

3. CARACTERITZACIÓ FISIOLÒGICA
D'Escherichia coli
EN CULTIUS EN SUSPENSIÓ

3. CARACTERITZACIÓ FISIOLÒGICA D'*Escherichia coli* EN CULTIUS EN SUSPENSIÓ

3.1. INTRODUCCIÓ

Com ja s'ha destacat en la introducció, *Escherichia coli* juga un paper rellevant en molts bioprocessos, sobretot d'obtenció de proteïnes recombinants. El gran coneixement que es té de la seva fisiologia, genètica i condicions de cultiu fa que sigui escollit com a sistema de producció de proteïnes recombinants per molts investigadors que necessiten moderades quantitats de producte, bé per a realitzar estudis d'activitat, assaigs d'estructura i funció del producte, o bé per a l'obtenció de proteïnes d'interès en quantitats interessants per a la seva posterior producció a nivell industrial (Riesenberg, 1991). Malgrat ser un dels microorganismes millor estudiats i fins ara dels més utilitzats, l'obtenció de quantitats significatives de producte topa encara avui en dia amb importants limitacions de productivitat, i són relativament pocs els processos que han passat de l'escala de laboratori a escala industrial (Strandberg *et al.* 1991). L'obtenció d'elevades concentracions de cèl·lules i elevats nivells d'expressió dels gens recombinants és difícil d'assolir simultàniament, i les estratègies de millora de l'eficiència de processos, com s'ha exposat en l'apartat 1.4, normalment, fan èmfasi en un o altre aspecte per separat.

En un procés de cultiu en discontinu el creixement bacterià presenta normalment 4 fases diferenciades (figura 3.1). En una primera fase d'adaptació hi ha absència de creixement (fase de latència). La durada d'aquesta fase és molt variable i depèn principalment de l'estat fisiològic del cultiu inòcul i del volum d'aquest en relació amb el volum de medi. Un cop les cèl·lules s'han adaptat a les noves condicions comencen a dividir-se i el seu nombre augmenta de forma exponencial. En aquesta segona fase (fase de creixement exponencial), el creixement es pot descriure quantitativament en funció del temps de duplicació cel·lular i la velocitat de creixement es manté constant i al seu valor màxim tot i que les concentracions de

substrats i metabòlits en el brou van variant. Durant aquesta fase les cèl·lules assolixen la màxima velocitat de creixement. Els temps de duplicació varien en funció del medi i condicions de cultiu entre 20 i 90 minuts i, comunament s'assoleixen concentracions de cèl·lules viables de fins a 10^9 cèl·lules per mil·lilitre. Un cop el substrat principal s'ha exhaurit, o quan s'han acumulat en el brou metabòlits tòxics, la velocitat de creixement disminueix fins aturar-se per complet (fase estacionària). Durant aquesta fase la biomassa augmenta molt poc o es manté constant. Els recursos es destinen principalment al manteniment cel·lular. Alguns dels metabòlits excretats en el brou de fermentació, així com compostos que són alliberats al medi per lisi de les cèl·lules poden servir de substrats o fonts d'energia pel manteniment de la població existent. Un cop s'exhaureixen les reserves energètiques, les cèl·lules van morint (fase de mort). La velocitat de mort de les bacteries és molt variable, i depèn tant de l'ambient imposat com del propi microorganisme. Les bacteries com *Escherichia coli* moren lentament (Stanier *et al.* 1986). La durada de cada fase depèn de la soca, el medi de cultiu i les condicions d'operació.

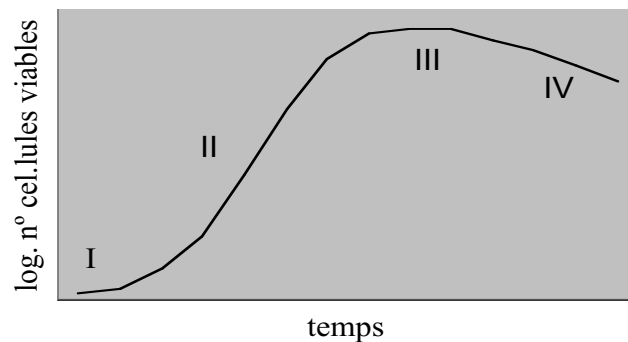


Figura 3.1: Cinètica de creixement típica d'un cultiu bacterià en discontinu. En la corba es poden apreciar les quatre fases del creixement: fase de latència (I), exponencial (II), estacionària (III) i mort (IV).

La facilitat d'operació del cultiu en discontinu l'ha convertit en l'estratègia de cultiu preferida, però precisament aquesta simplicitat operacional ha motivat que es doni un grau baix d'optimització del sistema. El creixement de les poblacions

bacterianes en discontinu es troba limitat normalment bé per l'esgotament dels nutrients disponibles al medi de cultiu (Robbins i Taylor, 1989) o bé per l'acumulació de subproductes tòxics del metabolisme (Han *et al.* 1991). En aquestes condicions d'operació es poden obtenir concentracions cel·lulars d' *Escherichia coli* entre 1 i 3 grams de pes sec cel·lular per litre (g PSC/l) en cultius en matràs, i entre de 5-10 g PSC/l en cultius en bioreactor (Riesenbergs, 1991).

En general, la baixa productivitat d'aquests processos fa que sigui difícil obtenir quantitats importants de producte i sovint el cost unitari final d'obtenció de producte és molt elevat. Per això, un dels aspectes més interessants en tot procés de producció és l'obtenció d'elevades densitats cel·lulars en cultiu que permetin millorar l'eficiència del procés. S'han realitzat molts esforços en intentar perllongar la fase exponencial del creixement per obtenir cultius d'alta densitat cel·lular. L'estratègia d'operació en discontinu-alimentat és una de les més emprades en aquest sentit. En els cultius en discontinu-alimentat es van addicionant substrats a mesura que la fermentació progressa. Les concentracions màximes de biomassa s'assoleixen emprant components complexos com l'extracte de llevat, les peptones i els casaminoàcids (Ye *et al.* 1992). L'addició del substrats crítics del medi de cultiu en petites concentracions permet mantenir la velocitat específica de creixement baixa i perllongar el creixement (Riesenbergs *et al.* 1991; Schroeckh *et al.* 1992).

Emprant tècniques de cultiu discontinu-alimentat s'han arribat a obtenir concentracions de fins a 125 g PSC/l d'una sòca salvatge d'*Escherichia* (Mori *et al.* 1979) i fins a 60 g PSC/l d'una sòca recombinant (Strandberg i Enfors, 1991). Tot i les avantatges d'aquest tipus d'estratègies, per assolir aquestes concentracions de biomassa tant elevades s'han hagut d'equilibrar tota una sèrie d'aspectes que sovint poden ser limitants: un correcte aport de nutrients, evitant en tot cas concentracions elevades inhibidores, una minimització de l'acumulació de productes tòxics, que finalment s'acabarà produint, i una millora en l'aport d'oxigen, que sol

acabar generant limitacions, bé per l'augment de la viscositat del medi al avançar el cultiu en discontinu-alimentat, o bé per la limitació intrínseca del sistema d'aport d'oxigen, a mesura que augmenta el nombre de cèl·lules (Riesenberg *et al.* 1991).

En aquest capítol es presenten els resultats experimentals del cultiu de varies soques d'*Escherichia coli*, salvatges o recombinants, realitzats per tal de tenir una caracterització fisiològica i metabòlica de les mateixes que permeti establir un punt de partida pel treball a realitzar. Per això es van realitzar cultius en diferents medis de cultiu, de composició nutricional complexa, semicomplexa o definida, i en diferents sistemes de cultiu, ja sigui en matràs agitat o bioreactor, tant en discontinu com discontinu-alimentat i en continu.

