqüències a expressar (són articles de revisió sobre el tema: Makrides, 1996; Baneyx, 1999). De rellevant importància pel que fa a la seva tria i en relació a aquest treball:

**a) Origen de replicació (Ori):** determina el número de còpies del vector per unitat cel.lular. Generalment es treballa amb vectors de replicació relaxada, amb un número de còpies entre 15-60 per unitat cel.lular (com són els plàsmids derivats de pMB1/ColE1). Però depenent de l'efecte de l'expressió recombinant sobre el metabolisme de la soca hoste es pot triar entre vectors de baix, mitjà o alt número de còpies (inferiors a 15, inferiors a 100, i per sobre del centenar de còpies, respectivament).

**b) Control de segregació plasmídica:** un altre aspecte important a considerar és el dels mecanismes amb que es prepara el vector per evitar la segregació del plàsmid durant el cultiu: el total de còpies del plàsmid es distribueix arbitràriament amb la divisió cel.lular i una divisió molt desigual pot portar a la seva pèrdua al llarg de les generacions. Això comporta mantenir el creixement d'una fracció cada cop superior de cèl.lules del cultiu no productives. El mecanisme clàssic per evitar aquest problema de segregació és la coexpressió d'un gen que codifica per a la resistència a un antibiòtic que actua com a marcador de selecció.

**c) Promotor:** per arribar a sobreexpressions superiors al 20% de la proteïna cel.lular total és imprescindible treballar amb sistemes d'expressió controlats. Aquests sistemes es basen en un promotor regulable caracteritzat per una velocitat de transcripció molt baixa sota condicions de repressió i una alta velocitat de síntesi de mRNA després de la inducció.

Els sistemes d'inducció convencionals es basen en promotors forts d'*E. coli* o fags d'*E. coli*. Durant molts anys l'operó per a la utilització de la lactosa en *E. coli* (operó *lac*) ha sigut un dels grans paradigmes en l'enteniment de la regulació procariota i no es d'estranyar que

molts dels promotors emprats per a la transcripció de gens heteròlegs en *E.coli* s'hagin construït a partir d'elements derivats d'aquest promotor natural d' *E. coli*. Una bona revisió en relació a l'optimització de l'expressió recombinant controlada pel promotor *lac* la presenta el grup del Dr Glick (Univestitat de Waterloo, Canada) (Donovan i col., 1996). S'ha considerat oportú descriure, en línies molt generals, el funcionament i regulació d'aquest operó *lac* per ajudar a entendre el funcionament dels vectors d'expressió emprats en aquest treball (Apèndix 1).

Encara que el promotor natural de l'operó *lac* i el seu derivat més proper *lacUV5* (modificat per evitar la regulació per catabolit via AMP cíclic) són promotors dèbils i rarament utilitzats, han donat peu a derivats àmpliament emprats. Els promotors sintètics *tac* i *trc* (híbrids entre el promotor *lac* i el promotor del triptofen , *trp*, un altre promotor natural d'*E.coli*) són promotors forts que permeten l'acumulació rutinària de proteïna heteròloga entre el 15-30% de la proteïna total de l'hoste i són induïbles per IPTG però sense regulació per catabolit. Els principals desavantatges per a la utilització dels promotors derivats del *lac* van lligats a l'ús de l'IPTG com inductor de l'expressió heteròloga. L'IPTG és un anàleg estructural de lactosa no metabolitzable de cost elevat i que pot resultar tòxic per a la cèl.lula hoste i per a l'humà (Kosinski i col., 1992a).

La soca amb que s'inicia aquest treball per a la producció de Fuc-1-PA, XL1 Blue MRF'(pTrc*fuc*), disposa d'un origen de replicació ColE1, el gen de resistència a l'ampicil.lina i utilitza el promotor *trc* per al control d'expressió. En les últimes dècades però s'ha realitzat un esforç important per desenvolupar nous sistemes d'expressió. Constantment apareixen noves alternatives per intentar millorar la qualitat o quantitat en l'expressió recombinant en *E.coli*. Periòdicament es publiquen revisions sobre el tema (de les més recents: Neubauer i Winter, 2001) que intenten actualitzar les possibles alternatives desenvolupades. El Capítol VII d'aquests treball es centra en la millora del sistema d'expressió de Fuc-1-PA en *E.coli* i a la seva introducció es fa una àmplia revisió sobre les noves possibilitats en regulació d'expressió i control de segregació plasmídica.

### II.3.4.2. Tècniques de cultiu d'*E. coli* en la producció de proteïnes recombinants

Paral·lelament a la millora dels sistemes d'expressió, s'han anat desenvolupant noves i avançades tècniques de cultiu d'*E. coli* per assolir cultius d'alta densitat cel·lular i millorar la productivitat dels processos. Aquest tema també ha estat motiu de nombrosos articles de revisió (Yee i Blach, 1992; Lee, 1996; Riesenberg i Guthke, 1999)

Els sistemes de fermentació utilitzats per al cultiu d'*E. coli* són, bàsicament, tres: el cultiu discontinu, semicontinu i continu.

**El cultiu discontinu** és un sistema fonamentalment tancat en el que tots els nutrients necessaris per al creixement es carreguen al tanc de fermentació a l'inici del procés. Durant el procés no s'addiciona cap altre nutrient al marge de l'aeració i les solucions per al control del pH i es recupera el producte quan el cultiu es dona per finalitzat. En aquest mode d'operació, les condicions de creixement canvien contínuament amb el temps: a mida que creixen les cèl·lules consumeixen els nutrients presents al medi de cultiu i excreten subproductes. Generalment, s'atura el creixement cel·lular per l'esgotament d'un substrat o l'acumulació d'un subproducte tòxic molt abans que el cultiu quedi limitat per la transferència d'oxigen. El principal inconvenient del procés discontinu és l'elevat temps no productiu entre fermentacions que comprèn: càrrega i descàrrega del tanc de fermentació, neteja, esterilització i preparació del nou procés.

**El cultiu continu** és un procés on contínuament s'alimenta medi fresc al biorreactor que conté les cèl·lules en creixement i s'extreu el mateix cabal de cultiu homogeneïtzat amb cèl·lules. Es caracteritza perquè és possible assolir situacions de règim estacionari en que les propietats del cultiu romanen constants en el temps i això permet determinar relacions entre el comportament del microorganisme i les condicions ambientals. Nombrosos aspectes en relació a la fisiologia d'*E. coli* i a l'optimització de medis de cultiu han estat possibles gràcies a aquesta tècnica. Per exemple, s'han determinat velocitats de creixement crítiques per a la producció d'àcid acètic per a un gran nombre de soques (Han i col., 1991; Suárez i Kilikian, 2000) i s'han determinat els coeficients de rendiment de molts nutrients a

biomassa segons la velocitat específica de creixement amb l'objectiu de dissenyar medis definits de composició equilibrada (Lee i Blanch, 1993; Reiling i col., 1995; Rothen i col., 1997).

**El cultiu semicontinu** parteix d'una etapa de creixement discontinu amb una determinada concentració de nutrients al vas de fermentació. En aquesta etapa el microorganisme creix a la seva màxima velocitat específica de creixement. Abans d'entrar en fase estacionària per esgotament dels nutrients limitants, s'inicia una segona etapa de fermentació en la que es van addicionant els nutrients necessaris per mantenir el creixement del cultiu. Escollint la composició del medi de cultiu, del medi alimentat i l'estratègia d'alimentació adequades es possible minimitzar l'acumulació de nutrients i la formació de productes tòxics del metabolisme d'*E. coli* allargant el creixement del cultiu.

D'aquestes tres tècniques de fermentació, la semicontínua és l'única que permet assolir cultius d'alta densitat cel·lular en *E. coli* i, per tant, la de major interès amb finalitats productives de proteïnes recombinants. En cultius en discontinu d'*E. coli* les densitats cel·lulars màximes descrites oscil·len entre 5 i 15 grams de biomassa seca per litre de cultiu. En canvi, emprant estratègies semicontínues es poden arribar a assolir concentracions entre els 50 i 100 g PS/l (Curless i col., 1990; Lee i Blanch, 1992, Mendoza Vega i col., 1995). Les concentracions cel·lulars màximes assolides amb *E. coli* recombinant en fermentadors convencionals es troben al voltant dels 150 g PS/l (Horn i col., 1996; Korz i col., 1995). L'addició limitada d'un nutrient essencial per creixement durant l'etapa alimentada permet controlar el creixement del cultiu i això es tradueix en una solució per als principals problemes per assolir cultius d'alta densitat cel·lular d'*E. coli*. Aquests problemes són bàsicament dos:

- 1.- la limitació en la transferència d'oxigen. En bioreactors convencionals discontinus la transferència d'oxigen per mantenir el creixement queda limitada entre els 10-20 PS g/l (Neubauer i Winter, 2001). Treballant amb velocitats de creixement inferiors que la velocitat específica màxima per al microorganisme, s'allarga el temps de creixement en condicions aeròbies.

2.- L'acumulació d'àcid acètic al medi de cultiu com a principal producte tòxic del metabolisme d'*E. coli*. Al controlar l'addició de la font de carboni i energia per al creixement és possible evitar la seva acumulació al medi i mantenir velocitats de creixement inferiors a la crítica per a la producció d'acètic (veure I.3.2.).

Un altre aspecte que la majoria d'autors consideren de màxima importància en relació a la producció recombinant en *E. coli*, tant per a l'èxit de les estratègies semicontínues per assolir cultius d'alta densitat cel.lular com per maximitzar la productivitat específica, és la composició del medi de cultiu (Neubauer and Winter, 2001).

En base a aquesta revisió bibliogràfica general, resulta obvi que l'optimització d'un procés per a la producció de Fuc-1-PA ha de passar per posar a punt una estratègia semicontínua que permeti el seu cultiu a altes densitats cel.lulars. El Capítol V d'aquest treball es centra en l'elecció d'un medi adequat per a l'expressió de Fuc-1-PA en XL1 Blue MRF' (pTrc $fuc$ ) i la seva introducció es centra en descriure els diferents tipus de medis i els efectes que se'ls atribueix en relació a l'expressió heteròloga de proteïnes en *E. coli*. L'objectiu primer del capítol següent, Capítol VI, és l'optimització d'un procés semicontinu per assolir cultius d'alta densitat cel.lular. Igualment, la seva introducció es centra en una àmplia revisió bibliogràfica en relació a estratègies de cultiu semicontinu per assolir cultius d'alta densitat cel.lular.

### III. OBJECTIUS

#### Objectiu general

Definir un procés optimitzat i reproduïble per a l'obtenció de l'aldolasa Fuc-1-PA en *E.coli* a escala productiva.

#### Objectius específics

1. Determinar l'efecte de la composició del medi de cultiu en la sobreexpressió recombinant de Fuc-1-PA en *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).
2. Desenvolupar una estratègia de cultiu semicontínua que permeti assolir cultius d'alta densitat cel.lular d' *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en condicions reproduïbles.
3. Optimitzar la producció de Fuc-1-PA a les condicions d'operació fixades per l'estratègia semicontínua desenvolupada. Aquest objectiu passa per definir un criteri d'inducció que permeti maximitzar la concentració volumètrica de Fuc-1-PA activa ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1}$ ) i la productivitat ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) al final del procés.
4. Avaluar les possibilitats de millora del procés de producció obtingut a nivell genètic utilitzant nous sistemes d'expressió recombinant que presentin avantatges relacionats amb els nivells de sobreexpressió de Fuc-1-PA o els costos del procés.
5. Finalment, estudiar la viabilitat del procés desenvolupat a escala productiva.



## IV.1. EQUIPAMENT GENERAL I PRODUCTES QUÍMICS

### IV.1.1. EQUIPAMENT GENERAL

- Agitador magnètic:
  - Multiagitador Snijders.
  - Agitador SBS<sup>®</sup> A-161 serie B.
- Agitador vòrtex Velp Scientifica 2x<sup>3</sup>.
- Autoclau P-selecta AUTESTER-E
- Balança analítica Scaltec SBC22.
- Balança granetària Mettler PJ 6000.
- Bany termostatat P-selecta Tectron Bio
- Bomba peristàltica EYELA MP-3.
- Cambra de flux laminar Telstar BH-10.
- Centrífuga Kontrol Hermle Centrikon H-401 ZK-401.
- Centrífuga per a tubs Eppendorf Hettich Zentrifugen Mikro 12-24.
- Equip electroforesi:
  - Bio-Rad Mini-Protean II Dual Slab Cell.
  - Font d'alimentació LKB BROMMA 2197 Power Supply.
- Espectrofotòmetre KONTRON Uvicon 941 Plus
- Estufes:
  - Estufa de cultius Memmert.
  - Estufa P-selecta Digitronic.
- Incubador orbital de cultius Gallenkamp.
- Liofilitzador Virtis Sentry Benchtop 5L.
- Micropipetes de volum variable Nichiryo Nichipet.
- Microscopi òptic Olympus BH-2 .
- pH-metre Crison Micro pH 2001
- Sonicador Vibra-cell<sup>™</sup> Sonic & Materials Inc. DANBURY CT.
- Sonicador Braun Labsonic 2000.

### IV.1.2. PRODUCTES QUÍMICS

Els productes químics d'ús general utilitzats són de grau analític de les firmes Panreac (treballant als laboratoris del departament d'Enginyeria Química de la UAB) i Merck (treballant als laboratoris de Cobra Bio-manufacturing plc. (Keele, Regne Unit)). La procedència dels productes d'ús més específic s'indicarà a mesura que apareguin en el text.

El substrat per l'assaig enzimàtic específic de Fuc-1-PA, Fuc-1-P, no és comercial i s'ha sintetitzat al laboratori, tal i com es descriu a l'apartat IV.5.3.2.3. d'aquest capítol, seguint un protocol desenvolupat en anteriors treballs de l'equip (Durany, 2000) que permet la síntesi de lots de qualitat reproducible.

## IV.2. MATERIAL BIOLÒGIC I MEDIS DE CULTIU

### IV.2.1. SOQUES I VECTORS

#### IV.2.1.1. Descripció de soques i vectors

##### *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc)

Es disposa de la soca *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) per a la sobreexpressió de Fuc-1-PA. Aquesta soca recombinant ha estat cedida pel Dr. Garcia Junceda i obtinguda a partir dels seus treballs de col·laboració amb el grup de recerca del Dr. Wong (Scripps. Ins.; La Jolla, U.S.A.) (Garcia-Junceda et al., 1995).

- La soca *hoste E.coli* XL1 Blue MRF'.

La soca emprada com a *hoste*, XL1 Blue MRF' (Stratagene Co.; San Diego, CA), es caracteritza per ser deficient en els gens que codifiquen per als enzims involucrats en la síntesi de tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>) i també per contenir un episoma F'. L'episoma F' és un plàsmid que conté el factor F que codifica pel pili sexual a través del qual el bacteriòfag

M13 pot infectar la cèl·lula i pels gens que codifiquen els enzims involucrats en la síntesi de prolina. Un sistema de complementació per l'operó lactosa (*lac*) entre l'episoma F' i el plàsmid emprat com a vector de clonatge facilita la selecció dels clons transformats amb èxit que contenen el plàsmid amb l'insert que codifica per l'expressió de l'enzim d'interès.

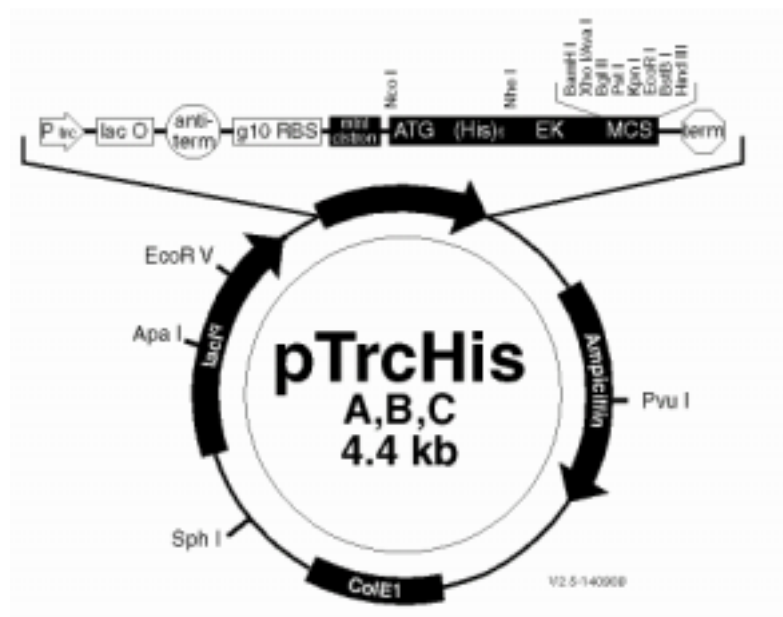
El genotip d'*E. coli* XL1 Blue MRF' és:

$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1}$   
 $\text{gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$

- *El vector de clonatge: plàsmid pTrcHis.*

El sistema d'expressió pTrcHis (Invitrogen; San Diego, CA) és un sistema dissenyat per l'expressió regulada d'alts nivells de proteïnes no tòxiques en *E. coli* sota el control del promotor d'expressió *trc*. Aquest promotor *trc* és un híbrid derivat dels promotors *trp* i *lac* regulat per l'operador *lacO* i el producte d'expressió del gen *lacI*<sup>q</sup>. La presència de lactosa o el seu anàleg estructural isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranosid (IPTG) activen la transcripció del gen *lacI*<sup>q</sup>, el producte d'expressió obtingut actua sobre l'operador *lacO* i permet l'expressió dels gens dependents d'aquest promotor fort.

Aquest plàsmid consta d'un origen de replicació (ColE1), un gen de resistència a ampicil·lina (*Amp*<sup>r</sup>) i, sota el control del promotor *trc*, la seqüència codificant per una cua d'histidines junt al *polylinker*. de forma que la proteïna clonada s'expressa com a proteïna de fusió a sis histidines en el seu extrem N-terminal.



Plàsmid pTrcHis (Invitrogen; San Diego, CA).

#### ***E.coli* XL10-Gold *Kan<sup>r</sup>* (Ref.: 200315; Stratagene)**

La soca *E.coli* XL10-Gold *Kan<sup>r</sup>* es caracteritza per la seva alta eficiència en la transformació de molècules de DNA grans i procedents de lligació. És una soca especialment preparada per experiments de clonatge en que es requereix eficiències de transformació altes. Conté el gen de resistència a kanamicina al episoma F'.

Aquesta soca s'ha utilitzat en aquest treball en tots els passos de clonatge per l'obtenció dels nous vectors pORT1 per l'expressió de Fuc-1-PA.

El genotip d'*E.coli* XL10-Gold *kan<sup>r</sup>* és:

*Tet<sup>r</sup> D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96  
relA1 lac Hte [F $\phi$  proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Tn5 (Kan<sup>r</sup>) Amy]*

### ***E.coli* DH1*lacdapD* i *E.coli* DH1*lacP2dapD* (Cobra Bio-Manufacturing plc.)**

Aquestes soques, *E.coli* DH1*lacdapD* i *E.coli* DH1*lacP2dapD*, són la base del sistema d'expressió ORT patentat per Cobra Bio-Manufacturing plc. El seu cromosoma ha estat modificat de forma que contenen el gen cromosòmic essencial *dapD* sota el control del promotor/operador *lac* (Cranenburgh et al., 2001). Aquestes cèl.lules lisen sinó és en presència de:

- lactosa o IPTG (que indueixen l'expressió de *dapD*),
- la proteïna codificada per *dapD*, tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa (DAP), o
- transformades amb un plàsmid multicòpia que contingui l'operó *lac*.

Aquesta última opció permet un sistema de selecció plasmídica eficaç lliure de l'ús d'antibiòtics i amb aquest objectiu han estat emprades en aquest treball.

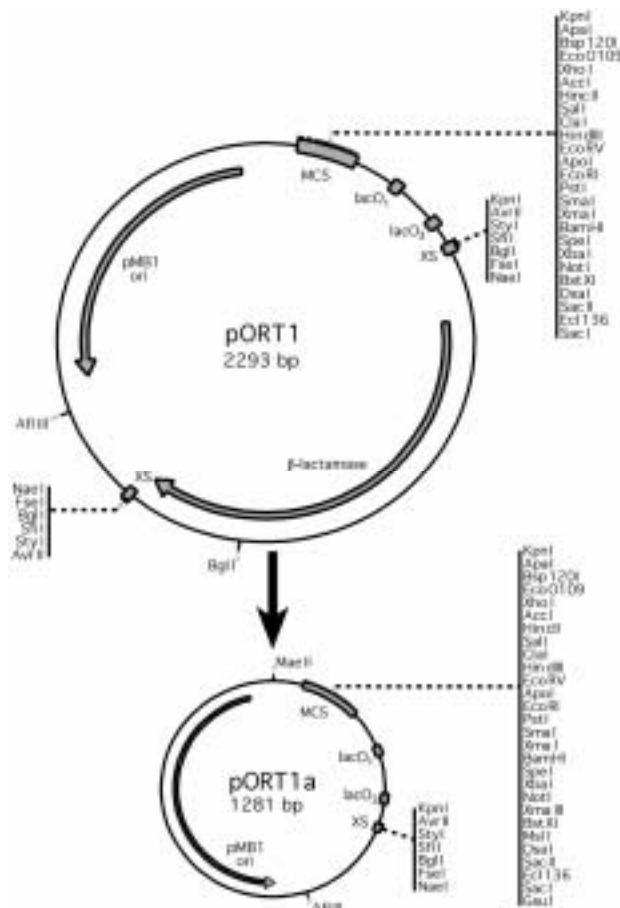
*E.coli* DH1*lacdapD* conté un promotor *lac* però aquesta soca és capaç de créixer en LB sense les suplementacions esmentades al punt anterior degut a uns nivells d'expressió basal, no regulada pel promotor *lac*, molt baixos però suficients per mantenir el creixement cel.lular. El genotip d'*E. coli* DH1*lacP2dapD* és idèntic al d'*E. coli* DH1*lacdapD* però en aquest cas només es modifiquen 2 nucleòtids en la seqüència del promotor *lac* que passa a *lacP2* per una millor unió operó-proteïna repressora i una menor expressió del gen sota control: aquesta soca ja no és capaç de créixer en LB sense les suplementacions necessàries per induir l'expressió del gen essencial.

- El genotip d'*E. coli* DH1*lacdapD* i *E.coli* DH1*lacP2dapD* és:  
recA endAI gyrA96 thi1hsdr17 supE44 relA1  $\Delta$ (dapD)::kan hipA::lac-dapD

### **Vectors pORT1 i pORT1a (Cobra Bio-Manufacturing plc.)**

El vector pORT1 ha estat construït a partir del vector comercial pBluescript SK(+) (Stratagene) (Cranenburgh et al., 2001). Conté una regió amb llocs de tall únics per molts enzims de restricció (MSC, *multicloning site*) flanquejat pels llocs d'unió de l'encebador

(*primer*) M13 per facilitar la seqüenciació, l'origen de replicació pMB1 *ori* per alt número de còpies, les seqüències d'operó *lac* òptimament espaiades: *lacO*<sub>1</sub> i *lacO*<sub>3</sub> i el gen *bla* flanquejat per dos seqüències repetides amb lloc de tall per sis endonucleases (XS, *excision sites*) . Tallant amb qualsevol d'aquestes endonucleases i relligant s'obté el plàsmid pORT1a lliure del gen *bla*.



Plàsmids pORT1 i pORT1a. S'indiquen els enzims de restricció amb lloc de tall únic.

#### IV.2.1.2. Conservació i manipulació de soques

Per assegurar la integritat de la soca es manté un estoc d'alíquotes de glicerinat de cada soca original a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cada experiment parteix d'una d'aquestes alíquotes i l'estoc es

renova quan és necessari amb la preparació de nous glicerinars partint d'una de les alíquotes de la soca original.

#### IV.2.1.2.1 Revifament a partir de glicerinars.

##### *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc)

1.- En condicions asèptiques, es transfereix un anell glicerinat de l'estoc d'*E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) a  $-80^{\circ}\text{C}$  a un matràs Erlenmeyer de 100 ml de capacitat que contingui 15 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina a concentració final  $250\mu\text{M}$ .

2.- S'incuba el cultiu inoculat al voltant de 12 hores a  $37^{\circ}\text{C}$  i 250 rpm.

3.- El cultiu obtingut s'utilitza com a pre-inòcul en estudis de creixement en fermentador o bé per a la preparació de nous glicerinars.

##### *E.coli* XL10 gold *kan*' , *E.coli* DH1lacdapD i *E.coli* DH1lacP2dapD

El mode d'operació als laboratoris de Cobra Bio-Manufacturing plc. és bàsicament el mateix, únicament cal considerar:

- per al primer pas de cultiu líquid s'inoculen només 5 ml de LB en un tub estèril amb 10  $\mu\text{l}$  d'una alíquota glicerina prèviament descongelada.
- Les soques *E.coli* DH1lacdapD i *E.coli* DH1lacP2dapD no requereixen de la suplementació del medi amb ampicil·lina.

#### IV.2.1.2.2 Preparació de glicerinars

##### *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc)

Per a la preparació dels glicerinars s'utilitzen uns preparats comercials amb aquest finalitat: *Cryobilles* (Ref: AEB400100; AES Laboratoire (França)). Es tracta d'uns tubs asèptics de 1ml de

capacitat útil que contenen unes boles a les que s'adhereix el microorganisme submergides en una solució hipertònica crio-preservativa.

1.- El cultiu de revifament obtingut al punt IV.2.1.1.1. s'utilitza com a pre-inòcul d'un segon cultiu realitzat en les mateixes condicions i que es fa créixer fins assolir la fase exponencial de creixement. Quan la D.O.  $_{600\text{nm}} = 1,00 \pm 0,5$  s'utilitza per la preparació de glicerinats (són necessàries al voltant de 2 hores de creixement)

1.- S'obre, en condicions asèptiques, un tub de *Cryo-billes* i s'afegeix 500 µl del cultiu.

2.- S'homogeneïtza el contingut del tub per inversió i es retira, amb ajut d'una micropipeta, el màxim de la solució sobrenedant.

3.- Es conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*E.coli* XL10 gold *kan'*, *E.coli* DH1*lacdapD* i *E.coli* DH1*lacP2dapD*

El mode d'operació als laboratoris de Cobra Bio-Manufacturing plc. és bàsicament el mateix, únicament cal considerar que els glicerinats es preparen directament amb glicerol estèril, sense cap suport comercial, igualment a partir d'un cultiu en creixement exponencial a D.O. $_{600\text{nm}} = 1.00 \pm 0,5$ , barrejant cultiu i glicerol a una concentració final en glicerol 15%.

#### IV.2.2. MEDIS DE CULTIU

Tots els medis, o les seves solucions components, s'esterilitzen a  $120^{\circ}\text{C}$  durant 20 min. Només en el cas de solucions concentrades de glucosa el temps d'esterilització és de 15 min per minimitzar caramelitzacions del sucre (McNeil and Harvey, 1990). Quan és necessària l'esterilització alternativa per filtració amb filtres de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millex-GS, Millipore) es detalla al text.



Els medis es suplementen amb ampicil.lina com a marcador de selecció a concentració final 100  $\mu\text{M}$  quan és necessari. Altres suplementacions específiques per auxotrofies concretes de la soca de treball es detallen per a cada medi.

### **Medi complex LB (Luria-Bertani)**

Composició (g·l<sup>-1</sup>): Triptona (Ref.: L42; Oxoid), 10; Extracte de llevat (Ref: L21; Oxoid), 5; NaCl, 10.

### **Medi complex SOC**

Aquest medi s'utilitza únicament per al revifament de cèl.lules sotmeses a electroporació segons el protocol de transformació per electroporació.

Composició (g·l<sup>-1</sup>): Triptona (Ref.: L42; Oxoid), 2; Extracte de llevat (Ref: L21; Oxoid), 5; NaCl, 0.6; KCl, 0.2; MgCl<sub>2</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>, 1.3; glucosa, 3.6.

### **Medi definit MD**

Medi definit utilitzat en creixements en matrassos Erlenmeyer d'*E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrc*fac*), modificació del prèviament descrit per Yee i Blanch (Yee and Blanch, 1993b):

Composició (g·l<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13.23; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.65; NaCl, 1.33; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.47; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.09; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.04; Glucosa, 10; Tiamina, 0.01 i solució d'elements traça, 16 ml.

Solució d'elements traça (mg·l<sup>-1</sup>): Cl<sub>3</sub>Al·6H<sub>2</sub>O, 110; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 160; CuSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 40; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 400; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 20; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 100.

Preparació: es preparen dues solucions de sals separades per esterilitzar a l'autoclau (120°C, 30min ): la solució concentrada d'elements traça i una solució concentrada que inclou tota la resta de sals al medi, solució de *macroelements*. La glucosa es prepara en una solució

estoc de  $100\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  i s'esterilitza a l'autoclau ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 min). També es preparen solucions individuals d'ampicil.lina (estoc  $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) i tiamina (estoc  $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) que cal esterilitzar per filtració amb filtres de  $0.22\ \mu\text{m}$  (Millex-GS, Millipore).

### **Medi semidefinit MSC**

Medi semidefinit utilitzat en creixements en matrassos Erlenmeyer d'*E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc). Es prepara segons es descriu per al medi MD suplementant-lo amb la quantitat d'extracte de llevat d'interès. L'extracte de llevat s'afegeix a la solució de *macroelements* prèvia esterilització.

### **Medi definit MD-FB**

Medi definit per al cultiu d'*E. coli* a altes densitats cel.lular en estratègies semicontínues. Dissenyat en base a la composició elemental d'*E. coli* i a dades per als rendiments a biomassa dels principals nutrients. La discussió en relació a la composició d'aquest medi i als criteris per la distribució dels seus components entre la fase discontinua i alimentada forma part del Capítol VI. d'aquest treball.

#### *Medi MD-FB per l'etapa discontinua de creixement*

Composició ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ): Glucosa,  $25^{(*)}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 13.23;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.65; NaCl, 2.04;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4.10;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}^{(*)}$ , 0.5;  $\text{FeCl}_3$ , 0.026, Tiamina, 0.01 i *solució d'elements traça*,  $2,86\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Quan es treballa amb soques recombinants derivades de *DH1lacdapD* també és necessària la suplementació de L-prolina. La concentració de L-prolina al medi es fixa segons el seu consum relatiu a glucosa i el valor d'aquest rendiment ha estat motiu d'estudi del Capítol VII d'aquest treball.

*Solució d'elements traça* ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.44;  $\text{Cl}_3\text{Al} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.04;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.87;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.55;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.01;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.42;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.02.

(\*) Només  $10 \text{ g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$  quan es treballa en matrassos Erlenmeyer: generalment per a l'obtenció dels precultius per inocular els experiments en fermentadors.

Puntualment, també s'ha treballat amb altres concentracions de glucosa en l'etapa discontinua d'experiments en fermentador. Concretament, a  $5$  i  $10 \text{ g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$ . En aquests casos no es va modificar la composició en la resta d'elements adicionats segons els seus rendiments relatius a glucosa treballant amb un excés superior respecte a la glucosa com a nutrient limitant.

Preparació: Es preparen, esterilitzen i barregen en la proporció adequada les següents solucions:

- Glucosa  $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $120^\circ\text{C}$ , 15 min).
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $500 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
- *Solució concentrada de macroelements* ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 17.91;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.59;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5.55;  $\text{NaCl}$ , 2.76.
- *Solució d'elements traça* ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.44;  $\text{Cl}_3\text{Al} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.04;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.87;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.55;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.01;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.42;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.02. S'ajusta el pH entre 1.5 i 2.00 amb  $\text{HCl}$ .
- $\text{FeCl}_3$   $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  (Esterilització per filtració amb filtres de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millex-GS, Millipore)).
- Tiamina  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Esterilització per filtració amb filtres de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millex-GS, Millipore)).

#### Medi MD-FB per a l'etapa alimentada de creixement

Es treballa amb dos solucions alimentades: una de glucosa concentrada com a font de carboni limitant del creixement que conté a més la resta de nutrients que cal alimentar en lleuger excés segons el seu rendiment relatiu a glucosa. La segona és una solució

concentrada per la suplementació puntual de fosfats segons el criteri fixat per la seva addició (veure Capítol VI.)

*Solució A: per l'alimentació concentrada de glucosa.* Composició ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Glucosa, 582.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10.7;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 11.6;  $\text{FeCl}_3$ , 0.6, Tiamina, 0.35 i solució d'elements traça,  $76,6 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Preparació: Es preparen, esterilitzen separadament i es barregen en la proporció adient les següents solucions:

- *Solució estoc de glucosa concentrada (solució A.1).* Composició ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Glucosa, 600.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12.0;  $\text{FeCl}_3$ , 0.61; Tiamina, 0.42 i *solució d'elements traça*  $79 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ . (Esterilització:  $120^\circ\text{C}$ , 15 min)

- *Solució estoc d'amoni concentrat (solució A.2).* Composició ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $475 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

*Solució B: per l'alimentació concentrada de fosfats ( $111.7 \text{ g P} \cdot \text{l}^{-1}$ ).* Composició ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 500;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100

### **Medi definit MDI**

Aquest és un medi descrit per Wilms i col.laboradors per al cultiu d'*E. coli* fins a altes densitats cel.lulars en estratègies semicontínues (Wilms i col., 2001). Aquest medi s'utilitza únicament a l'experiment FB-2 d'aquest treball.

#### Medi MDI per l'etapa discontinua de creixement

Composició ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Glucosa, 25,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 14.60;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4.00;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.68;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2.00;  $(\text{NH}_4)_2 - \text{H} - \text{citrat}$ , 1.00; Tiamina,  $0.01^{(*)}$  i *solució d'elements traça* (anomenada TES),  $3 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ .

<sup>(\*)</sup>. El medi original descrit per Wilms i col.laboradors no té tiamina. S'inclou en la mateixa proporció que en el medi MD-FB.

*Solució TES* ( $\text{g.l}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_3$ , 8,35,  $\text{CaCl}_2$ , 0.50;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.18;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.18;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.10;  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11.13.

*Preparació:* Es preparen, esterilitzen i barregen en la proporció adequada les següents solucions:

- Glucosa  $100\text{g.l}^{-1}$  (Esterilització:  $120^\circ\text{C}$ , 15 min).
- *Solució concentrada de macroelements* ( $\text{g.l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 19.55;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.36;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.59;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2.68;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.67;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.67;  $(\text{NH}_4)_2 - \text{H} - \text{citrat}$ , 1,34.
- *Solució TES* ( $\text{g.l}^{-1}$ ):  $\text{FeCl}_3$ , 8,35,  $\text{CaCl}_2$ , 0.50;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.18;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.18;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.10;  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11.13.
- Tiamina  $100\text{ mg.ml}^{-1}$  (Esterilització per filtració amb filtres de  $0.22\ \mu\text{m}$  (Millex-GS, Millipore)).

#### *Medi MDI per l'etapa alimentada de creixement*

*Solució A: per l'alimentació concentrada de glucosa.* Composició ( $\text{g.l}^{-1}$ ): Glucosa, 600.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 23.68; Tiamina, 0.63 i solució TES,  $125\text{ ml.l}^{-1}$ . (Esterilització:  $120^\circ\text{C}$ , 15 min).

*Solució B: per l'alimentació concentrada de fosfats.* Composició ( $\text{g.l}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 76.2.

### **IV.3. CULTIU EN MATRÀS ERLNMEYER**

#### **a.- Departament d'Enginyeria Química (UAB)**

Per als estudis de caracterització de la soca XL1 Blue MRF' (pT $\text{rcfuc}$ ) en matrassos Erlenmeyer realitzats al Departament d'Enginyeria Química de la UAB s'ha seguit el següent protocol:

1.- Es parteix d'un cultiu de revifament a partir de glicerinat tal com es descriu a l'apartat IV.2.1.2.1.

2.- Amb aquest cultiu de revifament s'inoculen matrassos Erlenmeyers d'1 litre de capacitat que contenen 200ml del medi de cultiu en estudi. El volum d'inòcul emprat és tal que la  $D.O_{600nm}$  inicial oscil·li entre 0,3 i 0,35 unitats. Les condicions de cultiu prèvies a la inducció es fixen a 37°C i 200 rpm .

En tots els casos i prèvia inoculació, s'addiciona ampicil·lina com a marcador de selecció a concentració final de 100 mg.l<sup>-1</sup>. Per als estudis d'expressió de Fuc-1-PA, es fixa el moment d'inducció a les 4,5 hores de creixement i s'indueix per addició del volum d'una solució 100mM IPTG necessari per assolir la concentració d'IPTG al medi de cultiu fixada per a l'estudi en cada cas. Només quan s'indica al text la temperatura es redueix a 30°C després de la inducció.

#### **b.- Laboratoris de Cobra Bio-Manufacturing plc. (Keele, UK)**

Els estudis de caracterització equivalents als laboratoris de Cobra Bio-Manufacturing plc. es realitzen seguint bàsicament el mateix protocol. Cal considerar només les següents modificacions:

1.- es treballa amb matrassos Erlenmeyers de 250ml de capacitat que contenen 50ml del medi de cultiu en estudi.

2.- s'indueix a l'inici de la fase exponencial de creixement, quan la  $D.O_{600nm}$  és de 1.0 +/- 0.5 unitats.

3.- Per cada una de les soques en estudi canvia l'inductor d'expressió recombinant i les suplementacions dels medis segons es detalla a la següent taula:

Soca	Inductor	Suplementacions del medi de cultiu	
		LB	MD-FB
XL1 Blue MRF'(pTrefuc)	500 $\mu$ M IPTG	Ampicil.lina (0,1 g.l <sup>-1</sup> )	
DH1lacdapD(pORT1afuc)	500 $\mu$ M IPTG	-----	L-prolina (0,5 g.l <sup>-1</sup> )
DH1lacdapD(pORT1aLfuc)	30°C → 42°C	-----	L-prolina (0,5 g.l <sup>-1</sup> )

No s'especifica en aquesta taula les suplementacions necessàries per tiamina. Totes les soques en estudi són auxotròfiques per aquesta vitamina i la seva suplementació s'ha introduït directament en la formulació dels medis definits utilitzats en aquest treball.

#### IV.4. DESCRIPCIÓ D'EQUIPS DE FERMENTACIÓ I OPERACIÓ

##### IV.4.1. Biostat<sup>®</sup> B (Braun Biotech Int.)

###### IV.4.1.1. Descripció de l'equip i accessoris.

El Biostat<sup>®</sup> B (Braun Biotech Int.) és un fermentador compacte d'escala de laboratori que consta d'un vas de fermentació agitat i una unitat de control integrada.

Es treballa amb un vas de fermentació tipus B2 (Braun Biotech Int.), de capacitat màxima 3,0 l i un volum de treball de 1,6 l. Relació altura/diàmetre=2,0. Per al control de temperatura disposa d'una camisa d'aigua envoltant el vas de vidre. La tapa de l'equip és d'acer inoxidable i en ella es disposen totes les sortides i entrades al sistema per al seu control. Consta de totes les connexions necessàries per transferir la informació de seguiment a la unitat de control (en aquesta tapa es col·loquen les sondes de pH i oxigen i el sensor de nivell i de temperatura) així com la resta d'accessoris del sistema: difusor, presa de mostra, entrada d'àcid i àlcali i la sortida del condensador de gasos.

La unitat integrada conté un sistema de termostat i les instal·lacions necessàries per subministrar corrent elèctric a tot el sistema, aire a pressió, aigua de xarxa d'entrada a la

camisa del vas de fermentació i al condensador de gasos i també per l'evacuació de les aigües brutes d'ambdós sistemes. Disposa de quatre bombes peristàltiques integrades per l'addició d'àcid, base, d'antiespumant i d'altres suplementes del medi.

Aquesta unitat treballa amb una terminal de software Micro-DCU-system (Braun Biotech Int.) que facilita el seguiment, calibració i control de les variables de procés: agitació, temperatura, pH, i oxigen dissolt. L'equip disposa de mòduls de control del tipus on-off, PI o PID per cada una d'aquestes variables i s'ha treballat amb el mòdul PID. El mòdul de control de pH disposa d'una banda morta, dins la qual la variació de pH no provoca l'acció de les bombes dosificadores d'àcid i base.

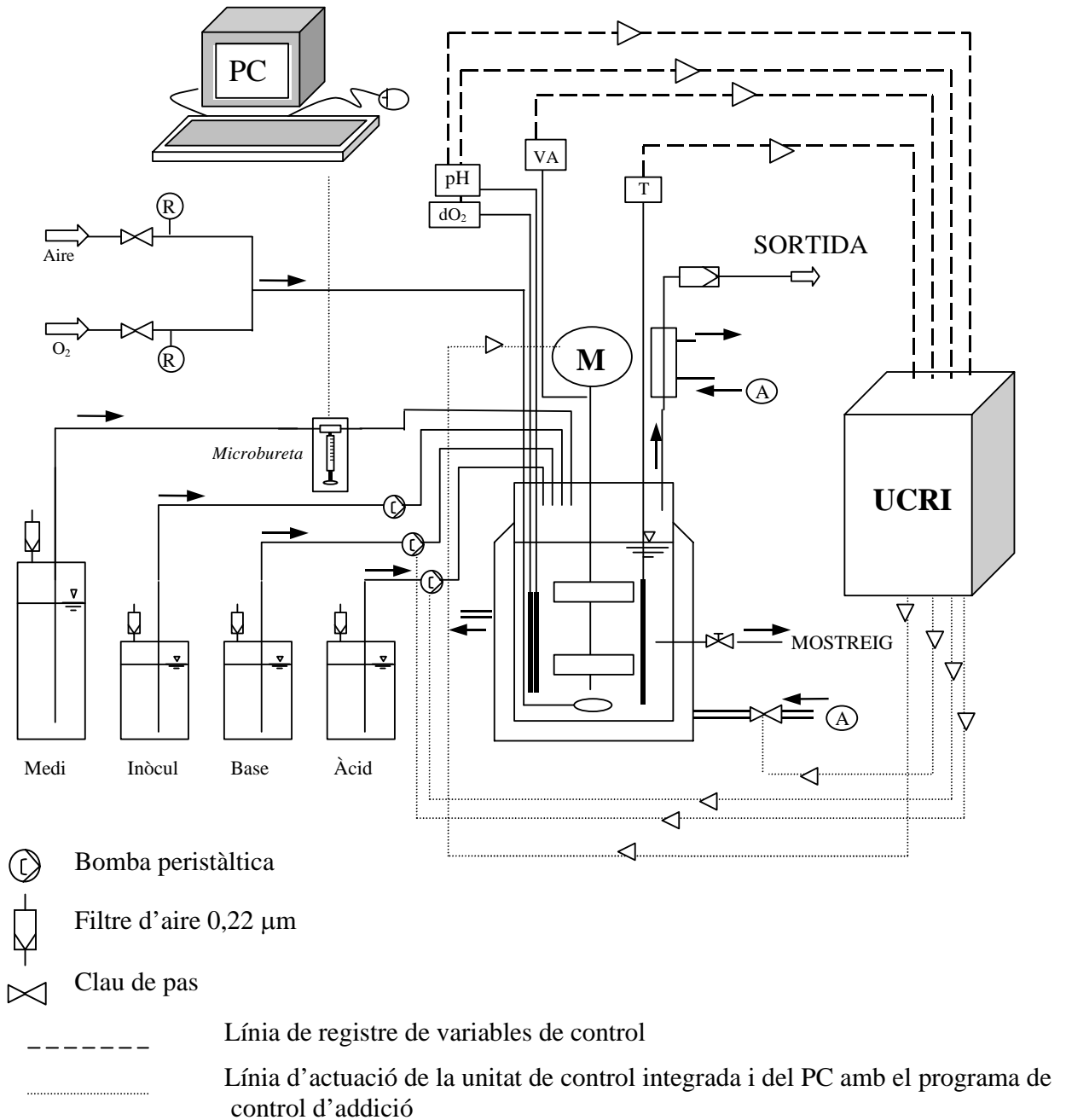
El cabal d'aire entrant al fermentador es controla amb un rotàmetre també implementat a la unitat de control. L'aire es fa difondre dins el brou de cultiu mitjançant un difusor tipus anell (*sparger ring*) i el sistema d'agitació consta de dos turbines de disc (Rhuston) òptimament espaiades segons el volum de treball.