3.2. CULTIU D'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 EN MATRÀS AGITAT EN MEDI COMPLEX LB I SEMICOMPLEX CAM9

El primer factor que es va considerar, de cara a caracteritzar el creixement en matràs agitat, va ser comparar la cinètica de creixement d'una soca d'*Escherichia coli* en dos medis de cultiu diferents, així com la producció d'una proteïna com a model de proteïna recombinant: la β -galactosidasa. La soca d'*Escherichia coli* utilitzada en aquest apartat fou la soca MC1061/pJCO46 (Vila *et al.* 1994). Aquesta soca és una soca recombinant que expressa, sota el control d'un promotor termoinduïble, l'enzim β -galactosidasa. L'activitat d'aquest enzim és un indicador dels nivells d'expressió del gen recombinant i s'usa com a sistema de quantificació dels nivells d'expressió de gens quimera (fusió de dos gens d'origen diferent) fet que permet disposar d'un mètode senzill de seguiment de la seva producció. Amb aquest experiment es volia determinar quin medi de cultiu seria més apte per al creixement i per obtenir un bon rendiment de producte, i posteriorment poder comparar el comportament amb el d'un cultiu en bioreactor. Un cop iniciat el cultiu es seguiria la corba de creixement i l'activitat β -galactosidasa i es compararien els

resultats tant de concentració de biomassa com de β -galactosidasa en un i altre medi de cultiu.

Es van escollir dos dels medis de cultiu més comuns pel cultiu d' *Escherichia coli*, el medi complex LB i el medi semicomplex CAM9 (Maniatis, 1982). Aquest medis són medis no selectius i barats que permeten obtenir, a nivell de laboratori, bons rendiments de cèl·lules i producte. Són medis que permeten el creixement d'un gran nombre de microorganismes sense requeriments especials, com és el cas d'*Escherichia coli*. El medi LB conté petits polipèptids i aminoàcids a més de factors de creixement i sals inorgàniques. Es considera un medi ric en nutrients capaç de suportar bons creixements a elevades velocitats de creixement. El medi CAM9 és un medi de composició semicomplexa. Conté sals d'amoní, fosfat, magnesi i calci a més d'una font complexa, com són els hidrolitzats de proteïnes o els casaminoàcids, i una font de carboni, la glucosa.

Els cultius es van realitzar començant a una temperatura que no suposés un elevat nivell d'expressió de la proteïna recombinant, 37°C, i que permetés a l'hora una bona velocitat de creixement. Durant les 3 primeres hores els cultius s'incubaven a aquesta temperatura, temps requerit per assolir la meitat de la fase exponencial, i després s'induïa l'expressió dels gens recombinants per augment de la temperatura d'incubació a 42°C fins a assolir la màxima concentració de biomassa, que coincidia amb el màxim nivell d'activitat. En experiments previs en matràs agitad (Vila *et al.*, 1994) s'havia determinat que el millor moment per a la inducció per temperatura d'aquest sistema d'expressió era de l'inici a la meitat de la fase de creixement exponencial. Els experiments consistien en seguir la corba de creixement mitjançant mesures d'absorbància i en determinar l'activitat enzimàtica per cada mostra (apartat 7.5). La concentració de biomassa s'expressa en grams de pes sec cel·lular per litre (PSC/l) segons la corba standard que permet convertir densitat òptica en pes sec (1 U DO = 0.43 g PSC).

Els resultats obtinguts es presenten a la figura 3.2. En aquest experiment la concentració de cèl·lules augmentava exponencialment fins aproximadament les 6 hores de durada del cultiu, en que s'aturava el creixement entrant-se en la fase estacionària, que s'allargava 2 hores més. En aquest punt es donava per acabat l'experiment sense apreciar-se l'entrada en la fase de mort cel·lular.

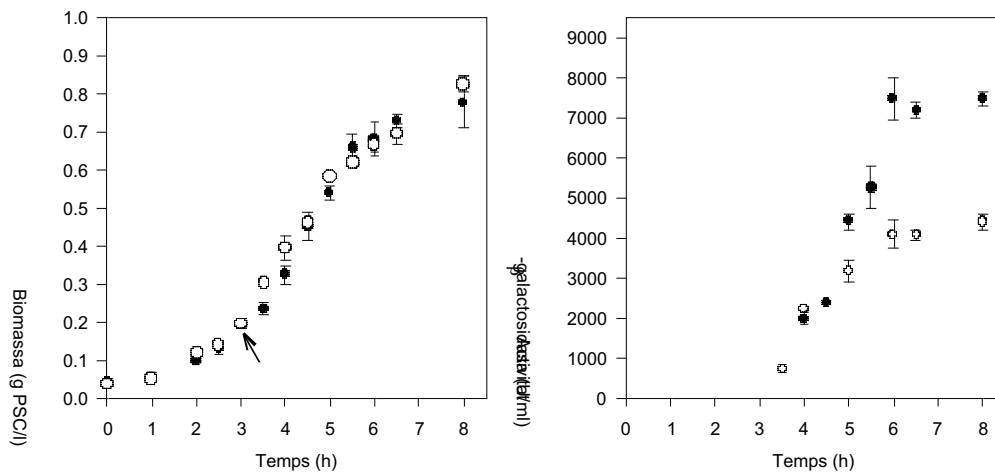


Figura 3.2: Cinètica de creixement d' *Escherichia coli* MC1061/pJCO46 en matràs agitat en medi LB (●) i CAM9 (○). A la figura de l'esquerra es representa la concentració de biomassa en g PSC/l. La sageta indica el moment d'inducció per temperatura a 42°C. A la de la dreta l'activitat β-galactosidasa en U/ml.

Tant el cultiu en medi complex LB com en medi semicomplex CAM9 presenten una velocitat específica màxima de creixement 0.68 h^{-1} . La concentració màxima de biomassa assolida en aquest experiment fou de 0.87 g PSC/l en LB i 0.84 g PSC/l en CAM9. El recompte de cèl·lules viables màxim en aquest experiment fou d'entre $2.1\text{-}2.3 \times 10^9 \text{ ufc/ml}$, per tant, no es van apreciar diferències significatives en la cinètica de creixement en ambdós medis de cultiu. El fet que l'aturada del creixement fos simultània, tant en LB com en CAM9, suggeria que el factor causant d'aquesta aturada podia ser el mateix per ambdós cultius, ja sigui un factor nutricional o bé de tipus físic-químic.

Pel que fa a l'expressió de la proteïna recombinant, al final del cultiu, després de 8

hores d'incubació s'havien obtingut un màxim de 7543 UI/ml d'activitat β -galactosidasa en LB i 4234 UI/ml en CAM9. L'activitat específica màxima resultant fou de 8670 U/g PSC en LB i 5040 U/g PSC en CAM9. El valor màxim d'activitat coincidia amb la concentració de biomassa màxima a les 8 hores de durada del cultiu després de 3 hores d'inducció.

Medi de cultiu	Biomassa	Activitat β -gal.	Activitat β -gal. sp.
LB	0.87 g PSC/l	7543 U/ml	8670 U/g PSC
CAM9	0.84 g PSC/l	4234 U/ml	5040 U/g PSC

Taula 3.1: Concentració de biomassa, activitat β -galactosidasa i activitat β -galactosidasa específica màximes dels cultius realitzats en matràs en medi LB i CAM9 per la soca d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46.

El títol de proteïna recombinant assolit en aquest experiment, és a dir, els nivells d'activitat β -galactosidasa específica en LB i CAM9, per una mateixa concentració de biomassa, variaven en quasi en un 44% a favor del cultiu realitzat en LB. Aquests resultats poden indicar que el major contingut en aminoàcids i vitamines del medi LB permetia a la cèl·lula sintetitzar amb més facilitat la proteïna recombinant.

Els resultats obtinguts suggereixen que el cultiu en medi LB és apte, tant pel creixement com per a l'obtenció de proteïna recombinant, almenys en les condicions en que es va dur a terme l'experiment. D'aquesta manera es va plantejar realitzar l'estudi del creixement d'aquesta soca en bioreactor en aquest medi de cultiu, per tal de comparar-ne els resultats. Amb això es proposava eliminar, com a mínim, les possibles limitacions inherents del cultiu en matràs. També es va optar per no induir per temperatura l'expressió de gens en el mateix bioreactor i, en canvi, induir independentment alíquotes del cultiu, per tal que l'augment de temperatura no suposés un factor addicional d'aturada del creixement.

Per altra banda, d'aquesta manera, es podria veure quin era el millor moment del cultiu per a fer la inducció.

3.3. CULTIU DISCONTINU D'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 EN BIOREACTOR EN MEDI COMPLEX LB

Es va realitzar un experiment de cultiu en bioreactor (Biostat-MD amb vas de 2 litres de capacitat) amb la mateixa soca recombinant d' *E.coli* MC1061/pJCO46. Les condicions d'operació del cultiu en bioreactor foren: temperatura 37°C, concentració d'oxigen dissolt del 50 % del valor de saturació inicial amb control del valor programat mitjançant la variació de la velocitat d'agitació (entre 500 i 700 rpm), cabal d'aire d'entrada estèril de 2 vvm (volum d'aire/volum de medi per minut), pH 7.0 amb control per addició amb NaOH 3.5M i HCl 1M. També es disposava d'un sistema de control d'escuma per addició d'un agent químic antiescumant. El medi de cultiu anava suplementat amb els antibiòtics corresponents: ampicil·lina 100 µg/ml i estreptomicina 25 µg/ml, per mantenir una pressió selectiva sobre el clon recombinant que permetés evitar la segregació plasmídica al llarg del cultiu. Un cop inoculat el bioreactor (10% v/v) s'anaven prenent mostres al llarg del procés. Es va determinar la concentració de biomassa, el nombre de cèl·lules viables i la segregació plasmídica durant el cultiu per a cada mostra.

En aquest primer experiment es va optar per no induir l'expressió del gen *lacZ* de la β-galactosidasa a 42°C durant el desenvolupament del propi cultiu per a no pertorbar les condicions de creixement, i per tant, la temperatura es va mantenir a 37°C durant tot el procés. No obstant, algunes mostres es van posar a induir en matràs agitat en un incubador a 42°C durant 2 hores per comprovar els nivells d'activitat assolits.

El resultat d'aquest experiment es mostren a la figura 3.3. Els paràmetres representats en la figura de temperatura, pH i pO_2 són els d'un dels tres cultius realitzats, el que es considera més representatiu, mentre que els valors de concentració de biomassa són la mitjana dels tres cultius. Les barres d'error representen la desviació estàndard.

Com es pot apreciar en la figura, en les condicions d'operació en que es van realitzar els cultius, es van poder mantenir durant tot el procés els valors programats de temperatura, pH, i pO_2 . La velocitat d'agitació i el cabal d'aire subministrat van permetre mantenir el cultiu en condicions aeròbiques durant tot el procés de creixement en els tres cultius realitzats: la pO_2 no va baixar del 50 % de saturació. El controlador de pH va permetre, per addició d'àcid, que les cèl·lules es trobessin permanentment en el seu rang de pH òptim pel creixement.

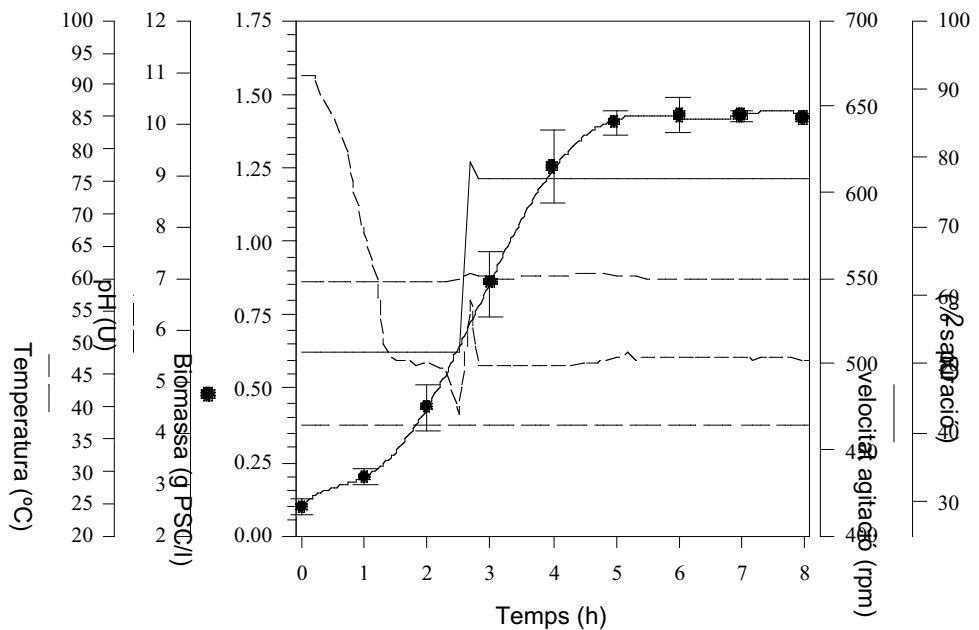


Figura 3.3: Evolució dels principals paràmetres físico-químics (temperatura, velocitat agitació, pH, i pO_2) i de la concentració de biomassa (en g PSC/l) durant el cultiu en discontinu d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 en medi complex LB a 37°C de temperatura.

En aquestes condicions es va obtenir, després de 8 hores d'incubació, una concentració de biomassa màxima de 1.47 g PSC/l. El recompte de cèl·lules viables va arribar a un valor màxim de $4,5 \times 10^9$ ufc/ml. Els cultius presentaren tots un creixement de tipus exponencial entre les 2 i 4 hores de durada del cultiu. La velocitat específica màxima de creixement fou de 0.80 h^{-1} . El cultiu entrava a la fase estacionària de creixement a partir de les 5 hores de durada, i a partir de les 7 hores s'apreciava una lleugera disminució en el nombre de cèl·lules fins a un valor de 1.2×10^9 ufc/ml al final de l'experiment.

Respecte als anteriors experiments en matràs, el cultiu en fermentador havia permès incrementar en un 61% la concentració de cèl·lules. De l'anàlisi de l'expressió de β -galactosidasa en les diferents alïquotes, es va observar que la màxima activitat es produïa en el moment que la concentració de cèl·lules era màxima, a les 6 hores, assolint-se un títol de 10890 U/ml d'activitat β -galactosidasa, el que representava un increment del 69 % respecte el títol del cultiu en matràs agitat. L'activitat específica es va situar al voltant de les 7723 U/g PSC, valor lleugerament inferior a l'obtingut en el darrer experiment de cultiu en matràs en el mateix medi de cultiu LB. Per altra banda, no es va detectar segregació plasmídica al llarg del cultiu.

Dels resultats obtinguts, tenint en compte que la realització del cultiu en fermentador ha permès controlar les variables ambientals bàsiques, es fa la hipòtesis que el creixement cel·lular s'ha aturat degut a l'exhauriment d'algun nutrient essencial. Com que tant la composició inicial i l'anàlisi detallat dels brous de fermentació en medis rics, com el medi LB, és força complicat tenint en compte la complexitat del medi i, no es pot realitzar un seguiment de cadascun dels components de manera rutinària, es va optar, per comprovar aquesta hipòtesi realitzant un cultiu discontinu-alimentat en que s'addicionava medi fresc per intentar superar la possible limitació deguda a l'esgotament del substrat al brou de fermentació.