#### **Accessoris per l'implementació de l'estratègia semicontínua l'equip Biostat®B (Braun Biotech Int.):**

- Per l'addició controlada del medi alimentat en l'etapa semicontínua s'ha implementat a l'equip de treball una microbureta automàtica MICRO BU 2030 (Crison Instruments S.A.) amb una xeringa Hamilton de 2,5 ml de capacitat (Microliter™ Syringe 2,5 ml; Hamilton).
- S'ha aprofitat la sortida de perifèrics de la unitat de control per implementar un PC que permet el registre i visualització de les dades adquirides per la unitat de control. En aquest PC s'implementa també el software de control de la microbureta d'addició d'aliment en la fase semicontínua. Ambdós programes han estat dissenyats i implementats per J.C. Hurtado. El llenguatge de programació és VisualBasic v.6 edició professional.



Esquema i fotografies de l'equip B Biostat®B (Braun Biotech Int.)



Esquema del muntatge de l'equip B Biostat®B (Braun Biotech Int.) per als experiments semicontinus. Abreviacions: **M**: motor d'agitació, **A**: aigua de xarxa, **UCRI**: Unitat de control i registre integrada, **R**: rotàmetre. Quadrats: controladors locals i sensors: **pH**: sensor de pH, **dO<sub>2</sub>**: sensor d'oxigen dissolt, **T**: sensor de temperatura, **VA**: controlador de la velocitat d'agitació (rpm)

Fotografia del montatge de l'equip B Biostat<sup>®</sup>B (Braun Biotech Int.)

#### IV.4.1.2. Condicions d'operació

Tots els experiments s'han realitzat fixant les mateixes condicions de treball:

**Medi de cultiu:** MD-FB

**Volum per l'etapa discontinua:** 0,8 l

**Temperatura:** 37°C

**Cabal i pressió d'entrada d'aire:**  $2,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$

**Valor fixat (*set point*) d'oxigen dissolt:** 50%

**Mode d'agitació:** en cascada; variant entre 250 i 960 rpm per mantenir el valor fixat d'oxigen dissolt al medi

**Valor fixat (*Set point*) de pH:** 7.00 +/- 0.05

**Solucions per al control de pH :** base:  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% (p/V); acid:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M

**Preparació i esterilització de l'equip**

Es prepara el vas de fermentació muntant tots els accessoris, introduint únicament la solució de macroelements del medi MD-FB per l'etapa discontinua i, finalment, les sondes de control necessàries (cal calibrar la sonda de pH prèvia esterilització). S'esterilitza a l'autoclau (120°C, 20 min) protegint les sortides de connexió a la unitat de control. Quan la temperatura del medi és inferior a 50°C es suplementa amb la resta de components del medi MD-FB per l'etapa discontinua a la campana de flux laminar i es connecta el vas de fermentació a la unitat de control. Són necessàries un mínim de 8 hores de polarització de la sonda d'oxigen prèvia calibració. Un cop calibrada aquesta sonda ja es pot procedir a la inoculació del sistema.

### **Preparació de l'inòcul**

El medi de cultiu s'inocula a una relació d'inòcul a volum inicial de fermentació 1:10. Per un volum per l'etapa discontinua de 0,8 l són necessaris 80 ml d'inòcul i 720 ml de medi fresc al fermentador. L'inòcul s'obté mitjançant un cultiu en matràs Erlenmeyer i medi MD-FB de 12 hores de creixement (*veure IV.3.a*).

### **Presa de mostres**

El fermentador Biostat®B incorpora un sistema d'extracció de mostra per a mostres de fins 25 ml. El sistema consta d'una cànula d'extracció i un dipòsit on queda recollida la mostra que es pot extreure en crear una diferència de pressió amb ajut d'una xeringa. La mostra es retira en condicions asèptiques a la flama.

#### IV.4.2. BIOREACTOR de 7 l Z61103CT07 (FT Applikon Ltd.)

##### IV.4.2.1 Descripció de l'equip i accessoris.

El bioreactor de 7 l Z61103CT07 d'Applikon és un fermentador d'escala de laboratori pensat per treballar amb un seguit d'unitats de control de la mateixa casa comercial que es detallen en aquest apartat.

El vas de fermentació té una capacitat màxima 7,0 l i un volum de treball de 5,4 l. Relació alçada/diàmetre = 2,2. Per al control de temperatura disposa d'una camisa d'aigua envoltant el vas de vidre. La tapa de l'equip és d'acer inoxidable i en ella es disposen totes les sortides i entrades al sistema per al seu control.

Les unitats de control i altres accessoris acoblats són:

- Bio Controller ADI 1010 (FT Applikon Ltd): és una unitat per al seguiment i control de les variables: pH, temperatura, oxigen dissolt, velocitat d'agitació i nivells d'espuma, en bioreactors que es poden esterilitzar a l'autoclau. L'algorisme de control per pH, temperatura i oxigen dissolt és del tipus PID.
- ADI 1025 Bio Console (FT Applikon Ltd): és un equip dissenyat per funcionar en combinació amb la unitat de control Bio Controller ADI 1010 (FT Applikon Ltd). Permet la regulació del cabal d'aire entrant al sistema mitjançant un rotàmetre integrat, el control de temperatura mitjançant un mòdul d'escalfament i recirculació d'aigua i l'addició de líquid mitjançant 3 bombes peristàltiques integrades.
- P310 Stirrer Motor i ADI 1032 Stirrer Speed Controller (FT Applikon Ltd): motor i control d'agitació implementat a l'equip. L'agitació pot variar entre 0-1250 rpm i per al control en cascada, l'equip està pensat per la seva implementació amb la unitat de control d'oxigen dissolt Bio Controller ADI 1010 (FT Applikon Ltd).

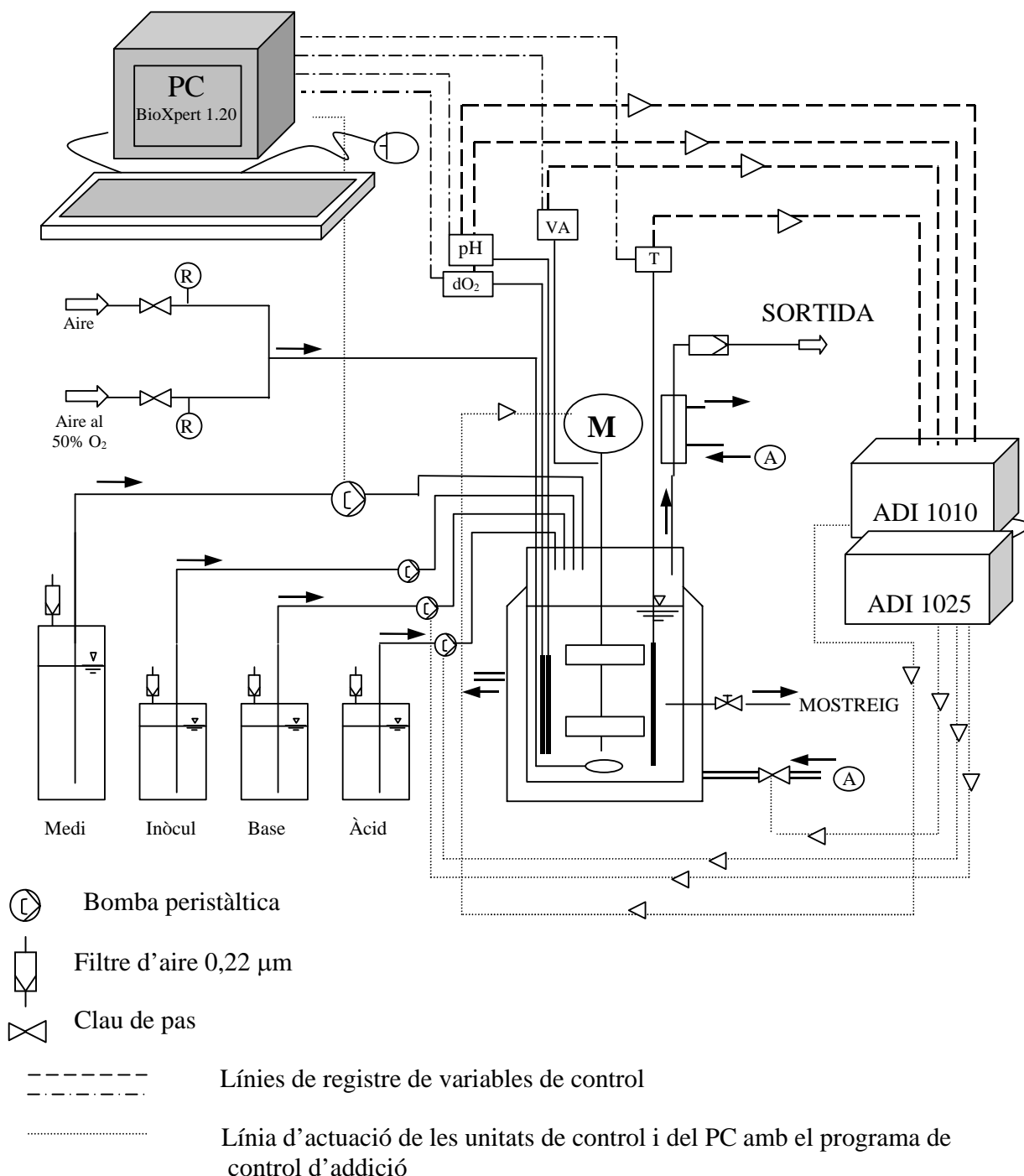
L'aire es fa difondre dins el brou de cultiu mitjançant un difusor tipus anell (*sparger ring*) i el sistema d'agitació consta de dos turbines de disc (Rhuston) òptimament espaciades segons el volum de treball.

Per al registre de dades de seguiment i el control de bombes addicionals per l'alimentació en cultius semicontínues s'utilitza el Software específic BioXpert 1.20 (FT Applikon Ltd).

**Accessoris per l'implementació de l'estratègia semicontínua l'equip 7 I Z61103CT07 d'Applikon :**

Per l'addició del medi alimentat en l'etapa semicontínua s'ha implementat a l'equip de treball una bomba peristàlica (101 U/R Pump, Watson Marlow) controlada mitjançant BioXpert 1.20. (FT Applikon Ltd). L'adaptació del programa d'addició per l'aliment dissenyat prèviament per JC. Hurtado amb VisualBasic per treballar amb l'equip Biostat®B (Braun Biotech Int.) va ser adaptat al llenguatge de programació de BioXpert 1.20 i implementat a l'equip per P.Bassette.

## Esquema i fotografies de l'equip 7 l Z61103CT07 d'Applikon :



Esquema del montatge de l'equip 7 l Z61103CT07 d'Applikon per als experiments semicontinus. Abreviacions: **M**: motor d'agitació, **A**: aigua de xarxa, **ADI**: Unitats de control i registre d'Applikon, **R**: rotàmetre. Quadrats: controladors locals i sensors: **pH**: sensor de pH, **dO<sub>2</sub>**: sensor d'oxigen dissolt, **T**: sensor de temperatura, **VA**: controlador de la velocitat d'agitació (rpm)

Fotografia del montatge de l'equip 7 1 Z61103CT07 d'Applikon per als experiments semicontinus.

#### IV.4.2.2. Condicions d'operació

Tots els experiments s'han realitzat fixant les mateixes condicions de treball, només s'ha modificat la temperatura d'operació segons la soca de treball:

**Medi de cultiu:** MD-FB

**Volum per l'etapa discontinua:** 3,0 l

**Temperatura:**

E.coli XL1 Blue MRF' (pTrefuc): 37°C

E.coli DH1lacdapD (pORT1aL<sub>fuc</sub>): 30°C / inducció: 42°C

**Cabal i pressió d'entrada d'aire:**  $10,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$

**Valor fixat (*set point*) d'oxigen dissolt:** 20%

**Mode d'agitació:** en cascada; variant entre 250 i 1200 rpm per mantenir el valor fixat d'oxigen dissolt al medi

**Valor fixat (*Set point*) de pH:**  $7.00 \pm 0.05$

**Solucions per al control de pH :** base:  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% (p/V); acid:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M

### **Preparació i esterilització de l'equip**

Tal com es descriu a IV.4.1.2.

### **Preparació de l'inòcul**

El medi de cultiu s'inocula a una relació 1:10 inòcul: volum inicial de fermentació. Per un volum per l'etapa discontinua de 3,0 l són necessaris 300 ml d'inòcul i 2,7 l de medi fresc al fermentador. L'inòcul s'obté mitjançant cultiu en matràs Erlenmeyer i medi MD-FB de 12 hores de creixement (*veure* IV.3.a)

### **Presa de mostres**

Tal i com es descriu a IV.4.1.2.

## **IV.4.3. 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.)**

### **IV.4.3.1. Descripció de l'equip i accessoris.**

El fermentador 50/75 l LSL Biolafitte és una unitat de fermentació de planta pilot que a Cobra Bio-Manufacturing plc. s'utilitza com a fermentador a escala productiva.



El tanc de fermentació i tot els accessoris metàl·lics en contacte amb el medi de cultiu són d'acer inoxidable (AFNOR Z2 CND 17/12 (316L)). Té una capacitat màxima 75 l i un volum de treball de 50,0 l. Relació altura/diàmetre = 2,5. Per al control de temperatura, el reactor disposa d'una camisa del mateix material envoltant la part lateral del cilindre: ni la part superior (per sobre del 50 l de capacitat) ni la base estan encamisats. L'encamisat té un sistema de connexió-control múltiple per l'entrada dels fluids de servei: aigua de xarxa, aigua procedent de refredament i vapor d'aigua. A la part superior es disposen les entrades de vapor per l'esterilització *in-situ* del sistema i per les bombes d'addició al sistema: àcid, base, inoculació, suplementes del medi i la sortida del condensador de gasos. Mitjançant una finestra lateral i un sistema d'enllumenat halògen també es permet el control visual del tanc durant l'operació. A la part inferior es troben els mecanismes per l'extracció de mostra i per la recuperació en condicions asèptiques del brou de fermentació per al seu processat. També en aquesta part inferior hi ha les entrades per al subministrament d'aire al tanc (difusor tipus anell (*sparger ring*)) i per a les sondes de control: temperatura, pH i oxigen dissolt directament connectades a la unitat de control. La pressió i temperatura màxima de treball de l'equip són 3 bar i 143°C respectivament. No es detalla tota la xarxa de vàlvules de seguretat per evitar sobrepressions del sistema en l'etapa d'esterilització *in-situ*.

El motor (4000 watts, per agitació variable entre 110 i 1100 rpm) i eix d'agitació es troben connectats a la part inferior del sistema. El sistema d'agitació consta de tres turbines de disc (Rhuston) de quatre fulles òptimament espaiades segons el volum de treball i quatre tabics deflegmadors. L'aire es fa difondre dins el brou de cultiu mitjançant un difusor rotatori.

Les unitats de control i altres accessoris acoblats són:

- BioView Controller (Adaptive Biosystems Ltd.): és una unitat per al seguiment, registre i control del global del procés. Permet diferents nivells d'actuació sobre el procés segons el codi d'entrada i el registre de les fermentacions segon GMP (Good Manufacturing Practice). Amb aquest unitat es controlen: pH, temperatura, oxigen

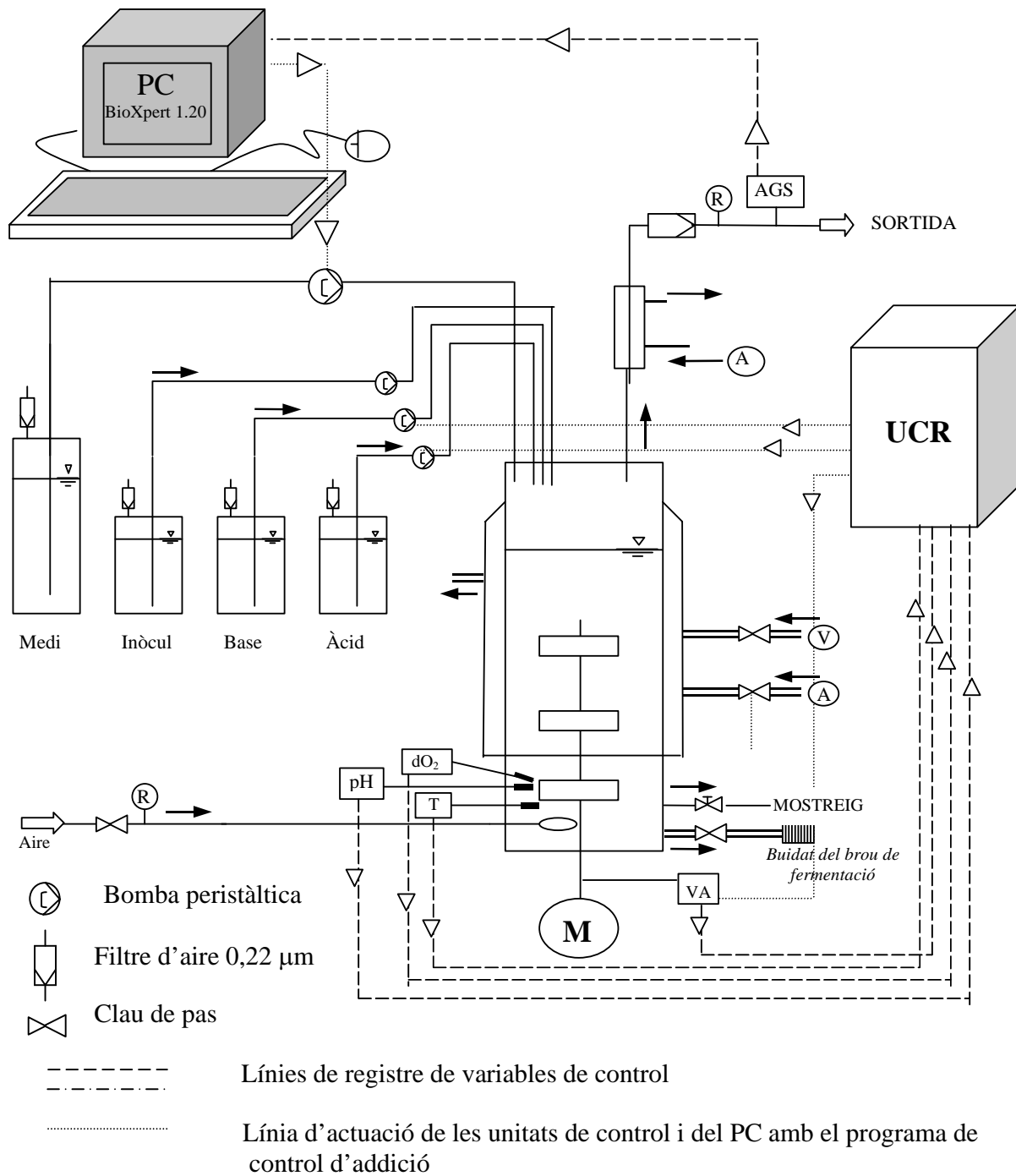
dissolt, velocitat d'agitació i tots els processos d'esterilització de l'equip. L'algorisme de control per pH, temperatura i oxigen dissolt és del tipus PID.

- Bombes FeedFlo (Adaptive Biosystems Ltd.) implementades al BioView Controller (Adaptive Biosystems Ltd.) per al control de pH.

#### **Accessoris per l'implementació de l'estratègia semicontínua a l'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.):**

- Per l'addició del medi alimentat en l'etapa semicontínua s'ha implementat a l'equip de treball una bomba peristàltica (101 U/R Pump, Watson Marlow) controlada mitjançant BioXpert 1.20. (FT Applikon Ltd) utilitzant la mateixa adaptació del programa d'addició de P.Bassette per l'equip d'Applikon a escala laboratori. La solució a alimentar s'introdueix en una bossa de 20 l de capacitat estèril que permet directament la connexió als tubs per bombeig amb bomba peristàltica (20 l Flexboy bag with MPC male connectors; Ref.: P/N:FBP20M01; Stedim) i MPC connectors male, female and blanks (Stedim))
- També sota el control de BioXpert 1.20. (FT Applikon Ltd) s'implementa a l'equip l'analitzador TanDem Gas Analyser (Adaptive Biosystems Ltd) per al seguiment de la composició de gasos de sortida ( $O_2$  i  $CO_2$ ) de fermentació. La mesura d'oxigen es basa en un mètode paramagnètic amb un marge de mesura del 0 al 30 % del gas sortint de procés. El mètode de detecció de  $CO_2$  és per absorbància en infraroig amb un marge de mesura del 0 al 5 % del gas sortint de procés. Ambdós mètodes són altament específics i minimitzen la interferència en la mesura d'altres gasos de composició. L'equip disposa d'un compensador de temperatura per reduir l'error dels mètodes. La calibració es realitza seguint les instruccions del fabricant i utilitzant dos punts de calibració :  $N_2$  i un gas específic de calibració de composició 3%  $CO_2$ , 18%  $O_2$  i 79 %  $N_2$ .

**Esquema i fotografies de l'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.)**



Esquema del muntatge de l'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.) per als experiments semicontinuos. Abreviacions: **M**: motor d'agitació, **A**: aigua de xarxa, **V**: vapor de xarxa, **UCR**: Unitat de control i registre, **R**: rotàmetre. Quadrats: controladors locals i sensors: **pH**: sensor de pH, **dO<sub>2</sub>**: sensor d'oxigen dissolt, **T**: sensor de temperatura, **VA**: controlador de la velocitat d'agitació (rpm), **AGS**: analitzador de gasos de sortida (CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>).

Fotografia del montatge de l'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.) per als experiments semicontinus.

#### IV.4.3.2. Condicions d'operació

**Medi de cultiu:** MD-FB

**Volum per l'etapa discontinua:** 30 l

**Temperatura:** *E.coli DH1lacdapD* (pORT1aL*luc*): 30°C / inducció: 42°C (canvi de temperatura ràpid mitjançant el pas de vapor per la camisa del tanc en el moment de la inducció).

**Cabal i pressió d'entrada d'aire:**  $50,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$

**Valor fixat (*set point*) d'oxigen dissolt:** 20%

**Mode d'agitació:** en cascada; variant entre 250 i 1000 rpm per mantenir el valor fixat d'oxigen dissolt al medi

**Valor fixat (*Set point*) de pH:** 7.00 +/- 0.05

**Solucions per al control de pH :** base: NH<sub>4</sub>OH 25% (p/V); acid: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M

### **Preparació i esterilització de l'equip**

L'esterilització del tanc de fermentació i tots els accessoris en contacte es fa *in-situ* mitjançant la xarxa de vapor (120°C, 20 min). Es prepara el tanc de fermentació muntant tots els accessoris, introduint únicament la solució de macroelements del medi MD-FB per l'etapa discontinua i, finalment, les sondes de control necessàries (cal calibrar la sonda de pH prèvia esterilització). Finalitzat el procés d'esterilització es canvia la circulació per la camisa del tanc de vapor a aigua de xarxa. Quan la temperatura del medi és inferior a 50°C es suplementa amb la resta de components del medi MD-FB per l'etapa discontinua. Per aquesta operació es prepara una única ampolla d'addició amb tots els suplementes del medi necessaris en condicions estèrils a la campana de flux laminar annexa i es bombeja al tanc de fermentació mitjançant la bomba (101 U/R Pump, Watson Marlow) implementada a l'equip. Es deixen transcorre 12 hores per assolir les condicions de procés fixades i garantir la correcte polarització de la sonda d'oxigen dissolt i es procedeix a la inoculació del sistema utilitzant la mateixa bomba peristàtica (101 U/R Pump, Watson Marlow).

### **Preparació de l'inòcul**

L'inòcul s'obté mitjançant cultiu en matràs Erlenmeyer i medi MD-FB: amb el cultiu de 12 hores de creixement obtingut tal com es descriu a l'*apartat* IV.3.a s'inoculen 4 matrassos Erlenmeyer de 5 l de capacitat que contenen 1 l de medi MD-FB i es fan créixer 12 hores més. S'utilitza la mateixa relació d'inoculació 1:10 inòcul: volum inicial de fermentació.

### **Presa de mostres**

L'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.) incorpora un mecanisme d'extracció de mostra per a mostres de fins 250 ml. El sistema consta d'una cànula d'extracció, connexió de rosca per la recollida la mostra en ampolles (Duran 250 ml), doble sistema d'aïllament entre l'ampolla recol.lectora de mostra i el tanc de procés (la mostra passa a un primer compartiment, s'aïlla de la unitat de procés i després s'obre el pas a la unitat de recollida) i finalment connexió amb la xarxa de subministrament de vapor per l'esterilització *in-situ* del mecanisme després de cada extracció de mostra. Prèvia fermentació s'esterilitzen a l'autoclau tantes ampolles Duran de 250ml com siguin necessàries per al seguiment del procés.

#### **IV.4.4. Implementació de l'estratègia d'alimentació exponencial (Capítol VI. 2.1.) als equips de fermentació**

Per a cada equip de fermentació es disposa d'un aparell destinat al control precís d'addició del corrent alimentat (bomba peristàltica o microbureta electrònica) i ha estat necessari posar a punt els programes per poder controlar l'addició d'aliment en base a l'estratègia exponencial proposada (Capítol VI.2.1.). L'elaboració i implementació d'aquests programes no ha estat un dels objectius d'aquesta tesi però sí el disseny del diagrama de flux comú en que es basen les diferents versions implementades i que es comenta breument en aquest apartat.

En tots els casos el programa d'addició es basa en l'Equació VI.2 que permet estimar el volum total del medi alimentat que s'hauria d'haver introduït al vas de fermentació a un temps determinat d'iniciar-se la fase alimentada per tal de mantenir el creixement exponencial a les condicions de treball. Aquesta estimació de volum es realitza de forma discontinua en el temps i es transmet en una ordre cap a l'equip d'addició. Fixant un increment de temps adequat entre les successives estimacions, es treballa amb un perfil

d'esglaons d'addició amb que es simula el perfil continu d'addició exponencial ideal del model.

En tots els casos el programa es basa en dues idees fonamentals:

1. *Control d'addició en base al perfil teòric prefixat*: es fixa un increment de temps constant,  $\Delta t$ , per actualitzar el volum d'addició. Per a cada  $\Delta t$  s'estima el volum necessari a addicionar des de l'última actualització per mantenir el creixement exponencial. Per això es prenen els valors de  $X$  i  $V$  corresponents a l'actualització anterior com a valors inicials de les variables,  $X_{i-1}$ ,  $V_{i-1}$ , a les equacions VI.2 i VI.3 segons:

$$\Delta t = t_i - t_{i-1}$$

$$m_x = V_i X_i = V_{i-1} X_{i-1} \exp(\mu \Delta t)$$

$$V_i = \frac{V_{i-1}}{\mu} (\mu + A X_{i-1} \exp(\mu \Delta t) - A X_{i-1}) \quad \text{on:} \quad A = \frac{\mu}{Y_{x/s} S_0}$$

$$X_i = \frac{m_x}{V_i}$$

$$V_{\text{addició a ti}} = V_i - V_{i-1}$$

$$F_i = \frac{V_i - V_{i-1}}{\Delta t}$$

on:

$\mu$  : velocitat específica de creixement ( $\text{h}^{-1}$ ).

$S_0$  : concentració de substrat a l'aliment ( $\text{g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$Y_{x/s}$  : coeficient de rendiment de substrat a biomassa

$t$  : temps (h).

$\Delta t$  : increment de temps fixat entre estimacions del volum a adicionar.

El subíndex  $i-1$  indica el moment actual des de l'inici de la fase alimentada.

El subíndex  $i$  indica el moment futur per al que es preveu la necessitat d'aliment per mantenir el creixement exponencial.

$V$  : volum de cultiu al vas de fermentació (l)

$X$  : concentració de biomassa al vas de fermentació ( $\text{g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$V_{\text{addició a } t_i}$  : volum estimat que cal adicionar al vas de fermentació entre  $t_{i-1}$  i  $t_i$  per mantenir el creixement exponencial a  $\mu$  constant (l).

$F_i$  : cabal d'alimentació corresponent a l'addició de  $V_{\text{addició a } t_i}$  segons un cabal constant per al període de temps comprès entre  $t_{i-1}$  i  $t_i$  ( $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

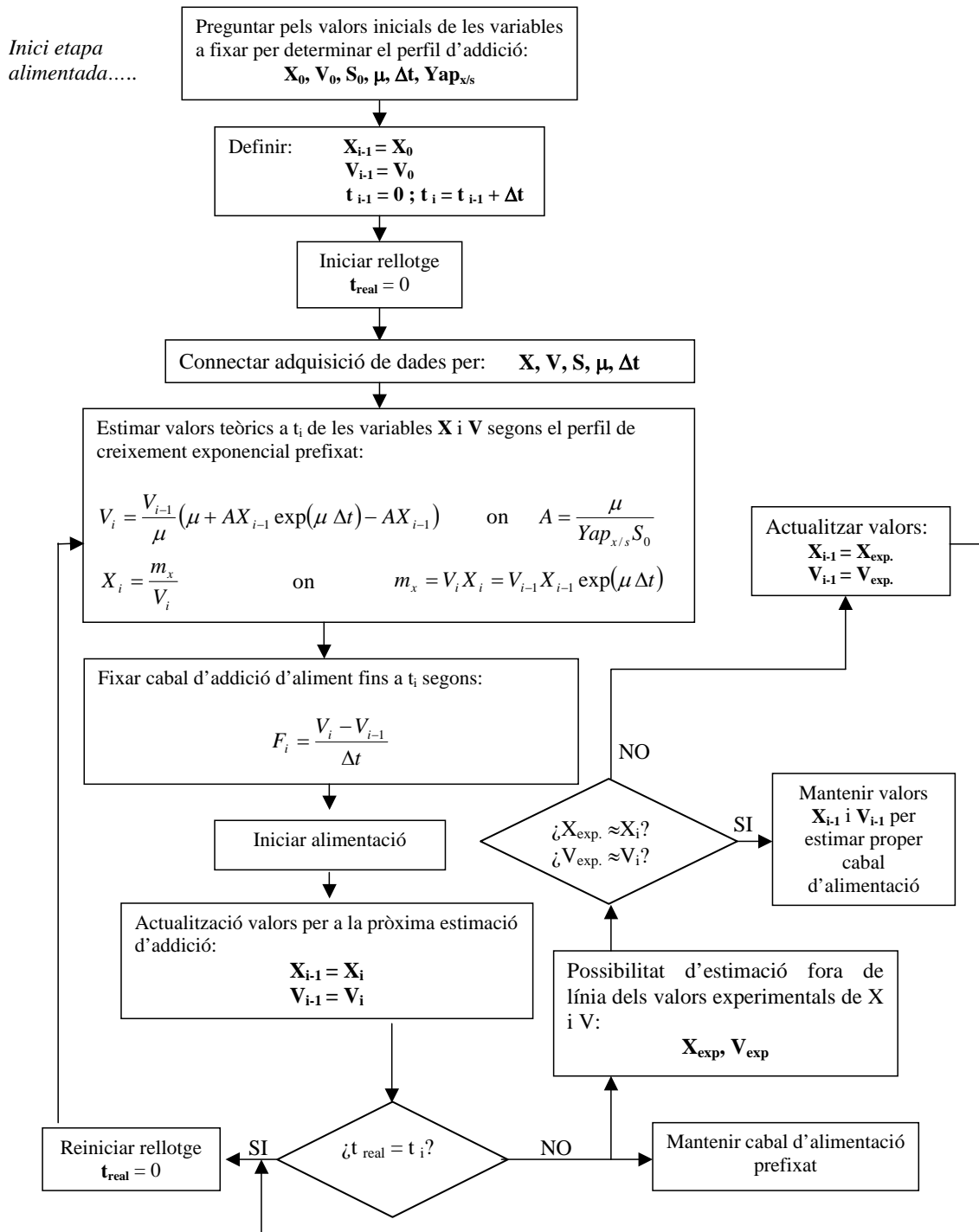
A la següent taula es resumeix la implementació en cada un dels equips:

<b>Equip de fermentació</b>	<b>Aparell d'addició acoblat</b>	<b><math>\Delta t</math> (min)</b>	<b>Ordre d'addició</b>
Biostat <sup>®</sup> B (Braun Biotech Int.)	Microbureta MICRO BU 2030(Crison)	1	$V_{\text{addició a } t_i}$
71 Z61103CT07 (FT Applikon Ltd)	Bomba peristàltica 101 U/R Pump (Watson Marlow)	15	$F_i$
50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.)	Bomba peristàltica 101 U/R Pump (Watson Marlow)	15	$F_i$

- El programa permet corregir les possibles desviacions del model teòric, mitjançant l'actualització dels valors experimentals de  $X_{i-1}$  i  $V_{i-1}$  cada cop que es pren una mostra de cultiu i s'analitza.



En el següent diagrama de flux s'esquemmatitza el funcionament del programa en tots els casos:



La persona encarregada del disseny i implementació dels programes específics per cada equip de treball es cita en la descripció de l'equip corresponent.

## IV.5. MÈTODES ANALÍTICS PER AL SEGUIMENT DELS CULTIUS

### IV.5.1. AVALUACIÓ DE LA BIOMASSA

Els mètodes comunment utilitzats per avaluar la concentració de biomassa en cultius microbians són la determinació de pes sec (g de biomassa seca per litre de cultiu) i la lectura de densitat òptica a una determinada longitud d'ona.

Els primers cultius d' *E.coli* XL1 Blue MRF' (pT<sub>rcfuc</sub>) i DH1<sub>lacdapD</sub> (pORT1aL<sub>fuc</sub>) en fermentador es segueixen, paral·lelament, per determinació de pes sec i densitat òptica a 600 nm. Això permet determinar una relació per estimar el pes sec en funció de la lectura de densitat òptica per cada soca i en experiments posteriors, s'ha seguit el creixement del cultiu únicament per densitat òptica.

#### IV.5.1.1. Determinació del pes sec

El pes sec difereix substancialment de la massa real de cèl·lules vives (amb un contingut en aigua superior al 80%) però permet referenciar les propietats del cultiu a una unitat mesurable de massa. Es segueix el següent protocol:

- 1.- Volums coneguts de brou de fermentació es renten per centrifugació (15 minuts a 8000 x g), decantat del sobrenedant i resuspensió del sediment cel·lular en un volum equivalent al inicial de solució isosmòtica 0.9 % NaCl. Aquesta operació es repeteix dos cops.
- 2.- El sediment cel·lular rentat es sotmet a temperatura: 105°C fins a registre de pes constant.
- 3.- Coneixent el volum inicial de mostra i el pes sec corresponent s'avalua el pes sec en grams de pes sec per litre de cultiu.

#### IV.5.1.2. Lectura de densitat òptica

L'avaluació de biomassa per lectura de densitat òptica es basa en el fet que a mesura que creix el cultiu, el brou es torna més tèrbol i absorbeix més llum d'un raig incident. L'absorbància del cultiu a una determinada longitud d'ona és proporcional a la concentració cel·lular i, per tant, un bon indicador del creixement.

La terbolesa o densitat òptica del brou de cultiu és potser el mètode més àmpliament utilitzat per al seguiment del creixement bacterià ja que és un mètode senzill, de resposta immediata i que requereix d'un volum i una manipulació de la mostra mínims.

Es llegeix l'absorbància a 600 nm i temperatura ambient de mostres correctament diluïdes del brou de fermentació per tal que les lectures d'absorbància estiguin entre 0.2 i 0.9 unitats d'absorbància. Com a blanc d'absorbància i per la dilució de les mostres, s'utilitza el mateix medi de cultiu fresc utilitzat en la fermentació. El valor de densitat òptica per la mostra real del brou de cultiu s'obté multiplicant el valor de la lectura pel factor de dilució utilitzat.

#### IV.5.1.3. Correlació entre pes sec i densitat òptica a 600nm en medi MD-FB

La correlació lineal entre les mesures de D.O.<sub>600nm</sub> corregides pel factor de dilució i les corresponent mesures de concentració de biomassa seca permet establir una relació d'equivalència d'una unitat de D.O.<sub>600nm</sub> a 0,27 i 0,38 g PS.1-1 per les soques *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i DH1lacdapD (pORT1aLfuc) respectivament (veure Apèndix 2).

Corregir les lectures de D.O. pel factor de dilució al que s'han sotmès les mostres prèvia correlació permet incloure a la correlació valors experimentals de concentració de biomassa seca corresponents a mostres directes de CADC i obtenir factors de correlació més precisos per al rang de treball experimental.

## IV.5.2. CONCENTRACIONS DE SUBSTRATS I METABOLITS

### IV.5.2.1. Anàlisi de glucosa

#### a) Determinació enzimàtica (Departament d'Enginyeria Química, UAB)

Les concentracions de glucosa en mostres de seguiment de creixement es determinen amb un analitzador automàtic model YSI 2700 (Yellow Spring Instruments). El mètode de detecció és un sensor enzimàtic: l'enzim glucosa oxidasa es troba immobilitzat en una membrana connectada a un elèctrode. La glucosa de les mostres analitzades difon a través de la membrana. De la reacció catalitzada per l'enzim immobilitzat es desprèn peròxid d'hidrogen que és oxidat electroquímicament a l'ànode de plata de l'elèctrode produint-se un senyal elèctric la intensitat del qual és proporcional a la concentració de glucosa.

L'analitzador té un rang de medició entre  $0.05$  i  $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de glucosa. L'error del mètode s'estima inferior al  $0,5 \%$ .

L'equip requereix de les següents solucions pel seu funcionament:

*Solució patró:*  $0.159 \text{ g K}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ,  $0.263 \text{ g}$  d'àcid benzoic,  $0.45 \text{ g}$  glucosa i  $0.125 \text{ g}$  de L-lactat en  $250 \text{ ml}$  de solució en aigua tipus Milli-Q de  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ .

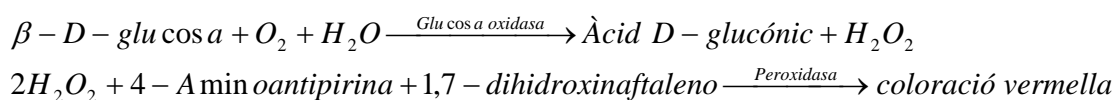
*Solució tampó:*  $0.572 \text{ g K}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ,  $0.948 \text{ g}$  benzoat sòdic,  $2.028 \text{ g}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ g}$  NaCl,  $16.2 \text{ g}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  i  $0.0076 \text{ g}$  de sulfat de gentamicina en  $1 \text{ litre}$  de solució en aigua tipus Milli-Q de  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ .

Les mostres de cultiu es centrifuguen prèviament a l'anàlisi i es filtren a través de membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  (Ref.: HAWP01300, Millipore). El volum de mostra mínim requerit és de  $50 \mu\text{l}$ . Quan la concentració de glucosa a les mostres sobrepassa el marge de mesura de l'analitzador, les mostres es dilueixen en aigua tipus Milli-Q de  $18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ .

b) Determinació colorimètrica (Cobra Bio-Manufacturing plc.)

Per la determinació colorimètrica de glucosa i amoni s'utilitza l'equip IBI Biolyser Rapid Analysis System (Kodak, Laboratory and research products section). Aquest equip basa la determinació de concentració d'un nombre molt considerable d'analits (glucosa, amoni, lactat, colesterol, proteïna total, fósfor, sodi, potasi, clor, etc) en la tecnologia patentada per Kodak d'assaig colorimètric sobre membrana seca. Totes les reaccions necessàries per la mesura colorimètrica tenen lloc a la superfície de membranes específiques per cada analit d'un sol ús. D'aquesta manera s'evita la manipulació de tots els reactius necessaris i es minimitza la quantitat de mostra necessària per l'assaig (10 µl).

La determinació de glucosa es basa en la reacció següent:



La intensitat del color generat és directament proporcional a la quantitat de glucosa present a la mostra. La mesura de llum a 555nm reflectida per la membrana després de la reacció permet al sistema avaluar la concentració de glucosa.

L'analitzador té un rang de mesura entre 2 i 4.5 g/l de glucosa. L'error d'aquest mètode s'estima entre un 6 i un 12 %.

**IV.5.2.2. Anàlisi d'amoni**a) Determinació per anàlisi de flux continu (CFA) (Departament d'Enginyeria Química, UAB)

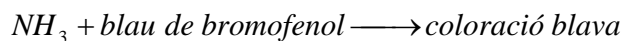
S'ha utilitzat una tècnica d'anàlisi de flux continu (CFA) no segmentat que consisteix en la injecció d'un corrent de mostra que entra directa i contínuament en el sistema de detecció sent el mateix corrent de mostra el portador.

En concret s'ha treballat amb el sistema CFA per l'anàlisi d'amoni en aigües residuals desenvolupat pel Dr. Gabriel (Departament d'Enginyeria Química, UAB) (Gabriel, 1996). El mètode d'anàlisi és el següent: el corrent de mostra es basifica amb NaOH per la conversió total d'amoni en amoníac, l'amoníac aquós difon a través d'una membrana de difusió i és arrastrat per un corrent de clorur amònic i clorur potàssic, l'amoníac present al sistema és detectat mitjançant un elèctrode connectat a un potenciòmetre. Es calibra el detector previ anàlisi amb dos patrons de 5 i 50 mg  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ . El rang de detecció és de 0,25 a 50 mg  $\text{NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ .

b) Determinació colorimètrica (Cobra Bio-Manufacturing plc.)