3.4. CULTIU DISCONTINU-ALIMENTAT D'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 EN MEDI COMPLEX LB

Per tal de realitzar un experiment de cultiu discontinu-alimentat es va equipar el bioreactor amb una bomba de membrana (FE-211-B.Braun Biotech) que permetia l'addició de medi fresc de forma acurada en un rang de cabals entre 6 i 6000 ml/h. Es va provar com a estratègia d'alimentació l'addició de medi concentrat 20 vegades (LB 20X) en perfil exponencial, des de 50 ml/h a l'inici de la fase d'alimentació i increments de 25 ml/h fins arribar a 250 ml/h al final del procés. Es va emprar la mateixa soca i condicions de cultiu que en l'anterior experiment de cultiu en bioreactor. A la figura 3.4 es representa l'evolució dels principals paràmetres d'aquest experiment.

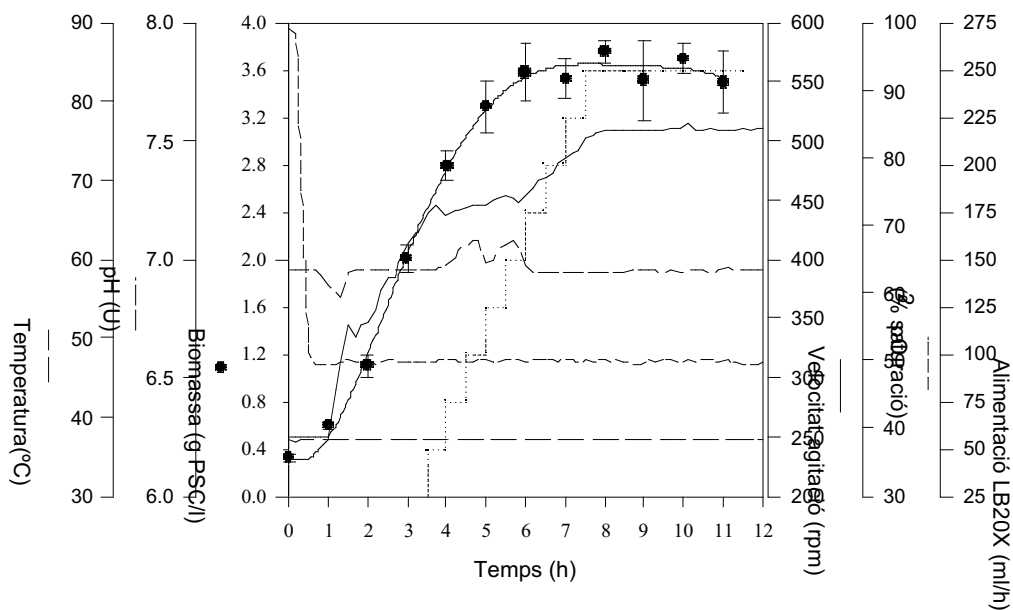


Figura 3.4: Paràmetres de seguiment del cultiu de la soca *E. coli* MC1061/pJCO46 en LB a 37°C. Addició de LB concentrat 20X progressivament des de 50 ml/h fins a 250 ml/h. L'alimentació de medi fresc començà a les 3.5 h. d'edat del cultiu.

Durant els cultius d'aquest experiment es van mantenir els valors de consigna tant de pH com de pO_2 al llarg de tot el procés. La pO_2 es va poder mantenir variant la velocitat d'agitació de manera automàtica entre 250 rpm, velocitat d'agitació inicial, i aproximadament 500 rpm al final del procés. L'addició de medi fresc

concentrat es va iniciar a les 3.5 hores de durada del cultiu, just quan es va detectar una disminució de l'increment de la velocitat d'agitació. Aquest fet indicava una disminució de la taxa de consum d'oxigen, i s'associava a un signe de que començava a haver-hi alguna limitació, atribuïda a l'exhauriment d'algun nutrient. Aquest factor limitant es reflectia en una disminució del consum global d'oxigen per part de la població bacteriana, fet que es traduïa en una lleugera disminució de la velocitat d'agitació. En el moment d'iniciar l'alimentació s'havia assolit una concentració de biomassa de 1.27 g PSC/l. A partir d'aquest moment la població va seguir augmentant fins assolir una concentració màxima de 3.87 g PSC/l entre les 6 i les 8 hores de durada del cultiu, després d'aproximadament 3 hores d'addició de medi fresc concentrat. La velocitat específica màxima de creixement va ser de 0.76 h^{-1} entre les 2 i 5 hores. Posteriorment, tot i seguir alimentant amb medi fresc concentrat, aquesta anava disminuint progressivament fins aturar-se per complet el creixement. El recompte de cèl·lules viables donà un valor màxim de $7,0 \times 10^9$ ufc/ml coincidint amb el valor de concentració de biomassa màxim.

Aquest resultat suggereix que hi podia haver algun factor, diferent a l'esgotament d'un substrat del medi, que impedia a les cèl·lules continuar amb el ritme de creixement de la fase exponencial.

L'anàlisi dels nivells d'expressió del gen recombinant, per inducció per temperatura a 42°C d'aliquotes de les darreres mostres, va resultar en valors màxims d'activitat β -galactosidasa de 24.876 U/ml a les 8 hores. L'activitat específica resultant fou de 6427 U/g PSC, lleugerament inferior a l'obtinguda en el cultiu discontinu de l'experiment anterior. Aquest resultat està d'acord amb observacions fetes per altres autors, que han descrit com al augmentar la concentració de biomassa per moltes soques d'*Escherichia coli* recombinants, disminueix la productivitat específica de proteïnes recombinants (DeLisa, 2000), tal i com s'ha pogut apreciar en els anteriors experiments.

Mitjançant aquesta estratègia es va poder millorar la concentració de biomassa final fins a 3.87 g PSC/l en cultiu discontinu-alimentat, el que suposava un augment en la concentració de biomassa del 36 % respecte el cultiu en discontinu en medi LB. La inducció per temperatura d'aliquotes del cultiu permetia obtenir un 43% més de proteïna recombinant, tot i obtenir-se menor productivitat específica (una disminució del 16%).

L'estratègia d'addició de medi fresc concentrat, utilitzada en aquest experiment, no va permetre assolir concentracions de biomassa superiors a les descrites a la bibliografia per cultius en discontinu en medis complexos de fins a 10 g PSC/l (Riesenberg, 1991). Per una altra banda, l'ús d'un medi complex no permetia l'anàlisi detallat de la utilització de nutrients (aminoàcids, vitamines...) per part de les cèl·lules i, per tant, es feia difícil esbrinar quin podia ser el factor metabòlic limitant del creixement, si és que aquest era un nutrient que s'exhauria al llarg del cultiu.

Per tant, per caracteritzar d'una manera racional i millorar el procés, convindria monitoritzar en línia el creixement a través d'alguna variable directament relacionada amb aquest, per tal de controlar-lo, mantenint la taxa específica de creixement baixa i constant durant el procés i augmentant així la durada del cultiu (Robbins i Taylor, 1989). Quan s'utilitzen medis complexos suplementats amb glucosa com a font addicional de carboni convé reduir dràsticament la velocitat específica de creixement per prevenir la limitació del creixement per acumulació de subproductes (Rinas *et al.* 1989). L'ús de medis complexos, no obstant, no permet regular fàcilment la velocitat de creixement, i és per això que es fa molt difícil obtenir bons rendiments en aquest tipus de cultiu.

Els treballs descrits a la bibliografia per altres grups en aquest tipus de medis rics mostren també una gran variabilitat en termes de concentració de biomassa final obtinguda. Per exemple, en un cultiu d'*E.coli* K12 recombinant que expressava un

antigen de la malària, el cultiu en medi ric suplementat amb una dosi extra d'extracte de llevat va permetre assolir una concentració de biomassa de fins a 5 g PSC/l (Zabriskie *et al.* 1987). Lee i col·laboradors (Lee *et al.* 1987) presentaven com a resultat del cultiu d' *E. coli* salvatge, l'obtenció de 27 g PSC/l en un cultiu discontinu-alimentat amb addició de casaminoàcids i glucosa. Fass i col·laboradors (Fass *et al.* 1987) van obtenir en cultiu discontinu-alimentat amb un medi LB suplementat amb glucosa, sals inorgàniques de fòsfor i magnesi i elements traça metàl·lics, fins a 40 g PSC/l d'una *E. coli* salvatge.