Per la determinació colorimètrica d'amoni s'utilitza l'equip IBI Biolyser Rapid Analysis System (Kodak, Laboratory and research products section) (veure IV.5.2.1.b).

La determinació d'amoni es basa en la reacció següent:



La intensitat de color es proporcional a la concentració d'amoni a la mostra. La mesura de llum a 605 nm reflectida per la membrana després de la reacció permet al sistema avaluar la concentració d'amoni.

L'analitzador té un rang de mesura entre 1 i 500 mmols  $\text{NH}_3 \cdot \text{l}^{-1}$ . L'error d'aquest mètode s'estima entre un 5 i un 11 %.

#### IV.5.2.3. Anàlisi d'àcid acètic

a) Determinació cromatogràfica (Departament d'Enginyeria Química, UAB)

El mètode es fonamenta en la separació dels components de la mostra per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) i posterior detecció per índex de refracció. Es disposa d'un

equip cromatogràfic 1050 de Hewlett Packard amb bomba isocràtica i injector automàtic. L'equip incorpora un detector d'índex de refracció 1047A de Hewlett Packard i les dades d'anàlisi es recullen i quantifiquen utilitzant el software Millennium 2.15.10.

Per la separació cromatogràfica s'utilitza una columna d'intercanvi iònic Aminex HPX-87H de Bio-Rad. La fase mòbil és àcid sulfúric 15 mM i es fixa el cabal de separació en 0.6 ml/min.

El rang de mesura del mètode queda comprés entre 20 i 0.25 g/l i l'error és inferior al 10%.

*Preparació de la fase mòbil:* s'ajusta el pH d'un litre d'aigua tipus Milli-Q de 18.2 MW a 3.00 amb àcid sulfúric. Es filtra l'eluent a través d'una membrana de 0.45 µm i es desgasifica.

Les mostres de cultiu es centrifuguen prèviament a l'anàlisi i es filtren a través de membrana de 0.45 µm (Ref.: HAWP01300, Millipore).

#### b) Determinació enzimàtica (Cobra Bio-Manufacturing plc.)

Alternativament, l'acetat es determina amb el test nº 148261 de Boehringer Mannheim. L'analitzador té un rang de mesura entre 0.03 i 0.15 g àcid acètic · l<sup>-1</sup> i l'error del mètode s'estima entre un 0.6 i un 1.6 %. Les mostres de cultiu es centrifuguen prèviament a l'anàlisi.

### **IV.5.3. MÈTODES PER L'ANÀLISI DE Fuc-1-PA**

S'han utilitzat dos mètodes per al control d'expressió de Fuc-1-PA en cultius de creixement d' *E. coli*: l'electroforesi discontinua en presència de SDS i l'assaig enzimàtic específic per la quantificació d'activitat aldolàsica Fuc-1-PA posat a punt en anteriors treballs de l'equip (Durany, 2000).

L'electroforesi discontinua en presència de SDS és un mètode qualitatiu que permet controlar l'expressió de l'enzim de forma relativa a la resta de proteïnes de la mostra però no aporta cap informació sobre la seva forma de plegament i, per tant, no ens permet avaluar, si l'enzim es troba com a tetràmer en la seva conformació activa. De forma complementària, l'assaig enzimàtic per l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA permet quantificar específicament l'activitat d'una mostra.

#### **IV.5.3.1. Electroforesi discontinua en presència de SDS (SDS-PAGE)**

L' electroforesi discontinua en presència de dodecilsulfat sòdic (SDS) és un mètode que permet l'anàlisi de mescles complexes de proteïnes per separació electroforètica sobre un suport físic de poliacrilamida (Laemmli,1970).

El SDS és un detergent aniònic que desnaturalitza les proteïnes i les envolta totalment. Això té un efecte apantallant de la càrrega intrínseca de les proteïnes front la càrrega aniònica que ell aporta (Shapiro et al., 196). Amb una proporció carrega/massa constant, les diferents proteïnes es separen únicament atenent al seu pes mol.lecular. Altres agents que complementen la seva acció desnaturalitzant són: la urea que debilita l' estructura proteica per intercanvi de pont d' hidrogen i un agent reductor de ponts disofre, mercaptoetanol.

L'electroforesi discontinua descrita per Laemmli (Laemmli,1970) augmenta la resolució front altres tècniques d'electroforesi de proteïnes anteriors perquè els complexos SDS-proteïna corren a través de dos gels de diferent densitat: el gel superior o concentrador, que és prou laxe com per permetre la formació d'un front homogeni, i el gel inferior o separador, que és més dens i permet que cada proteïna tingui una velocitat diferent en funció de la seva massa molecular.

La grandària de porus efectiva de separació del suport depèn de la concentració d'acrilamida i bisacrilamida que s'escull dins un marge útil: entre el 2,5 i el 30% en acrilamida per la separació de proteïnes al voltant dels 100KDa i 2000KDa respectivament.



Els agents polimeritzants són el persulfat amònic, que proporciona els radicals lliures per la polimerització i un agent accelerant de polimerització: TEMED .

Per als experiments corresponents als Capítols V i VI del present treball, realitzats al laboratori del Departament d'Enginyeria Química de la UAB, s'ha utilitzat l'equip d'electroforèsi MiniProtean II de Bio-Rad i s'han preparat els reactius i els gels necessaris tal com es descriu a continuació. Per als experiments realitzats a les instal·lacions de Cobra Bio-manufacturing plc., experiments corresponents al Capítol VII d'aquest treball, el mode d'operació ha estat el mateix però s'ha utilitzat l'equip d'electroforesi Invitrogen Novex Mini-cell (Invitrogen™) i no ha estat necessària la preparació dels tampons ni dels gels ja que s'utilitzen els que subministra la mateixa firma per aquest equip i que es detallen a continuació:

Tampó de recorregut:	NuPage™ MES SDS Running Buffer (20x), 500ml (Ref.: NP0002, Invitrogen)
Tampó d'aplicació:	NuPage™ Sample Reducing Agent (10x), 250µl (Ref.: NP0004, Invitrogen)
Gels prefabricats:	NuPage™ 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm x15 wells (Ref.: NP0323, Invitrogen)
Marcador de pesos moleculars:	Mark12™ MWStandard (1x), 1 ml (Ref.: LC5677, Invitrogen)

#### **IV.5.3.1.1. Preparació de mostres.**

##### *a.- Preparació de mostres de la fracció intracel·lular corregides per biomassa*

Per al seguiment d'expressió de Fuc-1-PA durant els cultius d'*E.coli* es treballa amb mostres de la fracció intracel·lular corregides per biomassa. Aquesta correcció permet avaluar la sobreexpressió de Fuc-1-PA respecte a la resta de proteïnes d'*E. coli* al llarg dels cultius.

1.- La correcció per biomassa es realitza en base a la lectura de D.O.<sub>600nm</sub> de les mostres per obtenir una lectura corregida de 4 unitats de D.O.<sub>600nm</sub> per ml (UDO<sub>600nm</sub> ml = 4.00). Es

centrifuguen volums de mostra adequats per obtenir un *pellet* cel.lular corresponent a 0,5 mg de PS en cada cas (5 min a 15000 rpm i 4°C).

2.- Els *pellets* cel.lulars obtinguts es resuspenen en 500 µl d'aigua milliQ i es lisen per sonicació (4 pulsos de 30s a 50W mantenint les mostres en gel després de cada cicle; Vibra-cell<sup>TM</sup> Sonicator (Sonic&Materials Inc., DANBURY CT)). La mostra obtinguda correspon a la proteïna total intracel.lular i es manté a 4°C fins a ser processada.

*b.- Preparació de mostres per avaluar la presència de cossos d' inclusió.*

Per avaluar la fracció de Fuc-1-PA acumulada en forma d'agregats insolubles al citoplasma cel.lular en relació a la fracció soluble es segueix aquest protocol alternatiu:

1.- Obtenció de mostres corregides per biomassa, resuspeses i lisades tal com es detalla per la preparació de mostres de la fracció intracel.lular al subapartat anterior (IV.5.3.1.1.a.).

2.- Els 500 µl de lisat es divideixen en dues fraccions de 250 µl. Amb la fracció (a) es procedeix a la centrifugació (5 min a 15000 rpm i 4°C) per l'obtenció de la fracció soluble intracel.lular.

3.- A la fracció (b) s'afegeix 1 µl de benzonasa (Benzonase<sup>®</sup>; Ref.: 1.01695.0001, Merck), s'homogenitza la mostra i s'incuba durant 2 hores.

La fracció (a) correspon a la proteïna intracel.lular soluble, la fracció (b) al total de proteïna intracel.lular: la inicialment soluble i la solubilitzada mitjançant el tractament amb benzonasa.

*c.- Preparació de mostres de la fracció extracel.lular.*

Correspondria directament al sobrenedant de centrifugació descartat al punt 1 de la preparació de mostres de la fracció soluble intracel.lular (IV.5.3.1.1.a.).

**IV.5.3.1.2. Protocol d'electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE.***a.-Preparació del gel*

1.- Es preparen les solucions que es detallen. L'aigua utilitzada en tots els casos és aigua tipus Milli-Q de 18.2 MΩcm.

*Solució A:* solució al 30% d'acrilamida i al 2,7% de bisacrilamida. S'utilitza la solució comercial acrilamida/bisacrilamida 30% de Bio-Rad (Ref.: 59678; Bio-Rad).

*Solució B:* Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4 % (pH 8,8)

*Solució C:* Tris-HCl 0,46 M, SDS 0,4 % (pH 6,8)

2.- Es monten els vidres i la cubeta seguint les instruccions del fabricant, utilitzant els espaiadors de 0.75 mm adequats per la càrrega de fins a 30 µl de mostra.

3.- Es prepara el gel separador (12% d'acrilamida).

S'ha treballat amb gels separadors al 12% d'acrilamida, concentració òptima per la separació de proteïnes tractades amb SDS en el rang de pesos moleculars entre 10 i 100 kDa entre les que es troba la Fuc-1-PA en estudi. Es preparen 10 ml del gel separador afegint el TEMED (Ref.: 17-1312-01; PlusOne™) i el persulfat amònic 10% a l'últim moment:

H <sub>2</sub> O MilliQ	3.35 ml
Solució B	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Solució A	4.0 ml
Solució G	50 µl
TEMED	5 µl

La solució preparada es vessa entre els vidres (fins a 1cm per sota de la posició que ocuparà la pinta formadora de butxaques) i es deixa polimeritzar (1 hora a temperatura ambient o bé, al voltant de 12 hores a 4°C) coberta amb una capa fina d'aigua. Un cop polimeritzat el gel, es retira la capa d'aigua absorbint-la totalment amb un paper de filtre.

3.- Es prepara el gel concentrador (2,4 % d'acrilamida):

H <sub>2</sub> O MilliQ	6.1 ml
Solució C	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Solució A	1.3 ml
Solució G	50 µl
TEMED	10 µl

Immediatament, aquest gel apilador que es vessa per sobre del separador omplint el *sandvitx* que formen els vidres. Tot seguit, es col·loquen les pintes formadores de butxaques. Es deixa polimeritzar 1h i 30 min abans de carregar les mostres i fer córrer el gel.

#### b.-Electroforesi:

1.- Es preparen les següents solucions:

Tampó de recorregut 10x:

Tris-HCl	0,25 M
Glicina	1,87 M
SDS	1% (p/vV)
S'ajusta el pH a 8,3 amb HCl	

Tampó d'aplicació 5x:

Tris-HCl	60 mM
Glicerol	10% (v/v)
SDS	2 % (p/v)
β-mercaptoetanol(Ref.:M-6250,Sigma)	5 % (v/v)
Blau de Bromfenol(Ref.: 8122, Merck).	punta d'espàtula
S'ajusta el pH a 6,8 amb HCl	

2.- Es prepara la cubeta d'electroforesi i s'omplen els compartiments superior i inferior del kit amb el tampó de recorregut diluït amb aigua Milli-Q de 18.2 MΩcm.

3.- Es barregen les mostres amb el tampó d'aplicació 5x en una relació mostra/ tampó de 4 a 1 i s'escalfen 5 min a 95°C.

4.- Es carreguen les mostres ( $V_{\max}=30 \mu\text{l}$ ) i el marcador de pes molecular adequat emprant una xeringa Hamilton a les butxaques del gel apilador. S'han utilitzat els següents marcadors de pes molecular :

- *Low Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (Ref.: 161-0304; Bio-Rad) en dilució al 5% (V/V) en aigua. Amb la càrrega de 10  $\mu\text{l}$  d'aquesta dilució del marcador és suficient per una bona visualització de les bandes patró.

Proteïna	Pes molecular aprox. (kDa)
Fosforilasa B	97.40
Albúmina sèrica bovina	66.20
Ovoalbúmina	45,00
Anhidrasa carbònica	31.00
Inhibidor de tripsina	21.50
Lisozim	14.40
Aprotinina	6,50

*Low Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (Ref.: 161-0304; Bio-Rad)

- Mark12™ MWStandard 1x (Ref.: LC5677; Invitrogen) Amb la càrrega de 10  $\mu\text{l}$  d'aquesta dilució comercial és suficient per una bona visualització de les bandes patró.

Proteïna	Pes molecular aprox. (kDa)
Miosina	200,00
$\beta$ -galactosidasa	116,30
Fosforilasa B	97,40
Albúmina sèrica bovina	66,30
Glutamat deshidrogenasa	55,40
Lactat deshidrogenasa	36,50
Anhidrasa carbònica	31,00
Inhibidor de tripsina	21,50
Lisozim	14,40
Aprotinina	6,50

Mark12™ MWStandard 1x (Ref.: LC5677; Invitrogen)

5.- Es fa córrer el gel a 20 mA fins que desaparegui el front colorejat per la part inferior (aprox. 1h i 30 min). Finalitzada l'electroforesi, s'obre el *sandvitx* que formen els vidres i es separa el gel apilador del separador per procedir a la tinció d'aquest últim.

c.- Tinció amb blau de Coomassie.

És un mètode de tinció específic i quantitatiu basat en la unió covalent del colorant als grups amino accessibles de les proteïnes presents. El seu límit de detecció inferior és de 0.3-1  $\mu$ g.

Comprèn les següents etapes:

Etapa	Solució:	Agitació suau a t.a.:
1. Fixació:	40% MeOH, 10% AcOH en aigua.	30 min
2. Tinció:	Metanol 45%, àcid acètic 10% en aigua En aquesta solució es dissol la solució de <i>Coomassie Brilliant Blue R</i> (Sigma) al 1% .	15 min
3. Destinció:	7% àcid acètic en aigua.	Rentats successius

d.- Imatges i quantificació dels gels.

Per a l'adquisició i tractament d'imatges s'han utilitzat els següents equips:

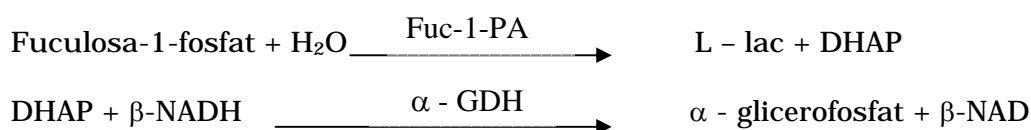
- Equip d'anàlisi densitomètric GS-700 Imagin Densitometer (Bio-Rad) amb la versió 1.1 del programa Multianalyst (Bio-Rad)(al Departament d'Enginyeria Química de la UAB, Barcelona).
- FluorChem Imaging System (Alpha Innotech Corporation) (a Cobra Bio-Manufacturing plc., UK).

**IV.5.3.2. Assaig enzimàtic específic per la quantificació de Fuc-1-PA****IV.5.3.2.1. Preparació de les mostres.**

De forma rutinària s'ha quantificat l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA en mostres directes del brou de cultiu corregides per biomassa i lisades seguint els següents passos:

1.- La correcció per biomassa es realitza en base a la lectura de D.O.<sub>600nm</sub> de les mostres. S'ajusta la concentració de mostres directes del brou de cultiu a 1,1 mg · ml<sup>-1</sup> (UDO<sub>600nm</sub> ml = 4.00) diluint amb la quantitat adient del tampó d'assaig enzimàtic (100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 7,5).

2.- Es lisen 500 µl de les mostres diluïdes per sonicació (4 pulsos de 30s a 50W mantenint les mostres en gel després de cada cicle; Vibra-cell<sup>TM</sup> Sonicator (Sonic&Materials Inc., DANBURY CT)).

**IV.5.3.2.2. Assaig enzimàtic específic per a la quantificació d'activitat Fuc-1-PA .****Fonament:**

**Mètode:** determinació espectrofotomètrica d'U.V. en continu a 340 nm.

**Condicions d'assaig:** T = 25°C, pH = 7.5, A<sub>340 nm</sub>, camí òptic = 1 cm., Volum total per l'assaig = 1 ml.

**Reactius:**

Totes les dissolucions aquoses es preparen amb aigua tipus MilliQ 18,2 MΩcm desgasificada i freda (aprox. 4°C).

A. Tampó 100 mM Tris HCl, 150 mM KCl, pH = 7,5 a 25 °C.

B. Solució aquosa de Fuculosa-1-fosfat 58 mM sintetitzada com la sal de dicitclohexilamoni (p.m. = 442,49). Aquesta sal no és comercial, es disposa d'un protocol per la seva síntesi enzimàtica desenvolupat en treballs anteriors del grup (Durany, 2000) i que es detalla a l'apartat següent IV.5.3.2.3.

C. α - GDH 50 UA/ml.

Es prepara en dos passos de dilució: 1) Preparació d'una solució 500 UA/ml a partir del liofilitzat comercial α - GDH de múscul de conill (205 U/ml) (Ref. 5001,5; Fluka,) que es conserva aliquidada a -20°C. 2) Preparació d'alíquotes 50 UA/ml, per al seu consum diari a l'assaig enzimàtic, per dilució 1:10 de l'estoc concentrat anterior.

D. β- NADH 4.0 mM ; β-NADH (Fluka, Ref. 43420)

E. Solució aldolàsica problema a quantificar.

L'assaig s'ha posat a punt per a mostres aldolàsiques que continguin entre 0.26 i 0.60 UA/ml; això correspon a una oxidació del β-NADH (considerant la velocitat inicial de consum per l'assaig) en el marge de 6.5 i 15.5 min.



Si la concentració d'activitat Fuc-1-PA de la mostra a quantificar excedeix els marges definits per l'assaig es treballa amb dilucions de la mostra en el tampó A (100mM Tris·HCl, 150 mM KCl, pH 7,5). Aquestes dilucions es preparen just abans de la seva quantificació.

### Procediment:

1.- Introduir paral·lelament en dues cubetes de quars d'1 ml de capacitat, els següents reactius. Cal seguir l'ordre que es detalla:

Reactiu	Cubeta A ( <i>Mostra</i> )	Cubeta B ( <i>Blanc</i> )
- Tampó A	864 $\mu$ l	898 $\mu$ l
- FUC-1-P 58 mM	34 $\mu$ l	34 $\mu$ l
- $\alpha$ - GDH 50 UA/ml	34 $\mu$ l	-----
- $\beta$ - NADH	34 $\mu$ l	34 $\mu$ l

2.- Homogeneïtzar per inversió.

3.- Monitoritzar l'absorbància a 340 nm durant dos minuts per tal de comprovar l'estabilitat del  $\beta$ -NADH al mateix temps que s'atemperen els reactius a 25°C. S'espera obtenir una lectura constant de  $Abs_{340nm} = 0.846$  segons la concentració de  $\beta$ -NADH i el seu coeficient d'extinció molecular,  $\epsilon_{\beta\text{-NADH } 340\text{ nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

4.- Addicionar 34 $\mu$ l de la mostra aldolàsica a quantificar a cada una de les cubetes.

5.- Inmediatament homogeneïtzar per inversió i monitoritzar la baixada d'absorbància en el temps a 340 nm.

6.- Els valors de  $\Delta A/\Delta t$  ( $\text{min}^{-1}$ ) corresponen a la velocitat inicial de consum de  $\beta$ -NADH en cada cas. Es mesuren com el pendent de disminució d'absorbància a 340 nm amb el temps durant el primer minut de seguiment.

**Concentracions finals a l'assaig:**

Per a 1 ml final de reacció les concentracions de cada reactiu són:

Reactiu	Cubeta A ( <i>Mostra</i> )	Cubeta B ( <i>Blanc</i> )
- Tampó A	86,4 mM	89,8 mM
- FUC-1-P 58 mM	1,97 mM	1,97 mM
- $\alpha$ - GDH 50 UA/ml	1,7 UA/ml	-----
- $\beta$ - NADH	0,136 mM	0,136 mM

**Càlcul d'activitat:**

$$UA/ml \text{ mostra aldolàsica} = \frac{[(\Delta A_{340nm} / \text{min test})_{mostra} - (\Delta A_{340nm} / \text{min test})_{blanc}] \cdot V_t (ml) \cdot (df)}{\varepsilon (mM^{-1} \cdot cm^{-1}) \cdot V_e (ml)}$$

on:

- $\Delta A_{340nm} / \text{min test}$ : Velocitats inicial de consum de  $\beta$ -NADH.  
Correspon al pendent inicial (1<sup>er</sup> min) obtingut en la monitorització de l'assaig enzimàtic.
- $V_t$ : Volum total (ml) per a l'assaig.
- $df$ : Factor de dilució de la mostra aldolàsica original a quantificar.
- $\varepsilon$ : Coeficient d'extinció;  $\varepsilon_{\beta\text{-NADH } 340nm} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- $V_e$ : Volum (ml) de la solució enzimàtica diluïda utilitzada a l'assaig.

Així per a les condicions normals d'assaig:

$$UA/ml \text{ mostra aldolàsica} = \frac{[(\Delta A_{340nm} / \text{min test})_{mostra} - (\Delta A_{340nm} / \text{min test})_{blanc}] \cdot 1(ml) \cdot (df)}{6,22 (mM^{-1} \cdot cm^{-1}) \cdot 0,034(ml)}$$

**Definició d'unitat d'activitat:**

Una unitat d'activitat enzimàtica correspon a la quantitat d'enzim capaç de convertir 1  $\mu\text{mol}$  de Fuc-1-P dicitclohexilamina en L-lac i DHAP per minut a pH 7.5 i 25 °C.

#### IV.5.3.2.3. Síntesi de la sal dicitclohexilamina de L-fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P(CHA)<sub>2</sub>)

El substart específic de Fuc-1-PA per l'assaig enzimàtic no és comercial i es sintetitza partir de la condensació aldòlica entre L-lactaldehyd i DHAP catalitzada per l'enzim fuculosa-1-fosfato aldolasa segons una modificació del procediment publicat pel grup del Dr. Fessner (Fessner i col., 1993) i posat a punt en anteriors treballs (Durany, 2000).

##### a) Síntesi L-lactaldehyd (L-lac).

Es prepara a partir de D-threonina no proteínogènica i ninhidrina segons una modificació del procediment publicat (Zagalak i col., 1966).

##### Reactius i tampons de síntesi:

- D-treonina (Sigma, Ref.: T-8250, p.m.= 119,1)
- Ninhidrina (Sigma, Ref.: N-4876, p.m.= 178,1)
- Tampó Citrat sòdic 0.05M, pH = 5,4. *Preparació* (per 1l de tampó): es dissolen 3,074 g d'àcid cítric i 10,000g Tri-sodi citrat dihidratat en 800 ml H<sub>2</sub>O desionitzada. S'ajusta el pH a 5,4 amb una dissolució d'àcid cítric 0,5M. i finalment, es porta a 1l amb H<sub>2</sub>O desionitzada.

##### Metòdica:

Per a la preparació de 25 mmols L-lactaldehyd:

1.- en un baló esmerilat de 1l de capacitat es dissolen 2,978 g D-treonina (25mmols) i 9,100 g ninhidrina (51,1 mmols) en 400 ml de Tampó Citrat sòdic 0.05M pH 5,4. El baló amb la dissolució resultant s'acobla a un condensador de gasos i es porta a ebullició. La mescla es manté en ebullició durant 15-20 min amb agitació magnètica vigorosa.

2.- Es refreda la mescla de reacció i es filtra al buit mitjançant un filtre Rossich de capa porosa n°3.

3.- El filtrat es tracta amb reïna Dowex 1x8 en forma bicarbonat (Fluka, Ref:44324): sota agitació magnètica vigorosa es va afegint la quantitat de reïna necessària fins assolir un pH de 6,5 i es manté l'agitació magnètica 2-3 h.

4.- Es separa la reïna Dowex 1x8 per filtració i el filtrat s'ajusta a pH= 4,0 mitjançant successives addicions de reïna Dowex 50Wx8 en forma H<sup>+</sup> (Fluka, Ref.:44504) sota agitació magnètica. És manté l'agitació 1h i es filtra.

5.- Es repeteix el tractament amb ambdues reïnes descrit als passos 3 i 4 i el filtrat es concentra al rotavapor fins a 100 ml .

6.- El tractament amb ambdues reïnes es repeteix dos o tres cops més: fins que la solució resultant sigui incolora a pH = 6,5 i que després del tractament amb la reïna de bescanvi aniònic durant 2-3h aquesta ja no s'enfosqueixi.

7.- El filtrat final es concentra al rotavapor fins a 25 ml i aquesta solució es conserva a 4°C, pH=4,0 i sota atmosfera inert.

#### **b) Síntesi de Dihidroxiacetona fosfat (DHAP).**

Es prepara per hidròlisi àcida de la sal de bari del dimer etil hemiacetal de dihidroxiacetona fosfat segons el procediment descrit per Effenberger (Effenberger and Straub, 1987)

#### **Reactius:**

- Sal de bari del dimer etil hemiacetal de dihidroxiacetona fosfat (Fluka, Ref.: 37435, p.m.= 667,87)

#### **Metòdica:**

Per a l'obtenció de 10 mmols DHAP:

1.- en un vas de precipitats de 250 ml es dissolen 4,5 g (6,75 mmols) del dímer en 95 ml H<sub>2</sub>O desionitzada emprant agitació magnètica.

2.- La dissolució resultant es tracta, sota agitació magnètica, amb la quantitat de reïna Dowex 50Wx8 (Fluka, Ref.:44504) en forma H<sup>+</sup> necessària per arribar a pH=1. Es filtra la dissolució àcida per separar la reïna i es comprova que el pH és aproximadament 1 abans de procedir amb la hidròlisi.

3.- Hidròlisi: la dissolució àcida resultant s'introdueix en un flascó hermètic i s'agita en un bany termostatat a 65°C, sota atmosfera inert, entre 4 i 5 hores. El seguiment de la hidròlisi es realitza per quantificació de la concentració en DHAP al medi de reacció i s'atura en assolir el 80% d'hidròlisi del dímer.

4.- La solució de DHAP resultant de la hidròlisi àcida es refreda en un bany a 4°C. Conservació sota atmosfera inert, a pH=1 i -20°C.

### **c) Síntesi de la sal dicitclohexilamina de L-fuculosa-1-fosfat (Fuc-1-P(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.**

A partir de la condensació aldòlica entre L-lactalehid i DHAP catalitzada per l'enzim fuculosa-1-fosfato aldolasa segons una modificació del procediment publicat (Fessner i col., 1993).

#### **Metòdica:**

Per a la síntesi d'un màxim de 4,425 g FUC-1-P (CHA)<sub>2</sub>.

1.- En un matràs de 500 ml es mesclen els volums de les dissolucions de L-lactalehid (pH≈4) i DHAP (pH≈1) corresponents a 10 mmols de cada reactiu i s'addiciona aigua tipus MilliQ 18mΩcm desgasificada fins a 250 ml.

2.- S'ajusta el pH a 7,5 amb NaOH 1N i la solució resultant s'introdueix en un baló aforat de 500ml.

3.- Condicions de síntesi: agitació magnètica suau, 25 °C (bany termostatat), atmosfera inert, pH= 7.5, concentració inicial de reactius: [DHAP]=[L-lac]= 40 mM.

Seguiment de reacció: per quantificació espectrofotomètrica del DHAP residual al medi de reacció.

4.- Extracció mostra a temps zero de reacció (just abans d'addicionar l'enzim).

5.- Addició de 5 UA Fuc-1-PA purificada (*segons* Suau, 2001)

6.- S'atura la síntesi quan s'ha consumit com a mínim el 80% del DHAP inicial.

7.- La mescla de reacció es conserva a 4°C fins la seva purificació.

8.- La mescla de reacció es filtra a través de carbó actiu. El pa de filtració es renta exhaustivament amb aigua (2 x 30 ml) i les aigües de rentat s'addicionen al filtrat.

9.- Pas per columna de bescanvi aniònic [Dowex 50Wx8 (Fluka, Ref.:44504) en forma HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]:

9.1.- Preparació de la columna:

9.1.1.- Es compacta correctament la columna amb uns 140 ml de reïna.

9.1.2.- Prèvia càrrega de la mescla de reacció es fa un rentat amb tres volums de columna d'aigua desionitzada. Es comprova que el pH és 7,00 a la sortida de columna.

9.1.3.- S'aprofita aquest rentat per fixar un cabal d'elució màxim de 1,5 ml/min que es mantindrà en tot el procés.

9.2.- Càrrega del filtrat de reacció a la columna.

9.3.- Rentat de la columna postcàrrega amb dos volums de columna d'aigua desionitzada.

9.4.- Elució amb 0,2M NaHCO<sub>3</sub>. Es van recollir fraccions d'elució de 140 ml. Total 8 fraccions d'elució.

9.5.- Rentat final de la columna a alta força iònica (65g NaHCO<sub>3</sub>/l). Tres volums de columna en tres fraccions de rentat.

9.6.- Seguiment de la separació cromatogràfica de bescanvi aniònic per cromatografia de capa fina i elecció de les fraccions d'elució que contenen Fuc-1-P.

10.- Liofilització de les fraccions d'elució que contenen fuc-1-P (24h).

11.- Ressuspensió del liofilitzat en 100 ml d'aigua desionitzada i tractament amb Dowex 50Wx8 (Fluka, Ref.: 44504) en forma H<sup>+</sup> fins a pH=1 i total despreniment de CO<sub>2</sub>: el liofilitzat ressuspès s'introdueix en un vas de precipitats i es sotmet a agitació magnètica vigorosa. Es va afegint Dowex H<sup>+</sup> al temps que es controla el pH, pH inicial ≈ 8, el pH es manté al voltant de 7 mentre es va produint CO<sub>2</sub> amb les successives addicions de Dowex H<sup>+</sup>, finalment el pH baixa a 1-2 i en aquest moment encara es fa una última addició de la reina per assegurar que el bescanvi catiònic és complet. Es manté durant una hora més l'agitació per la total eliminació del CO<sub>2</sub> generat.

12.- Es filtra la dissolució mitjançant un Filtre Rossich de placa porosa del nº3. La reina separada per filtració es renta exhaustivament amb aigua desionitzada (2x 20 ml) i les aigües de rentat s'addicionen al filtrat.

13.- La dissolució recuperada es neutralitza amb ciclohexilamina (Fluka, Ref.: 29300) i es liofilitza.

14.- El producte de liofilització, Fuc-1-P (CHA)<sub>2</sub>, es conserva a -20°C sota atmosfera inert.

#### IV.5.4. MÈTODES PER A L'ESTIMACIÓ D'ESTABILITAT PLASMÍDICA

##### IV.5.4.1. Unitats formadores de colònies (UFC) amb/sense marcador de selecció.

Es determina la fracció de cèl.lules que mantenen el plàsmid a diferents temps de cultiu mitjançant la comparació del número de colònies formades (UFC) quan es treballa amb o sense el marcador de selecció de la soca en estudi. En el cas de XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) només les cèl.lules que mantenen el plàsmid per la sobreexpressió de Fuc-1-PA són resistents a la presència d'ampicil.lina al medi de cultiu i, en el cas de les noves soques recombinants derivades de DH1lacdapD, només aquelles que mantenen el plàsmid poden créixer sense IPTG al medi. El protocol seguit és el següent:

1.- Es dilueix la mostra de cultiu amb NaCl 0,9 % segons la lectura de D.O. <sub>600nm</sub> per tal que el número de UFC per placa oscil.li entre 30 – 300.

2.- Amb el volum adequat de la dilució obtinguda es sembren, per triplicat, plaques de LB i plaques de LB suplementades amb el marcador de selecció (ampicil.lina 100µM per XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) i IPTG 500µM per les noves soques recombinants derivades de DH1lacdapD, però, en aquests cas, cal considerar les plaques no suplementades com les de creixement selectiu per a cèl.lules portadores del plàsmid ).

3.-Les plaques sembrades es deixen secar 5 min, s'incuben 12 hores a 37°C i es procedeix al recompte de colònies formades.



**IV.5.4.2. Extracció de DNA plasmídic**

Es procedeix a l'extracció del DNA plasmídic (*veure* IV.6.1) de volums idèntics de mostres a diferents temps de cultiu ajustades a la mateixa concentració de biomassa segons lectura de D.O.  $_{600\text{nm}}$ . Es compara el DNA plasmídic per unitat de biomassa obtingut :

a.- qualitativament: per observació de la intensitat de les bandes corresponents en gel d'agarosa (*veure* IV.6.4.1.).

b.- quantitativament: per quantificació espectrofotomètrica (*veure* IV.6.2.1.) de la quantitat de DNA plasmídic recuperat en cada l'extracció

**IV.5.4.3. Estimació del número de còpies del plàsmid per cèl.lula hoste (*Plasmid copy number*).**

Es parteix de l'estimació de concentració de DNA plasmídic per mostra de cultiu rectificada per biomassa (*veure* IV.5.4.2.b.).

Per la simplificació dels càlculs, s'assumeix:

- 1 parell de bases de DNA té una massa de 649 Daltons,
- 1 unitat de densitat òptica equival a  $2 \cdot 10^8$  cèl.lules,
- 100% d'eficiència en la recuperació del DNA plasmídic amb els kits de Qiagen (IV.6.1.)

Coneixent:

- Cnt. Avogadro =  $6,022 \cdot 10^{23}$

s'estima :

$$\text{pes molecular del plàsmid} \left( \frac{\text{g DNA}}{\text{plàsmid}} \right) = n^{\circ} \text{ parells de bases (pb)} \cdot \frac{649 \text{ Da}}{1 \text{ pb}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ Da}}$$

$$\text{Concentració cel·lular de la mostra} \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ cèl·lules}}{\text{ml mostra}} \right) = \frac{\text{unitats de D.O.}_{600\text{nm}}}{\text{ml mostra}} \cdot \frac{2 \cdot 10^8 \text{ cèl·lules}}{1 \text{ unitat de D.O.}_{600\text{nm}}}$$

$$\text{N}^\circ \text{ còpies plàsmid / cèl·lula} = \frac{\text{Concentració DNA plasmídic} \left( \frac{\text{g DNA}}{\text{ml mostra}} \right) \cdot \frac{1}{\text{pes molecular plàsmid} \left( \frac{\text{g DNA}}{\text{Plàsmid}} \right)}}{\text{Concentració cel·lular de la mostra} \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ cèl·lules}}{\text{ml mostra}} \right)}$$

## IV.6. MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR

### IV.6.1. EXTRACCIÓ DE DNA PLASMÍDIC

S'utilitzen els kits comercial d'extracció plasmídica de la firma Qiagen (QIAprep Spin Miniprep kit i QIAGEN plasmid Midi K per l'obtenció d'un màxim de 20 i 100 µg de DNA respectivament) basats en el mètode de la lisi alcalina (Birnboim i col., 1979). Aquests kits proporcionen un bon rendiment i deixen el DNA net i lliure de RNA.

### IV.6.2. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE DNA

#### IV.6.2.1. Determinació espectrofotomètrica

Consisteix en registrar l'espectre d'absorbància de la regió de 200 a 360 nm. Una unitat s'absorbància a 260nm equival aproximadament a 50 µg · ml<sup>-1</sup> de DNA de doble cadena i a 40 µg · ml<sup>-1</sup> de DNA de cadena senzilla.

La puresa del DNA es pot valorar amb el coeficient UDO<sub>260/280</sub>, que ha de ser proper a 1,8. Valors inferiors indiquen contaminació per proteïnes i valors superiors contaminació per RNA.

S'utilitza l'equip Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech).

#### IV.6.2.2. Estimació per electroforesi en gel d'agarosa

Aquest mètode s'utilitza quan es treballa amb quantitats molt petites de DNA o quan la quantificació es realitza en un pas intermedi de purificació en que la solució de DNA conté productes que falsegen la determinació espectrofotomètrica descrita al punt anterior (en concret, es fa necessària després de la purificació de fragment de DNA procedents de gels d'agarosa utilitzant el *QIAquick Gel Extraction kit* de Qiagen, veure IV.6.4.2.). S'estima la concentració de DNA a partir de la fluorescència emesa per la tinció amb bromur d'etidi, el qual s'intercala entre les bases nitrogenades.

Es realitza una electroforesi en agarosa i es visualitza per il·luminació amb una llum ultraviolada. La quantitat de DNA present a la banda de la dissolució problema s'estima per comparació de la seva intensitat amb les bandes corresponents als marcadors.

#### IV.6.3. DIGESTIONS ENZIMÀTIQUES D'ÀCIDS NUCLEICS

Les endonucleases de restricció són enzims que tallen per seqüències específiques de DNA. L'activitat dels enzims de restricció depèn del pH, de la força iònica i de la temperatura de la reacció. Cada enzim té unes condicions òptimes de funcionament.

Normalment, la quantitat de DNA assajada en les digestions oscil·la entre 0,5 i 10 µg i s'afegeix d'1 a 10 unitats d'enzim per µg de DNA. Cal tenir en compte que la quantitat d'enzim no pot superar mai el 10% del volum total de la reacció, ja que les solucions comercials d'aquests enzims de restricció contenen un 50% de glicerol. Una concentració de glicerol en el medi de reacció superior al 5% pot fer perdre l'especificitat de reconeixement. El temps de reacció es de 1-2 hores. Si s'utilitzen dos enzims alhora es fixen unes condicions de reacció de compromís en que tots dos enzims actuen encara que possiblement no en condicions òptimes i el temps de reacció es pot augmentar fins a 3 o 4 hores.

Els enzims de restricció i tampons de reacció emprats en aquest treball són de la firma Roche Molecular Biochemicals i s'han seguit les condicions de reacció recomanades al seu catàleg comercial.

#### IV.6.4. SEPARACIÓ DEL DNA MITJANÇANT GELS D'AGAROSA

##### IV.6.4.1. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

L'electroforesi horitzontal en gel d'agarosa s'ha utilitzat com a mètode habitual d'anàlisi del DNA. Aquesta és una tècnica electroforètica senzilla que separa fragments de dsDNA segons la seva mobilitat sobre un suport electrolític sotmès a un camp elèctric aprofitant l'estructura polianiònica del DNA que migrarà sempre en direcció a l'ànode.

La mobilitat d'un fragment sobre el gel és proporcional al logaritme del seu pes molecular i es pot determinar la seva mida per comparació amb les bandes d'un marcador comercial que cobreix el marge de pesos moleculars d'interès.

La finalitat de l'electroforesi pot ser analítica (per determinar la presència, puresa o concentració d'un fragment de dsDNA) o preparativa (per recuperar el fragment d'interès i procedir a la seva extracció i purificació).

##### Reactius:

##### **Agarosa:**

La concentració d'agarosa utilitzada varia segons la grandària de les molècules que cal separar:

<u>% agarosa</u>	<u>Rang de separació (kb)</u>
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
2,0	0,1-2

En aquest treball s'ha utilitzat de forma rutinària gels d'agarosa al 1,0 %.

**Tampó de recorregut:**

Dissolució TAE 50% (per 1 litre):

Tris	242,0	g
Àcid acètic glacial	57,1	ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100	ml

**Tampó de càrrega:**

S'utilitza en una preparació 10x:

Glicerina	500,0	mg
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	200,0	$\mu$ l
SDS 10% (p/V)	100,0	$\mu$ l
Blau de bromfenol (12,5 mg · ml <sup>-1</sup> )	200,0	$\mu$ l

**Protocol per la preparació del gel i electroforesi**

- 1.- Per preparar 50ml de la solució d'agarosa, quantitat necessària per un gel petit , es pesen 0,5g d'agarosa en un matràs Erlenmeyer i s'afegeix 50 ml de tampó d'electroforèsi TAE.
- 2.- Es fon l'agarosa escalfant el matràs Erlenmeyer fins a ebullició agitant durant el procés per obtenir una solució homogènia.
- 3.- Es deixa refredar i s'afegeix bromur d'etidi (10 mg · ml<sup>-1</sup>) fins una concentració final de 0,5  $\mu$ g · ml<sup>-1</sup>.
- 4.- Quan la temperatura de la solució d'agarosa és inferior a 50°C, es vessa dins el motllo del gel que duu una punta per formar les butxaques evitant la formació d'ampolles i retirant-les de la superfície del gel si és el cas.
- 5.- Deixar solidificar durant 20-30 min.

6.-Es col.loca el gel solidificat dins la cubeta d'electroforesi i es recobreix amb el tampó d'electroforesi fins 2 – 3 mm per sobre el gel.

7.- S'afegeix a les mostres el tampó de càrrega.

8.- Es carreguen de 10 a 20 µl de mostra preparada per butxaca. En el cas de gels preparatius s'uneixen fins a 3 butxaques per córrer mostres de fins a 60 µl. S'utilitzen els marcadors de pes molecular de Stratagene carregant 10 ug del preparat com a referència de mides i estimació de concentracions de DNA.

Marcador de pes molecular de DNA:	Longitud fragments referència (bp)
kb supercolied DNA ladder (Stratagene)	12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2
kb linear DNA ladder (Stratagene)	12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0,50, 0.25

9.- Es connecta el tanc d'electroforesi a 70-90 volts (segons la mida del gel).

10.- Finalment, les bandes es visualitzen per transil.luminació dels gels amb llum ultraviolada. El bromur d'etidi és una molècula poliaromàtica fluorescent que s'intercala entre les bases de DNA de forma que la seva acumulació permet visualitzar els fragments exposats a la llum ultraviolada.

En el cas de gels preparatius, es procedeix a l'extracció del fragment d'interès amb un bisturí exposant el menor temps possible el gel a la llum ultraviolada per evitar possibles mutacions del material genètic d'interès.

Les imatges dels gels d'agarosa s'obtenen amb l'equip FluorChem Imaging System (Alpha Innotech Corporation).