Per tal de poder realitzar un seguiment correcte del procés, s'hauria de tornar a l'ús de medis de composició coneguda i més definida com són els medis semicomplexes i els medis minerals salins, de composició completament definida. L'ús d'aquests medis hauria de permetre caracteritzar millor fisiològicament el cultiu, i així, esbrinar exactament les causes de l'aturada del creixement. Mentre els medis de composició definida són els preferits per a estudis de caire fisiològic i metabòlic, els medis complexos són els preferits en aplicacions industrials, precisament per el seu inferior cost i millor creixement (Diaz-Ricci *et al.* 1990).

3.5. CULTIU DISCONTINU D'*Escherichia coli* K12 EN MEDI SEMICOMPLEX CAM9

Per seguir amb la caracterització del creixement d'*Escherichia coli*, es va decidir utilitzar de nou el medi semicomplex CAM9 emprat en els primers experiments en matràs. L'anàlisi dels metabòlits del brou de fermentació i el seguiment del consum del substrat principal, la glucosa, hauria de permetre un millor seguiment del procés. Interessava esbrinar els motius pels quals les cèl·lules d'*Escherichia coli* deixaven de créixer a partir d'un determinat moment, proposar possibles solucions i aplicar-les per millorar l'eficiència del procés. Aquesta consideració va fer replantejar de nou l'elecció del medi cultiu més apropiat pel creixement i expressió de productes recombinants. L'ús de matrassos agitats com a pas previ al cultiu en bioreactor havia conduït a conclusions errònies. L'elecció del medi LB, que s'havia

basat en els resultats de nivell d'activitat en cultius en matràs, havia portat a escollir-lo com a medi apte pel creixement i d'obtenció de β -galactosidasa. No obstant, els resultats obtinguts amb aquest medi de cultiu no havien permès obtenir una caracterització fisiològica del comportament i les dades obtingudes no eren concloents, doncs, les pròpies limitacions del cultiu en matràs agitat podien amagar alguns resultats que, en bioreactor, conduirien a conclusions totalment diferents a les esperades. Com que el que s'intentava esbrinar era l'efecte del medi en el creixement es va optar per cultivar una soca salvatge d'*Escherichia coli* (*Escherichia coli* K12: CGSC#5073) per evitar l'interferència del sistema d'expressió de gens recombinants de la soca MC1061/pJCO46, que suposa una càrrega addicional pel metabolisme, ja que es tracta d'un plasmidi d'expressió multicòpia que s'autoreplica utilitzant tant la maquinària enzimàtica de la cèl·lula hoste, com els recursos que disposa aquesta per el creixement.

Es va realitzar un primer experiment en medi semicomplex CAM9 amb una concentració de glucosa del 15 g/l. Si es considera que els medis complexos són aptes per a iniciar el creixement però no per a sostenir-lo i perllongar-lo, degut a que la cèl·lula no està adaptada a aquestes situacions d'excés de nutrients, l'ús d'aquest medi de cultiu semicomplexe hauria de comportar millorar les condicions de creixement.

Les condicions d'operació per aquest experiment de cultiu en bioreactor foren les habituals en aquesta tanda d'experiments: temperatura 37°C, pH 7.0 amb addició de NaOH 7M i HCl 1M, i control de la pO_2 al 30% per control amb variació de la velocitat d'agitació entre 300 i 900 rpm. El cabal de subministrament d'aire es mantenia constant a 1 vvm. A la figura 3.5 A es presenta l'evolució pel que fa a la concentració de cèl·lules i de glucosa d'aquest experiment. Els paràmetres temperatura, pO_2 i pH del procés no es mostren en endavant per facilitar la interpretació gràfica dels resultats, ja que es mantenen controlats en el seu rang òptim al llarg del procés.

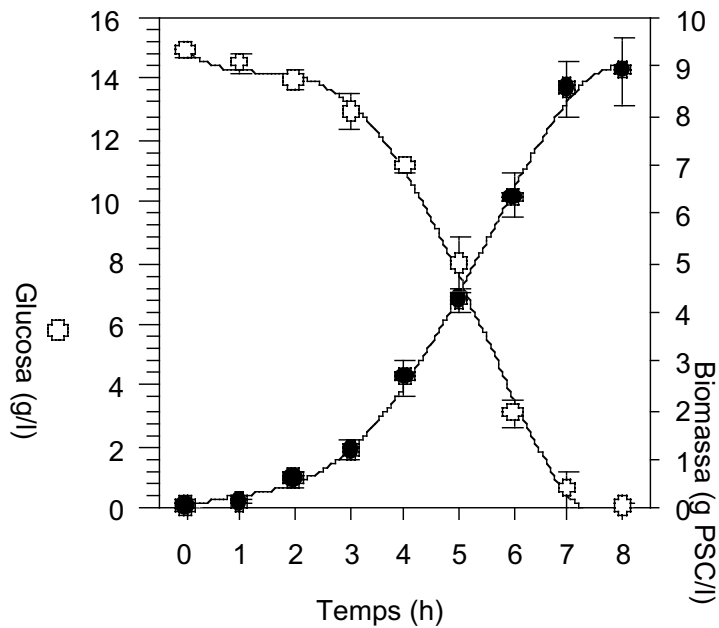


Figura 3.5 A: Evolució de la concentració de biomassa i de la concentració de glucosa durant un cultiu d'*Escherichia coli* K12 en medi semicomplex CAM9 amb 15 g/l de glucosa com a font de carboni.

El cultiu discontinu de la soca K12 d' *Escherichia coli* en medi CAM9 va permetre obtenir una concentració màxima de biomassa de 9.51 g PSC/l en 8 hores de cultiu, valor que estava en concordància amb els referenciats anteriorment a la bibliografia per aquest tipus de procés, com ja s'ha exposat prèviament. La velocitat específica màxima de creixement fou de $\mu = 0.89 \text{ h}^{-1}$ que correspon a un temps de duplicació d'aproximadament 46 minuts. El recompte de cèl·lules viables dona un valor màxim de $9.1 \times 10^9 \text{ ufc/ml}$.

Les anàlisis dels metabòlits del brou de fermentació per HPLC van permetre obtenir el perfil de consum de glucosa i de producció de metabòlits al llarg de tot el cultiu, que es presenta a la figura 3.5 B:

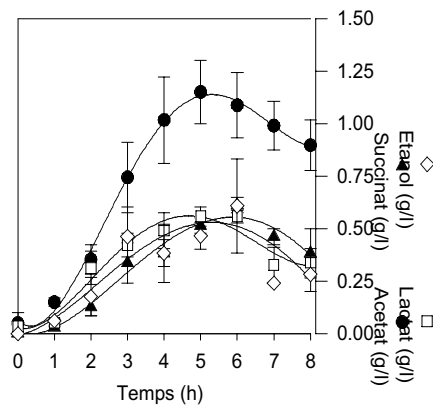


Figura 3.5 B: Evolució de la concentració de subproductes del metabolisme cel·lular durant el cultiu d'*Escherichia coli* K12 en medi semicomplex CAM9 amb 15 g/l de glucosa com a font principal de carboni.