#### IV.6.4.2. Purificació de bandes de DNA de gels d'agarosa

Per a l'extracció del DNA de l'agarosa s'ha utilitzat un kit comercial de la firma Qiagen anomenat *QIAquick Gel Extraction kit*. El protocol d'utilització és el següent:

- 1.- Es retalla la banda del gel d'agarosa i s'afegeix 1 µl del tampó caotrópic subministrat pel kit per cada miligram d'agarosa a la banda estreta.
- 2.- S'incuba a 60°C fins a fondre l'agarosa.
- 3.- S'incuba la mostra durant 1 min en una columna mida Eppendorf que conté una reina per la retenció del DNA.
- 4.- Es centrifuga a 13000 rpm 30s. Es llença l'eluat i s'introdueixen 500 µl de tampó de rentat a la columna. Es deixa incubar 1 min i es torna a centrifugar a 13000 rpm 30s.
- 5.- El DNA purificat s'elueix amb 50 µl d'aigua milliQ estèril: es canvia el tub Eppendorf que suporta la columna de purificació per recollir el DNA purificat, s'introdueixen els 50 µl d'aigua a la columna, s'incuba 1 min i s'elueix per centrifugació a 13000 rpm 30s.

#### IV.6.5. CLONATGE DE FRAGMENTES DE DNA EN PLÀSMIDS.

El procediment comprèn els següents passos:

- 1.- Es restringeixen el vector i l'insert amb els enzims de restricció adequats segons es descriu a l'apartat IV.6.3.
- 2.- Per aïllar els fragments d'interès de les digestions realitzades, es fan córrer en una electroforesi preparativa en gel d'agarosa, es tallen les bandes corresponents i es purifica el DNA segons es descriu a l'apartat IV.6.4.2.

### 3.- Reacció de lligació.

La reacció de lligació ens permet unir fragments de DNA d'extrems compatibles. L'enzim usat per a dur a terme aquesta reacció és la T4 DNA lligasa (Promega). Per la lligació d'extrems compatibles cal que el quocient entre el nombre de molècules de vector i el nombre de molècules d'insert sigui proper a 0,5, és a dir, es realitza la lligació amb un excés de 2 molècules d'insert per cada molècula de vector.

Es barregen els volums de vector linealitzat i l'insert estimats adequats, una unitat de lligasa (1 µl) i 1 µl del tampó de la lligasa 10x (composició: Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 100mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM) completant els 10 µl de volum total de reacció. La reacció es pot dur a terme durant tota la nit a 16°C o 3 hores a temperatura ambient.

#### IV.6.6. INCORPORACIÓ DE DNA FORANI EN BACTERIS

Les soques modificades *E. coli* DH1*lacdapD* i *E. coli* DH1*lacdapD2*, propietat de Cobra Bio-Manufacturing plc. com a part del sistema d'expressió ORT patentat per aquesta empresa, tenen una eficiència de transformació molt baixa. Per aquest motiu, per l'obtenció de noves soques recombinant basades en aquest sistema d'expressió ORT, es segueixen plans de treball que eviten la manipulació d'aquestes soques sinó és estrictament necessari i tots els passos de transformació intermedis es realitzen amb soques comercials alternatives per a les que s'han descrit eficiències altes de transformació.

En tots aquest passos intermedis del procés es treballa amb el vector tipus pORT1 que encara conté el gen *bla* per la resistència a ampicil.lina, i s'utilitza la soca *E.coli* XL10-Gold *Kan<sup>r</sup>* (Ref.: 200315; Stratagene). Aquesta soca es transforma per electroporació i els transformants es seleccionen en base a la seva resistència a ampicil.lina. Amb aquesta estratègia de treball es clona l'insert que codifica per la proteïna d'interès, Fuc-1-PA, i tota la resta d'informació genètica que es considera necessària per al control de la seva



expressió al vector pORT1. Per tal de no perdre l'ampicil·lina com a marcador de selecció, l'últim pas del procés és la transformació del vector derivat del pORT1 en pORT1a per eliminació del *gen bla*.

Les soques modificades d'interès *E. coli* DH1*lacdapD* i *E. coli* DH1*lacdapD2* només s'utilitzen en aquest últim pas de transformació. Tot i que, en principi, es descriu l'electroporació com la tècnica de major eficiència en la transformació, per a aquestes soques s'obtenen millors resultats de transformació utilitzant clorur càlcic i aquesta és la tècnica emprada en aquests casos. Només les cèl·lules transformades amb èxit sobreviuran en medi complex LB sense suplementació de DAP o d'un inductor del promotor *lac* (IPTG o lactosa) i aquest és el criteri aplicat per la selecció de transformants.

#### IV.6.6.1. Transformació per electroporació

L'electroporació amb voltatge alt és el mètode més eficient per transformar *E. coli* amb DNA plasmídic (Coligan, 1996). Les cèl·lules preparades per ser sotmeses a aquest tractament poden congelar-se al·liquotades a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### a.- Preparació de les cèl·lules per la transformació per electroporació

- 1.- S'inocula 5 ml de LB fresc amb 50  $\mu\text{l}$  del preparat glicerinat de la soca a transformar i s'incuben durant 12-15 hores a 250 rpm i  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- S'utilitza 2,5 ml d'aquest cultiu saturat per inocular un matràs Erlenmeyer de dos litres de capacitat amb 500ml de LB. S'incuba a 250 rpm i  $37^{\circ}\text{C}$  fins que la lectura de D.O.<sub>600nm</sub> estigui entre 0,5 i 0,6.
- 3.- Es transfereix el cultiu a un tub de polipropilè estèril d'un litre i es refreda en un bany de gel i aigua entre 10 i 15 min.

Per la resta de passos les cèl·lules s'han de mantenir a  $2^{\circ}\text{C}$ .

4.- Es centrifuga a 3000 rpm (1600 x g) durant 20 min a 2°C. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el sediment cel.lular en 5 ml d'aigua estèril freda. Afegir 500ml més d'aigua estèril freda, barrejar bé i centrifugar un altre cop (3000 rpm (1600 x g) durant 20 min a 2°C).

5.- Es decanta immediatament el sobrenedant i es resuspèn el sediment cel.lular en el líquid residual al tub.

6.- Afegir 500ml més d'aigua estèril freda, barrejar bé i repetir els passos 4 i 5.

7.- Per procedir a l'electroporació a partir de cèl.lules congelades, s'afegeixen 40ml de solució al 10% en glicerol estèril i fred, s'homogenitza i es transfereix a un tub de polipropilè de 50ml. Es centrifuga (3000 rpm (1600 x g) durant 10 min a 2°C).

8.- Es decanta el sobrenedant, s'estima el volum de sediment cel.lular obtingut i es resuspèn en un volum similar de solució al 10% en glicerol estèril i freda. S'aliquota en fraccions de 100µl en tubs Eppendorf de 1,5 ml de capacitat prèviament atemperats en un bany de gel i es congelen en gel sec. L'estoc d'alíquotes preparades per electroporació es manté a -80°C.

#### b.- Transformació per electroporació

1.- Incubar les cubetes d'electroporació en gel un mínim de 15 min.

2.- Sense esperar que es descongeli, afegir a una alíquota de cèl.lules preparades per electroporació 2µl del DNA plasmídic amb que es vol transformar (directe del producte de lligació).

3.- Mantenir la mescla en gel fins que es comenci a descongelar i transferir-la a la cubeta d'electroporació freda.

4.- Es treballa amb l'equip d'electroporació de Bio-Rad fixant les següents condicions d'operació: 2,5 kV, 25  $\mu$ F i 400 Ohms.

5.- Inmediatament després de sotmetre la mescla a electroporació, s'afegeixen 900  $\mu$ l de medi complex SOC a la cubeta, es barreja per inversió i s'incuba amb agitació suau a 37°C durant 1 hora.

6.- Es transfereix a un tub Eppendorf de 1,5 ml de capacitat i es centrifuga (1 min a 13000 rpm). Es descarta el sobrenedant i el sediment cel.lular es resuspèn en 100 $\mu$ l de medi complex SOC fresc

6.- Directament amb els 100 $\mu$ l de resuspensió es plaqueja una única placa de LB-agar suplementada amb ampicil.lina a concentració final 100 $\mu$ M.

7.- Es deixa reposar la placa durant 10 min per a l'absorció del medi, s'inverteix i s'incuba a 37°C durant 16 hores.

8.- Resembrar colònies de transformació a una segona placa de LB-agar suplementada amb ampicil.lina a concentració final 100 $\mu$ M, incubar 37°C durant 16 hores i inocular colònies aïllades en tubs amb 5 ml de medi líquid LB.

9.- Incubar a 37°C i 250 rpm 16 hores més. Aquest cultiu s'utilitza per a: a) comprovar l'èxit en la transformació mitjançant l'extracció de DNA plasmídic (*veure* IV.5.4.2.) i b), un cop comprovat, preparació d'estocs glicerinat de la soca recombinant obtinguda.

#### **IV.6.6.2. Transformació utilitzant clorur sòdic**

La introducció de vectors plasmídics en cèl.lules d'*E. coli* es realitza mitjançant la transformació per xoc tèrmic de cèl.lules competents. Per la preparació de cèl.lules competents s'ha utilitzat el mètode del clorur càlcic (Mandel i Higa, 1970), seguint els següents passos:

*a.- Preparació de les cèl.lules competents*

1.- S'inocula 5 ml de LB fresc suplementat amb IPTG a concentració final 0,1 mM amb 50 µl del preparat glicerinat de la soca a transformar i s'incuben durant 12-15 hores a 250 rpm i 37°C.

2.- S'utilitza 1 ml d'aquest cultiu saturat per inocular un matràs Erlenmeyer d'un litre de capacitat amb 100ml de LB suplementat amb IPTG a concentració final 0,1 mM. S'incuba a 250 rpm i 37°C fins que la lectura de D.O.<sub>590nm</sub> estigui al voltant de 0,375.

3.- Es reparteix el volum de cultiu en dos tubs de polipropilè estèril de 50 ml i es refreda el cultiu en gel un mínim de 15 min.

4.- Es centrifuga a 3000 rpm (1600 x g) durant 10 min a 4°C. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn el sediment cel.lular en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM atemperat prèviament en gel. S'incuba en gel durant 30 min.

5.- Es centrifuga a 2500 rpm (1100 x g) durant 5 min a 4°C. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn suaument en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM atemperat prèviament en gel.

6.- Les cèl.lules sotmeses a aquest tractament ja són competents i s'aliquoten en fraccions de 100µl en tubs Eppendorf de 1,5 ml de capacitat. Si no han de ser utilitzades immediatament aquestes alíquotes de competents es congelen a -80°C.

Les solucions de CaCl<sub>2</sub> 100 mM s'esterilitzen per filtració. amb filtres de 0.22 µm (Millex-GS, Millipore).

*b.- Transformació per xoc tèrmic*

1.- Es deixa descongelar una alíquota de cèl.lules competents en gel i es transfereix a un tub de 15ml de polipropilè prèviament incubat en gel.

2.- Afegir la solució del plàsmid de transformació (es treballa directament amb la barreja de lligació amb un volum aproximat de 10µl). S'incuba en gel durant 30 min.

3.- Xoc tèrmic: es transfereixen les mostres a un bany a 42 °C i es mantenen 45s. Ràpidament es transfereixen a un bany de gel on es mantenen 2 min més.

4.- S'afegeix 0,9 ml de LB atemperat prèviament a 37°C, s'afegeix IPTG a concentració final 0,1 mM i s'incuba a 37°C amb agitació suau (100 rpm) durant 1 hora.

5.- Es transfereixen les cèl.lules a un tub Eppendorf de 1,5 ml de capacitat, es centrifuga (1 min a 13000 rpm) i es resuspèn el sediment cel.lular en 1.0 ml de LB fresc per eliminar completament l'IPTG.

6.- Es plaqueja amb una nansa de Digrafsky sobre plaques de LB-agar (100µl de les dilucions  $10^{-1}$  i  $10^{-2}$  de la solució obtinguda al punt anterior).

7.- Es deixa reposar la placa durant 10 min per a l'absorció del medi, s'inverteix i s'incuba a 37°C durant 16 hores.

8.- Resembrar colònies de transformació a una segona placa de LB-agar, incubar 37°C durant 16 hores i inocular colònies aïllades en tubs amb 5 ml de medi líquid LB, incubar a 37°C i 250 rpm 16 hores més. Aquest cultiu s'utilitza per a: a) comprovar l'èxit en la transformació mitjançant l'extracció de DNA plasmídic (*veure* IV.5.4.2.) i b), un cop comprovat, preparació d'estocs glicerinatats de la soca recombinant obtinguda.

#### IV.6.7. SEQÜENCIACIÓ DE DNA

La seqüenciació de DNA es va realitzar a través del servei: The DNA Sequencing Facility, Department of biochemistry, University of Oxford. El mètode de seqüenciació és una variació del mètode de Sanger (Sanger i col., 1977) basat en la seqüenciació cíclica.

---

S'utilitzen encebadors marcats amb un grup fluorescent (ALFexpress) que permeten l'elongació del DNA en presència de Taq polimerasa. Es duen a terme separatament quatre reaccions amb cadascun dels quatre ddNTPs.

## V.1. INTRODUCCIÓ

La composició del medi de cultiu juga un paper essencial en la millora de productivitat de processos per a la sobreexpressió de proteïnes recombinants intracel·lulars. La productivitat del procés en aquests casos ve determinada tant per la concentració cel·lular assolida al final de creixement com per la productivitat específica per a la proteïna d'interès (unitats d'activitat per gram de biomassa). La influència de la composició del medi en ambdós aspectes ha estat àmpliament descrita (Donovan i col., 1996; Lee i col., 1997; Rhee i col., 1997).

Un medi de cultiu correctament dissenyat ha d'aportar tots els nutrients necessaris, i en quantitats suficients, per garantir de no limitar el creixement cel·lular. L'aproximació més senzilla són els medis anomenats complexos, que en base a hidrolitzats protèics (extractes de llevat, casaminoàcids, peptones), aporten abundants quantitats de varietat d'aminoàcids, vitamines i elements traça i mantenen el creixement cel·lular sense necessitat de conèixer estrictament la seva composició. Com alternativa oposada, es troben els medis definits que contenen únicament productes de composició química definida i en quantitats conegudes: una font de carboni, una font de nitrogen, minerals, elements traça i sovint alguna vitamina o aminoàcid concret necessari per al creixement de soques modificades que en són auxotròfiques. Aquests medis cal dissenyar-los en base al coneixement de la composició elemental del microorganisme en estudi i als coeficients de rendiments a biomassa per als principals nutrients. Un bon disseny d'aquests medis es crític perquè concentracions sub-òptimes en determinats components suposen limitacions no controlades del creixement (Yee i Blanch, 1993a).

Cada un d'aquests tipus de medis presenta diferents avantatges com alternativa en el cultiu de microorganismes recombinants per a la producció de proteïnes intracel·lulars. Els medis definits, gràcies a la seva propietat de medis *nets*, faciliten el control de l'evolució del cultiu i permeten:

- el seguiment d'aspectes com ara la disponibilitat de substrats que podrien limitar el creixement o l'acumulació de productes tòxics per al metabolisme,

- el disseny i control d'estratègies de creixement basades en la disponibilitat de nutrients al medi,
- l'obtenció de resultats previsibles i reproduïbles .

Tots aquests aspectes justificarien que els millors resultats en l'estudi de cultius d'alta densitat cel.lular corresponguin a estratègies de creixement controlat i en base a aquest tipus de medi. Resultats amb concentracions al voltant dels 100g de pes sec per litre de cultiu (g PS/l) han estat publicats per alguns grups (Riesenberget al., 1991; DeLisa et al., 1999, Wilms et al., 2001) i aquests rendiments s'han millorat fins al voltant dels 150 g PS/l amb l'optimització d'estratègies per al control del procés (Korz et al., 1995; Horn et al., 1996). Els bons resultats a nivell de densitats cel.lulars i les possibilitats d'un control robust de les fermentacions ha despertat el seu interès en l'àmbit industrial ( Riesenberget Guthke, 1999).

En canvi, els medis complexos aporten aminoàcids, vitamines i altres productes de metabolisme que la cèl.lula pot utilitzar directament sense necessitat d'utilitzar recursos en la seva síntesi. D'aquesta manera es facilita el creixement cel.lular, és possible treballar a velocitats de creixement molt superiors a la dels medis definits i s'augmenta la productivitat del procés mitjançant la reducció del temps associat. Com a principal avantatge però, aquesta naturalesa complexa tendeix a alleugerar l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant i les productivitats específiques assolides acostumen a ser considerablement superiors (Glick, 1995; Winter i col., 2000).

Amb l'objectiu d'aprofitar els avantatges dels medis definits pel que fa al control del procés, però al mateix temps incrementar la velocitat de creixement i productivitat específiques, una tendència habitual és enriquir medis definits correctament dissenyats amb altres nutrients. Quan s'addicionen suplementes complexos com ara casaminoàcids, peptones o extracte de llevat, entre els més comuns en el cultiu d'*E. coli*, aquests medis s'anomenen semicomplexos o semidefinits i s'han utilitzat amb molt bons resultats en estratègies de cultiu per assolir altes densitats cel.lulars (Whitney i col., 1989; Kawabe i col., 1993; Mendoza i col., 1995). Una altra alternativa és l'addició de quantitats controlades de determinats aminoàcids de rellevància en determinades rutes



importants del metabolisme cel.lular o en la síntesi del producte recombinant (Kenneth i col., 1995; Mizutani i col., 1986; Han i col., 2002; Harcum, 2002). Aquesta estratègia pot suposar una inversió de temps considerablement superior però resulta molt més elegant ja que es manté la naturalesa definida del medi de partida.

De la revisió bibliogràfica realitzada s'extreu que no és possible generalitzar a l'hora de triar un medi de cultiu adequat en processos d'expressió recombinant. En cada cas, el medi de cultiu òptim vindrà determinat, principalment, pels següents aspectes:

- la soca i el sistema d'expressió recombinant utilitzats,
- la proteïna d'interès a expressar,
- l'estratègia de creixement amb que es pretén treballar.

En aquest capítol es planteja l'estudi del medi de cultiu per a la producció de Fuc-1-PA en *E. coli XLI Blue MRF' (pTrcfuc)* pensant en la seva utilització final en cultius semicontinus. En aquest sistema recombinant, l'expressió ve controlada pel promotor *trc*, derivat del promotor *lac* i induïble per lactosa o el seu anàleg estructural IPTG. L'objectiu és triar un medi de cultiu que permeti tant maximitzar la productivitat específica de Fuc-1-PA com assolir cultius d'alta densitat cel.lular per tal d'optimitzar la productivitat volumètrica del procés utilitzant aquest sistema d'expressió.

## V.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

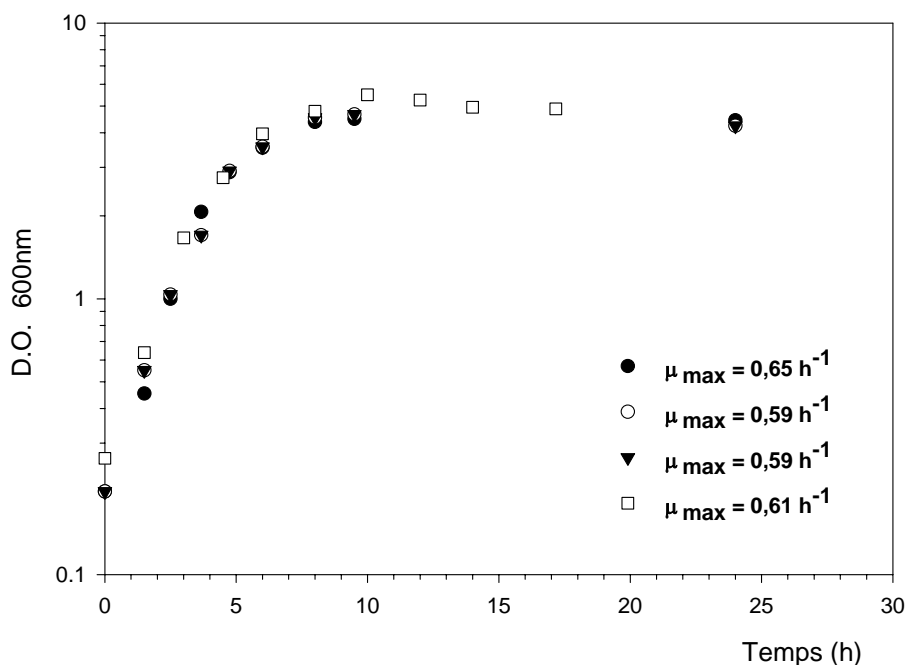
Es pretén avaluar l'efecte del tipus de medi tant en el creixement de la soca de treball, *E. coli* XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*), com en la producció recombinant de Fuc-1-PA sota aquest sistema d'expressió. Amb aquests objectius, es planteja un estudi comparatiu a petita escala en que s'inclouï un medi complex, un de definit i un de semidefinit.

Tot l'estudi es realitza en matrassos Erlenmeyer de 1 l de capacitat segons el protocol i condicions general descrites a Materials i Mètodes (Capítol IV). Només en els experiments per a l'estudi d'expressió de Fuc-1-PA recombinant, es fa necessari estudiar les condicions d'inducció. Per a la resta d'experiments la temperatura de creixement es manté a 37° C, temperatura òptima de creixement del microorganisme.

### V.2.1. Creixement en medi complex LB

Com a medi complex a incloure a l'estudi, es tria el medi de Luria-Bertani (LB) donat que és el medi emprat en els treballs previs realitzats amb la soca de treball *E. coli* XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*) (García-Junceda et al., 1995).

Es realitza un primer experiment per tal d'avaluar la càrrega metabòlica i l'efecte en el creixement que el manteniment del plàsmid *pTrcfuc* i la inducció d'expressió del gen *fucA* poden suposar per a la soca hoste. A la Figura V.1. es mostren els perfils de creixement de la soca XL1 Blue MRF' no recombinant i de la soca recombinant XL1 Blue MRF'(*pTrcfuc*) no induïda i induïda amb dues concentracions d'inductor diferents: 50 µM i 500 µM. La temperatura es manté a 37°C i s'indueix a l'inici del creixement. En experiments posteriors per a l'estudi d'expressió recombinant, dins d'aquest mateix capítol, es fixa la reducció de temperatura a 30°C en el moment d'inducció com a condició de treball, però, en aquest experiment concret, l'objectiu no és tant avaluar la sobreexpressió de Fuc-1-PA soluble activa, com l'efecte d'aquesta sobreexpressió en el creixement del microorganisme i es decideix mantenir la temperatura òptima de creixement d'*E. coli* per a l'estudi.



**Figura V.1.** Perfils de creixement en medi LB a 37°C. (●) *XL1 Blue MRF'* no transformada, (○) *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) no induïda, (▼) *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) induïda a 50  $\mu$ M IPTG, (□) *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) induïda a 500  $\mu$ M IPTG.

No s'observen diferències entre els perfils de creixement de la soca recombinant (induïda / no induïda) ni tampoc quan es comparen amb la soca *XL1 Blue MRF'* no transformada. La velocitat màxima de creixement s'estima al voltant de  $0,6 \text{ h}^{-1}$  en tots els casos. Ni el manteniment del plàsmid de selecció per antibiòtic ni la sobreexpressió de Fuc-1-PA afecten al metabolisme cel.lular de forma significativa i cap dels dos fenòmens es tradueix en una reducció de la màxima velocitat específica de creixement o en modificacions del perfil de creixement. Aquests resultats semblen indicar que els nivells de proteïna recombinant expressada seran molt moderats tot i la inducció (Glick et al., 1995).

Soca:	Concentració d'inductor ( $\mu\text{mols IPTG/l cultiu}$ )	Activitat FUC-1-PA (UA / g PS)
XL1 Blue MRF' no transformada:	...	<i>No detectada</i>
XL1 Blue MRF' ( <i>pTrcfuc</i> ):	<i>No induïda</i>	108
	50	200
	500	276

**Taula V.1.** Activitat Fuc-1-PA específica al final del creixement per a cultius en LB a 37°C. Mostres corresponents a 12h de cultiu.

A la Taula V.1. es recullen els resultats de quantificació d'activitat al final del creixement. Els resultats confirmen que la sobreexpressió de Fuc-1-PA activa per inducció amb IPTG és molt moderada i que els nivells d'expressió en condicions de no inducció no es poden menysprear.

En treballs anteriors publicats pel grup del Dr. Wong fixant les mateixes condicions de treball, la concentració d'inductor òptima descrita es trobava al voltant de 50  $\mu\text{M}$  d'IPTG i, amb concentracions d'inductor superiors, disminuïa l'activitat detectada (Garcia-Junceda i col., 1995). De forma contrària, els resultats obtinguts en el present treball semblen indicar que els rendiments en sobreexpressió augmenten a l'augmentar la concentració d'inductor malgrat que, amb concentracions de 500  $\mu\text{M}$  d'IPTG, no s'obtenen augments proporcionals de sobreexpressió indicant una possible situació de saturació.

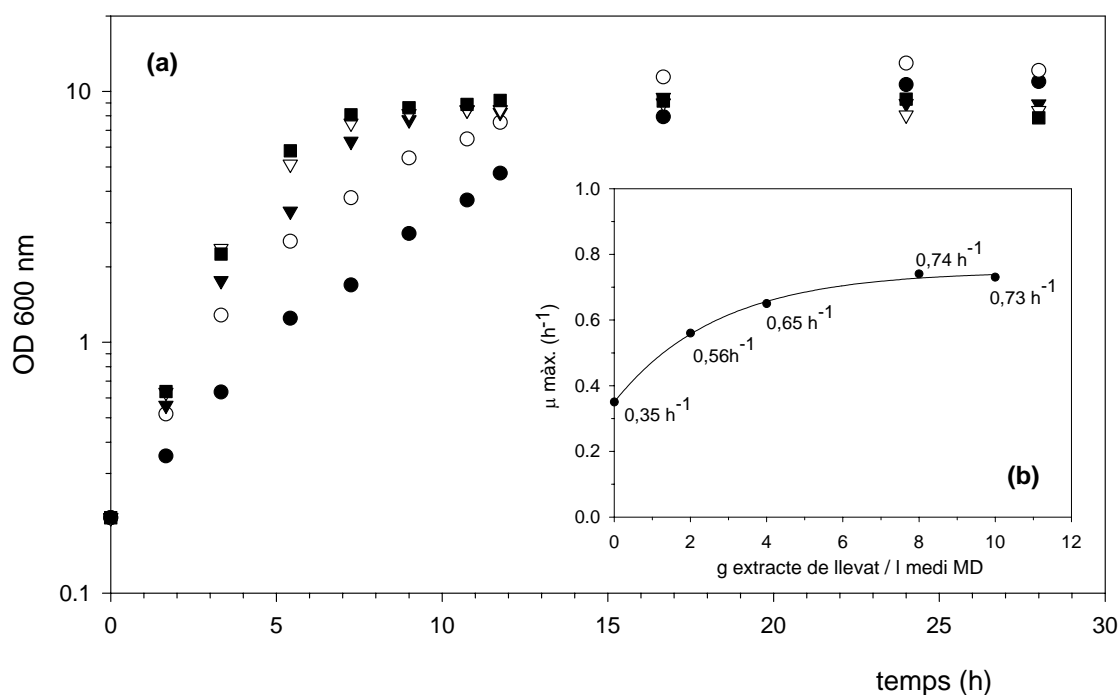
### V.2.2. Creixement en medi definit (MD) i semicomplex (MSC).

Com a medi definit (MD) es tria l'adaptació d'un medi prèviament descrit a la bibliografia per al cultiu d'una soca d'*E. coli* genotípicament molt similar a la de treball (Yee and Blanch, 1993b).

Per a l'elecció del medi semidefinit es realitza un estudi preliminar per avaluar l'efecte de suplementar el medi MD amb diferents concentracions d'una font complexa de nutrients. Cal no oblidar que la finalitat d'aquest estudi és determinar quin tipus de medi és el més adequat per a la producció de Fuc-1-PA i, per tant, només en el cas que el medi semidefinit ho fos, seria el moment de plantejar-se aprofundir en aquest estudi: provar altres fonts complexes alternatives o intentar esbrinar quins són els components definits d'aquest suplement que li infereixen un avantatge sobre creixement i/o expressió.

Es tria l'extracte de llevat com a font complexa per realitzar l'estudi en base a una extensa revisió bibliogràfica comparant l'efecte de suplementació de diverses fonts complexes. Entre els resultats obtinguts destaca l'efecte de l'addició d'extracte de llevat en la millora dels nivells d'expressió i d'estabilitat de proteïnes recombinants produïdes en *E. coli* i que sovint és la font escollida en estudis en que es comparen diferents suplementos complexos (Lee i col., 1994; Yoon i col., 1996; Kweon i col., 2001). També pel que fa a la millora de rendiments cel·lulars, s'han descrit molt bons resultats, concretament en treballs realitzats amb la mateixa soca hoste en estudi (Li i col., 1990). No es pot amagar, però, que també s'han trobat alguns treballs destacant l'efecte negatiu de l'extracte de llevat per incrementar l'expressió basal quan es treballa sota el control de promotors tipus *lac* (Doran i col., 1990; Solaiman i col., 1991).

A la Figura V.2(a). es mostren els perfils de creixement de la soca *XL1 Blue MRF'*(*pTrcfuc*) segons la quantitat d'extracte de llevat suplementada al medi definit MD.



**Figura V.2.** (a) Perfils de creixement de *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) no induïda a 37°C en medi MD enriquit amb concentracions creixents d'extracte de llevat: (●)medi MD, (○) medi MD + 2 g extracte de llevat/l, (▼)medi MD + 4 g extracte de llevat/l, (▽) medi MD + 8 g extracte de llevat/l, (▀) medi MD + 10 g extracte de llevat/l.(b) Perfil de variació en la velocitat específica màxima de creixement en medi definit MD a l'augmentar la concentració d'extracte de llevat suplementat.

Els valors de velocitat específica màxima de creixement en cada cas es mostren a la Figura 2(b). El creixement en medi definit MD ( $\mu_{\text{m}\ddot{a}\text{x}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ) és clarament més lent que en medi complex LB ( $\mu_{\text{m}\ddot{a}\text{x}} = 0,65 \text{ h}^{-1}$ ). L'addició d'extracte de llevat té un efecte positiu sobre el creixement. Suplementacions superiors a 8 g d'extracte de llevat per litre de MD ja no suposen cap avantatge en creixement. Amb una suplementació al voltant dels 4 g d'extracte de llevat per litre, la velocitat específica de creixement per al nou medi semidefinit és molt similar a la que caracteritza el creixement en medi complex LB. En conseqüència, es tria el medi MD enriquit amb 4 g d'extracte de llevat per litre com a medi semidefinit (medi MSC) a incloure a l'estudi (Figura .V.2 (b)).

Fins aquest moment s'han definit els medis a incloure a l'estudi com a representació dels diferents tipus de medi: LB com a medi complex, MD com a medi definit i MSC com a medi semidefinit, i s'ha estudiat l'efecte de la composició del medi de cultiu en el creixement de la soca recombinant. En aquest punt, es decideix introduir un quart medi abans de prosseguir amb l'estudi de l'efecte del medi de cultiu en l'expressió de Fuc-1-PA.

La inclusió d'agents quelants, com ara l'EDTA, en la composició de medis definits o semidefinits dissenyats per assolir cultius d'alta densitat cel.lular és una pràctica habitual per facilitar la solubilització de grans concentracions de components del medi (Wilms i col., 2001, Kweon i col., 2001). La proteïna recombinant d'interès en aquest treball, Fuc-1-PA, és un haloenzim que utilitza de forma preferent zinc com a cofactor entre altres cations divalents (Dreyer i col., 1996). En el cas que posteriorment fos necessari pensar en l'addició d'aquest tipus d'agents quelants per evitar problemes operacionals de solubilització d'alts continguts en sals, sembla interessant parar-se a avaluar l'efecte que podria tenir la seva addició en l'estabilitat i activitat de la proteïna expressada. En base a aquest raonament, es decideix incloure un quart medi a l'estudi: el medi definit MD suplementat amb EDTA (0,033 g Na<sub>2</sub>-EDTA-2H<sub>2</sub>O per litre de medi MD, suplementació habitual en medis descrits per assolir altes densitats cel.lulars).

### **V.2.3. Efecte del medi de cultiu en l'expressió de Fuc-1-PA**

Un cop fixats la soca hoste i el sistema d'expressió recombinants, la inducció òptima per a l'expressió de proteïnes recombinants sota el control de promotors derivats del *lac* no només depèn de la qualitat del medi de cultiu. Per fixar les condicions d'inducció: moment del creixement en que s'indueix l'expressió i concentració d'inductor, també cal considerar altres aspectes com són, principalment, l'estratègia de fermentació amb que es farà créixer la soca hoste, l'estrès metabòlic causat per la sobreexpressió recombinant i la forma en que la proteïna expressada tendeix a acumular-se (Donovan i col., 1996; Lee i col., 1997; Ramirez i col., 1999; Kilikian i col., 2000).

Per a la realització de l'estudi que es planteja en aquest capítol, es fa necessari fixar unes condicions de compromís per a la inducció recombinant per tal de comparar els medis de cultiu i poder extreure la màxima informació possible en relació a les possibilitats de cada un d'ells per a l'expressió de Fuc-1-PA.

#### *criteris per fixar les condicions de temperatura d' inducció en l'estudi*

La formació de cossos d'inclusió, agregats de proteïna insoluble al citoplasma cel.lular, ha estat prèviament descrita per a l'expressió de Fuc-1-PA en *E. coli* XLI Blue MRF' (*pTrcfuc*) treballant en medi complex LB i a 37°C com a temperatura òptima de creixement d'*E. coli* (García-Junceda et al., 1995). Entre els principals aspectes que determinen la formació d'aquests agregats es troben la velocitat i temperatura de creixement, el medi de cultiu i el moment d'inducció (Strandberg i Enfors, 1991a; Georgiou i Valax, 1996). En fixar unes condicions de creixement i inducció comuns per a tots els medis inclosos a l'estudi, en lloc de fixar les condicions òptimes particulars per evitar-ne la formació en cada un d'ells, el grau de formació aquests agregats pot ser significatiu en alguns casos i falsejar els resultats obtinguts en termes de màxima activitat intracel.lular soluble. La reducció de temperatura és una mesura habitual per tractar de minimitzar la formació d'aquests agregats (Chalmers i col., 1990) i, concretament, el grup del Dr. Wong descriu millores en la recuperació de Fuc-1-PA i altres liases recombinants en la seva forma soluble activa quan es redueix la temperatura de creixement de 37°C a 30°C (García-Junceda et al., 1995; Herrman et al., 1994).

Amb l'objectiu de poder comparar en les millors condicions possibles els nivells de sobreexpressió de Fuc-1-PA intracel.lular soluble activa, es fixa com a condició de treball aquesta reducció de temperatura de 37°C a 30°C just en el moment de la inducció.



Críteris per fixar les condicions de concentració d'inductor i moment d'inducció en l'estudi

Els nivells d'inductor requerits per assolir el màxim rendiment de sobreexpressió en sistemes d'expressió basats en l'operó *lac* depenen d'un conjunt molt extens de factors: la força del promotor, la presència de gens repressors *lacI* o *lacI<sup>q</sup>* al plàsmid, la resposta de la cèl.lula hoste a l'expressió recombinant, la solubilitat de la proteïna sobreexpressada i d'altres aspectes de la proteïna a sobreexpressar (Donovan i col., 1996). En concret, per induir l'expressió de proteïnes recombinants intracel.lulars, és habitual utilitzar concentracions de 1 mM d'IPTG donat que, amb aquesta concentració, es preveu obtenir la màxima inducció tant per a vectors amb gens repressors *lacI* com *lacI<sup>q</sup>* (Laffend i Shuler, 1994).

En aquest estudi es treballa amb una concentració final al medi de cultiu de 500µM d'IPTG per induir l'expressió recombinant. Aquesta decisió es pren en base a estudis preliminars (no mostrats) en què, fixant les mateixes condicions de creixement i variant la concentració d'inductor entre 50 i 1500µM de IPTG, amb concentracions superiors a 500 µM ja no es detecten increments significatius en l'activitat específica (UA · g<sup>-1</sup> PS) per a cap dels medis.

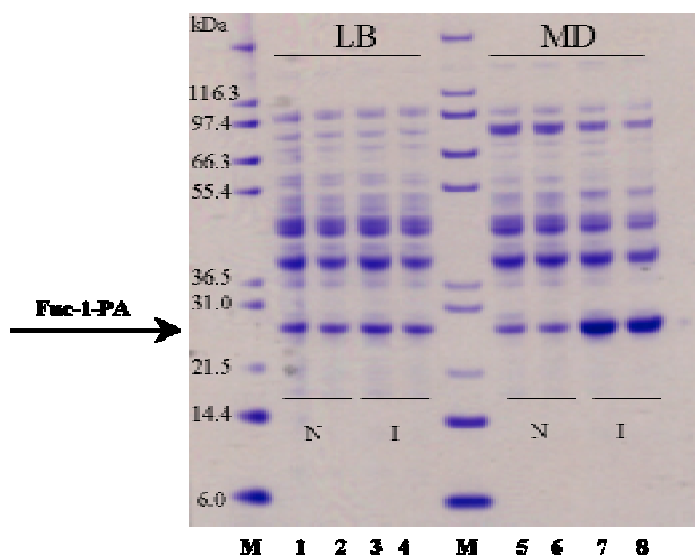
Per últim, el moment d'inducció es fixa a l'inici de la fase exponencial de creixement (D.O.<sub>600nm</sub> ≈ 0,7) i es manté el creixement induït el màxim de temps possible per tal d'avaluar:

- l'efecte de la sobreexpressió recombinant sobre el metabolisme cel.lular i el creixement de la soca recombinant,
- els perfils d'acumulació de la proteïna recombinant d'interès i qualitat d'aquesta expressió (formació d'agregats insolubles, nivells d'activitat)

Les condicions finalment fixades per a l'estudi són: inducció a l'inici de la fase exponencial de creixement (D.O.<sub>600nm</sub> ≈ 0,7) per addició d'IPTG a concentració final al medi de cultiu 500 µM i simultàniament, reducció de la temperatura de 37°C a 30°C. Sota aquestes

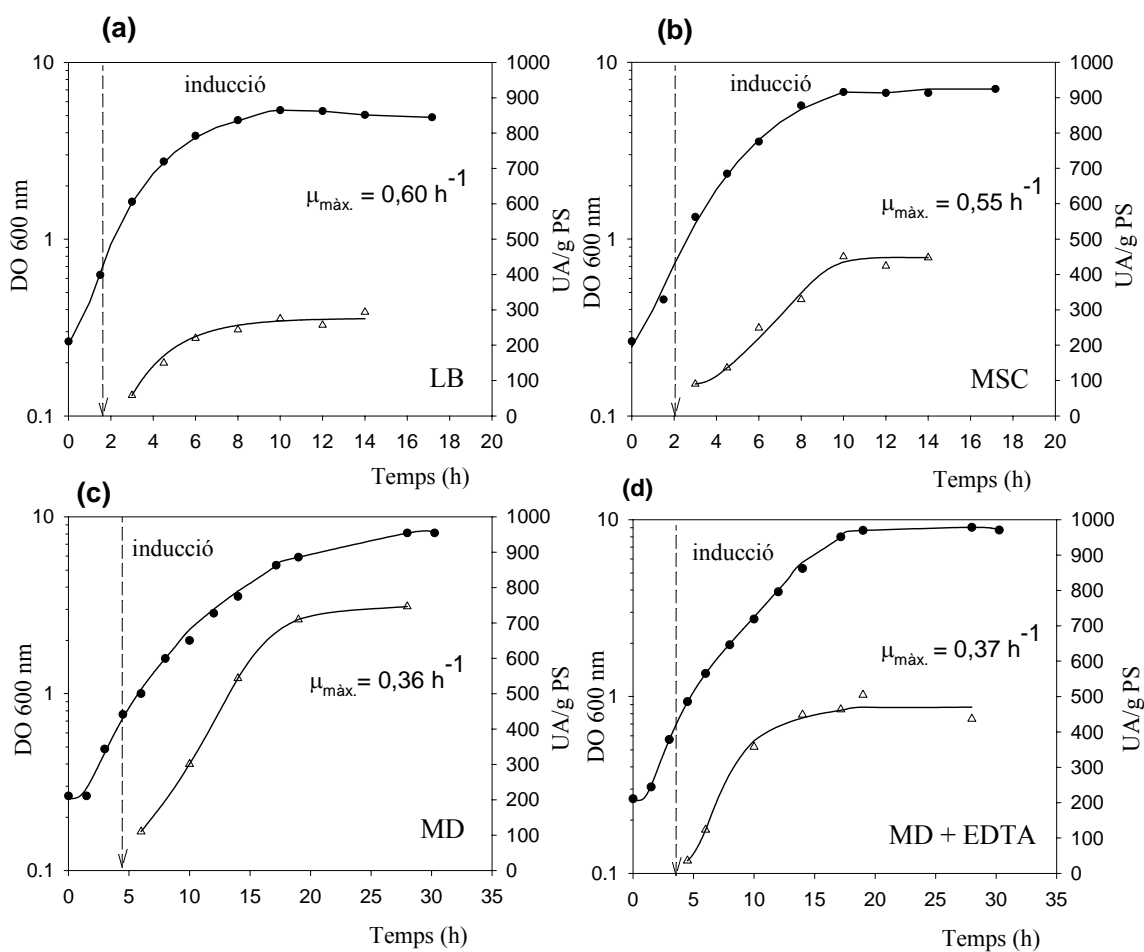
condicions de treball no es detecta la formació de cossos d'inclusió en cap dels medis inclosos a l'estudi fent més senzilla la comparació dels resultats obtinguts.

El control de formació d'aquests agregats es realitza mitjançant observacions rutinàries al microscopi òptic, on es distingeixen com cossos refractaris citoplasmàtics. Els resultats es comproven per microscopia electrònica de transmissió i mitjançant electroforesi de proteïnes. En aquest últim cas, comparant la quantitat de Fuc-1-PA recuperada quan les mateixes mostres de cultiu a final de creixement es processen per a la recuperació de la fracció soluble citoplasmàtica i, per altra banda, aplicant un tractament desnaturalitzant per a la solubilització d'aquests agregats (*veure* Materials i mètodes IV.5.3.1.1.b). A la Figura V.3 es mostren els resultats obtinguts per als medis LB i MD. En cap dels medis el processat alternatiu de les mostres suposa un augment significatiu de Fuc-1-PA recuperada i es descarta la formació d'aquests agregats proteïcs.

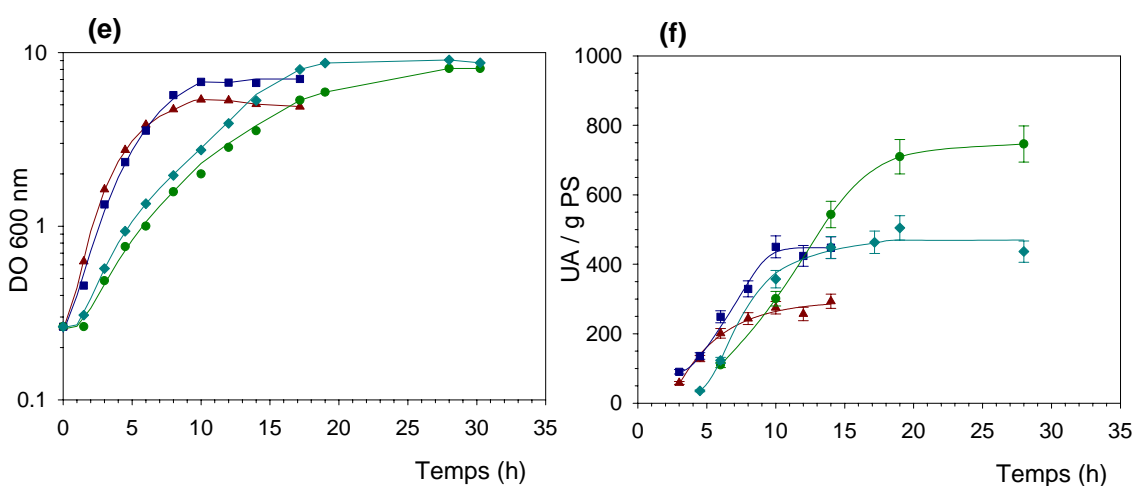


**Figura V.3.** Electroforesi desnaturalitzant SDS-page de mostres a final de creixement ajustades a la mateixa concentració de biomassa. Reducció de temperatura de 37 a 30°C en el moment d'inducció. Carrils: (2,4,6,8) directament per a la fracció soluble citoplasmàtica ; (1,3,5,7) sotmetent-les mostres a un tractament desnaturalitzant per a la recuperació de cossos de inclusió. N: no induït, I: inducció a 500µM d'IPTG a fase inicial de creixement. M: marcador de pesos moleculars.

A la Figura V.4 es presenten els perfils de creixement per a la soca *XLI Blue MRF'* (*pTrcfuc*) en els quatre medis inclosos a l'estudi i també els perfils d'acumulació de Fuc-1-PA intracel.lular soluble activa després de la inducció.



**Figura V.4.** (a) – (d) Valors i corbes de tendència per al creixement i l'acumulació de Fuc-1-PA específica en *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*). Inducció a l'inici de la fase exponencial de creixement amb reducció de temperatura de 37°C a 30°C. (●) D.O.<sub>600 nm</sub>, (Δ) Concentració d'activitat Fuc-1-PA.



**Figura V.4.** (e)-(f). Presentació de les mateixes dades per a la comparació de creixement i acumulació de Fuc-1-PA entre els diferents medis: (▲) LB, (■) MSC, (●) MD, (◆) MD+EDTA.

De l'ànalisi dels resultats obtinguts es poden treure algunes conclusions comunes per al comportament del sistema en tots els medis de cultiu inclosos a l'estudi:

a) No s'observen diferències significatives de creixement quan s'indueix o no l'expressió del gen *fucA* (Comparació de creixements per la Figura V.4.e. i Figures V.1 i V.2). Sembla que la sobreexpressió recombinant no suposa un estrès metabòlic significatiu per a la soca *XLI Blue MRF'* (*pTrcfuc*). Aquesta manca d'efecte de la inducció sobre el creixement ja s'havia observat prèviament en els estudis de creixement inicials en medi complex LB mantenint la temperatura a 37°C.

b) Un cop induïda l'expressió i mentre dura la fase exponencial de creixement, es va acumulant Fuc-1-PA com a proteïna soluble intracel·lular activa però l'acumulació s'atura quan s'assoleix la fase estacionària del cultiu. Es pot concloure que, en tots els medis, l'acumulació d'activitat específica va lligada a creixement.

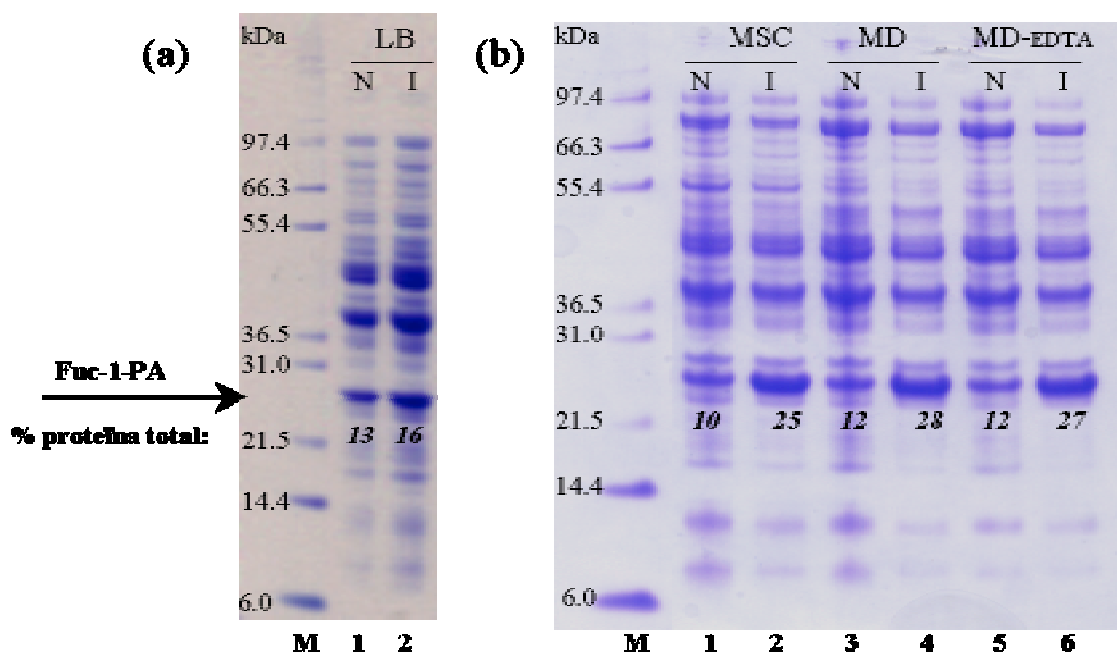
c) L'acumulació progressiva d'activitat aldolàsica durant el creixement i la seva estabilitat en fase estacionària fa descartar la possibilitat d'una activitat proteolítica important, àmpliament descrita per a la producció d'enzims recombinants en *E. coli* (Enfors, S.O., 1992).

L'acumulació d'activitat Fuc-1-PA específica al final del creixement per al medi definit MD ( $700 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ ) és clarament superior a l'obtinguda amb els medis LB ( $200 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ ) i MSC ( $460 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ ). Quan es comparen els resultats obtinguts amb LB i MSC (Figura V.4.a i b.), mantenint similars perfils de creixement i velocitats de creixement màximes, l'acumulació de Fuc-1-PA activa en MSC és molt superior (més del doble) que en LB. Aquesta observació ve a confirmar la influència de la composició del medi sobre l'expressió recombinant que, per l'expressió de Fuc-1-PA en aquest sistema, sembla afavorir-se d'una composició definida mineral. D'altra banda, quan es comparen els resultats obtinguts amb MD i MSC (Figura V.4.b i c.), mantenint ara una base definida mineral per la composició del medi en tots dos casos, la concentració específica de Fuc-1-

PA a final de creixement és notablement superior en MD indicant la influència de la velocitat de creixement sobre l'expressió recombinant.

La reducció en la velocitat de creixement en medi MD, en comparació a quan es treballa amb medis de composició complexa, afavoreix allargar la vida del cultiu i assolir la màxima acumulació d'activitat específica al final del procés donat que, en tots els medis, l'expressió de Fuc-1-PA va lligada a creixement. Per altra banda, es troba àmpliament descrit a la bibliografia que la velocitat de creixement del microorganisme hoste és un dels paràmetres que determinen la qualitat en l'expressió recombinant i que a baixes velocitats de creixement s'afavoreix el plegament correcte de les proteïnes sobreexpressades maximitzant la seva recuperació en forma soluble activa (Neubauer i Winter, 2001). Aquest factor també podria estar afavorint l'acumulació de Fuc-1-PA activa en el medi MD. No obstant, aquests resultats semblen indicar que modificant les condicions de creixement amb MSC, disminuint la velocitat de creixement i allargant la vida del cultiu, es podrien assolir concentracions específiques de Fuc-1-PA molt superiors ja que la composició mineral del medi també afavoreix la producció de Fuc-1-PA.

Les quantificacions densitomètriques dels gels d'electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres de la fracció intracel·lular venen a confirmar els resultats obtinguts d'activitat específica (Figura V.5.). L'acumulació de Fuc-1-PA arriba a un valor màxim al final del creixement en medi MD, al voltant del 28 % de la proteïna total; valor que es manté també quan s'inclou EDTA a la composició del medi MD. L'acumulació en el medi MSC suposa al voltant del 25 % de la proteïna total i només al voltant del 16 % en LB. En LB, la sobreexpressió de Fuc-1-PA un cop induïda l'expressió no és significativa.



**Figura V.5.** Electroforesi desnaturalitzant SDS-page de mostres de la fracció intracel.lular al final del creixement corregides per biomassa. Reducció de temperatura de 37 a 30°C en el moment d'inducció. N: no induït, I: inducció a 500μM d'IPTG a fase inicial de creixement. M: marcador de pesos moleculars.

El sistema d'expressió utilitzat, basat en els plàsmids pTrcHis (Invitrogen Co.), resulta difícil de regular i l'expressió recombinant basal és alta. Aquesta manca de control en la repressió d'expressió recombinant és un comportament àmpliament reportat a la bibliografia quan es treballa amb promotors basats en l'operó *lac* i derivats: l'operador no es troba ocupat contínuament pel repressor *lac* i és habitual observar nivells considerables d'expressió basal (Donovan et al., 1996)

La suplementació del medi MD amb EDTA no influència ni el perfil de creixement ni la fracció de proteïna total intracel.lular soluble que suposa l'aldolasa recombinant al final del creixement però sí té un efecte important en termes d'activitat. Amb l'addició d'aquest agent quelant, l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA intracel.lular a final de creixement es redueix pràcticament a la meitat. Com s'havia sospitat en incloure aquest medi en l'estudi, efectivament sembla que l'addició d'EDTA limita la disponibilitat del  $Zn^{2+}$  i altres cations divalents al medi de cultiu per constituir la forma activa de l'enzim. En una fase inicial del

creixement aquest efecte és inapreciable i el perfil d'acumulació en termes d'activitat específica és gairebé coincident per a tots dos medis, MD i MD+EDTA, però, és al voltant de les 5 hores de creixement induït (Figura V.4.f) que la limitació en cations divalents disponibles al medi de cultiu podria justificar l'aturada en l'acumulació d'activitat aldolàsica que es registra per a aquest medi només en el cas en que es contempla l'addició de l'agent quelant en la seva formulació.

La recuperació de l'activitat de metaloenzims sotmesos a l'acció d'agents quelants ha estat una tasca difícil d'assolir. Generalment, no s'arriba a recuperar el total d'activitat previ al tractament quelant i comporta etapes addicionals en el procés de recuperació final dels enzims per a la seva utilització (Ramilo et al., 1997). Com a conseqüència d'aquest resultat, s'evitarà incloure EDTA en la formulació de cap medi per a la producció de Fuc-1-PA

#### **V.2.4. Influència de la concentració d'inductor en l'expressió de Fuc-1-PA**

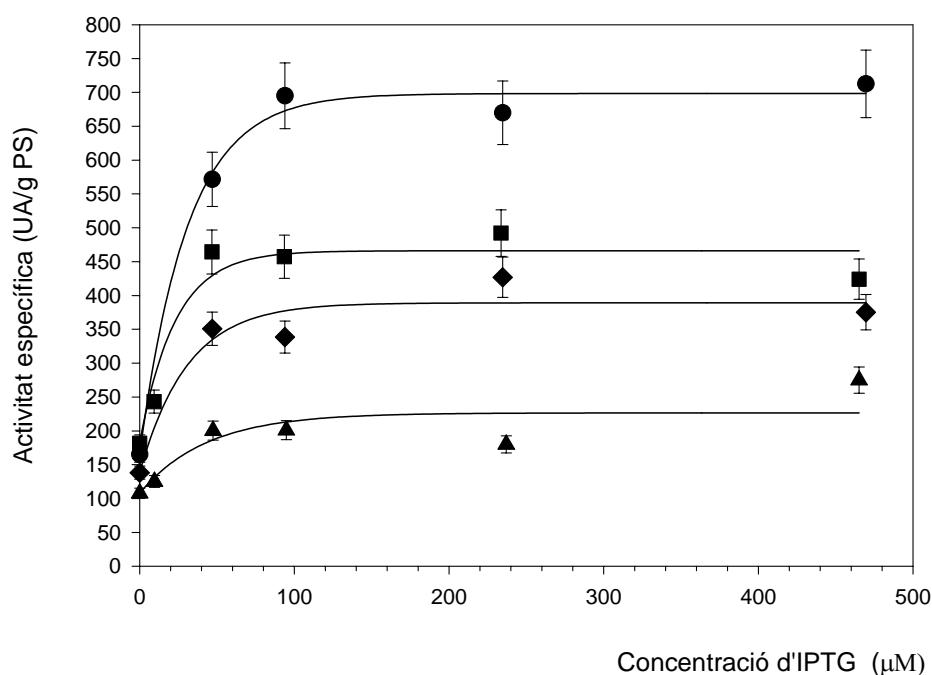
En estudis d'expressió a petita escala, és habitual fixar una concentració d'inductor en excés que asseguri la total inducció del sistema (sempre que no resulti inhibidora). Com ja s'ha comentat, la concentració d'IPTG més àmpliament utilitzada quan es treballa amb promotors tipus *lac* per a l'expressió de proteïnes recombinants citoplasmàtiques solubles ha estat 1 mM (Donovan et al., 1996). Però els criteris per fixar la concentració d'inductor canvien quan es planteja portar a escala de producció un procés d'expressió recombinant basat en un sistema induïble per IPTG. En aquests casos cal considerar que:

- 1) al controlar les condicions de creixement en fermentador, les concentracions cel·lulars finals assolides són molt superiors que en els estudis preliminars en matrassos Erlenmeyer. Mantenir la mateixa concentració d'inductor al medi no garanteix la completa inducció del sistema d'expressió.
- 2) L'IPTG és un inductor car i es fa necessari minimitzar la seva concentració per tal d'intentar garantir la viabilitat econòmica del procés.

S'han publicat treballs en que la concentració d'inductor utilitzada a nivell de matràs Erlenmeyer per a la total inducció del sistema resulta insuficient quan s'aplica a cultius d'alta densitat cel.lular, obtenint-se millores de productivitat molt considerables quan s'incrementava aquesta concentració d'inductor al medi (Kweo et al., 2001). Encara que no es té consciència de cap estudi específic al respecte a la bibliografia, sembla lògic pensar que la quantitat d'IPTG per induir l'expressió recombinant s'hagi de decidir en funció de la concentració cel.lular que s'espera assolir al final del creixement i en base a una estimació prèvia de la quantitat d'inductor per unitat cel.lular necessària per garantir la total inducció del sistema.

Per tal de determinar aquesta relació òptima de quantitat d'inductor per unitat cel.lular, s'estudia l'efecte de la concentració d'inductor en cada medi mitjançant la inducció dels cultius amb concentracions creixents d'IPTG i mantenint la resta de condicions de creixement fixades per a l'estudi al punt V.2.2. D'acord amb els perfils d'acumulació de proteïna recombinant obtinguts (Figura V.4.a-d), es mesura l'activitat aldolàsica a final de creixement en cada cas. Es presenten els resultats obtinguts expressats en termes d'activitat Fuc-1-PA específica màxima acumulada per concentració d'IPTG (Figura V.5)





**Figura V.5.** Influència de la concentració d'inductor en l'expressió específica de Fuc-1-PA en *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*). Inducció a l'inici de la fase exponencial de creixement amb reducció de temperatura de 37°C a 30°C. Per a cada concentració d'IPTG assajada es presenta l'activitat específica corresponent al final del creixement en cada medi: (●) MD; (■) MSC; (◆) MD amb EDTA i (▲) LB.

Dels resultats obtinguts, s'extreu que l'activitat aldolàsica assolida es pot considerar màxima per a concentracions d'inductor notablement inferiors a 1mM treballant amb el sistema d'expressió *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) i en qualsevol dels medis de cultiu en estudi. Concentracions d'IPTG superiors a 100 μM tenen un efecte insignificant en la producció de Fuc-1-PA activa.

Treballant amb les dades de l'experiment presentat a la Figura V.5, a la Taula V.2. es presenten els valors de màxima activitat aldolàsica específica acumulada al final del creixement quan es fixa una concentració d'IPTG final al medi de cultiu de 100μM. Coneixent la concentració cel.lular final assolida en cada cas, es calcula la relació de quantitat d'inductor IPTG per gram de biomassa al final del creixement que caldria

mantenir en cultius d'alta densitat cel.lular per arribar a assolir aquest rendiment específic màxim. Els resultats es presenten a la mateixa Taula V.2.

Medi de cultiu	Activitat específica Fuc-1-PA (UA/g PS)	Relació IPTG-biomassa òptima ( $\mu\text{mol/g PS}$ )
LB	200	72
<b>MSC</b>	<b>460</b>	<b>50</b>
<b>MD</b>	<b>700</b>	<b>44</b>
MD + EDTA	375	40

**Taula V.2.** Activitats específiques màximes a final de creixement i estimació de la relació d'inductor per gram de biomassa necessària per assolir aquests valors d'activitat específica final.

Dels resultats obtinguts s'extreu que per treballar en les condicions òptimes d'inducció amb la soca recombinant *XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) seria necessari fixar un relació al voltant dels 50  $\mu\text{mol}$  d'IPTG per gram de biomassa seca al final del creixement per als dos medis d'interès: MD i MSC. En capítols posteriors d'aquest treball, un cop fixada l'estratègia de fermentació i coneixent la concentració cel.lular que és possible assolir, s'utilitzarà aquest factor per a l'optimització de la inducció i serà aleshores que es podrà avaluar l'eficiència en la inducció atenent a aquest criteri.

A mode d'exemple, per poder avaluar la importància que l'estimació d'aquest factor podria tenir en escalats de procés, imaginem una fermentació de 50 l en medi MD per a la producció de Fuc-1-PA. A la Taula V.3. es comparen, en funció de la concentració cel.lular assolida al final del procés, les quantitats d'inductor que caldria suplementar segons el criteri de inducció:

- a) mantenir una concentració d'IPTG de 1mM al medi, criteri comunment utilitzat per aquest tipus de sistemes d'expressió en base a promotors *lac*,
- b) optimitzar la inducció segons aquesta relació inductor-biomassa generada en medi MD (45  $\mu\text{mol IPTG} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ ).

Concentració cel.lular al final del creixement ( g PS · l <sup>-1</sup> ):	Quantitat IPTG en la inducció (mmols IPTG):	
	<i>Segons es triï el criteri d'inducció:</i> a) 1mM d'IPTG    b) 45 μmols IPTG · g <sup>-1</sup> PS	
15	50	33
25	50	55
50	50	110
75	50	165

**Taula V.3.** Simulació de les quantitats d'IPTG necessàries per induir l'expressió recombinant segons el criteri d'inducció utilitzat. Fermentació imaginària: 50 l de cultiu final en medi MD.

Fixant com a criteri d'inducció mantenir una concentració 1mM d'IPTG, en totes les estratègies de fermentació en que no s'assolissin concentracions cel.lulars finals superiors a 20g PS · l<sup>-1</sup> s'estaria treballant amb un excés d'inductor. Aquest seria el cas de tots els processos industrials en discontinu en que, normalment, no es sobrepassen els 10-15 g PS · l<sup>-1</sup>. En canvi, quan la concentració cel.lular superés els 25 g PS · l<sup>-1</sup>, amb aquest criteri d'inducció es treballaria en condicions subòptimes. Aquest seria el cas treballant amb CADC, a mida que s'assolissin concentracions cel.lulars superiors, menor seria la concentració d'inductor al medi per unitat cel.lular i menor l'activitat específica assolida. Per evitar aquesta possibilitat, en tots els CADC realitzats en aquest treball es fixarà el criteri en base a la relació inductor-biomassa generada com a criteri d'inducció.

### V.3. CONCLUSIONS

Ni la transformació amb el plàsmid *pTrcfuc* per l'expressió recombinant de Fuc-1-PA, ni la inducció de la sobreexpressió amb IPTG, afecten el perfil de creixement de la soca *XLI Blue MRF'* en LB.

La suplementació del medi MD amb extracte de llevat a 4 g/l, medi anomenat MSC, permet assolir el mateix perfil de creixement que en medi LB.

En creixements induïts en els medis MD i MSC l'acumulació de Fuc-1-PA arriba, respectivament, al 25% i al 28% de la proteïna total intracel.lular front un valor del 16% en medi LB. L'activitat específica al final de creixement corresponent és 3,5 i 2,3 cops superior en els medis MD i MSC que en LB. Per tant, els medis de composició definida i semidefinida, MD i MSC, semblen molt més convenient per a la producció de Fuc-1-PA que el medi complex LB, utilitzat en tots els treball previs trobats en la bibliografia per a l'estudi i producció d'aquest enzim. A les condicions de treball, l'activitat específica màxima s'assoleix en medi MD amb un valor de  $700 \pm 42 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$  a final de creixement.

L'addició d'agents quelants, en concret EDTA, en la composició del medi de cultiu per a la producció de Fuc-1-PA comporta una important pèrdua d'activitat en limitar la concentració de cations divalents lliures al medi de cultiu necessaris per rendir la forma activa de l'enzim. Cal evitar l'addició d'aquest tipus de compostos quelants en la formulació de medis per a la producció de Fuc-1-PA.

Per optimitzar la producció de Fuc-1-PA en processos en que es millorin els rendiments cel.lulars, sembla inadequat mantenir una concentració fixa d'IPTG per a la inducció i es defineix una relació d'inductor òptima en base a la concentració cel.lular assolida al final del creixement en cada cas. Aquesta relació s'estima en 45 i 50  $\mu\text{M}$  IPTG / g PS en medi MD i MSC respectivament. Fixant aquesta relació d'inductor, s'espera mantenir la mateixa activitat específica de Fuc-1-PA assolida en aquests experiments de caracterització en

Erlenmeyer, al voltant de 700 +/- 42 UA/g PS, en cultius d'alta densitat cel.lular en medi MD.

## VI.1. INTRODUCCIÓ

L'optimització de processos per a l'obtenció de productes recombinants té com objectiu principal maximitzar la concentració final del producte d'interès (g/l) i la seva productivitat volumètrica ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ): no només obtenir la màxima quantitat o activitat del producte en un volum donat de treball sinó millorar les condicions de producció i expressió per aconseguir-ho en el menor temps possible. Per assolir aquest objectiu, es fa necessari, primer, l'estudi i optimització d'una estratègia de cultiu que permeti assolir cultius d'alta densitat cel.lular (CADC) amb resultats reproduïbles.

Treballar amb tècniques que permetin assolir CADC suposa, a més d'una millora en la productivitat, altres avantatges derivats de la reducció del volum de cultiu. Es facilita la manipulació final del brou de fermentació per a la recuperació dels productes d'interès, es redueix el volum d'aigües residuals que generalment necessiten tractaments especials, es redueix els costos d'inversió en equipament i tot això comporta una reducció del cost global del procés.

En aquest capítol VI es pretén definir un procés de fermentació reproduïble per assolir CADC d'*E. coli* XLI Blue MRF'(*pTrcfuc*) i les condicions d'inducció òptimes per maximitzar la concentració final de Fuc-1-PA i la productivitat volumètrica del procés. Al Capítol V ja es van discutir els principals aspectes a considerar en relació a la inducció de sistemes d'expressió d'*E. coli* basats en promotors tipus *lac*. La introducció d'aquest capítol es centra únicament en la revisió de les estratègies que s'han vingut utilitzant per al cultiu d' *E. coli* a altes concentracions cel.lulars.

### **Estratègies per assolir cultius d'alta densitat cel.lular d'*E. coli***

Per assolir cultius d'alta densitat cel.lular d' *E.coli* és necessari treballar amb estratègies semicontínues limitant el creixement del cultiu mitjançant l'addició controlada d'un substrat essencial. D'aquesta manera és possible solucionar els principals problemes que es presenten en intentar incrementar la concentració cel.lular, bàsicament:

- la baixa solubilitat d'alguns substrats sòlids o gasosos en els medis aquosos que limita la seva disponibilitat per al creixement,
- l'efecte inhibitori associat a altes concentracions de substrats o de productes derivats del propi metabolisme cel.lular en determinades condicions de creixement (principalment, àcid acètic en *E. coli* (veure I.3.2.),
- la creixent demanda d'oxigen per mantenir el creixement cel.lular, així com l'increment de viscositat del medi en cultius ja molt densos. Ambdós aspectes faran que la velocitat de transferència d'oxigen del medi a la cèl.lula sigui cada cop un factor més crític per limitar el creixement cel.lular.

Una fermentació semicontínua per assolir CADC consta, generalment, de dues etapes: una inicial discontinua i, a continuació, una segona alimentada. L'etapa discontinua es caracteritza per un medi de cultiu amb concentracions altes de nutrients però no inhibidores. En aquesta etapa, s'assoleixen velocitats de creixement màximes. La segona etapa comença quan s'exhaureix en el medi inicial de cultiu el nutrient fixat com a limitant per al creixement, típicament la font de carboni. Durant aquesta etapa cal alimentar aquest nutrient limitant per mantenir el creixement controlat. Per assolir CADC, resulten crítiques tant la tria de l'estratègia d'alimentació com de la composició del medi de cultiu: inicial i alimentat.

### **Desenvolupament de medis de cultiu per estratègies semicontínues de cultiu d'*E. coli***

Alguns components essencials del medi de cultiu, entre ells la font de carboni i la d'amoní, poden inhibir el creixement cel.lular d'*E. coli* quan sobrepassen certes concentracions (veure Taula VI.1.). Això explica perquè assolir cultius d'alta densitat cel.lular no és tan senzill com incrementar la concentració de nutrients en un cultiu discontinu sense cap altre modificació.

Es fa necessari el disseny d'un medi de cultiu equilibrat que contingui tot els elements necessaris per al creixement en cada una de les etapes però que al mateix temps eviti

l'acumulació de cap component fins a concentracions inhibidores. Sembla que la tendència general és simplificar al màxim la composició de l'aliment i carregar al màxim el medi inicial intentant que no sigui necessari alimentar més que la font de carboni i de nitrogen. Alimentant només dissolucions concentrades de glucosa, amoni, magnesi i els components necessaris segons les auxotrofies puntuals de la soca en estudi, s'han assolit concentracions cel.lulars superiors al 100 g/l amb diferents soques recombinants d'*E. coli*. (Reisenberg i col., 1991a; Yee i Blanch, 1993b).

Compost	Concentració amb efecte inhibitori (g·l <sup>-1</sup> )
Glucosa	50
Amoni	3
Ferro	1,15
Magnesi	8,7
Fòsfor	10
Zinc	0,038
Acetat	5

**Taula VI.1.** Concentracions per sobre les quals s'han descrit efectes inhibitoris per al creixement d'*E.coli* (Riesenberg., 1991b).

Els medis definits, al permetre conèixer i controlar la concentració de cada nutrient durant el procés, són amb els que s'han aconseguit densitats cel.lulars superiors i són els utilitzats amb més freqüència en els últims anys en CADC degut al desenvolupament d'estratègies de control robustes basades en el seguiment analític del procés (Riesenberg i Guthke, 1999). La suplementació de nutrients complexos que poden variar en la seva composició i qualitat entre lots, fa els processos menys reproduïbles i dificulta el seu seguiment analític. Tot i així, en moltes ocasions la millora en els rendiments d'expressió recombinant justifica la seva elecció (Li i col., 1998; Kweon i col., 2001). La màxima concentració de biomassa en cultiu semicontinu i medi semicomplex de la que es té coneixement és de 86 g/l (Macaloney i col., 1996) però fou possible gràcies a un complicat sistema de control basat en espectroscopia d'infraroig proper (NIR) per al control de la font de carboni, amoni i altres productes simultàniament. En general, els treballs publicats en que es descriuen



concentracions cel·lulars superiors a  $50 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$  emprant suplementacions complexes són escassos mentre que treballant amb medis definits aquestes són concentracions àmpliament superades (Lee, 1996; veure Taula VI.2).

Un aspecte important a considerar tant en l'elecció del medi de cultiu com en l'estratègia d'alimentació és l'acumulació de productes tòxics de metabolisme. Els problemes derivats de l'acumulació d'àcid acètic, principal producte inhibitori de metabolisme en *E. coli* (veure I.3.2.), s'agregen en processos semicontinus al allargar-se el temps de fermentació respecte als processos discontinus. La seva acumulació afecta reduint velocitats de creixement, rendiments cel·lulars i producció recombinant. En processos semicontinus per assolir CADC, la velocitat d'acumulació d'acètic depèn, bàsicament, de la composició del medi i la velocitat de creixement. Com ja es comentava a la introducció general, alguns treballs semblen indicar que la inhibició per acètic s'accentua en medis de composició complexa front als de composició definida (Pan i col., 1987) i, per altra banda, no es pot generalitzar en relació a les velocitats crítiques per la seva producció que oscil·len en rangs entre  $0,05 \text{ h}^{-1}$  i  $0,4 \text{ h}^{-1}$  depenent de la soca de treball, del medi de cultiu i l'estratègia de fermentació.

Una solució habitual per evitar l'acumulació d'acètic en processos semicontinus és treballar amb estratègies d'alimentació que permetin controlar la velocitat de creixement intentant mantenir-les constants a valors baixos, entre  $0,1$  i  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . Recolzen aquesta idea els estudis publicats en que es treuen les següents conclusions:

- 1) entre  $0,1$  i  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , es satura la capacitat de producció de la cèl·lula (Flickinger i Rouse, 1993; Hellmuth i col., 1994),
- 2) per sota de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  es redueix sensiblement la capacitat d'assimilar glucosa d' *E. coli* (Lin i col., 2001),
- 3) a velocitats de creixement inferiors a  $0,09 \text{ h}^{-1}$  la limitació de glucosa pot desencadenar respostes d'estrès cel·lulars importants (Teich i col., 1999).

Com a conseqüència, s'han vingut desenvolupant tot un munt d'estratègies d'alimentació diferents que tenen com a característica comú evitar els problemes de inhibició per acètic mitjançant el control de la velocitat de creixement (veure Taula VI.2).

La glucosa és la font de carboni més fàcilment metabolitzable per *E.coli* i amb la que s'obtenen millors rendiments cap a formació de biomassa (Yee i Blanch, 1993b). Però, al mateix temps, s'acumula ràpidament al citoplasma cel.lular quan s'alimenta en excés i és la font de carboni amb que més s'accentuen els problemes de producció d'acètic. Hi ha autors que conclouen que el metabolisme *E.coli* no està optimitzat per a una utilització eficient de la glucosa (Farmer i Liao, 1997) però, tot i així, la glucosa segueix sent la font de carboni que es tria amb més freqüència per a CADC i amb la que s'han obtingut els millors rendiments cel.lulars (*veure* Taula VI.2.)

### **Estratègies d'alimentació per processos semicontinus de cultiu d'*E. coli***

L'estratègia òptima és aquella amb que és possible alimentar el substrat limitant a la mateixa velocitat que el microorganisme l'utilitza per mantenir el seu creixement (Neubauer i Winter, 2001). Així és possible garantir la no acumulació de substrats al medi i controlar la velocitat de creixement del cultiu. Si la velocitat de creixement es manté suficientment baixa s'assegura mantenir el creixement en condicions aeròbiques i no superar el seu valor crític per a l'acumulació d'àcid acètic optimitzant les condicions de cultiu.

Els mètodes d'alimentació es poden classificar bàsicament en dos grans grups: mètodes amb control retroalimentat i mètodes sense control retroalimentat i , a partir d'aquí, atenent al criteri amb que es fixi el perfil d'alimentació que pot ser constant, lineal, exponencial o optimitzat segons l'evolució real del procés (Yamanè i Shimizu, 1984).

#### *Mètodes sense control retroalimentat*

Els mètodes sense control retroalimentat es basen en seguir un perfil d'addició prefixat amb independència de l'evolució real del cultiu i, en tot cas, en base a l'ajust d'un model matemàtic predeterminat pel creixement del microorganisme. Els més senzills són els que mantenen un cabal d'alimentació constant de forma que la quantitat alimentada serà cada

cop inferior en relació a la biomassa existent. Tot i en el cas que l'alimentació fixada suporti inicialment el creixement exponencial del cultiu, la velocitat específica de creixement disminuirà, primer bruscament quan l'aliment passi a ser insuficient, i progressivament en el temps, mantenint un creixement lineal del cultiu. Els models matemàtics que expliquen el creixement del cultiu sota aquesta estratègia han estat àmpliament estudiats i es troben a la bibliografia (Yamanè i Shimizu, 1984) però no es presenten en aquesta revisió donat que és la mateixa estratègia qui limita el creixement del cultiu i ha caigut en desús.

Dins d'aquest mateix grup es troben els mètodes que permeten prefixar un perfil d'alimentació exponencial. L'èxit d'aquesta estratègia dependrà de la qualitat d'ajust a un model matemàtic prou exacte per simular l'evolució real del creixement. Aquesta estratègia sembla poc robusta donat que és impossible reflectir la gran complexitat del metabolisme cel.lular en un model matemàtic i que l'evolució real del cultiu tendirà a allunyar-se del perfil teòric prefixat. *E. coli* és però el microorganisme millor estudiat a nivell metabòlic i, la fiabilitat dels models matemàtics que descriuen el seu creixement ha quedat provada en funció dels resultats publicats treballant sense control retroalimentat i amb perfils teòrics pel creixement exponencial. Aquesta estratègia ha permès assolir concentracions cel.lulars per sobre dels 100g PS/l per al cultiu d'aquest microorganisme (*veure* Taula VI.2). Aquest addició es pot controlar directament amb una funció exponencial o, de forma encara més senzilla i amb molt bons resultats, mitjançant esglaons creixents del cabal addicionat (Yee i Blanch, 1993b; DeLisa i col., 1999; Wilms i col., 2001)

#### *Mètodes amb control retroalimentat*

Els mètodes amb control retroalimentat permeten decidir l'addició en base al seguiment, directe o indirecte, de la concentració del substrat limitant al medi mitjançant la mesura en línia d'algun paràmetre de procés relacionat. Aquests mètodes requereixen sensors *in-situ* i un equip de control acoblat i programat per decidir l'addició en funció de la lectura del sensor. Els paràmetres típicament emprats per al seguiment indirecte de la concentració del substrat limitant són: la concentració d'oxigen dissolt, el pH, la turbidesa i les velocitats de

producció de CO<sub>2</sub> (CER) o de consum d'oxigen (OUR) quan s'analitza la composició de gasos de sortida del fermentador. El control retroalimentat directe pot no ser tant fiable degut a la dificultat en l'obtenció de mesures prou exactes de la concentració de substrats en línia o, simplement, perquè no s'han desenvolupat sensors per al substrat que interessa controlar.

El principal avantatge del control retroalimentat és que permet la resposta del sistema a algunes situacions inesperades, fora del perfil de creixement esperat i dona la possibilitat d'adaptar l'addició a la nova situació.

El control d'alimentació en base al nivell d'oxigen dissolt, anomenat DO-stat, es basa en l'observació que la lectura d'oxigen dissolt augmenta bruscament quan s'esgota el nutrient limitant del creixement. Aquesta estratègia ha permès mantenir el creixement fins altes concentracions cel·lulars (Mori i col., 1979; Akesson i col., 2001) però, donat que aquest paràmetre de seguiment no és sensible als canvis en el coeficient de consum relatiu d'oxigen a substrat (relació entre la velocitat de respiració i l'assimilació de glucosa) i que aquest coeficient no és constant (Lin i col., 2001), la tendència habitual és a caure en la sobrealimentació i en la pèrdua del control sobre la velocitat de creixement. Addicionalment, els nivells d'oxigen dissolt sovint s'afecten de factors externs físics o fisiològics, com ara variacions en la pressió del vas de fermentació, canvi en la composició de l'aire entrant o l'addició d'agents antiespumants. Per aquest motiu, és molt més recomanable fixar l'alimentació en funció de la composició dels gasos de sortida, atenent als valors en el temps de CER o OUR, que no en base a l'oxigen dissolt. Les cèl·lules consumeixen O<sub>2</sub> i produeixen CO<sub>2</sub> durant el creixement i els valors de CER i OUR són directament proporcionals al consum de la font de carboni emprada. En base a aquesta idea s'han obtingut bons resultats combinant DO-stat i la mesura de CER (Riesenberg i col., 1991b; Mendoza-Vega i col., 1995).

Un altre mètode de control retroalimentat indirecte sovint emprat és el seguiment del pH, anomenat pH-stat, que es basa en l'observació que també el pH augmenta bruscament quan s'esgota la font de carboni, principalment per l'excreció d'ions amoni quan les cèl·lules

intenten utilitzar pèptids com a font alternativa de carboni (Suzuki i col., 1990; Choi i Lee, 1999; Wang i col., 2001). Ambdós mètodes, pH-stat i DO-stat, són mètodes senzills que no requereixen de instrumentació addicional per al control de l'alimentació. Es considera que el control de pH-stat és més adequat per al control d'alimentació en medis amb suplementació complexa mentre que el DO-stat dona millors resultats en medis definits minerals: la suplementació complexa, extracte de llevat o peptones, suposa una font alternativa complexa de carboni que, en el cas del DO-stat suavitzarà el canvi en la mesura d'oxigen dissolt perquè el microorganisme pot créixer emprant una altra font de carboni i, en canvi, en el cas de pH-stat es farà més ràpid i evident el canvi al alliberar-se més ràpidament ions amoni pel metabolisme d'aquestes fonts complexes com a font de carboni (Lee, 1996).

En relació al control retroalimentat directe, diversos autors han utilitzat la mesura en línia de la glucosa mitjançant equips FIA per regular la velocitat d'addició de l'aliment per mantenir una concentració de glucosa al medi entre 1-2 g/l (Riesenberg i col., 1990a; Horn i col., 1996). Aquesta estratègia i altres que igualment permeten el control directe fiable de la font de carboni al medi com ara l'espectroscopia d'infraroig proper (NIR) per l'anàlisi de glucosa o glicerol (Macaloney, 1996) permeten mantenir concentracions baixes però no limitants de la font de carboni al medi. D'aquesta forma les velocitats de creixement s'apropen a les velocitats específiques màximes ( $\mu \approx \mu_{\max}$ ) sense observar-se problemes de formació d'acètic al llarg del procés semicontinu. S'ha arribat a concentracions cel.lulars finals de 145 g PS/l (Horn i col., 1996), que no correspon a la concentració màxima publicada per un procés semicontinu d'*E.coli* però sí a la màxima productivitat cel.lular. També amb control retroalimentat directe s'ha treballat basant l'alimentació en el control en línia de la concentració d'acètic al medi de cultiu mitjançant HPLC (Turner i col., 1994). Aquesta estratègia a permès igualment treballar a velocitats de creixement superiors a les velocitats de creixement crítiques.

Les concentracions cel.lulars més altes reportades per al cultiu d'*E. coli* recombinant, 190 g PS/l, corresponen al grup de Dr. Märkl (Technical University Hamburg-Harburg, Alemanya) treballant amb un reactor de diàlisi per l'eliminació contínua de l'àcid acètic i

altres productes tòxics o inhibitoris acumulats al medi de cultiu sense que aquesta mena de cultiu de perfusió suposi un estrès addicional per les cel.lules (Märkl i col., 1993; Nakano i col., 1997; Fuchs i col., 2002). Però aquest és un mètode de cultiu sofisticat que s'allunya de les configuracions dels reactors de tanc agitat convencionals, difícil d'escalar i en el que fàcilment es malgasten quantitats considerables de nutrients.

En els darrers anys s'han vingut desenvolupant nous sensors en línia i estratègies de control robustes per aconseguir un control estricte de la velocitat de creixement en cultius semicontinus i permetre la seva aplicació industrial (Riesenberg i Guthke, 1999; Neubauer i Winter, 2001). S'han implementat, per exemple, medidors de turbidesa làser per al control d'addició directament en base a la concentració cel.lular i al volum de cultiu (Yamane i col., 1992) i són molts els esforços per millorar els sistemes de control en base a reds neuronals i aplicació de sistemes adaptatius i sistemes experts de control (Estler, 1995; Horiuchi i Hiraga, 1998; Farza i col., 2000). Per altra banda, la manipulació genètica d'*E. coli* ha permès aïllar mutants amb millors propietats fisiològiques per al seu cultiu a alta densitat cel.lular (Weikert i col., 1997): rendiments de font de carboni a biomassa més alts i/o menor excreció de subproductes tòxics de metabolisme, principalment àcid acètic. Aquestes millores no han permès assolir concentracions i/o productivitats superiors a les prèviament obtingudes amb els mètodes més convencionals però sí facilitar les condicions de treball.

Märkl i col.laboradors estimen la màxima densitat cel.lular assolible en un cultiu d'*E. coli* al voltant de 160-200 g PS · l<sup>-1</sup> (Märkl i col., 1993), mentre que en un estudi anterior el grup de Reisenberg l'estima al voltant de 400 g PS · l<sup>-1</sup> (Reisenberg, 1991). El fet que deu anys després d'aquestes estimacions, les màximes densitats cel.lulars assolides es trobin al voltant de 190 g PS · l<sup>-1</sup> (veure Taula VI.2) i que s'estimi que per sobre de 220g PS · l<sup>-1</sup> el medi hagi de perdre la seva fluidesa (Mori i col., 1979), venen a recolzar que el límit real de màxima densitat cel.lular assolible en CADC d'*E. coli* es trobi rallant els 200 g PS · l<sup>-1</sup>.

El disseny d'una estratègia de fermentació semicontínua vindrà determinat per la disponibilitat de models matemàtics que descriguin de forma fiable l'evolució del creixement i de les possibilitats de seguiment de variables directes o indirectes del procés.