Com es pot observar en la gràfica anterior, el cultiu de cèl·lules es va mantenir en fase de creixement exponencial des de les 2 hores fins que es va esgotar la glucosa del medi, a les 8 hores de cultiu. Paral·lelament i, pràcticament des de l'inici del cultiu, es van anar acumulant al brou de fermentació una sèrie de subproductes metabòlics. Els subproductes detectats en aquest cultiu foren acetat, succinat, lactat i etanol en ordre decreixent de concentració. Les concentracions màximes d'aquests subproductes van ser: 1,27 g/l d'acetat, 0,87 g/l de succinat, 0,80 g/l lactat i 0.73g/l d'etanol, entre les 5 i 6 hores de durada del cultiu. L'acetat és, doncs, el subproducte majoritari del metabolisme aeròbic, per aquesta soca, en aquest medi i condicions de cultiu, i representa quasi el 12% de la glucosa consumida. A partir de les 5 hores de cultiu s'observà que la concentració d'aquests àcids orgànics anava disminuint. Aquest fet indicava que al esgotar-se la glucosa, les cèl·lules van començar a consumir els subproductes presents en el

medi, tot i que això no va suposar un augment net significatiu de la concentració de biomassa.

En aquest experiment quasi un 20% de la glucosa consumida s'havia destinat a la formació d'aquests subproductes del metabolisme enlloc de destinar-se a la formació de biomassa cel·lular. Aquests resultats suggerien que l'elevada velocitat de creixement obtinguda i l'elevada concentració de glucosa inicial al medi de cultiu podien ser, en part, els responsables de la formació de subproductes a *Escherichia coli* i, representaven de fet, la primera referència en l'objectiu de caracteritzar el creixement d'aquest bacteri, ja que l'acumulació de subproductes al medi podia significar un factor d'inhibició del creixement. Està descrit que, inclòs en condicions de creixement aeròbic, s'acumulen al brou de fermentació acetat i altres subproductes del metabolisme quan hi ha glucosa en excés al medi (Andersen i von Meyenburg, 1980; Rinas *et al.* 1989). Per un altre costat, la formació d'àcids per *Escherichia coli*, principalment acetat, es correlaciona en altres treballs amb l'elevada velocitat de creixement (Majewski i Domach, 1989).

Una possible explicació a la causa de la formació d'aquest subproductes seria que, tot i haver-se mantingut la concentració d'oxigen dissolt al medi de cultiu, les cèl·lules no haguessin pogut obtenir l'energia necessària pel creixement per respiració, és a dir per fosforilació oxidativa, i que la formació dels subproductes observada en el darrer experiment fos deguda a l'obtenció d'energia per fermentació, enlloc de per respiració. No obstant, basant-se en la informació bibliogràfica disponible es va descartar aquesta hipòtesi: segons la velocitat de creixement de les cèl·lules, tot i mantenir-se el tant per cent d'oxigen dissolt al medi, pot donar-se una limitació en la utilització de l'oxigen, ja que hi ha una taxa màxima d'utilització per sobre de la qual la cèl·lula no pot utilitzar-lo, encara que n'hi hagi de disponible (Varma *et al.* 1993). El manteniment de les condicions operatives que permeten a les cèl·lules créixer en condicions totalment aeròbiques és d'especial rellevància si el microorganisme que es vol cultivar és de metabolisme anaeròbic facultatiu com *Escherichia coli*. Quan l'oxigen esdevé limitant, primer

apareix acetat, i posteriorment àcid fòrmic, etanol i lactat (Varma *et al.* 1993). En general en un cultiu discontinu d'*Escherichia coli* amb qualsevol font de carboni com a substrat i a velocitat de creixement entre 0.2 i 1.0 h⁻¹ el consum d'oxigen és quasi idèntic: 10-20 mmols /g PSC·h (Andersen i von Meyenburg, 1980). Aquest fet indica que arriba un moment en que la respiració funciona al límit i que la cèl·lula, encara que tingui més recursos, no pot augmentar més la seva capacitat respiratòria i per tant oxidativa. El valor de consum màxim d'oxigen per *Escherichia coli* és de 20 mmols/g PSC · h (Varma *et al.* 1993). El valor mínim que es considera per entrar en condicions anaeròbies és de menys de 1 mmol/g PSC·h. La transferència d'oxigen al medi depèn de la temperatura, composició del medi i condicions d'operació (cabal d'aire i velocitat d'agitació) però es pot considerar que, en sistemes com l'utilitzat en aquest treball i, en les condicions d'operació imposades durant el cultiu (control de la pO₂ per agitació en cascada i 1 vvm de cabal d'aire), el valor de transferència d'oxigen és d'entre 50 i 100 mmol O₂ /l ·h (Andersen i von Meyenburg, 1980). Això permetia eliminar la limitació d'oxigen a les cèl·lules per factors externs, i per tant, assegurar que la formació de subproductes metabòlics no era deguda a una manca d'oxigen.

Tot i que els experiments anteriors havien permès caracteritzar el comportament d'*Escherichia coli* en cultius en suspensió, encara no es podia donar resposta a les causes que feien que durant el creixement aeròbic es produïssin subproductes metabòlics i si aquests podien ser, suposadament, responsables de l'aturada observada del creixement. Si s'observen les principals rutes metabòliques, es poden establir hipòtesis per explicar les causes de la formació de subproductes.