Soca d' <i>E.coli</i>	Medi de cultiu (font carboni def.)	Reactor <sup>(*)</sup> / Estratègia semicontínua / alimentació	Conc. cel.lular final (g PS/l)	Referència
W3310	Definit (G)	Reactor de diàlisi/ Alimentació constant	190	Nakano i col., 1997
X90	Definit (G)	Exponencial prefixat (NR)	92	Yee i Blanch, 1993b
TG1	Definit (G)	Exponencial prefixat (NR)	128	Korz i col, 1995
TG1	Definit (Gli)	Exponencial prefixat (NR)	148	Korz i col, 1995
JM105	Definit (G)	Exponencial prefixat (NR)	110	DeLisa i col., 1999
JM109	Definit (G)	Exponencial prefixat (NR)	100	Wilms i col., 2001
WSH-KE1	Semicomplex (G)	Exponencial prefixat (NR)	59	Kweon o col., 2001
TG1	Definit (G)	Control específic de $\mu$ per mesura en línia f.c.	60	Reisenberg i col., 1990
TG1	Definit (G)	Control específic de $\mu$ per mesura en línia f.c.	145	Horn i col., 1996
K-12	Semicomplex (Gli)	Control específic de $\mu$ per mesura en línia f.c.	86	Macaloney i col, 1996
XL1 Blue	Definit (G)	glucosa-stat	25	Wang i col., 2001
XL1 Blue	Definit (Gli)	pH-stat	27	Wang i col., 2001
XL1 Blue	Definit (G)	pH-stat	120	Choi i Lee, 1999
BL21 DE3	Definit (G)	DO-stat	40	Akesson i col., 2001
TG1	Definit (G)	CER / DO-stat	110	Reisenberg i col., 1991
MC1061	Semicomplex (G)	CER / DO-stat	58	Mendoza-Vega i col., 1995

G: glucosa; Gli: glicerina; f.c.: font de carboni; (\*): quan no s'especifica el tipus de reactor: reactor de tanc agitat; (NR): sense control retroalimentat

**Taula VI.1.2.** Resum bibliogràfic d'estratègies semicontínues utilitzades per al cultiu d'*E. coli* i resultats obtinguts.

## **VI.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ.**

### **VI.2.1. Elecció i implementació d'una estratègia semicontínua per al cultiu de *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).**

La velocitat de creixement és un paràmetre clau en fermentacions semicontínues ja que condiciona la productivitat específica i l'acumulació d'àcid acètic al medi. La velocitat d'expressió de productes recombinants en la seva forma soluble activa en *E.coli* és superior a velocitats de creixement baixes (Reisenberg et al., 1990) i la producció d'acètic es minimitza al mantenir la velocitat de creixement per sota de la velocitat de producció crítica per a la seva formació (Suárez i Kilikan, 2000).

En aquest treball, es tria una estratègia d'alimentació exponencial per limitació de glucosa com a font de carboni per al cultiu semicontinu d'*E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc). La idea és mantenir una velocitat de creixement constant del cultiu fixada a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i addicionar la glucosa de forma proporcional al creixement, assegurant que la concentració residual al medi sigui nul·la al llarg del procés per tal que no es pugui metabolitzar cap a la producció d'acètic. Amb aquesta estratègia s'intenta minimitzar la inhibició al creixement associada a l'acumulació d'acetat i maximitzar l'expressió recombinant.

Es decideix prefixar el perfil d'addició de l'aliment en base a l'ajust d'un model matemàtic per al creixement d' *E. coli* en processos semicontinus. En aquesta primera aproximació, no es contempla la possibilitat de control retroalimentat del sistema per tal de simplificar la seva implementació.

Les expressions finals que ens permeten descriure el sistema de treball (Equacions VI.1, VI.2. i VI.3) s'obtenen a partir del model matemàtic general per al creixement microbià en estratègies semicontínues descrit a l'Apèndix 3. Aquest model es simplifica en base a la consideració de totes les particularitats del sistema de treball i certes suposicions de partida que caldrà verificar a nivell experimental. La deducció completa d'aquestes expressions es troba detallada també a l'Apèndix 3.



Expressió per al perfil d'alimentació necessari per mantenir el creixement exponencial a  $\mu$  constant amb el temps:

$$Q_v = \frac{\mu XV}{S_0 Y_{x/s}} = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{S_0 Y_{ap_{x/s}}} \quad (\text{VI.1.})$$

Expressions per als increments de volum i biomassa al vas de fermentació a temps  $t$  de l'inici de la fase alimentada corresponents a mantenir aquest perfil d'addició:

$$V = \frac{V_0}{\mu} (\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0) \quad \text{on:} \quad A = \frac{\mu}{Y_{ap_{x/s}} S_0} \quad (\text{VI.2.})$$

$$X = \frac{\mu X_0 \exp(\mu t)}{(\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0)} \quad (\text{VI.3.})$$

on:

$\mu$  : velocitat específica de creixement ( $\text{h}^{-1}$ )

$t$  : temps de cultiu des de l'inici de l'etapa alimentada(h)

$V$ : volum de cultiu al vas de fermentació (l)

$V_0$ : volum de cultiu al vas de fermentació a l'inici de l'etapa semicontínua (l)

$X$ : concentració de biomassa al vas de fermentació ( $\text{g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$X_0$ : concentració de biomassa al vas de fermentació a l'inici de l'etapa semicontínua ( $\text{g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$S$ : concentració de substrat al vas de fermentació ( $\text{g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$S_0$ : concentració de substrat a l'aliment ( $\text{g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$Y_{ap_{x/s}}$ : coeficient de rendiment aparent de substrat a biomassa

$Q_v$ : cabal d'addició del corrent alimentat ( $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ )

Aquestes expressions només seran vàlides quan es compleixen les següents assumpcions per al període semicontinu de creixement (*veure* Apèndix 3):

- la velocitat de creixement es manté constant a un valor prefixat i només depèn de la velocitat d'alimentació del substrat limitant del creixement.
- La concentració del substrat limitant del creixement a l'aliment és constant.
- El rendiment aparent d'aprofitament del substrat a biomassa, es manté constant durant tot el procés i el consum de substrat per al manteniment de la biomassa existent s'inclou dins aquest rendiment aparent.

Els programes amb que s'implementa aquesta estratègia als equips de fermentació utilitzats (Capítol IV.4.4., Materials i Mètodes) permeten corregir els valors de volum al vas de fermentació,  $V$ , i concentració cel.lular,  $X$ , que en principi s'estimen en base a les expressions teòriques VI.2 i VI.3, pels valors reals d'aquestes variables determinats per extracció de mostra i anàlisi fora de línia. La possibilitat d'utilitzar els valors experimentals permetrà adaptar l'alimentació a les desviacions del perfil de creixement teòric que es donin durant el creixement. Aquesta correcció és important quan es planteja l'optimització de paràmetres per a la soca de treball.

### **VI.2.2. Adaptació de la composició d'un medi de cultiu definit per a la seva utilització en cultius semicontinus per assolir altes densitats cel.lulars.**

Al Capítol V es proposava el medi definit MD per a la producció de Fuc-1-PA en *E.coli*. En aquest apartat es descriu la reformulació d'aquest medi per a la seva utilització en estratègies semicontínues per a cultius d'alta densitat cel.lular, CADC. D'entrada s'estimen les quantitats necessàries de cada un dels nutrients essencials per a creixement per generar una quantitat de biomassa determinada. Aquest càlcul es realitza en base a la composició elemental general per bacteris i als rendiments a biomassa per als principals nutrients descrits per *E.coli*. Amb aquesta informació es determina la composició del medi inicial al vas de fermentació per al creixement discontinu i la composició de l'aliment per a l'etapa de creixement semicontinu per tal de subministrar les quantitats necessàries de tots els nutrients evitant problemes de solubilitat o inhibicions al creixement.

Per poder realitzar aquests càlculs en relació a la quantitat i distribució dels nutrients a les diferents etapes del procés, primer es fa necessari determinar la quantitat de biomassa total que es vol arribar a generar. Es fixa com objectiu assolir una concentració cel.lular al final del procés de fermentació de 80 g PS · l<sup>-1</sup> aprofitant els 1,6 l de capacitat útil màxima de l'equip de treball BRAUN BIOSTAT B<sup>®</sup>, equip en que es realitza tot l'estudi en relació a l'optimització d'una estratègia operacional corresponent al Capítol VI d'aquest treball. Aquesta concentració cel.lular de 80 g PS · l<sup>-1</sup> correspon a un total de 128 g PS per al volum de treball fixat. A la Taula VI.3 es presenten les quantitats de nutrients necessàries per assolir aquest total de 128 g de biomassa (g PS) així com la informació emprada per la seva estimació.

EL.	NUTRIENT	CONTINGUT DE L'ELEMENT, % p/p		Yx/s (g PS / g nutrient)	TOTAL ( a 128g PS) (g nutrient)	Consum relatiu a glucosa (g nutrient / g glucosa)
		Al nutrient	A la cèl.lula (per 100 g PS)			
C	C6H12O6	40,00	90,91	<b>0,44</b> (1)	290,91	1,00E+00
N	(NH4)2SO4	21,20	10	<b>2,12</b> (1)	60,38	2,08E-01
S	(NH4)2SO4	24,27	0,614	<b>39,53</b> (1)	3,24	1,11E-02
P	K2HPO4	17,78	2,94	<b>6,05</b> (1)	21,16	7,27E-02
K	K2HPO4	44,89	1,89	<b>23,75</b> (1)	5,39	1,85E-02
Mg	MgSO4·7H2O	9,91	0,360	<b>27,56</b> (1)	4,64	1,60E-02
Na	NaCl	39,34	<b>1</b> (2)	39,34	3,25	1,12E-02
Fe	FeCl3	34,40	<b>0,2</b> (2)	172,00	0,74	2,56E-03
Ca	CaCl2·2H2O	27,26	<b>0,01</b> (2)	2726,02	0,05	1,61E-04
Cu	CuSO4 ·5H2O	25,45	<b>0,01</b> (2)	2545,10	0,05	1,73E-04
Zn	ZnSO4·7H2O	22,74	<b>0,005</b> (2)	4548,24	0,03	9,67E-05
Mn	MnCl2·4H2O	27,76	<b>0,01</b> (2)	2775,91	0,05	1,59E-04
Mo	Na2MoO4	39,65	<b>0,0002</b> (2)	198264,10	0,00	2,22E-06
Cl	NaCl	60,67	<b>0,5</b> (2)	121,33	1,05	3,63E-03
Co	CoCl2·6H2O	24,77	<b>0,001</b> (2)	24769,05	0,01	1,78E-05

**Taula VI.3.** Requeriments estimatius dels principals nutrients per generar 128 g biomassa seca d'*E. coli*. (1) Dades bibliogràfiques de rendiments de nutrient a biomassa (Lee i Blanch, 1993a); (2) dades de composició elemental del bacteri (Bailey i Ollis, 1977; Mak i col., 1995).

Els valors de rendiment a biomassa per als principals nutrients s'extreuen dels resultats obtinguts per Lee i Blanch en l'optimització de la composició d'un medi definit per al creixement d'*E. coli* recombinant (Yee i Blanch, 1993a). Aquests autors, un cop identificats els principals nutrients essencials per a creixement, determinen els coeficients individuals de rendiment a biomassa mitjançant una sèrie de cultius en quimiostat en que la composició del medi es va modificant per tenir en cada cas un únic substrat limitant del creixement. Els mateixos autors puntualitzen que els valors de rendiment a biomassa poden variar en funció

de diversos paràmetres: la soca recombinant de treball, la velocitat específica de creixement, la temperatura, l'osmolaritat del medi, pH, la concentració i font dels diferents nutrients i la formació de productes recombinants entre els més importants. Descriuen que el rendiment de glucosa a biomassa s'incrementa a mida que augmenta la velocitat específica de creixement i no descarten la modificació dels valors a mida que evolucioni un procés en que no es puguin mantenir les condicions de cultiu de la manera en que és possible treballant en quimiostat.

Tot i així, els valors de rendiments cel.lulars dels principals nutrients estimats per Lee i Blanch són molt similars als aportats per altres estudis en quimiostat treballant amb altres soques recombinants d'*E. coli* i fixant altres condicions de cultiu (Rothen i col., 1998 Reiling i col., 1995). En tots els casos, l'ús dels valors de rendiments estimats permeten una bona aproximació a la formulació d'un medi equilibrat amb molt bons resultats quan s'aplica en cultius semicontinus.

La resta de valors a la Taula VI.3, per a elements minoritaris però essencials per a creixement, corresponen als valors per a composició cel.lular bacteriana obtinguts a partir de l'anàlisi elemental de la biomassa seca (Bailey i Ollis, 1977; Mak i col., 1995).

Coneixent ara les quantitats de nutrients necessaris per assolir la biomassa total objectiu (Taula VI.3) i havent fixant un volum de treball inicial per a l'etapa discontinua de 0,8 l, es descriuen els criteris en que es basa la composició final dels medis discontinu i alimentat de treball:

1. per minimitzar la càrrega iònica del medi, sempre que sigui possible cobrir les necessitats de diferents elements amb un únic nutrient es farà atenent al de menor rendiment a biomassa.
2. Es treballa amb un medi tamponat en base a fosfats. Per aconseguir-ho a més de  $K_2HPO_4$  s'addiciona al medi  $KH_2PO_4$  en relació 5:1.

3. Per tal de poder minimitzar la dilució del cultiu deguda a l'alimentació en l'etapa discontinua i maximitzar la productivitat del procés, interessa simplificar al màxim la composició del medi alimentat per assolir la màxima concentració de glucosa. D'entrada es pensa només en alimentar aquells nutrients per als quals es descriu problemes d'inhibició al creixement o de solubilitat en les concentracions finals que les quantitats descrites a la Taula VI.3 suposarien en l'etapa discontinua (0,8 l). Aquests nutrients són els ombrejats a la Taula VI.3: les sals de magnesi i nitrogen. El total d'amoni necessari suposaria una concentració de 21 g  $\text{NH}^{4+}$ /l al medi pel cultiu en discontinu quan per a concentracions al voltant de 3 g  $\text{NH}^{4+}$ /l ja es descriuen efectes inhibitoris del creixement (*veure* Taula VI.1.). No s'arriba a concentracions inhibidores per al magnesi però s'inclou a l'aliment per minimitzar problemes de precipitació amb fosfat potàssic i clorur de calci (Neubauer i Winter, 2001) i per garantir-ne la no limitació ja que s'associa a greus problemes de lisi cel.lular a curt termini (Yee and Blanch, 1993a)
4. Per als nutrients alimentats junt amb la glucosa, les concentracions als medis alimentat i discontinu, s'estimen, en un lleuger excés, en base als seus coeficients de consum relatius a glucosa i segons la concentració de glucosa en cada medi. Els coeficients de consum relatiu a glucosa s'estimen a partir de les dades bibliogràfiques recollides a la Taula VI.3 i s'inclouen a la mateixa taula.

Es realitza una sèrie d'experiments preliminars per avaluar l'efecte sobre el creixement que suposaria carregar la resta de nutrients al medi en l'etapa discontinua. Es formula un nou medi definit, medi MDF, aplicant els criteris anteriors (punts 1-4) i variant les concentracions inicials de fosfats i elements traça (elements a la Taula VI.3 amb rendiments a biomassa iguals o superiors a 40) segons es descriu a la següent taula:

Medi de cultiu	Glucosa (g/l)	NH <sup>4+</sup> ; Mg <sup>2+</sup> (g/l)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (g/l)	Elements traça (g/l)
MDF-1	10	R.G. <sup>(1)</sup>	Total <sup>(2)</sup>	R.G. <sup>(1)</sup>
MDF-2	10	R.G. <sup>(1)</sup>	½ Total <sup>(2)</sup>	Total <sup>(2)</sup>
MDF-3	10	R.G. <sup>(1)</sup>	½ Total <sup>(2)</sup>	R.G. <sup>(1)</sup>

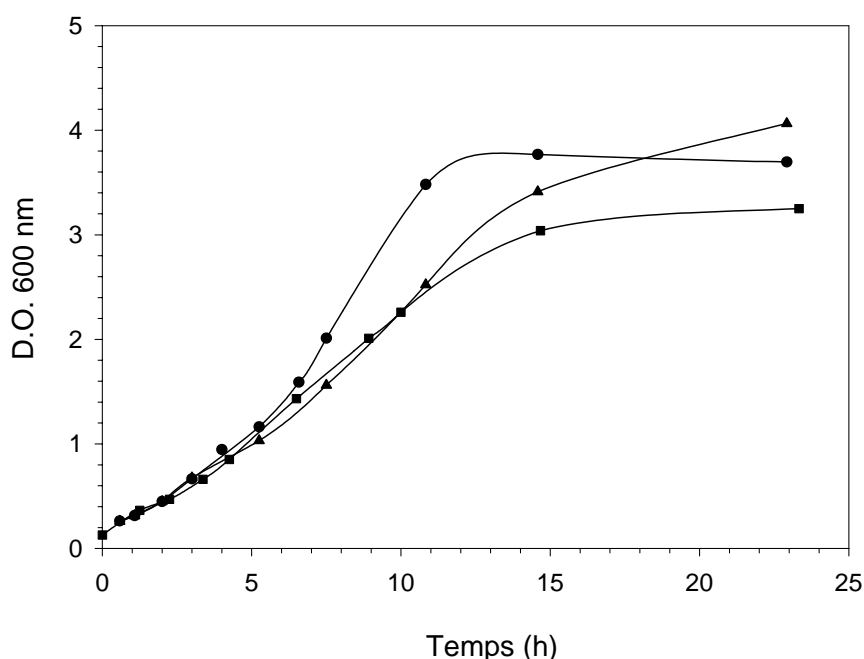
<sup>(1)</sup> R.G.: concentració estimada segons els consums relatius a glucosa (veure Taula VI.3).

<sup>(2)</sup> Total: quantitat total del nutrient necessària per assolir 128g PS (veure Taula VI.3).

**Taula VI.4.** Variacions de composició del medi MDF (per al cultiu d'*E. coli* a altes concentracions cel·lulars) en l'etapa discontinua.

Per avaluar l'efecte de mantenir altes concentracions en fòsfats es prepara el medi MDF-1 amb una concentració en elements traça estimada segons el consum relatiu d'aquests elements a glucosa (veure Taula VI.3) però amb tota la càrrega de fòsfats necessària per assolir 128 g PS. En l'altre extrem, per avaluar l'efecte de mantenir altes concentracions en elements traça, es prepara el medi MDF-2 reduint la càrrega en fòsfats a la meitat del que s'estima necessari per assolir 128 g PS però mantenint tota la càrrega d'elements traça per assolir aquesta biomassa. Finalment, es prepara el medi MDF-3 reduint simultàniament la càrrega de fòsfats i elements traça seguint els mateixos criteris que en la formulació dels medis anteriors. La composició d'aquest medi MDF-3 és molt similar a la del medi MD utilitzat per a cultius a baixa densitat cel·lular i s'inclou a l'estudi a mode de control de creixement òptim.

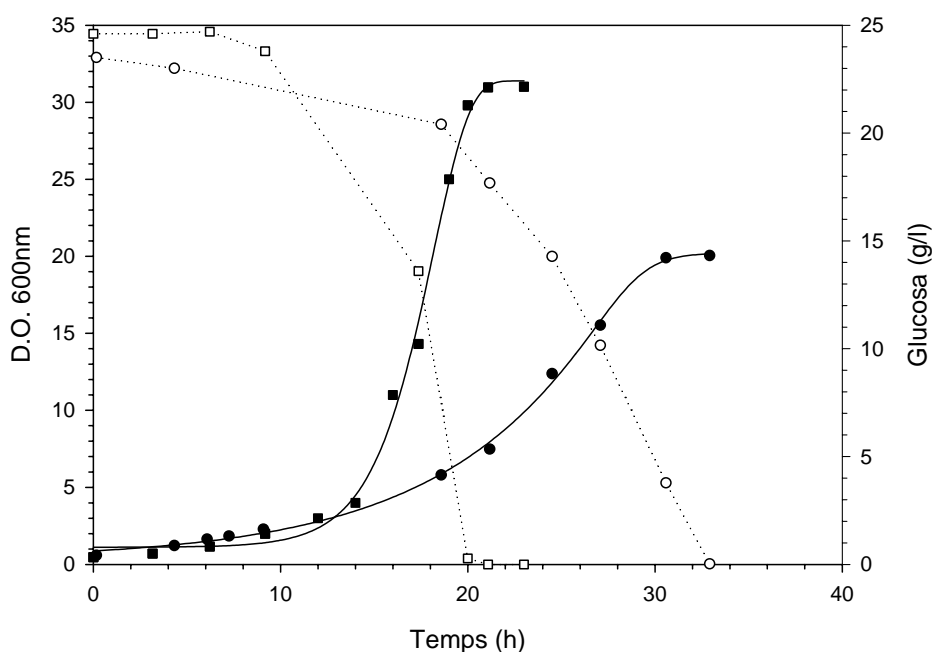
Els experiments es realitzen en matrassos Erlenmeyer d'un litre de capacitat segons es descriu a Materials i Mètodes (Capítol IV). A la Figura VI.1. es comparen els perfils de creixement segons la composició dels diferents medis MDF.



**Figura VI.1.** Efecte de la concentració de fosfats i d'elements traça al medi de cultiu per al creixement d'*E.coli XL1 Blue MRF'* (*pTrcfuc*) (●) MDF-3: Control de creixement reduint les concentracions de fosfats i elements traça als nivells del medi MD per a creixement a baixes concentracions cel.lulars. (▲) MDF-1: mantenint la concentració necessària de fosfats per assolir 128 g PS però reduint la d'elements traça. (■) MDF-2: mantenint la concentració necessària d'elements traça per assolir 128 g PS però reduint la de fosfats.

S'observa que, tot i no arribar a concentracions descrites com a inhibidores a la bibliografia per a cap dels nutrients principals (Riesenber., 1991b), tant les altes concentracions en fosfats com en elements traça afecten al creixement cel.lular: en el primer cas, MDF-1, allargant el temps de creixement per assolir la màxima densitat cel.lular i en el segon, MDF-2, reduint la densitat cel.lular màxima assolida al final de creixement. Sembla que es fa necessari reduir el contingut tant de fosfats com d'elements traça al medi discontinu per treballar en condicions òptimes de creixement sent MDF-3 el medi més adequat per l'etapa discontinua de creixement.

Per confirmar aquest resultat, es realitza un segon experiment, aquest cop utilitzant l'equip BRAUN BIOSTAT B<sup>®</sup>, per comparar el creixement discontinu en el medi MDF-3 i en un nou medi MDF que inclou tota la càrrega de fosfats i elements traça necessària per assolir els 128 g PS, MDF-4. Els resultats es mostren a la Figura VI.2. i a la Taula VI.5. A concentracions altes d'aquestes sals, la velocitat específica de creixement màxima es redueix a la meitat i el rendiment de glucosa a biomassa es redueix al voltant del 30%. Com a conseqüència, la concentració cel.lular assolida al final del procés és considerablement inferior tot i allargar el temps de cultiu unes 12h per al consum total de la glucosa al medi.



**Figura VI.2.** Creixement discontinu d'*E.coli* XLI Blue MRF' (*pTrcfuc*) en: (■)MDF-3 i (●) MDF-4, a alta i baixa concentració de fosfats i elements traça respectivament; (□) i (○) perfil de consum de glucosa en cada cas.

Medi de cultiu:	$Y_{x/s}$ (g PS/g glucosa)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
MDF- 4	0,23	0,11
<b>MDF-3</b>	<b>0,32</b>	<b>0,23</b>

**Taula VI.5.**



Finalment, per al cultiu en l'etapa discontinua del procés, es tria el medi MDF-3, amb l'addició de les sals de magnesi, amoni i elements traça segons el seu coeficient de consum relatiu a glucosa i la meitat dels fosfats necessaris per assolir la biomassa objectiu. La resta d'elements traça, s'inclouen en la composició del medi alimentat aplicant el mateix criteri en base als coeficients de consum relatiu a glucosa (veure Taula VI.3.). No es pot fer el mateix per a l'addició de la resta de fosfats ja que es podrien donar els mateixos problemes de precipitació que s'intentaven evitar amb la separació inicial de les sals de magnesi.

Es pensa en dues possibilitats alternatives per a la suplementació de fosfats durant el creixement semicontinu:

a) la primera, seguint el mateix criteri de consums relatius a glucosa, passaria per l'addició proporcional a la de glucosa durant tota l'etapa alimentada però mitjançant el bombeig paral·lel d'una solució concentrada únicament de fosfats. Wilms i col.laboradors solucionen així el problema i mantenen el creixement alimentat sense problemes de limitacions per fosfats durant més de 15 hores assolint concentracions cel·lulars al voltant de 150 g PS/l (Wilms i col., 2001). Aquesta solució però requereix d'un segon equip d'addició controlada i dificulta d'entrada la implementació de l'estratègia.

b) La segona aproximació, més senzilla i aplicable a escala de laboratori sense necessitat d'equipament addicional, consisteix en la addició puntual de la mateixa solució concentrada de fosfats en base al rendiment de fosfats a biomassa (Taula VI.3.). Si es considera que:

- concentracions al voltant de 10 g  $\text{PO}_4^{3-}$ /l no semblen afectar al creixement (segons s'extreu dels resultat obtinguts en els cultius preliminars discontinus realitzats per al medi MDF-3).

- Segons el valor de  $Y_{X/\text{PO}_4}$ - estimat per Yee i Blanch (Taula VI.3), aquesta concentració inicial en fosfats al medi discontinu ha de ser suficient per assolir una biomassa seca total al voltant de 64 g.

- Per a l'estimació experimental d'aquest rendiment  $Y_{X/PO_4^{3-}}$ , Yee i Blanch utilitzen un coeficient de correlació de mesura de densitat òptica a 600 nm a biomassa seca (g PS) 1,6 cops superiors a l'obtingut per a la soca XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en les condicions en que s'ha realitzat el present treball.

Es pot estimar que serà necessària una nova addició de fosfats cada cop que la biomassa seca total al cultiu s'incrementi entre 35 i 40 g si en cada addició es suplementa puntualment la quantitat necessària d'una solució tamponada concentrada en fosfats per assolir de nou la concentració inicial al medi de cultiu en l'etapa discontinua.

La composició final dels medis per l'etapa discontinua i l'alimentada dependrà de la concentració de glucosa de treball en cada cas. La composició i descripció de la seva preparació es descriuen a l'apartat de medis de cultiu del Capítol IV, Materials i Mètodes. Per establir un criteri d'addició de fosfats que mantingui el creixement semicontinu a altes concentracions cel.lulars s'han d'estudiar les diferents alternatives plantejades.

### **VI.2.3. Estudi i optimització del creixement d'*E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en estratègies semicontínues exponencials amb limitació per glucosa.**

Fins aquest punt, s'ha triat una estratègia semicontínua a velocitat de creixement  $0,1 \text{ h}^{-1}$  constant utilitzant glucosa com a nutrient limitant del creixement i s'han intentat solucionar els problemes relacionats amb la seva implementació: control d'addició i composició dels medis per evitar inhibicions de creixement.

En aquest apartat, es procedeix a estudiar la viabilitat del procés semicontinu proposat per a l'obtenció de CADC amb velocitat de creixement controlada. D'entrada no s'indueix l'expressió recombinant per tal d'evitar que el possible estrès metabòlic associat pugui interferir en l'estudi de creixement. Un cop caracteritzat el sistema a nivell de creixement cel.lular, es procedirà a l'estudi de les condicions òptimes d'inducció.

Tots els experiments es realitzen utilitzant el fermentador BRAUN BIOSTAT B<sup>®</sup> i en les mateixes condicions d'operació segons es descriu a l'apartat d'equips del Capítol IV, Materials i Mètodes. Es fixa la temperatura de treball a 37°C i la concentració d'oxigen dissolt al medi de cultiu al 50% de l'escala de saturació per al sensor de treball en condicions de no creixement. Per mantenir aquest nivell d'oxigen dissolt a mida que augmenta la demanda d'oxigen per mantenir el creixement cel·lular, es tria un mode de control d'agitació en cascada que permet ajustar la velocitat d'agitació segons sigui necessari per mantenir valor d'oxigen dissolt prefixat. Quan es fa necessari s'enriqueix l'aire amb fraccions creixents d'oxigen fins arribar a alimentar únicament oxigen pur. Al llarg d'aquest capítol, sinó es descriu explícitament una altra causa per l'aturada del creixement, aquesta es produirà quan, mantenint els nivells d'agitació màxims i treballant amb oxigen pur, la demanda d'oxigen per mantenir el creixement cel·lular sigui tan elevada que no permeti mantenir aquests nivells d'oxigen dissolt al medi i el creixement quedi limitat per la velocitat de transferència d'oxigen del medi al microorganisme.

*Experiments FB-1 i FB-2: comparació de criteris per al control de la concentració d'amoni al medi de fermentació.*

El control de la concentració d'amoni al vas de fermentació és un factor crític per al control de creixement a velocitat constant i per limitació de glucosa al medi. S'ha d'assegurar que en cap moment no serà la font de nitrogen qui limiti realment el creixement però això no es pot garantir, com amb la resta de nutrients, treballant amb un clar excés en relació a la font de carboni perquè a concentracions relativament baixes d'amoni al medi ( $3\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ja es descriuen efectes inhibitoris per al creixement. En aquest cas es fa necessari estimar de forma precisa el coeficient de consum relatiu d'amoni a glucosa ( $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$ ) per a la soca de treball i en les condicions de cultiu amb l'objectiu final de formular equilibradament el medi a alimentar i poder mantenir la concentració d'amoni al medi entre  $0,5$  i  $2,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  al llarg de tot el procés.

El control de la concentració d'amoni al medi de cultiu en base a la determinació d'aquest paràmetre  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$  es pot fer molt complicat si, per a una soca i condicions de treball

fixades, aquest paràmetre encara varia en funció d'altres aspectes com la velocitat específica de creixement, l'osmolaritat del medi o la formació de productes recombinants perquè són aspectes que aniran variant al llarg d'un procés discontinu.

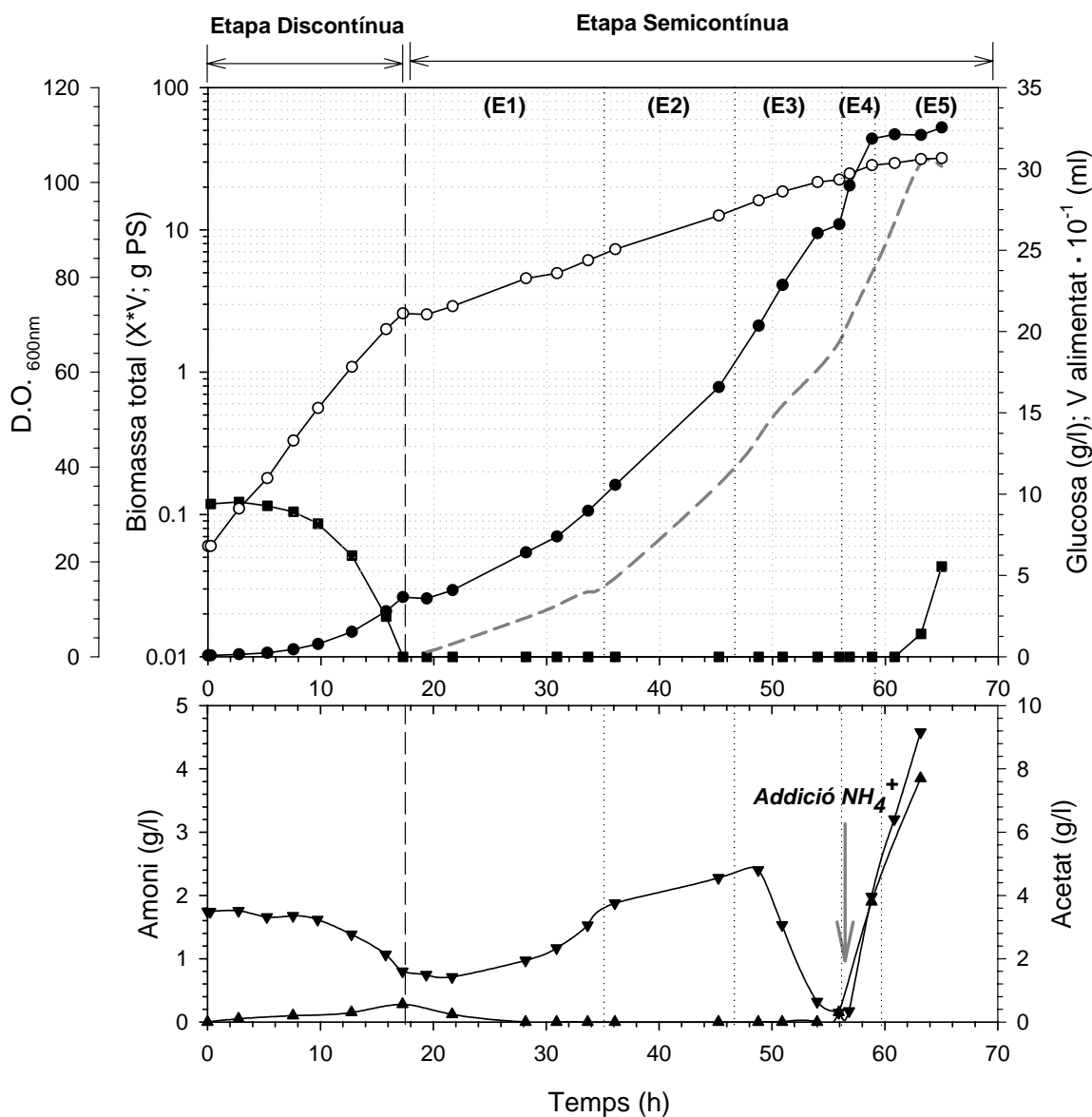
Alguns autors són capaços de mantenir la concentració d'amoni dins els límits recomenats durant tot el procés utilitzant hidròxid amònic concentrat com a solució bàsica per al control de pH i eliminant, o bé reduint de forma considerable, el contingut d'amoni a les solucions alimentades durant l'etapa semicontínua (Wilms i col., 2001; Yee i Blanch, 1993b).

Es programen dos experiments inicials per determinar la possibilitat d'assolir CADC a velocitat de creixement controlada amb el procés semicontinu proposat. Al primer, *Experiment FB-1*, s'intenta mantenir la concentració d'amoni al medi en base a l'estimació de  $Y_{NH_4^+/glucosa}$  per a la soca i condicions de treball. Al segon, *Experiment FB-2*, s'intenta controlar la concentració d'amoni dissolt al medi en base al control del pH mitjançant una solució d'hidròxid amònic concentrada. En ambdós casos es fixa un rendiment aparent aproximat de  $0,40 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per al control exponencial d'addició (veure Eq. VI.2.i Apèndix 1). Es tria aquest valor per  $Y_{ap \ x/glucosa}$  en base a la bibliografia: segons han estat els valors publicats per processos semicontinus similars al que es proposa i soques genotípicament semblants a la de treball (Yee i Blanch, 1993b).

A la Figura VI.3. es presenten els resultats obtinguts per l'*Experiment FB-1*. Es treballa amb el medi MDF-3 (veure VI.2.2.) a  $10 \text{ g glucosa} \cdot \text{l}^{-1}$  en l'etapa discontinua i s'utilitza una solució de hidròxid sòdic 30% (p/V) per al control de pH.

Amb l'objectiu de poder estudiar durant l'etapa semicontínua d'aquesta fermentació el valor de  $Y_{NH_4^+/glucosa}$  per a la soca i condicions de treball, es preparen dues solucions d'aliment: una concentrada de  $(NH_4)_2SO_4$  per al suplement d'amoni com a font de carboni i una segona que inclou glucosa i la resta de nutrients a alimentar atenent als seus rendiments de consum relatius a glucosa generals per a *E.coli*. L'objectiu de separar la font d'amoni és

poder fixar diferents relacions per al seu consum relatiu a glucosa al llarg del procés i controlar la seva concentració residual al cultiu.



**Figura VI.3.** Experiment FB-1. Creixement d'*E. coli* XL1 Blue MRF'(*pTrcfuc*) no induït en medi definit. Estratègia semicontínua a velocitat de creixement constant per limitació de glucosa com a font de carboni. (●) Densitat Òptica a 600 nm, (○) biomassa total (g PS), (■) glucosa (g/l), (▲) acètic (g/l) i (▼) amoni (g/l). (— — —) Perfil d'addició de medi aliment. (→) Addició puntual d'amoni per recuperar la concentració al medi a 2 g/l.

La fase alimentada s'inicia al voltant de les 17h de creixement discontinu, quan s'esgota la font de carboni al medi inicial. Les diferents etapes en que es divideix el procés semicontinu corresponen als canvis en la composició del medi alimentat per mantenir la concentració d'amoni entre 0,5 i 2 g/l al llarg del procés. A partir de les 56 hores de cultiu, coincidint amb el final de E3, es perd el control sobre el creixement, es comencen a acumular amoni i acètic fins a concentracions inhibidores que aturen el creixement. Després de 60 hores de cultiu, la concentració cel·lular màxima assolida és de 30 g PS · l<sup>-1</sup>. A la taula VI.6. es presenten els resultats obtinguts en les diferents etapes del procés.

Etapa de cultiu	Període de temps (h)	Relació amoni/glucosa a l'aliment (g NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g glucosa)	μ (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>ap x/glucosa</sub> (g PS/g gluc.)	Y <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/glucosa</sub> (g NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g gluc.)
<b>Discontínua:</b>	0 - 17h	---	0,230	0,338	0,096
<b>Semicontínua:</b>					
Global	17 - 56h	---	0,060	0,192	0,050
E1	17 - 36h	0,1	0,059	0,229	0,066
E2	36 - 46h	0,06	0,060	0,179	0,048
E3	46 - 56h	0 ( <i>no NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i> )	0,057	0,185	0,046
E4	56 - 60h	0,1 (*)	0,047	0,107	0,007
E5	60 - 65h	0,06	0,021	0,119	0,011

(\*)addició puntual al principi de l'etapa fins a recuperar 2 g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l cultiu

**Taula VI.6.** *Experiment FB-1.* Descripció d'etapes i resultats.

Per a E1, es prepara l'aliment en funció del coeficient de consum relatiu d'amoni a glucosa estimat per a l'etapa prèvia discontinua. Però l'amoni es comença a acumular al llarg d'aquesta etapa d'acord amb la posterior estimació de Y<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/glucosa, E1</sub>. En E2 es canvia la composició de l'aliment atenent al nou valor Y<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/glucosa, E1</sub>. La velocitat d'acumulació d'amoni al medi es redueix però no s'aconsegueix evitar i es superen els 2 g NH<sub>4</sub><sup>+</sup> · l<sup>-1</sup> al final de l'etapa. Per evitar assolir concentracions inhibidores, en E3 no s'alimenta amoni. Com a conseqüència, a les poques hores la concentració d'amoni residual, inferior a 0,5 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g · l<sup>-1</sup>, és insuficient per mantenir el creixement cel·lular. Tot i que s'intenta evitar una situació limitant en amoni amb una addició puntual suficient per restaurar una concentració

al voltant de  $2 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$  (E4) i augmentant la concentració d'amoni en l'aliment, a partir d'aquest moment es perd el control sobre el creixement cel.lular. Sembla que, com a conseqüència de la limitació de la font de nitrogen per al creixement hi ha un canvi de metabolisme cel.lular i, a partir d'aquest moment, part de la glucosa alimentada es comença a metabolitzar cap a la producció d'acètic, es redueixen els valors reals de  $Y_{x/\text{glucosa}}$  i  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$  i es comencen a acumular amoni i acètic al medi superant concentracions inhibitories per al creixement (3 i 5 g/l respectivament). Finalment, s'arriba a acumular la glucosa alimentada.

Entre E1 i E3, mentre no es presenten problemes de limitació de la font de nitrogen al medi, es segueix un perfil de creixement exponencial mantenint una velocitat de creixement constant de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , la concentració de glucosa residual al vas de fermentació és nul.la i no es detecten acumulacions d'acètic. D'aquesta primera anàlisi dels resultats s'extreu que l'estratègia d'alimentació resulta adequada per al control de creixement exponencial del cultiu, tot i que no es manté la velocitat de creixement prefixada al programa de control d'addició de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

El fet que es mantingui la velocitat de creixement constant però a un valor inferior al prefixat per al control,  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , i que s'estimin uns valors de rendiment aparent de glucosa a biomassa aproximadament constant per a tot el període E1-E3, entre  $0,18$  i  $0,23 \text{ g Ps} \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa, sense acumulacions de glucosa ni d'acètic al medi, implica que el factor de rendiment de glucosa a biomassa prefixat per al control d'addició,  $0,40 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa, és massa alt per a la soca i condicions de treball. S'alimenta glucosa de forma proporcional al creixement cel.lular però amb una exponencial d'addició massa lenta per mantenir la velocitat de creixement desitjada.

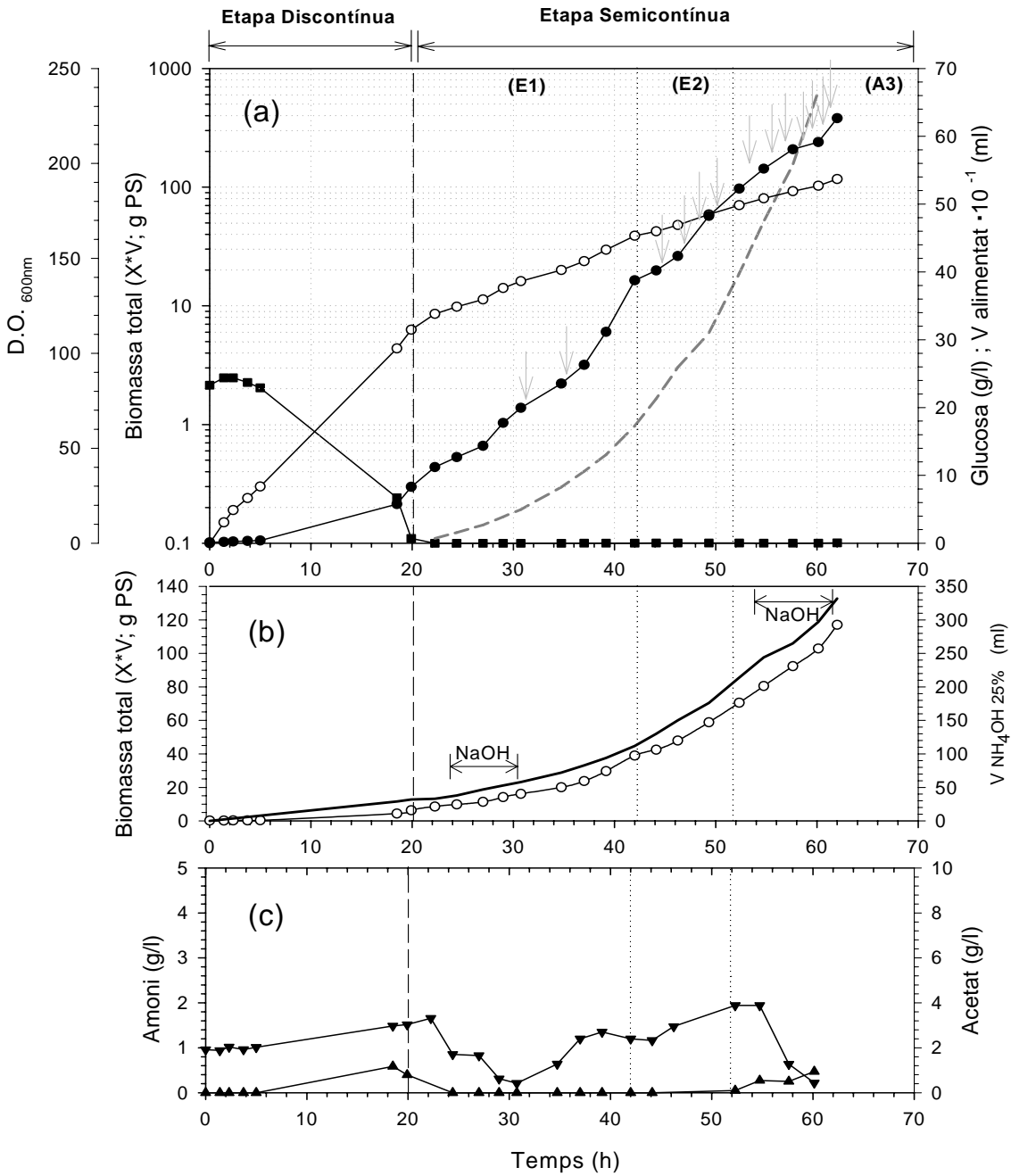
Si analitzem els valors de  $Y_{x/\text{glucosa}}$  i  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$  estimats per a les diferents etapes del procés en que es manté el creixement no limitat per amoni (Taula VI.5.: etapa discontinua, E1, E2 i E3), s'observa que, al variar la velocitat de creixement de  $0,23$ , a  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , varien els valors d'ambdós paràmetres: de  $0,34$  a  $0,19 \text{ g Ps} \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa i de  $0,1$  a  $0,05 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa respectivament. Si es confirmés la dependència d'ambdós paràmetres amb la

velocitat de creixement, per poder implementar aquesta estratègia semicontínua es faria necessari determinar  $Y_{x/\text{glucosa}}$  a la velocitat de creixement concreta que es vol mantenir i, per poder determinar la composició de l'aliment, conèixer el corresponent valor de  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$ .

Per tractar d'evitar la necessitat de determinar  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$  per a les diferents fases del procés i augmentar la robustesa de l'estratègia es planifica l'*Experiment FB-2*. Amb aquest experiment es prova la implementació de les estratègies descrites per Wilms i col.laboradors per al manteniment d'amoni i fòsfats al medi (Figura VI.4).

Per tal d'introduir el menor número de variables possibles en relació al procés descrit per aquests autors, únicament es varia la soca de treball i el sistema per al control d'addició del medi alimentat (s'utilitza el prèviament implementat a l'equip de treball: sense control retroalimentat i en base al perfil teòric de creixement, *veure* VI.2.1). Es manté la composició del medi de cultiu emprat per Wilms i col.laboradors tot i incloure concentracions elevades d'agents quelants (EDTA i àcid cítric) que afectarien la recuperació de Fuc-1-PA en la seva forma activa (*veure* Conclusions del Capítol V). La composició d'aquest medi, que s'ha anomenat MDI, s'ha inclòs a l'apartat de medis de cultiu del Capítol IV, Materials i Mètodes. S'utilitza una solució d'hidròxid amònic al 25% (p/V) per al control de pH durant tot el procés. Per l'etapa discontinua es fixa una concentració de glucosa inicial de  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Durant l'etapa semicontínua s'alimenta una solució concentrada en glucosa que no inclou amoni en la seva composició i paral.lelament, una de fòsfats d'amoni que s'alimenta en funció del rendiment  $Y_{\text{fosfats}/\text{glucosa}}$  estimat pels autors. A diferència de l'article de referència, en aquest cas es discretitza el criteri d'addició per aquesta solució de fòsfats per tal de treballar amb una alimentació discontinua evitant la necessitat d'un segon equip d'addició. L'amoni alimentat en la solució de fòsfats, que suposaria un consum relatiu a glucosa de  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}} = 0,0087$ , s'estima insuficient per mantenir el creixement cel.lular (*veure* Taula VI.3 i Taula VI.5) i, per tant, el manteniment de la concentració d'amoni al vas de fermentació per mantenir el creixement cel.lular dependrà de la suplementació addicional d'amoni per al control de pH.





**Figura VI.4.** Experiment FB-2. Creixement d'*E. coli* XLI Blue MRF' (*pTrcfuc*) no induït en medi MDI. Estratègia semicontínua a velocitat de creixement constant per limitació de glucosa com a font de carboni. Control del pH del medi per addició de NH<sub>4</sub>OH concentrat (●) Densitat Òptica a 600 nm, (○) biomassa total (g PS), (■) glucosa (g/l), (▲) acètic (g/l) i (▼) amoni (g/l). (— — —) Perfil d'addició de medi aliment. (—) Perfil d'addició d'hidròxid amònic 25% (p/V) per al control de pH. (↓) Addicions puntual de fosfats. (↔) Indicació de substitucions puntuals de NH<sub>4</sub>OH 25% (p/V) per NaOH 30% (p/V) per al control de pH.

S'aconsegueix mantenir un perfil de creixement exponencial durant tot el procés, aproximadament unes 40 hores d'operació semicontínua, amb una concentració de glucosa residual al medi nul·la i sense detectar acumulacions d'acètic. A les 50h, treballant a la velocitat màxima d'agitació del sistema i suplementant oxigen pur en l'aireació, per mantenir l'oxigen dissolt al medi de cultiu es fa necessari sobrepressionar el sistema i és només a partir d'aquest moment, treballant en condicions de limitació en oxigen, que es comença a acumular acètic.

A la Taula VI.7 es mostra l'estimació de paràmetres per a les diferents etapes del procés. Tal com succeïa a l'experiment *FB-1*, no és possible mantenir la velocitat de creixement fixada de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i es confirma que el valor bibliogràfic per  $Y_{ap \text{ x/glucosa}}$  de  $0,4 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa utilitzat per al control d'alimentació és massa alta per a la soca de treball.

	Etapa de cultiu	Període de temps	$\mu$	$Y_{ap \text{ x/glucosa}}$	$Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$
		(h)	( $\text{h}^{-1}$ )	(g PS/g gluc.)	(g $\text{NH}_4^+$ /g gluc.)
<b>Experiment FB-2</b>					
	<b>Discontínua:</b>	0 - 20h	0,202	0,302	0,145
	<b>Semicontínua:</b>				
	Global	20 – 60h	0,068	0,244	0,097
	E1	20 – 42h	0,078	0,318	0,107
	E2	42 – 52h	0,059	0,236	0,098
	E3	52 – 60h	0,048	0,203	0,089

**Taula VI.7.** Experiment *FB-2*. Descripció d'etapes i resultats.

Tal com es mostra a la Figura VI.4.c, dels resultats obtinguts s'extreu que amb el control de pH per addició de  $\text{NH}_4\text{OH}$  és possible mantenir la concentració d'amoni per al procés dins els marges  $0,5\text{-}2,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  tant en l'etapa discontínua com en l'etapa alimentada. Els dos descensos importants de la seva concentració, aprox. de les 24 a les 30 hores i de les 54 hores al final del creixement (*veure* Figura VI.4.b), corresponen a falles operacionals (descebats de la bomba d'addició i substitucions puntuals de la solució d'hidroxid amoni

per hidròxid sòdic per mantenir el control de pH del medi) però, en el primer cas, la concentració d'amoni dissolt es reajusta dins els marges tant punt es soluciona el problema i es manté estable fins el final del procés.

Tal com es mostra a la Figura VI.4.b, aquest control de la concentració d'amoni al llarg del procés és possible gràcies a que l'addició de  $\text{NH}_4\text{OH}$  segueix un perfil exponencial proporcional al d'acumulació de biomassa total (g PS). Aquest fenomen es podria explicar de forma senzilla considerant que a mida que la glucosa alimentada és metabolitzada per generar biomassa, el consum proporcional d'amoni dissolt al medi segons  $Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$  provoca l'acidificació del medi i activa l'addició de la solució bàsica per al control de pH. D'aquesta forma l'amoni es suplementa segons es requerit per mantenir el ritme de creixement independentment de la velocitat de creixement del cultiu.

El procés s'atura havent assolit una concentració cel.lular final al voltant dels  $60 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$  i degut a limitacions en la transferència d'oxigen al reactor per mantenir el creixement cel.lular. Queda demostrat que els criteris per a l'addició d'amoni i de fosfats proposats pels autors són també aplicables al creixement de la soca recombinant XL1 Blue MRF' (pTrcfuc), objecte del present estudi.

Experiments FB-3 i FB-4: estimació del paràmetre  $Y_{\text{x}/\text{glucosa}}$  per a la soca recombinant XL1 Blue MRF' (pTrcfuc)

Dels experiments realitzats fins el moment, s'extreu que:

- el rendiment  $Y_{\text{x}/\text{glucosa}}$ , necessari per al correcte control d'alimentació segons el programa d'addició implementat (veure Apèndix I i VI.2.1), varia amb la velocitat de creixement de la soca en estudi per al mateix sistema de treball. Per fixar la velocitat de creixement en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  es fa necessari l'estimació d'aquest paràmetre per a aquesta velocitat específica de creixement.

- Els valors obtinguts fins el moment en l'estimació d'aquest paràmetre a velocitats de creixement entre 0,25 i 0,05 h<sup>-1</sup> oscil·len entre 0,34 i 0,15 g PS · g<sup>-1</sup> glucosa.
- Segons els resultats obtinguts pel cultiu de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en el medi MDI emprat per Wilms i col.laboradors (*Experiment FB-2*), sembla factible el control de l'amoni dissolt al medi de cultiu utilitzant una solució d'hidròxid amònic 25% (p/V) per al control de pH.

Es planteja una segona sèrie d'experiments, *experiments FB-3 i FB-4*, amb l'objectiu d'estimar amb prou precisió un valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  que ens permeti mantenir la velocitat específica de creixement a l'etapa semicontínua a 0,1 h<sup>-1</sup>. Al mateix temps es pretén confirmar l'eficiència de l'estratègia de control de pH per hidròxid amònic per al manteniment dels nivells d'amoni òptims utilitzant el medi de cultiu desenvolupat en el present treball per la producció de Fuc-1-PA mitjançant CADC de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).

Per implementar aquesta estratègia de control d'amoni dissolt en base al control de pH amb hidròxid amònic, per aquests experiments es manté la composició del medi MD-3 a 25g glucosa/l (*veure* VI.2.2) per a l'etapa discontinua de creixement però es redueix substancialment la concentració d'amoni al medi alimentat. Donat que ja no es pretén alimentar l'amoni de forma proporcional a la glucosa en aquesta etapa, es fixa un consum relatiu aparent d'amoni a glucosa de 0,005 g NH<sub>4</sub><sup>+</sup> · g<sup>-1</sup> glucosa (Wilms i col., 2001) únicament per garantir una mínima concentració de la font de nitrogen al medi en cas de problemes puntuals en el sistema de control de pH i evitar els canvis de metabolisme observats en l'*Experiment FB-1* quan es limitava el creixement per la manca puntual d'amoni. Al medi formulat segons aquesta descripció, per ambdues etapes de creixement, s'anomena medi MD-FB i la seva composició detallada es troba descrita a l'apartat de medis de cultiu del Capítol IV, Materials i Mètodes. Per ambdues fermentacions s'utilitza una solució d'hidròxid amònic 25 % (p/V) per al control de pH.

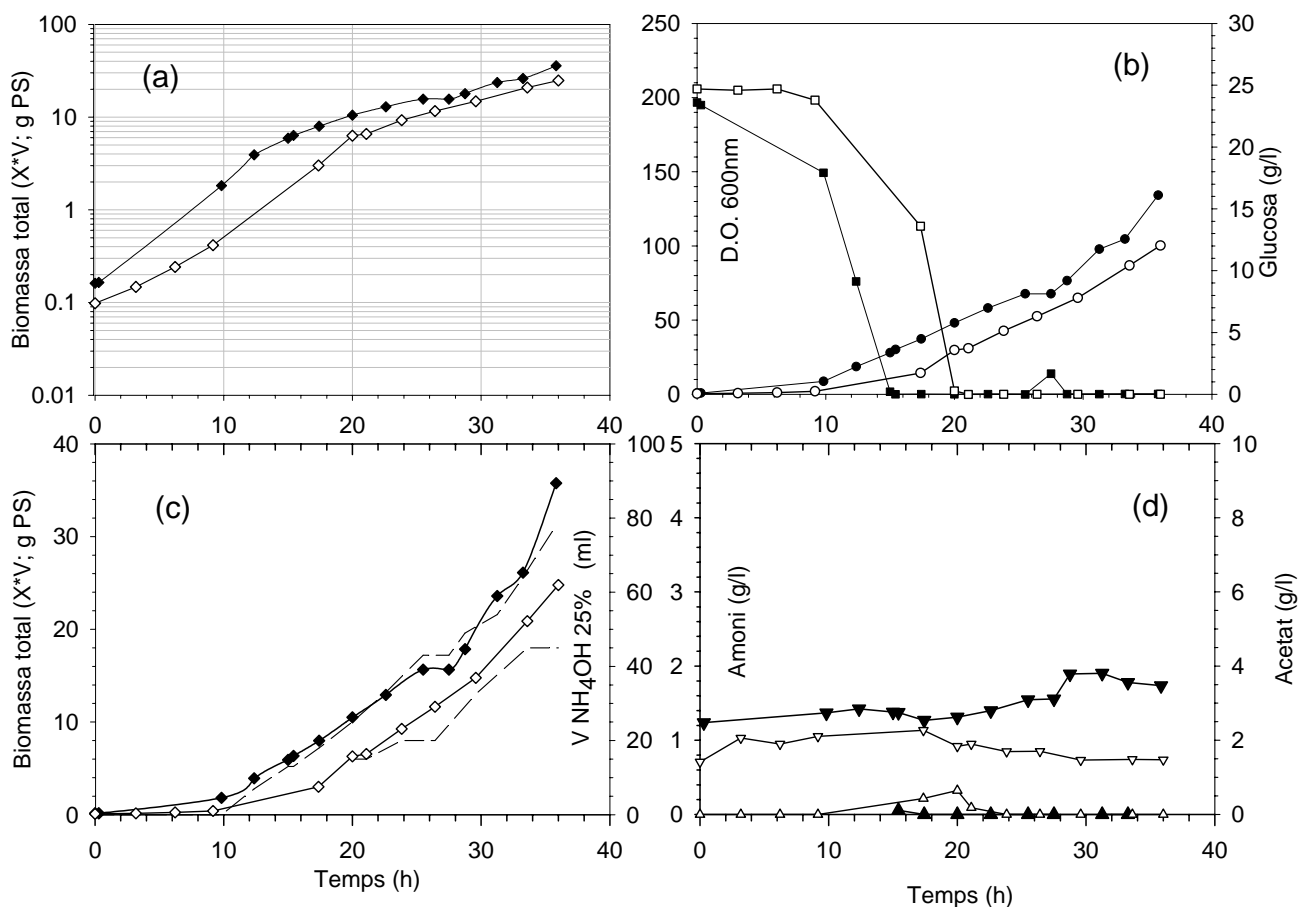
S'ha proposat a la literatura una variació lineal amb pendent positiu de  $Y_{x/glucosa}$ , amb la velocitat de creixement (Yee i Blanch, 1993a). En aquesta sèrie d'experiments es fixa com

a valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per al control d'addició en l'etapa semicontínua el valor estimat per al mateix paràmetre en l'etapa prèvia discontinua. Segons la suposició anterior, aquest valor ha de suposar un límit superior al valor real a estimar a velocitat de creixement inferior  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

A la Figura VI.5 i Taula VI.8 es presenten els resultats obtinguts en els *Experiments FB-3 i FB-4*. Un altre cop es confirma l'eficiència d'aquesta estratègia semicontínua per limitació en glucosa per mantenir el creixement exponencial de XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) mantenint les concentracions residuals de glucosa i acètic nul·les durant tot el procés. Ambdues fermentacions es van aturar voluntàriament al voltant de les 33 hores d'operació sense haver arribat a una situació en que l'oxigen limités el creixement.

Per l'*Experiment FB-3*, es fixa el valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  obtingut a l'etapa discontinua del mateix experiment,  $0,32 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , per al control d'addició per l'etapa semicontínua. Es manté una velocitat de creixement de  $0,09 \text{ h}^{-1}$  i s'estima un valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  de  $0,28 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . Per l'*Experiment FB-4*, amb un valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per l'etapa discontinua molt similar a l'experiment precedent, es fixa un valor de  $0,30 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per l'etapa alimentada, valor mitjà entre els obtinguts experimentalment per l'etapa semicontínua de l'experiment anterior i l'etapa discontinua d'aquest mateix experiment. En aquest cas, s'aconsegueix mantenir una velocitat de creixement constant de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  durant tota l'etapa semicontínua del procés i el rendiment experimental estimat coincideix amb el prefixat pel control d'alimentació,  $0,30 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , confirmant l'optimització d'aquest paràmetre  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per al procés semicontinu de treball.

Per altra banda, cal destacar l'èxit en la implementació de l'estratègia de control d'amoni dissolt en funció del control de pH. A la Figura VI. 5.c. es pot observar la proporcionalitat de perfils de generació de biomassa i d'addició d'amoni al medi durant tot el procés i, a la Figura VI.5.d., com això es tradueix en el manteniment de la concentració d'amoni en els marges òptims pel creixement (entre  $0,5$  i  $2 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ ) durant tot el procés.



**Figura VI.5.** *Experiment FB-3* (Símbols buits) i *Experiment FB-4* (Símbols plens). Creixement d'*E. coli* XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) no induït en medi MD-FB. Estratègia semicontínua a velocitat de creixement constant per limitació de glucosa com a font de carboni. Control del pH del medi per addició de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrat (●), (○) Densitat Òptica a 600 nm, (◆), (◇) biomassa total (g PS), (■), (□) glucosa (g/l), (▲), (Δ) acètic (g/l) i (▼), (▽) amoni (g/l). (— — —) Perfil d'addició de hidròxid amònic concentrat per al control de pH al medi.

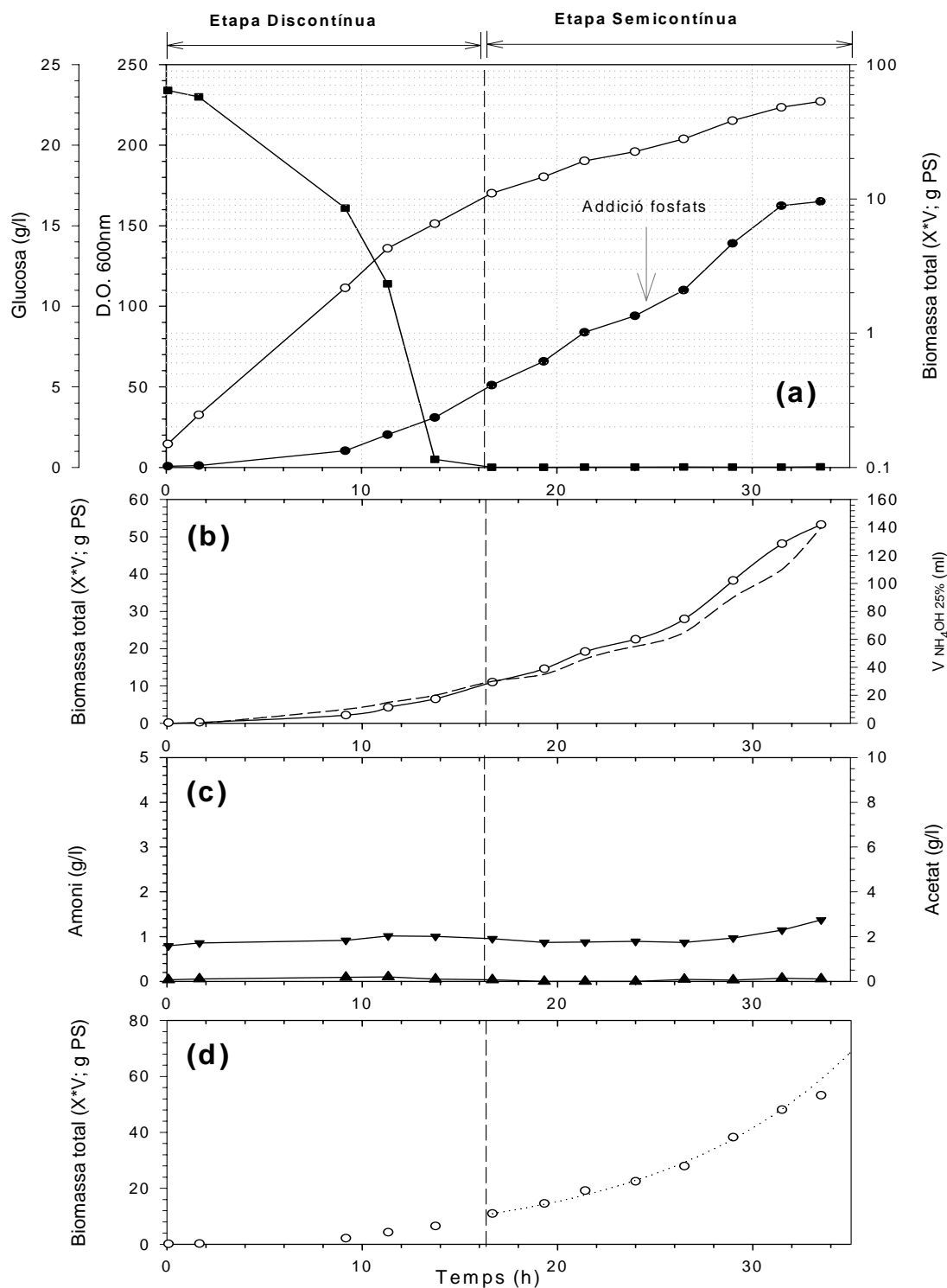
	Ètapa de cultiu	Període de temps (h)	$\mu$	$Y_{\text{apx/glucosa}}$	$Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$
			( $\text{h}^{-1}$ )	(g PS/g gluc.)	(g $\text{NH}_4^+$ /g gluc.)
<b>Experiment FB-3</b>					
	<b>Discontínua:</b>	0 - 20h	0,226	0,317	0,104
	<b>Semicontínua:</b>	20 - 36h	0,087	0,281	0,075
<b>Experiment FB-4</b>					
	<b>Discontínua:</b>	0 - 15h	0,260	0,312	0,084
	<b>Semicontínua:</b>	15h - 35h	<b>0,100</b>	<b>0,301</b>	0,103

Taula VI.8. *Experiment FB-3* i *FB-4*. Descripció d'etapes i resultats.

*Experiments FB-5: criteri per a l'alimentació de fosfats*

A l'apartat VI.2. es proposava una alternativa per al manteniment de la concentració de fosfats al medi en base al seu rendiment a biomassa. Considerant la concentració de fosfats fixada en l'etapa discontinua, s'estima necessari alimentar fosfats quan s'assoleixi un total de biomassa seca entre 35 i 40 g PS. Si amb cada addició puntual es suplementa la quantitat necessària d'una solució concentrada en fosfats per assolir de nou la concentració inicial de fosfats a l'inici de l'etapa discontinua, es pot aplicar el mateix criteri per a cada nou increment de biomassa total al voltant dels 35 g PS.

A la Figura VI.6.i Taula VI.9 es mostren els resultats obtinguts en l'*Experiment FB-5* aplicant aquesta estratègia per al control de fosfats al medi de cultiu. Es treballa amb el medi MD-FB mantenint la concentració de glucosa a l'inici de l'etapa discontinua en  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , s'utilitza  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% (p/V) per al control de pH i es fixa un valor de  $Y_{\text{ap x:glucosa}} = 0,30 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per al control d'alimentació segons s'estimava a l'apartat anterior per mantenir el creixement a velocitat constant  $0,1 \text{ h}^{-1}$  durant tota l'etapa alimentada. Es planifica una primera addició de fosfats quan s'estimi la biomassa total al voltant dels 30 g PS al medi, aquesta addició ha de ser suficient per mantenir el creixement fins a un mínim de 60 g de biomassa total.



**Figura VI.6.** Experiment FB-5. Creixement d'*E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) no induït en medi MD-FB. Estratègia semicontínua a velocitat de creixement constant per limitació de glucosa. Control del pH del medi per addició de NH<sub>4</sub>OH concentrat (●) Densitat Òptica a 600 nm, (○) biomassa total (g PS), (■) glucosa (g/l), (▲), acètic (g/l) i (▼) amoni (g/l). Perfil d'addició de: (—) hidròxid amònic concentrat per al control de pH al medi. (↓) Addició puntual de fosfats per recuperar la concentració inicial al cultiu. (· · · · ·) Perfil teòric de creixement.



	Etapa de cultiu	Període de temps	$\mu$	$Y_{x/\text{glucosa}}$	$Y_{\text{NH}_4^+/\text{glucosa}}$
		(h)	(h <sup>-1</sup> )	(g PS/g gluc.)	(g NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /g gluc.)
<i>Experiment FB-5</i>					
	<b>Discontínua:</b>	0 - 15h	0,284	0,350	0,262
	<b>Semicontínua:</b>	15 - 34h	<b>0,104</b>	<b>0,314</b>	0,174

Taula VI.9. *Experiment FB-5*. Descripció d'etapes i resultats.

Amb aquest criteri per a l'addició de fosfats és possible mantenir el creixement cel·lular sense limitacions durant tot el procés. No és necessari una segona addició ja que al voltant dels 55g PS totals (45g PS/l) s'atura el creixement degut a limitacions en la transferència d'oxigen. Quan es compara aquesta estratègia amb l'assajada a l'*Experiment FB-2* en base a  $Y_{\text{fosfats}/\text{glucosa}}$ , tot i que en ambdós casos s'aconsegueix alimentar adequadament els fosfats, es troba que aquest últim sistema és, efectivament, molt més senzill i fàcilment implementable.

La concentració d'amoni dissolt es manté constant, al voltant de  $1 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ , al llarg de tota l'etapa semicontínua sense problemes. Només comença a acumular-se lleugerament superades les 30h de fermentació quan ja són evidents les limitacions de transferència d'oxigen al sistema. No es detecta glucosa residual, ni acumulacions d'acètic en tot el període alimentat i, amb el valor fixat per al rendiment  $Y_{\text{ap } x/\text{glucosa}} = 0,30 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  és possible mantenir constant la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  fins al final del procés.

A Figura VI.7.d. es pot comprovar el grau d'adequació entre els resultats obtinguts experimentalment en aquesta *fermentació FB-5* i els previsibles segons el model de creixement en que es basa el perfil d'alimentació quan es fixen els mateixos valors per a les variables de control. El model s'ajusta perfectament al comportament real del sistema i es poden considerar certes totes les suposicions inicials per a la simplificació del model general de creixement bacterià (veure Apèndix 3).

Finalment, utilitzant tots els valors estimats de  $Y_{ap\ x/glucosa}$  per períodes d'operació semicontínua en que la velocitat específica de creixement s'ha mantingut constant a  $0,1 \pm 0,01\ h^{-1}$  s'estima un valor de  $0,30 \pm 0,02\ g\ PS \cdot g^{-1}\ glucosa$  per aquest paràmetre de control a les condicions d'operació fixades.

Amb aquests resultats es considera optimitzat el procés semicontinu a velocitat de creixement constant per limitació de glucosa proposat per al cultiu de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc). Com s'extreu dels resultats obtinguts en FB-5 és possible mantenir el creixement en les condicions fixades durant tot el procés i aquest es limita, no per problemes associats a l'estratègia, sinó per limitacions en la transferència d'oxigen. Caldria millorar la velocitat de transferència d'oxigen a l'equip de treball per determinar les concentracions cel.lulars màximes que es podrien assolir amb aquesta estratègia.

A continuació es resumeixen els criteris d'operació que, finalment, es decideix fixar i que s'aplicaran per a l'estudi de les condicions òptimes d'inducció:

- Medi de cultiu MD-FB per l'etapa discontinua i alimentada del procés (veure apartat de medis de cultiu al Capítol IV, Materials i Mètodes)
- Control d'alimentació en base a l'Equació VI.2. i utilitzant el rendiment aparent optimitzat per a la soca i condicions de treball:  $Y_{ap\ x:glucosa, \mu=0,1\ h^{-1}} = 0,30 \pm 0,02$ .
- Control de pH amb hidròxid amònic 25% (p/V)
- Alimentació de fosfats a l'etapa semicontínua segons  $Y_{x/fosfats} = 5\ g\ PS \cdot g\ PO_4^{3-}$

Per poder avaluar la millora en productivitat cel.lular que aquest procés semicontinu proposat suposa front a l'operació discontinua utilitzada en treballs anteriors dels grup per al creixement de XL1 Blue MRF'(pTrcfuc), a la Taula VI.10 es comparen les concentracions cel.lulars assolides al final de creixement amb aquest sistema, amb el procés discontinu en medi complex LB (Durany, 2000) i amb el procés discontinu en medi definit MD-FB. La concentració cel.lular s'incrementa més de 30 cops en relació al procés discontinu en medi complex LB i al voltant de 6 en comparació a un sistema discontinu en

el medi MD-FB per l'etapa discontinua. En termes de productivitat cel·lular global, calculada dividint la concentració cel·lular final obtinguda per la durada de la fermentació en cada cas, amb el sistema semicontinu es milloraria al voltant de 10 i 2,5 cops en relació als processos discontinus en medi complex i definit respectivament. Aquests valors augmenten quan es tenen en compte els temps morts d'operació, si es considera que és en la preparació i neteja dels fermentadors entre processos discontinus on s'encareix més el cost global de procés.

Medi	Estratègia de fermentació	Concentració cel·lular assolida (g PS / l)	Durada del procés (h)	Productivitat global (g PS·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
LB	Discontínua	1,3	10	0,13
MD-FB	Discontínua	7,9	16	0,49
MD-FB	Semicontínua	43,9	32	1,37

**Taula VI.10**

#### **VI.2.4. Estudi i optimització de les condicions d'inducció per maximitzar la producció de Fuc-1-PA.**

Un cop caracteritzat el procés semicontinu per al creixement de XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*), es procedeix a l'estudi de les condicions i moment òptim per induir l'expressió de forma que es maximitzi la producció del procés.

Els aspectes fonamentals que influeixen la inducció en sistemes d'expressió recombinant derivats del promotor *lac* ja es discuteixen al Capítol I d'aquest treball. Entre els paràmetres més rellevants a considerar es contemplaven: la concentració d'inductor, la temperatura d'inducció, la velocitat de creixement i el moment de la inducció.

En el procés semicontinu de treball, la velocitat de creixement es manté constant i s'ha triat considerablement baixa per tal d'afavorir el creixement i l'expressió recombinant. L'efecte de la temperatura de creixement sobre la inducció sovint es justifica per l'increment en la velocitat de creixement associat a l'augment de temperatura que afavoreix el plegament incorrecte de les proteïnes recombinants induïdes cap a formes no actives (Donovan, 1996). Donat que amb l'estratègia d'alimentació utilitzada és possible controlar la velocitat de creixement en funció de la glucosa alimentada i, en principi, de forma independent de la temperatura, no es considera necessari reduir la temperatura de treball per a l'estudi d'inducció. La temperatura de treball, a diferència del capítol I en que es pretenia evitar la formació de cossos d'inclusió, es manté a 37°C durant tot el creixement.

Segons els resultats obtinguts al Capítol I per a la comparació de medis de cultiu per a la producció de Fuc-1-PA, la concentració d'inductor òptima en medi MD estaria al voltant dels 45 µmols d'IPTG/g PS al final del creixement. Aquest estudi es va realitzar en cultius en matràs Erlenmeyer però s'expressaven els resultats per unitat de biomassa seca amb la intenció de poder escalar el criteri d'inducció al treballar en CADC. S'induirà segons aquest criteri, fent, en el moment de la inducció, una previsió de la màxima biomassa assolible al sistema al final de creixement.

Per tant, en aquest cas, l'estudi es centrarà a definir el moment òptim en que cal dur a terme la inducció. Bàsicament, aquest moment dependrà de l'efecte sobre el creixement associat a l'expressió recombinant i de la velocitat d'acumulació de proteïna activa a partir d'aquest moment.

L'expressió recombinant suposa una càrrega metabòlica addicional per al microorganisme hoste. En alguns casos l'acumulació de proteïna recombinant suposa un estrès metabòlic tal que, en poques hores, s'atura el creixement del cultiu (Yee i Blanch, 1993b; Kramer i col., 1996). En altres casos, la proteïna es va acumulant sense alterar aparentment el metabolisme cel.lular però acaba frenant el creixement cel.lular quan assoleix certa concentració específica màxima (Lee i col., 1997; Kramer i col., 1996). Com a conseqüència del consum addicional d'energia i nutrients cap a l'expressió recombinant

també es poden veure modificats paràmetres característics del sistema en els que sovint es basen els sistemes de control del creixement del cultiu:  $Y_{x/\text{glucosa}}$ , OUR (t), CER (t),  $Y_{\text{NH}_4/\text{glucosa}}$ , etc (Riesenberg i Guthke, 1999). En el cas concret en estudi, la modificació significativa del valor estimat de  $Y_{x/\text{glucosa}}$ , com a conseqüència de la inducció, suposaria estimar de forma errònia els volums d'addició per mantenir el creixement exponencial durant l'etapa semicontínua amb la conseqüent pèrdua de control sobre el creixement.

Per altra banda, també s'ha de considerar la velocitat d'acumulació del producte recombinant d'interès (Kramer i col., 1996). Quan l'acumulació és ràpida, sovint l'efecte sobre el creixement cel.lular és dràstic però poques hores de creixement induït poden conduir a productivitats volumètriques molt altes. En canvi, per a acumulacions lentes la millor solució sol passar per induir al començament del creixement. Altres aspectes, com l'efecte de l'activitat proteolítica sobre l'acumulació recombinant poden ser determinants per decidir el moment de la inducció (Enfors, 1992).

Per poder avaluar les característiques de l'expressió recombinant de Fuc-1-PA en el sistema de treball es plantegen dos experiments mantenint les condicions d'operació per l'estratègia semicontínua per limitació en glucosa fixades a l'apartat anterior VI.2.3. i induïnt l'expressió recombinant en diferents moments del creixement. A l'*Experiment FB-6* s'indueix al principi de la fase semicontínua de creixement, un cop s'ha comprovat que la velocitat de creixement abans de la inducció es manté a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . A l'*Experiment FB-7* s'indueix al final del creixement: al voltant de les quatre hores prèvies al moment en que es preveu que el creixement quedi limitat per la transferència d'oxigen des del medi de cultiu en base als resultats obtinguts per la fermentació control no induïda *FB-5* (veure Figura VI.6). En ambdós casos es suplementa la mateixa quantitat d'IPTG per induir l'expressió recombinant (2,4 mmols) aplicant la relació  $45 \mu\text{mols d'IPTG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$  al final del creixement i considerant la biomassa final en el cas de no inducció (53,3 g PS), que es considera la màxima assolible al sistema (veure Figura VI.6, control no induït *FB-5*).

Per analitzar l'expressió recombinant, per una banda es mesura l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA de mostres de la fracció intracel.lular al llarg del procés i, paral.lelament, es segueix

l'acumulació de Fuc-1-PA al citoplasma cel.lular per anàlisi espectrofotomètric SDS-PAGE de mostres ajustades a la mateixa concentració cel.lular.

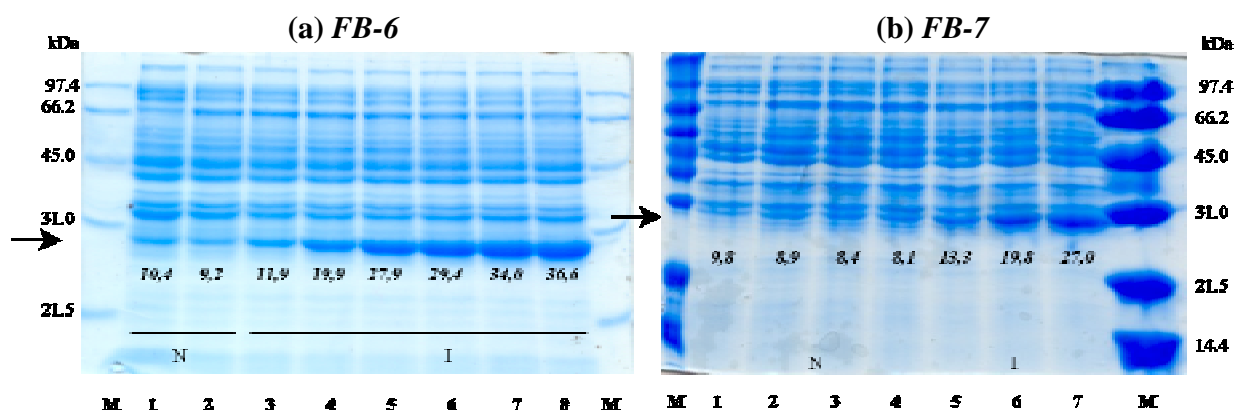
La Figura VI.7. resumeix els resultats obtinguts per ambdues fermentacions, *FB-6* i *FB-7*, en relació a creixement i concentració de nutrients i de productes de metabolisme al llarg del procés. S'inclou el perfil de mesures de D.O. 600<sub>nm</sub> de l'experiment *FB-5* com a control de creixement no induït amb l'objectiu de poder avaluar l'efecte de la sobreexpressió sobre el creixement cel.lular. Per completar aquesta figura, a la Taula VI.11. es mostren les principals dades de procés per aquestes fermentacions i les estimacions per a l'evolució dels paràmetres de control de creixement corresponents. S'inclouen les dades de la fermentació control no induïda *FB-5* per facilitar la comparació.

A la Figura VI.8. es mostren els resultats obtinguts per al seguiment d'acumulació de Fuc-1-PA com a fracció del total de proteïna intracel.lular segons l'anàlisi per SDS-PAGE. D'un primer anàlisi d'aquests gels electroforètics s'extreu que, en ambdós casos, el cultiu respon a la inducció en un marge curt de temps: entre 1 i 2 hores després de la inducció ja s'aprecia la sobreexpressió de Fuc-1-PA tan induït al principi com al final de l'etapa semicontínua. La concentració específica de Fuc-1-PA assolida a final del procés és alta en ambdós casos superant el 25% del total de proteïna intracel.lular però notablement superior quan s'indueix al principi de la fase alimentada, un 36% front un 27%. Més endavant s'avaluaran de nou aquests resultats comparant-los amb els seguiment d'activitat Fuc-1-PA igualment a la fracció intracel.lular al llarg del procés i en relació a creixement.

*Aquí Figura VI.7 apaisada*

**Taula VI.11** *taula apaisada dades creixement FB-6 i FB-7*





**Figura VI.8.** *Experiments FB-6 i FB-7:* acumulació de Fuc-1-PA intracel.lular al llarg del procés. Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres a diferents temps de creixement i corregides per biomassa. N: no induït, I: induït. M: marcador de pesos moleculars. (a) 1- 15h40min, 2- 19h45min, 3- 21h55min, 4- 24h, 5- 27h20min, 6- 30h10min, 7- 35h 20min, 8- 37h50min(b). 1- 20h45min, 2- 27h, 3-33h35min, 4- 40h, 5- 43h15min, 6- 46h, 7- 51h 25min. *En cursiva:* quantificació densitomètrica de fracció de Fuc-1-PA relativa a proteïna total intracel.lular.

Abans de la inducció, el perfil de creixement per ambdues fermentacions, *FB-6* i *FB-7*, correspon a l'esperat per al control de creixement en base a l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa implementada: es manté la velocitat de creixement prefixada en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  sense acumulacions d'acètic ni glucosa al medi de cultiu i la concentració d'amoni es manté gaire bé constant al voltant de  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Només en el cas de *FB-7* un problema operacional porta a l'acumulació anòmala d'una concentració important, no inhibidora, d'amoni al final de l'etapa discontinua que es corregeix després durant les primeres hores de l'etapa alimentada no induïda.

Quan s'indueix al principi de la fase semicontínua, *FB-6*, durant les 5 primeres hores de creixement induït sembla que el perfil de creixement no s'afecta de la inducció mantenint-se el valor de  $Y_{ap \text{ x/glucosa}}$  fixat per al control d'alimentació i, en conseqüència, la velocitat de creixement prefixada ( $Y_{ap \text{ x/glucosa}}=0,304$ ;  $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ ). A partir d'aquest moment tots dos paràmetres comencen a disminuir i es modifica el perfil de creixement respecte al de l'experiment control no induït (*veure* Figura VI.7.a.1. i Taula VI). Donat que en ambdós casos es mantenen les mateixes condicions d'operació induït o no l'expressió

recombinant, es dedueix que l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant comença a afectar al creixement a partir d'aquest moment. Cap a les 30h de cultiu, quan la reducció en els valors prefixats per a ambdós paràmetres ja arriba al voltant del 50% inicial, el consum de la glucosa alimentada en excés es tradueix en l'acumulació d'acètic i amoni al medi de cultiu i poc després ja no és possible evitar l'acumulació de glucosa, quan ja s'han assolit concentracions inhibidores d'acètic i amoni al vas de fermentació. A les 35 hores, després de 14 hores de creixement induït, es considera aturat el creixement havent-se assolit només el 68% de la biomassa total en condicions de no inducció (36 g PS front 53 g PS).

Quan s'indueix al final del creixement, *FB-7*, en el moment de la inducció ja és necessària la suplementació d'oxigen pur per mantenir l'oxigen dissolt al 50% de saturació al medi de cultiu i poc després es decideix sobrepressionar el vas de cultiu per intentar allargar el màxim possible la fermentació induïda. Per aquest motiu en aquest cas s'assoleixen concentracions cel.lulars superiors que en el cultiu control però, a partir d'aquest moment, ja no és la concentració de glucosa sinó la disponibilitat d'oxigen qui controla la velocitat de creixement. Progressivament, des del principi de la fase induïda, es redueix la velocitat de creixement del cultiu (*veure* Figura VI.7.b.1 i Taula VI.11.). Per evitar la ràpida acumulació d'acètic i amoni en aquestes condicions de creixement, es decideix aturar l'alimentació cada cop que s'acumulen concentracions de glucosa al medi superiors als  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  i esperar a que es consumeixi l'acumulada. D'aquesta manera és possible mantenir el creixement fins les 50h, al voltant de 9 hores de creixement induït, i s'explica que en aquest cas la biomassa total assolida superi en un 25% la màxima corresponent al control no induït en que no es va mantenir la sobrepressió del sistema (66 g PS front 53 g PS).