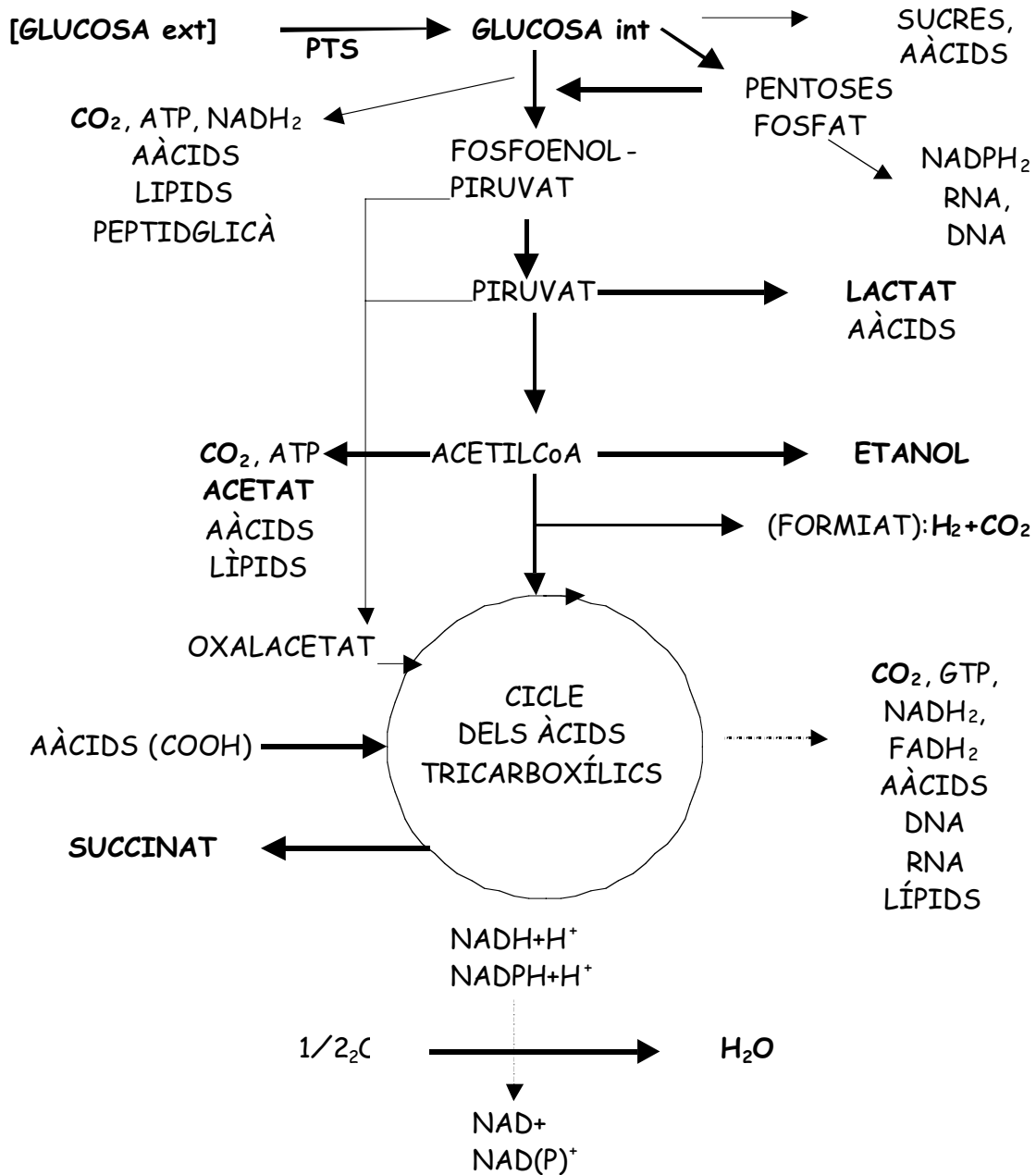


Figura 3.6: Esquema de les vies centrals del metabolisme de la glucosa a *Escherichia coli*. La via principal d'oxidació de la glucosa és la glucòlisi, el cicle de les pentoses i el cicle dels àcids tricarboxílics (CAT). S'indica també la principal entrada d'aminoàcids (esquelet carbonatat) al CAT. Amb negreta s'indiquen els subproductes metabòlics de l'oxidació parcial de la glucosa.

En la glucòlisi, per mitjà d'un sèrie de reaccions, es degrada una molècula de glucosa donant lloc a dues molècules de piruvat. Durant aquesta seqüència de reaccions part de l'energia lliure que cedeix la glucosa, es conserva en forma d'ATP per fosforilació a nivell de substrat. La glucòlisi és una ruta central de la degradació de la glucosa, quasi universal per a tots els organismes, tant en condicions aeròbies com anaeròbies. La fosforilació a nivell de substrat és el mecanisme principal d'obtenció d'energia en anaerobiosi. En aquestes condicions s'obtenen 2 molècules d'ATP i 2 de NADH_2 per cada molècula de glucosa, ja que el el cycle dels àcids tricarboxílics (CAT) no pot tancar-se i opera bàsicament com a mecanisme generador de precursors de biosíntesi. En la respiració, el piruvat produït en la glucòlisi pateix una deshidrogenació i una descarboxilació, obtenint-se Acetil-CoA i CO_2 . L'Acetil-CoA entra a continuació al CAT, on al cedir el grup acetil a l'oxalacetat produeix una molècula de citrat. Després d'una sèrie de reaccions que rendeixen principalment poder reductor en forma de GTP, NADH_2 i FADH_2 , es torna a convertir en oxalacetat que pot tornar a acceptar un grup acetil i així, seguir circulant pel cycle. Els productes del CAT són, després de passar per la cadena de transport d'electrons, el CO_2 , l' H_2O i energia en forma de poder reductor, que genèricament ve representat pel NADH. En aquestes condicions es generen 32 molècules d'ATP per cada molècula de glucosa oxidada gràcies al mecanisme de fosforilació oxidativa.

Cal ressaltar que tant l'oxalacetat del CAT com l'Acetil-CoA provinent del piruvat, han de trobar-se en quantitats estequiomètriques per circular a través del CAT. Si el primer no pogués fer front a la quantitat d'Acetil-CoA a tractar degut al buidat del CAT per a funcions de biosíntesi, com seria la sortida de citrat per donar àcids grassos, el cycle s'aniria extingint gradualment. En els casos de buidat de productes intermedis del cycle (com per exemple en cultius en medis definits on s'han de sintetitzar tots els aminoàcids) són de vital importància les reaccions anapleròtiques, és a dir aquelles que reomplen el cycle amb intermediaris. L'Acetil-CoA és l'únic substrat del cycle que pot oxidar-se per complet, mentre que cap

altre intermediari del cicle pot fer-ho completament. Aquest poden, com a molt, oxidar-se fins a oxalacetat. Una part de les molècules de NADH_2 i FADH_2 generades en el CAT s'utilitzen per a funcions de biosíntesi i manteniment dels nivells de cofactors, però la gran majoria serveix per a regenerar enllaços fosfat rics en energia en el procés de fosforilació oxidativa que té lloc en la cadena de transport d'electrons. L'acceptor d'electrons és l'oxigen molecular. Normalment, el CO_2 i l' H_2O són els productes metabòlics finals de la respiració per la majoria de microorganismes. No obstant, *Escherichia coli* presenta, com a productes finals de la respiració, subproductes de la oxidació incompleta de nutrients, com s'ha pogut observar experimentalment en el darrer experiment de cultiu.

Del quadre metabòlic presentat, es pot observar com els subproductes metabòlics es produeixen bàsicament a la part final de la glucòlisi, a partir del piruvat, i també a partir de l'Acetil-CoA, substrat principal del cicle dels àcids tricarboxílics. Aquest punt del metabolisme és un punt clau doncs és el nexa d'unió entre les vies de degradació i les de subministrament de precursors per a funcions de biosíntesi. Aquest fet suggereix que hi podria haver un desacoblament entre unes i altres funcions del metabolisme.

3.6. CULTIU DISCONTINU-ALIMENTAT D'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 EN MEDI CAM9E

Per tal de continuar explorant les possibilitats de l'estratègia de cultiu-discontínu emprada en el darrer apartat, es va realitzar un cultiu discontínu-alimentat en medi CAM9E amb 20 g/l de glucosa inicial i, en el que s'addicionava de manera intermitent glucosa (solució de glucosa concentrada al 50% p/v), casaminoàcids (solució concentrada al 20% p/v), sals de magnesi i calci, oligoelements (solució concentrada 1000 vegades). El volum inicial era de 1.5 litres de volum. En aquest experiment es va utilitzar de nou, la soca d'*Escherichia coli* recombinant MC1061/pJCO46 emprada en el darrer cultiu discontínu-alimentat en medi LB. Les condicions d'operació i criteris de control van ser els mateixos que en els

experiments previs: 37°C de temperatura, pH 7.0, i pO₂ al 30% de saturació, amb un cabal inicial d'aire d'1 vvm. L'addició de glucosa i casaminoàcids es va realitzar de manera discontinua seguint el criteri de la disminució de la velocitat d'agitació com a paràmetre indicador de la demanda metabòlica. La resta de components minerals es van anar afegint a mesura que avançava el cultiu, un cop s'havia assolit la concentració de biomassa màxima de l'experiment anterior, per tal de reposar les concentracions inicials del medi, en cas que s'haguessin exhaurit.

A la figura següent es mostra l'evolució d'aquest cultiu.

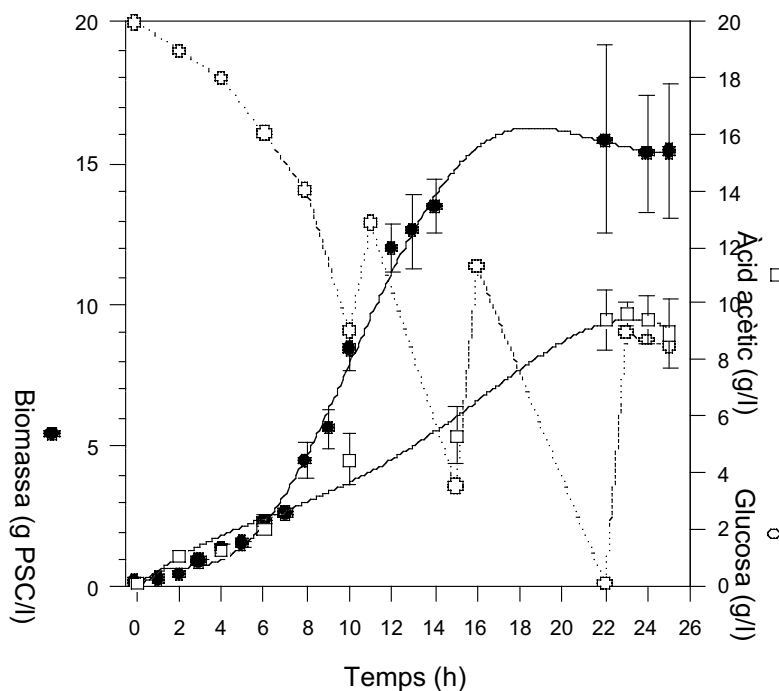


Figura 3.7: Evolució del cultiu discontinu-alimentat d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 en medi CAM9 amb 20 g/l de glucosa i addició d'una solució concentrada de glucosa (50% p/v), casaminoàcids (20% p/v) i sals minerals.

En aquest cultiu, l'estratègia d'addició de glucosa i casaminoàcids va permetre assolir la màxima concentració de biomassa: 15.7 g/l de pes sec cel·lular en 24 hores de cultiu. La concentració de biomassa va anar augmentant exponencialment des de les 6 fins les 14 hores, assolint-se una velocitat específica màxima de creixement de 0.71 h⁻¹. El recompte de cèl·lules viables va donar valors d'entre 3.3 x i 4.2 x10¹⁰ ufc/ml a les 24 hores.

Per tal de mantenir el valor d'oxigen dissolt al 30% es va haver d'augmentar el cabal de subministrament d'aire des de 1.0 lpm inicials fins a 8 lpm a les 8.5 hores, moment en que l'agitació havia assolit el seu valor màxim de 900 rpm. Posteriorment es va haver d'enriquir el corrent amb oxigen pur, a partir de les 9 hores per tal de mantenir el valor de consigna. Per mantenir el valor de pH es van haver d'addicionar 80 ml de NaOH 7M. En total es van realitzar 4 addicions de glucosa (solució concentrada 50%p/v) i casaminoàcids (solució al 20% p/v): a les 7 hores (5 ml de glucosa i 20 ml de CAA), 10 hores (10 ml de glucosa i 20 ml de CAA), 14 hores (20 ml de glucosa i 20 ml de CAA) i 22 hores (20ml de glucosa i 20 ml de CAA). L'addició de sals es va realitzar en una sola vegada a les 14 hores (15 ml). En total es van consumir uns 70 grams de glucosa. La darrera addició ja no va permetre augmentar la concentració de biomassa, i per tant es va donar per acabat l'experiment a les 25 hores de durada. Durant el cultiu es va acumular al medi fins a 10 g/l d'acetat, valor que es va obtenir a les 23 hores de durada del procés. Els valors de succinat, lactat i etanol es van mantenir a nivells per sota dels 2 g/l de concentració al llarg de tot el procés.

Pel que fa a l'anàlisi de l'expressió del gen *lacZ* recombinant, la inducció d'aliquotes del cultiu va permetre obtenir, coincidint amb la màxima concentració de biomassa assolida (19.7 g PSC/l), un títol màxim d'activitat β -galactosidasa de 90.867 UI/ml, tot i que la segregació plasmídica, malgrat la pressió selectiva dels antibiòtics emprats (ampicil·lina i estreptomicina), va arribar a assolir valors del 35% en el pitjor dels casos. L'activitat específica de proteïna recombinant va assolir valors màxims de 4636 U/g PSC. El valor més baix d'activitat màxima en aquest experiments fou de 46.595 UI/ml, amb una concentració màxima de biomassa de 15 g PSC/l. En aquest cas l'activitat específica es situa al voltant de 3100 U/g PSC.

Per últim, per tal de comparar el comportament en diferents medis i continuar caracteritzant la fisiologia d'*Escherichia* en cultiu, es va plantejar realitzar un cultiu en un medi completament definit, és a dir, sense cap font de tipus complex. *Escherichia coli* pot sintetitzar-se totes les molècules necessàries per al creixement a partir de sals inorgàniques i una font de carboni. Es pretenia veure si en aquestes condicions, el comportament era similar a l'observat en medis amb fonts complexes i glucosa, on s'assolien elevades velocitats de creixement. També es volia comparar el comportament de la soca salvatge enfront la soca recombinant.

3.7. CULTIU DISCONTINU D'*Escherichia coli* K12 I *Escherichia coli* MC1061/pJCO46 EN MEDI DEFINIT M9E

El medi de cultiu escollit en aquest experiment fou el medi mínim M9E amb 15 g/l de glucosa com a única font de carboni i energia (el medi M9E, com s'exposa a a l'apartat de materials i mètodes, és un medi que a partir del M9 s'ha enriquit amb sals d'amoni i elements traça metàl·lics per tal d'afavorir el creixement). Les condicions d'operació del bioreactor foren les mateixes que en els anteriors experiments: 37°C de temperatura, pH 7.0 controlat amb NaOH 3.5M i pO₂ al 30% de saturació amb aire amb control en cascada amb la velocitat d'agitació i 1 vvm de cabal d'entrada d'aire.

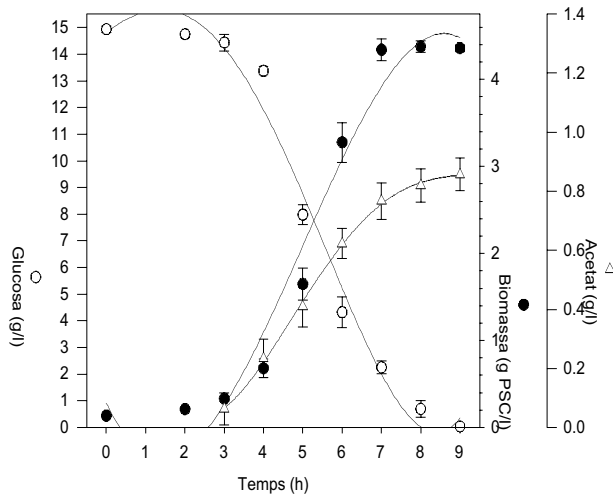


Figura 3.8: Evolució de la concentració de biomassa, glucosa i acetat durant un cultiu d'*Escherichia coli* K12 en medi mineral definit amb 15 g/l de glucosa.

Després de 7 hores de durada del cultiu la concentració de biomassa màxima assolida en aquest experiment fou de 4.45 g PSC/l. La velocitat específica màxima de creixement fou de 0.73 h^{-1} que correspon a un temps de duplicació d'aproximadament 57 minuts. La glucosa s'havia consumit completament al produir-se l'aturada del creixement. El rendiment del creixement fou de 0.3 g PSC/g glucosa. Pel que fa a la generació de subproductes del metabolisme es va poder observar com l'acetat s'excretava al medi des de ben aviat i, la seva concentració va augmentar proporcionalment a l'augment de concentració de biomassa i a la desaparició de glucosa. La concentració final màxima d'acetat fou de 0.91 g/l. Aquest valor representa entre un 5.5 i un 6 % de la glucosa total consumida (0.055-0.060 g acetat/g glucosa). Tot i que es va obtenir un rendiment de formació d'acetat similar que en l'anterior experiment de cultiu discontinu en medi CAM9, en aquest experiment aquest àcid fou l'únic subproducte detectat, per tant, s'havia destinat menys glucosa a la formació de subproductes. Aparentment, a major complexitat del medi de cultiu i, per tant, a major disponibilitat de nutrients, major és el colapso metabòlic a nivell de la glucòlisi i el CAT. En medis complexes, com LB, els aminoàcids del medi s'incorporarien al CAT com a

intermediaris del cicle saturant la seva capacitat d'absorbir l'acetil-CoA generat en la glucòlisi, i forçant la cèl·lula a dissipar l'excés en forma d'acetat. En medis definits, com el medi M9E, la cèl·lula podria aprofitar millor la glucosa i generar nova biomassa sense haver de produir subproductes metabòlics, com els observats en els