*Pàgina apaisada per Figura VI.9!!!*

La Figura VI.9. mostra l'anàlisi dels resultats de producció de Fuc-1-PA per aquestes fermentacions *FB-6* i *FB-7* en relació al creixement. A les Figures VI.9.a.1 i VI.9.b.1 es mostra els perfils de biomassa total (g PS) i unitats d'activitat Fuc-1-PA totals (UA Fuc-1-PA) al vas de fermentació al llarg del procés i les corresponents estimacions de velocitat de producció de biomassa (g PS / h) i Fuc-1-PA activa (UA / h). A les Figures VI.9.a.2 i VI.9.b.2 es mostren els resultats en relació a la producció específica de Fuc-1-PA: activitat específica (UA · g<sup>-1</sup> PS) i fracció de proteïna intracel.lular corresponent a Fuc-1-PA (% proteïna total) (*veure* Figura VI.8). Finalment, les Figures VI.9.a.3 i VI.9.b.3 corresponen a la variació en la concentració de Fuc-1-PA activa al brou de cultiu (UA · l<sup>-1</sup>) al llarg del procés i al càlcul de productivitat volumètrica acumulada des de l'inici de la fermentació (UA · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>), considerant també el temps invertit en l'etapa discontinua.

La biomassa total (g PS), la quantitat total de Fuc-1-PA activa produïda i la concentració específica de Fuc-1-PA activa segueixen perfils de tipus sigmoïdal en el temps (Figures VI.9.a/b.1. i 2.). Les estimacions per a l'evolució de les velocitats de producció cel.lular (g PS · h<sup>-1</sup>), de Fuc-1-PA activa total (UA · h<sup>-1</sup>) i de Fuc-1-PA activa específica (UA · g<sup>-1</sup> PS · h<sup>-1</sup>) s'obtenen a partir de la derivació analítica de les equació sigmoïdals ajustades als corresponents perfils de producció total i concentració específica.

Per poder seguir la discussió d'aquests resultats, a la Taula VI.12. es resumeixen els principals resultats obtinguts en relació a la producció de Fuc-1-PA per *FB-6* i *FB-7* en termes de productivitats globals i concentracions de Fuc-1-PA assolides al final dels processos. També s'inclouen les velocitats de producció de Fuc-1-PA màximes, totals (UA · h<sup>-1</sup>) i específiques (UA · g<sup>-1</sup> PS · h<sup>-1</sup>), com a valors de referència per poder comparar la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa en cada cas.

	velocitats producció màx.		Concentracions finals			Productivitats globals	
	Específica	Total	Específica	Volumètrica		Específica	Volumètrica
	UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup>	UA·h <sup>-1</sup>	(UA·g <sup>-1</sup> PS)	% proteïna total	(UA·l <sup>-1</sup> )	(UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup> )	(UA·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
FB-6	108,4	3005	1025	36,6	29916	29	846,8
FB-7	98,4	6441	794,9	27	40173	15,9	803,5

**Taula VI.12.** Experiments *FB-6* i *FB-7*. Producció de Fuc-1-PA.

Per ambdues fermentacions, a partir del moment d'inducció, la quantitat total de Fuc-1-PA activa produïda al vas de fermentació (UA Fuc-1-PA total) augmenta proporcionalment a l'augment de biomassa total (g PS ) aturant-se amb l'aturada del creixement del cultiu (*veure* Figures VI.9.a.1 i VI.9.b.1). En base a aquesta observació, es pot afirmar que la producció de Fuc-1-PA activa al sistema de treball està associada al creixement (Bailey, 1986; Kramer i col., 1996).

Quan s'indueix a l'inici de la fase alimentada i en condicions òptimes de creixement, *FB-6*, l'acumulació de Fuc-1-PA activa al medi de cultiu és proporcional al creixement fins que, per efecte de l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant, es comença a frenar el creixement al voltant de les 6 hores de creixement induït. A partir d'aquest moment, ja no és possible controlar la velocitat de creixement mitjançant el control d'addició (*veure* Taula VI.11 i Figura VI.9.a.1.). Aquesta frenada del creixement es tradueix en una decaiguda progressiva en la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa (*veure* Figures VI.9.a.1). No es considera aturat el creixement fins a les 35 hores però al voltant de les 32 hores, 11 hores després de la inducció, sembla que ja s'ha assolit la màxima concentració possible de Fuc-1-PA per unitat cel.lular. Aquesta hipòtesi es planteja en base a la tendència a saturació de les corbes de concentració específica de Fuc-1-PA activa (UA · g<sup>-1</sup> PS) en el temps i d'acumulació de Fuc-1-PA intracel.lular (% de proteïna total corresponent a Fuc-1-PA) (*veure* Figures VI.12.a.3 i Figura VI.8).

Com ja es comentava a la introducció d'aquest capítol, l'optimització d'aquest procés per la producció de Fuc-1-PA ha de passar per assolir la màxima concentració final de Fuc-1-PA

activa al brou de fermentació i la màxima productivitat volumètrica possible simultàniament. A la Figura VI.9.a.3. es presenta una aproximació al perfil de productivitats volumètriques acumulades que s'obtidria aturant aquest procés *FB-6* a diferents moments del creixement induït i considerant el temps total de procés, també l'etapa discontinua de creixement. Aquesta estimació s'obté a partir de l'equació sigmoïdal ajustada al perfil experimental de concentració volumètrica de Fuc-1-PA activa en el temps ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1}$ ) que es mostra a la mateixa Figura VI.9.a.3. La productivitat volumètrica del procés seria màxima parant la fermentació al voltant de les 32 hores de cultiu, després de 11 hores de creixement induït, amb un valor de  $865 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A les 32 hores però la concentració de Fuc-1-PA és de  $27693 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  mentre que la màxima,  $29916 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$ , s'assoleix al final del procés. Aquest resultat ve a indicar que a partir d'aquest moment la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa, de forma proporcional la velocitat de creixement, és tant lenta que l'increment de producció no compensa la inversió de temps corresponent.

Quan s'indueix al final del creixement coincidint amb la limitació del creixement per transferència d'oxigen, *FB-7*, la velocitat de creixement decau poc després de la inducció (*veure* Taula VI.11 i Figura VI.9.b.1). S'indueix quan ja s'atura el creixement i això es tradueix en un desfasament important en el temps entre les velocitats de producció màximes de biomassa i de Fuc-1-PA activa assolides. Aquesta observació indica que s'ha induït massa tard per maximitzar aquesta última d'acord amb la idea que la producció de Fuc-1-PA activa és simultània i proporcional al creixement. Tot i així, quan es comparen els resultats amb *FB-6*, com la biomassa total en el moment de la inducció per *FB-7* és molt superior (al voltant de 40g PS front 11 g PS, *veure* Figura VI.9.a/b.1.), les velocitats de producció de biomassa i, proporcionalment, de Fuc-1-PA activa a l'inici de l'etapa induïda també són considerablement superiors amb un valor màxim al voltant de  $6440 \text{ UA} \cdot \text{h}^{-1}$  front a  $3005 \text{ UA} \cdot \text{h}^{-1}$  en *FB-6* (*veure* Taula VI.12.). Per aquest motiu, encara que no s'arriba a assolir la màxima concentració específica assolida en *FB-6* ( $1025 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1}$  PS i  $795 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1}$  PS per *FB-6* i *FB-7* respectivament; *veure* Taula VI.12.) perquè l'aturada del creixement s'accelera per la limitació en la transferència d'oxigen, la concentració de Fuc-1-PA final assolida en aquest cas és superior a la assolida en *FB-6* ( $40173 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  front a  $29916 \text{ UA} \cdot$

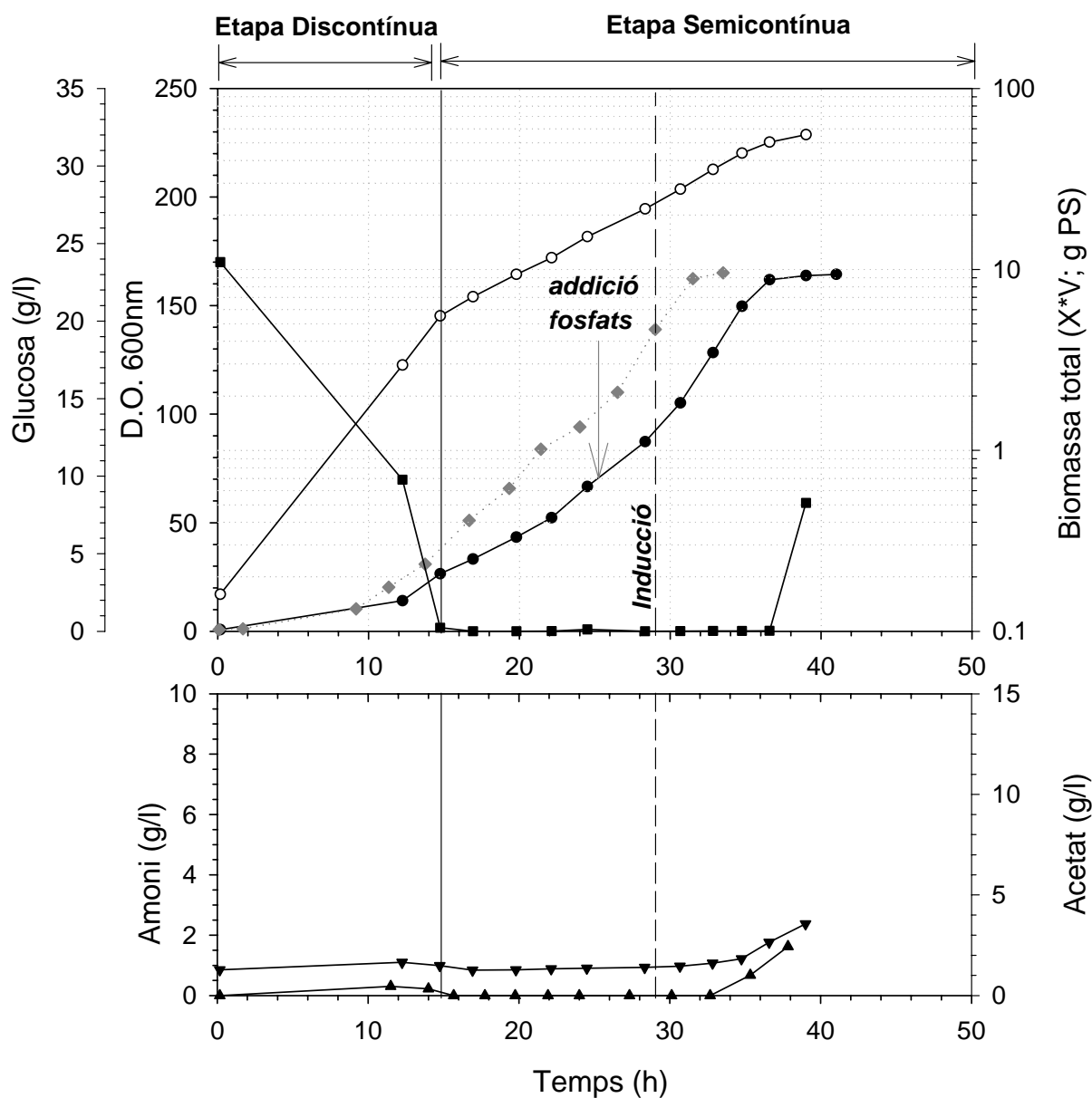
$l^{-1}$ , *veure* Taula VI.12) i la productivitat volumètrica global del procés és molt similar per ambdues fermentacions ( $845 \text{ UA} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$  i  $804 \text{ UA} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$  per *FB-6* i *FB-7* respectivament; *veure* Taula VI.12.).

Dels resultats obtinguts en *FB-6* i *FB-7* s'extreu que per maximitzar la productivitat volumètrica del procés en estudi és necessari induir al voltant de les 11 hores abans de preveure la limitació del creixement per transferència d'oxigen en condicions de no inducció. D'aquesta forma es pretén donar temps a assolir la màxima concentració cel.lular específica (al voltant de  $1025 \text{ UA} \cdot g^{-1}$  PS segons *FB-6*) abans que l'efecte de l'expressió recombinant sobre el metabolisme cel.lular freni el creixement però assegurant, simultàniament, la inducció de la quantitat màxima de biomassa per maximitzar la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa ( $\text{UA} \cdot h^{-1}$ ) durant el període induït.

Fixant el criteri de moment d'inducció argumentat al punt anterior per optimitzar la producció de Fuc-1-PA al procés es realitza l'*Experiment FB-8*. Es mantenen les condicions d'operació per a l'estratègia semicontínua per limitació en glucosa fixades a l'apartat anterior VI.2.3. i, prenent com a model de perfil de creixement no induït l'*Experiment FB-5* (*veure* Figura VI.6), es decideix induir l'expressió recombinant quan la concentració cel.lular al cultiu es trobi al voltant dels  $25 \text{ g PS} \cdot l^{-1}$ . S'utilitza la mateixa quantitat d'IPTG que en *FB-6* i *FB-7* ( $2,22 \text{ mmols}$ ), segons la relació  $42 \mu\text{mols d'IPTG} \cdot g^{-1}$  PS al final del creixement i considerant la biomassa final en el cas de no inducció ( $53,3 \text{ g PS}$ ), que es considera la màxima assolible al sistema. (*veure* Figura VI.6, control no induït *FB-5*).

Es realitza el mateix seguiment analític descrit prèviament per *FB-6* i *FB-7*. La Figura VI.10 resumeix l'evolució d'aquesta fermentació en relació a creixement i acumulació de substrats i subproductes de metabolisme en el temps. La Figura VI.11 mostra els resultats obtinguts per al seguiment d'acumulació de Fuc-1-PA com a fracció del total de proteïna intracel.lular per SDS-PAGE. La Taula VI.13. mostra les principals dades de procés per

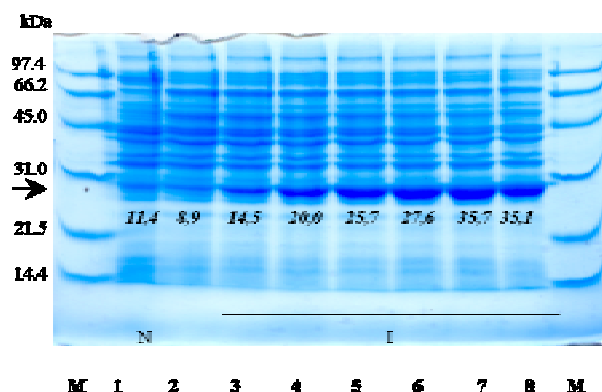
aquesta fermentació comparant-les amb les obtingudes per *FB-6* i *FB-7* i les estimacions per a l'evolució dels paràmetres de control de creixement corresponents.



**Figura VI.10.** Experiment *FB-8*. Cultiu induït d'*E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) segons el criteri definit per maximitzar la productivitat volumètrica del procés. (●) Densitat Òptica a 600 nm, (○) biomassa total (g PS), (■) glucosa (g/l), (▲), acètic (g/l) i (▼) amoni (g/l). (↓) Addició puntual de fosfats per recuperar la concentració inicial al cultiu. (◆) Perfil de creixement control no induït (D.Ò.600 nm; Experiment *FB-5*).

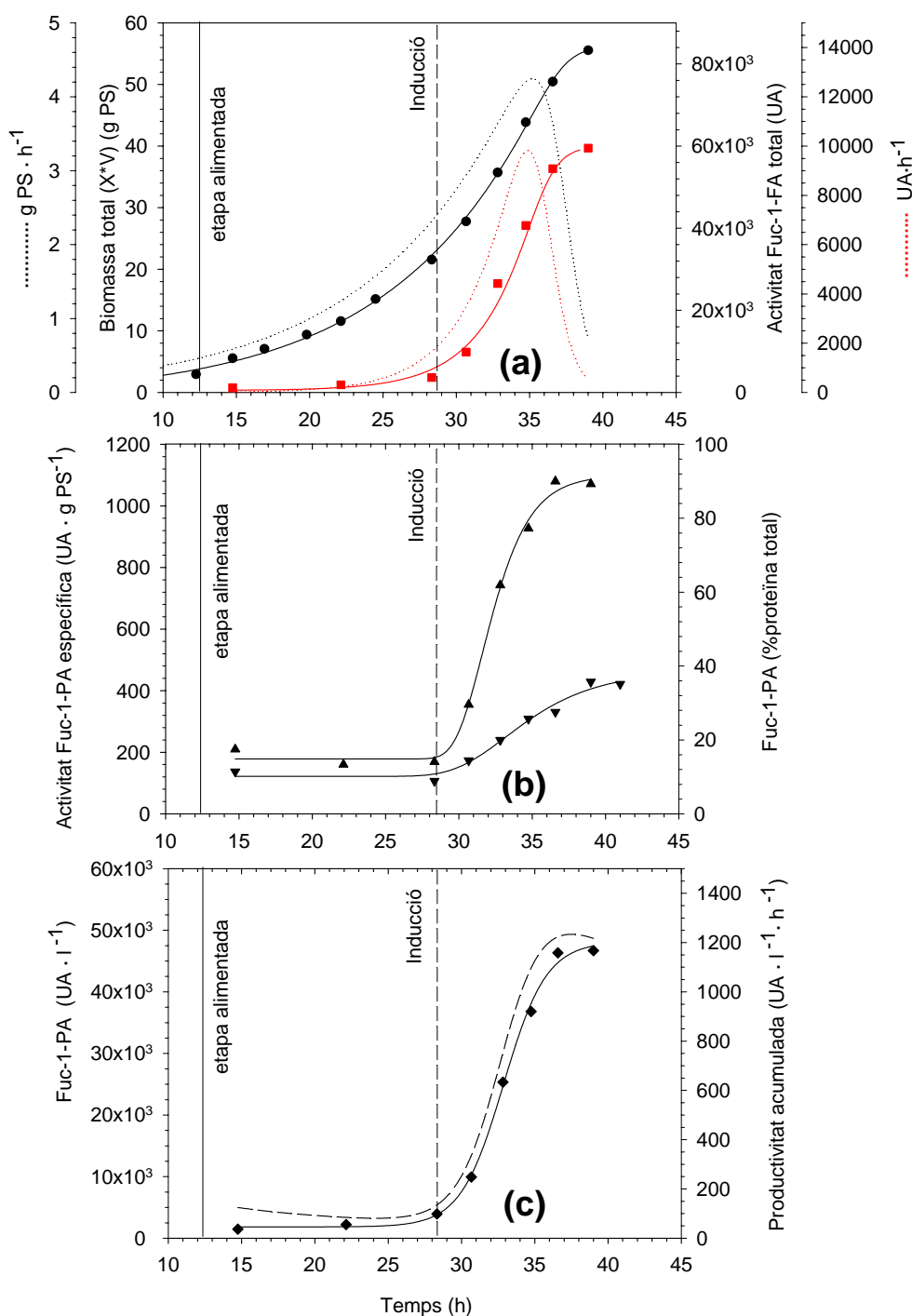


***Tabla VI.13***



**Figura VI.11.** *Experiment FB-8.* Cultiu induït d'*E. coli* XL1 Blue MRF'(*pTrcfuc*) segons el criteri definit per maximitzar la productivitat volumètrica del procés. Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres a final de creixement i corregides per biomassa. N: no induït, I: induït. M: marcador de pesos moleculars. 1- 14h75min, 2- 28h20min, 3- 30h40min, 4- 32h50min, 5- 34h45min, 6-36h 35min, 7-39h, 8-41h. En cursiva: quantificació densitomètrica de fracció relativa a proteïna total intracel.lular.

Durant les 15 hores de creixement alimentat prèvies a la inducció, l'estratègia semicontínua per limitació per glucosa permet controlar perfectament la velocitat de creixement prefixada i l'acumulació de productes de metabolisme. Un altre cop la concentració d'amoni es manté constant el voltant de  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  durant tot aquest període, i no es detecten acumulacions de glucosa alimentada ni d'àcid acètic. S'indueix l'expressió recombinant pràcticament a les 28,5 hores de fermentació amb una concentració cel.lular al medi de  $24 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ . Coincidint amb els resultats obtinguts per a *FB-6*, al voltant de les 6,5 hores de creixement induït l'efecte de la sobreexpressió recombinant sobre el creixement ja no permet controlar la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . A partir d'aquest moment es va frenant el creixement al temps que s'acumulen progressivament àcid acètic i amoni al medi de cultiu però sense arribar a concentracions inhibidores. El creixement s'atura a les 39 hores com a conseqüència de la limitació en la transferència d'oxigen per al creixement i havent assolit una concentració cel.lular final de  $43 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ , coincidint amb el control no induït *FB-5*. Per tant, és possible mantenir el creixement induït al voltant de 10,5 h d'acord amb el criteri prefixat per la inducció i s'assoleix un dels objectius en base als quals s'ha fixat aquest criteri: s'assoleix la màxima biomassa possible per al sistema de treball.



**Figura VI.12.** Experiment FB-8. Acumulació de Fuc-1-PA aplicant el criteri de temps d'inducció definit per maximitzar la productivitat volumètrica del procés. (a) (●) i (■) Biomassa total (g PS) i activitat Fuc-1-PA total (UA) al vas de fermentació respectivament; (.....) i (.....) estimació dels perfils de velocitats de producció de biomassa i Fuc-1-PA activa. (b) (▲) Concentració específica de Fuc-1-PA (UA g<sup>-1</sup> PS) i (▼) % Fuc-1-PA de proteïna total intracel·lular. (c) (◆) Concentració volumètrica de Fuc-1-PA (UA l<sup>-1</sup>) i (----) estimació al perfil de productivitat volumètrica acumulada

A la Figura VI.12. s'analitzen els resultats de producció de Fuc-1-PA per *FB-8* en relació al creixement. Es presenten les dades de la mateixa manera que prèviament per *FB-6* i *FB-7*. A la Taula VI.14. es resumeixen els resultats en relació a la producció de Fuc-1-PA i es comparen amb els obtinguts per *FB-6* i *FB-7*.

	velocitats producció màx.		Concentracions finals			Productivitats globals	
	Específica	Total	Específica	Volumètrica	Específica	Volumètrica	
	UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup>	UA·h <sup>-1</sup>	(UA·g <sup>-1</sup> PS) % proteïna total	(UA·l <sup>-1</sup> )	(UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup> )	(UA·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	
<i>FB-6</i>	108,4	3005	1025	36,6	29916	29	846,8
<i>FB-7</i>	98,4	6441	794,9	27	40173	15,9	803,5
<b><i>FB-8</i></b>	<b>185,9</b>	<b>9814</b>	<b>1086</b>	<b>35</b>	<b>47447</b>	<b>27,8</b>	<b>1216,6</b>

**Taula VI.14.** Experiments *FB-6* i *FB-7*. Producció de Fuc-1-PA.

A la Figura VI.12.(a). es mostra la variació de biomassa total (g PS) i activitat aldolàsica total (UA) en el temps. A partir del moment de la inducció, l'activitat aldolàsica al medi de cultiu augmenta seguint el perfil de producció de biomassa i es frena quan també s'atura el creixement cel.lular. Aquest resultat ve a confirmar la hipòtesi plantejada a partir del resultats obtinguts a *FB-6* i *FB-7* segons la qual, per al procés estudiat, la producció de Fuc-1-PA activa segueix una cinètica simple associada a creixement (Bailey, 1986; Kramer i col., 1996).

Tant en *FB-6*, induït a l'inici de l'etapa semicontínua, com en *FB-8*, induït 11 hores abans de preveure l'aturada del creixement per limitació d'oxigen en condicions de no inducció, s'observa el mateix desviament del curs normal del creixement respecte al control no induït *FB-5* entre les 6 i les 6,5 hores després de la inducció i ja no es possible mantenir la velocitat de creixement prefixada per al control d'alimentació. Donat que en cap dels dos casos es coneix cap altre aspecte que pogués explicar aquesta limitació del creixement en relació al control, es confirma que la inducció de l'expressió recombinant de Fuc-1-PA afecta al metabolisme cel.lular de XLI Blue MRF' (*pTrcfuc*) frenant progressivament el creixement cel.lular a partir de les 6 hores de creixement induït.

Les dades de producció específica es mostren a la Figura VI.12.b. Segons es plantejava en base als resultats de *FB-6*, per assolir la màxima concentració d'activitat Fuc-1-PA per unitat cel.lular per a aquest sistema de treball:  $1025 \pm 62 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ , es fa necessari un període al voltant de 11 hores de creixement induït. Els resultats obtinguts en *FB-8* confirmen aquesta hipòtesi: a les 10 hores de creixement induït ja s'ha arribat a saturació per la concentració específica de Fuc-1-PA al sistema amb un valor màxim de  $1086 \pm 66 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1}$  (Figura VI.12.b.). Els resultats d'acumulació específica de Fuc-1-PA en termes de fracció de proteïna total intracel.lular corresponent a Fuc-1-PA (determinats per electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE) confirmen aquest període de creixement induït per assolir la màxima acumulació específica al sistema (Figura VI.12.b. i Figura VI.11).

El fet d'esperar a assolir altes densitats cel.lulars abans de procedir a la inducció permet incrementar considerablement la velocitat de producció de Fuc-1-PA ( $\text{UA} \cdot \text{h}^{-1}$ ), amb un màxim de  $9814 \text{ UA} \cdot \text{h}^{-1}$ , més de tres cops l'assolida en *FB-6*,  $3005 \text{ UA} \cdot \text{h}^{-1}$ , per al mateix temps de creixement induït i igual concentració específica final (veure Taula VI.14. i Figura VI.12.a.). Com a conseqüència, la concentració volumètrica final és també la màxima assolida,  $47447 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$ , i la productivitat global al final del procés,  $1216 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , ve a coincidir amb el valor màxim de productivitat acumulada (veure Figura VI.12.c. i Taula VI.14): en aquest cas sí s'assoleixen productivitat i concentració màximes al final del procés.

Es confirma l'eficiència del criteri per al moment d'inducció aplicat en aquesta fermentació *FB-8* per maximitzar l'expressió de Fuc-1-PA activa: s'aconsegueix mantenir el creixement induït entre 10 i 11 hores per maximitzar la producció específica i, al mateix temps, s'assoleix una concentració cel.lular màxima similar a la del procés optimitzat en condicions de no inducció.

	Inducció (h)	Densitat cel·lular:		Volum procés:		IPTG per unitat de biomassa		Conc. IPTG		Conc. específica final (UA·g <sup>-1</sup> PS)
		Inducció (g PS · l <sup>-1</sup> )	Final (g PS · l <sup>-1</sup> )	Inducció (l)	Final (l)	Inducció (umols·g <sup>-1</sup> PS)	Final (umols·g <sup>-1</sup> PS)	Inducció (mM)	Final (mM)	
FB-6	21	14	31,3	0,836	1,148	189	<b>61,7</b>	2,7	<b>1,9</b>	<b>1067</b>
FB-7	41,25	37,6	45,8	1,063	1,226	55,3	<b>39,5</b>	2,1	<b>1,8</b>	601
FB-8	28,67	23,24	43,6	0,92	1,266	103,6	<b>40,1</b>	2,4	<b>1,8</b>	<b>1071</b>
<i>Experiments en matràs Erlenmeyer:</i>										
	inici	0,213	2,4	0,2	0,2	469,5	<b>42,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>695</b>
	inici	0,213	2,4	0,2	0,2	2347,4	207,0	0,5	0,5	706

**Taula VI.15.** Concentració d'inductor en els diferents experiments. Resum dels resultats obtinguts en els experiments per l'optimització de la productivitat del procés.

A la Taula VI.15 es recullen les condicions d'inducció experimentals. En tots els casos es treballa segons el criteri d'inducció fixat en base a l'estudi de inducció en matràs Erlenmeyer realitzat al Capítol I d'aquest treball: 45 μmols IPTG·g<sup>-1</sup> PS a final de creixement. Per poder avaluar si aquest criteri per a la concentració d'inductor és correcte, a la mateixa taula es recorden els resultats obtinguts en matràs Erlenmeyer al Capítol I induint a l'inici de la fase exponencial de creixement. Aplicant el mateix criteri per a la concentració d'inductor, en cultius en matràs s'assolien al voltant de 700 UA·g<sup>-1</sup> PS a final de creixement. Treballant amb l'estratègia optimitzada per obtenir CADC, es supera aquesta producció específica fins a un màxim de 1086 UA · g<sup>-1</sup> PS quan s'optimitza el moment d'inducció per garantir mantenir el creixement induït al voltant de les 10 hores. Amb aquest període de creixement induït en aquestes condicions d'inducció (temps i quantitat d'IPTG) s'assoleix la màxima acumulació de Fuc-1-PA al citoplasma cel·lular de XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*): s'arriba a nivells de saturació per l'acumulació de Fuc-1-PA per unitat cel·lular (*veure* resultats dels experiments *FB-6* i *FB-8* Figura VI.9.a.2. i Figura VI.12.b.) sense que quedi limitat el creixement cel·lular per cap altre motiu que el propi efecte de la sobreexpressió de Fuc-1-PA sobre el metabolisme cel·lular. Es pot concloure que aquest criteri per determinar la quantitat d'inductor òptima en base a la quantitat de biomassa que s'espera assolir al final del procés permet assolir la màxima concentració específica de Fuc-1-PA independentment del moment d'inducció i la concentració cel·lular en el moment d'inducció. Si la mateixa condició de inducció determinada al Capítol I es

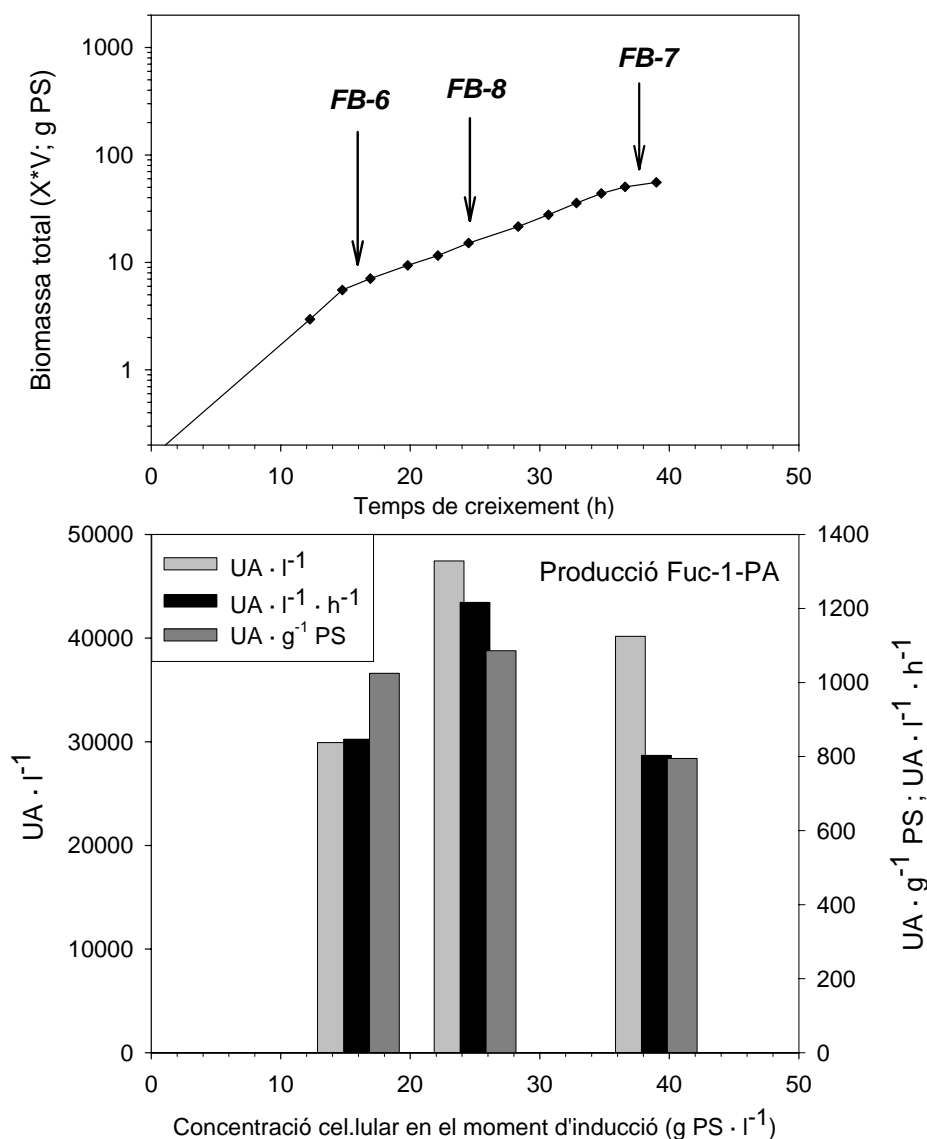
fixés en termes de concentració molar correspondria a treballar amb una concentració final de inductor al medi 20 cops inferior a la utilitzada per la inducció dels CADC segons l'estratègia semicontínua optimitzada. Aquesta diferència podria afectar substancialment la producció de Fuc-1-PA com ja succeïa al reduir la concentració en un factor de 10 en cultius en matràs Erlenmeyer.

Si l'aturada del creixement a partir de les 6 hores de creixement induït va associada a la mort i lisi del microorganisme hoste, podria ser que a partir d'aquest moment fos considerable la concentració de Fuc-1-PA al medi extracel·lular. Per avaluar si aquesta pèrdua és significativa s'analitza el contingut en Fuc-1-PA del brou de fermentació net de cèl·lules a temps final de fermentació mitjançant electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE. Els resultats de la fracció extracel·lular de Fuc-1-PA respecte al total sobreexpressat es recullen a la Taula VI.16. En tots els casos, aquesta fracció extracel·lular es pot considerar negligible respecte a la fracció intracel·lular.

Fermentació	% Fuc-1-PA extracel·lular
<i>FB-6</i>	0,5
<i>FB-7</i>	5,4
<b><i>FB-8</i></b>	<b>3,8</b>

**Taula VI.16** Fracció de Fuc-1-PA total extracel·lular.

Per tancar aquest capítol, a la Figura VI.13. es comparen gràficament els resultats obtinguts en aquestes tres fermentacions, *FB-6*, *FB-7* i *FB-8*, en relació a la sobreexpressió de Fuc-1-PA en termes de concentracions finals d'activitat Fuc-1-PA, específica i volumètrica, i productivitats globals.



**Figura VI.13.** Relació entre la concentració cel.lular assolida en el moment d'inducció i la producció de Fuc-1-PA a final de creixement en termes de concentració d'activitat i productivitats.

Quan s'indueix al principi de la fase exponencial de creixement, amb una concentració cel.lular al medi al voltant de 15 g PS · l<sup>-1</sup>, és possible maximitzar la concentració específica però s'atura el creixement cel.lular degut a l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant i la concentració cel.lular assolida al final del procés no permet maximitzar també la concentració volumètrica. A l'extrem oposat, quan s'indueix al final



de creixement, amb una concentració cel.lular al voltant de la màxima assolible al sistema de treball en condicions de no inducció,  $40 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ , es redueix el període de creixement induït perquè el creixement queda limitat per la transferència d'oxigen i no es possible assolir la màxima concentració específica descrita pel sistema :  $1086 \pm 66 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ . Tot i així, l'alta densitat cel.lular assolida abans de procedir a la inducció permet arribar a una concentració volumètrica d'activitat Fuc-1-PA considerablement superior a la del primer cas. Quan s'indueix 11 hores abans de preveure la mort del cultiu per limitació d'oxigen, amb una concentració cel.lular al voltant de  $25 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ , el període de creixement induït és l'adequat per assolir concentracions específiques màximes i l'alta densitat cel.lular en el moment de la inducció permet obtenir, simultàniament, les màximes concentracions volumètriques possibles per aquest sistema de treball.

Finalment, per optimitzar aquest procés d'obtenció de Fuc-1-PA per la seva explotació, cal comparar simultàniament els resultats obtinguts en termes de productivitat volumètrica global ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) i concentració volumètrica final al brou de cultiu. Només quan s'indueix segons el criteri emprat en *FB-8* és possible maximitzar ambdós aspectes, amb valors de  $1217 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  i  $47447 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  respectivament, perquè es manté una velocitat de producció de biomassa, i paral.lelament, de Fuc-1-PA activa, alta durant gran part del procés induït i es maximitza el rendiment específic de XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) en les condicions de treball.

### VI.3. CONCLUSIONS

La implementació d'una estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa com a font de carboni a l'equip Biostat B<sup>®</sup> (Braun Ltd.) permet el creixement d'*E. coli XLI Blue MRF' (pTrcfuc)* a altes densitats resultats de forma reproducible.

La composició del medi de cultiu en cada etapa del procés resulta crítica per al bon funcionament de l'estratègia. A l'etapa discontinua, altes concentracions de fosfats o elements traça resulten inhibidores per al creixement. Per a aquesta etapa, es fixa la composició de tots els components del medi en un lleuger excés respecte als seus coeficients de consum relatiu a glucosa com a substrat limitant. L'única excepció és l'amoni donat que, al fixar la concentració de glucosa a l'etapa discontinua en 25 g/l, la concentració d'amoni necessària ja resultaria inhibidora per al creixement. Per l'etapa discontinua es fixen els següents criteris d'addició:

- els elements traça s'addicionen de forma contínua afegint-los, segons el seu coeficient de consum relatiu a glucosa, amb l'aliment de glucosa concentrada.
- L'addició de fosfats es discretitza en base a una estimació del seu rendiment relatiu a biomassa,  $Y_{x/\text{fosfats}} = 5 \text{ g PS} \cdot \text{g PO}_4^{3-}$ . Mitjançant una solució concentrada en fosfats es recupera la seva concentració inicial a l'etapa discontinua,  $10 \text{ g PO}_4^{3-} \cdot \text{l}^{-1}$ , cada cop que la biomassa total al medi es veu incrementada en 35-40 g PS.
- Per mantenir la concentració adequada d'amoni per al creixement tant en l'etapa discontinua com l'alimentada s'utilitza una solució d'hidròxid amònic concentrat per al control de pH. Fixant una concentració d'amoni entre 1 i 2 g /l per l'etapa discontinua, aquest mètode permet mantenir la seva concentració dins el marge òptim per al creixement al llarg de tot el procés i resulta un mètode molt robust e independent de la velocitat de creixement del cultiu o de possibles falles experimentals.

Tots aquests resultats porten a la definició d'un medi de cultiu MD-FB la composició i preparació del qual es detalla al Capítol IV (Materials i Mètodes) per a cada etapa del procés.

Encara que s'utilitza una estratègia d'alimentació senzilla, sense control retroalimentat i basada exclusivament en un model matemàtic general per al creixement semicontinu bacterià, l'evolució experimental del cultiu no s'allunya significativament del perfil esperat segons la simulació teòrica. És possible controlar estretament la velocitat de creixement del cultiu coneixent el valor de rendiment de glucosa a biomassa aparent,  $Y_{ap_{x/glucosa}}$ . Aquest paràmetre varia amb la velocitat de creixement i, per tant, caldrà determinar-lo en cada cas segons siguin les condicions prefixades de treball. Per mantenir la velocitat de creixement d'*E. coli* XLI Blue MRF' (pTrcfuc) a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  en les condicions d'operació s'ha trobat un valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}} = 0,30 \pm 0,02 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ .

L'elecció d'una velocitat de creixement baixa,  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , junt amb l'estratègia d'alimentació per limitació en glucosa amb que s'aconsegueix minimitzar la seva concentració residual al medi, eviten la producció d'àcid acètic al llarg del creixement. Fins i tot, quan, per algun problema operacional s'acumula puntualment aquest àcid dins el marge de concentracions no inhibidores per al creixement, aquesta estratègia operativa facilita que es metabolitzi com a font de carboni secundària minimitzant els seus efectes tòxics.

La màxima concentració cel·lular assolida per al sistema i condicions de treball és de  $44 \text{ g PS} / \text{l}$  però el creixement no s'atura per limitacions associades a l'estratègia de fermentació, com ara l'acumulació de productes inhibitoris de metabolisme o la manca de nutrients essencials a altes densitats cel·lulars, sinó per la limitació en la velocitat de transferència d'oxigen per mantenir el creixement. Amb aquesta mateixa estratègia operacional però millorant l'agitació i aireació de l'equip de treball es podrien assolir concentracions cel·lulars superiors.

La inducció del cultiu a la fase inicial i final de l'etapa semicontínua permet conèixer les característiques de sobreexpressió recombinant de Fuc-1-PA en aquest sistema de treball:

- la producció de Fuc-1-PA va associada al creixement.
- Induït a l'inici de l'etapa alimentada, el rendiment màxim del sistema per a la producció de Fuc-1-PA en termes de concentració específica s'estima al voltant de

les 1025 +/- 62 UA per gram de pes sec, corresponents al voltant del 35% del total de proteïna intracel.lular. En les condicions fixades per al creixement, són necessàries al voltant de 11 hores per assolir aquesta concentració específica màxima. Per aquest motiu, quan s'indueix al final del creixement i no és possible mantenir aquest període el creixement induït, la concentració específica assolida al final de creixement es redueix en un 30% amb un valor màxim de 795 +/- 48 UA · g<sup>-1</sup> PS i la acumulació de Fuc-1-PA correspon només al 27 % de la proteïna total intracel.lular.

- L'efecte de la sobreexpressió recombinant de Fuc-1-PA sobre el metabolisme cel.lular afecta el creixement del cultiu al voltant de les 6 hores de creixement induït. Durant aquest primer període de creixement induït no es modifica el valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  estimat en condicions de no inducció i és possible controlar la velocitat de creixement del cultiu però, a partir d'aquest moment, es perd el control sobre el creixement que és cada cop més lent.
- No es detecten problemes de degradació de Fuc-1-PA per proteòlisi al llarg del procés i la fracció de Fuc-1-PA extracel.lular es pot considerar negligible respecte a la fracció intracel.lular a recuperar per la seva purificació.

Aquesta informació permet fixar les condicions òptimes d'inducció per maximitzar la producció de Fuc-1-PA al sistema:

- a) es retarda el moment de la inducció el màxim possible per assolir la màxima concentració cel.lular que permet el sistema però mantenint el creixement induït el temps necessari per maximitzar també la producció específica.
- b) Es fixa la quantitat d'inductor necessari en base a la biomassa total que s'espera assolir a final de creixement, segons la relació 45 µmols IPTG / g PS. Amb aquest criteri és possible maximitzar la producció específica per tota la biomassa generada.

Treballant sota aquest criteri d'inducció, es maximitzen simultàniament la concentració volumètrica de Fuc-1-PA i la productivitat volumètrica per a la seva producció al final del

procés i es pot considerar optimitzada l'estratègia d'inducció del sistema. En termes de concentració específica és possible assolir els màxims trobats per la inducció a l'inici del creixement:  $1086 \pm 66 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$  corresponents a una acumulació de Fuc-1-PA màxima al voltant del 35% de la proteïna total intracel.lular. Però en aquest cas també s'obté una concentració volumètrica màxima de Fuc-1-PA de  $47447 \text{ UA} / \text{l}$ , corresponent a  $3,6 \text{ g Fuc-1-PA} / \text{l}$  segons el valor d'activitat específica definit per l'enzim (Suau, 2001), i una productivitat volumètrica global de  $1217 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $93,6 \text{ mg Fuc-1-PA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .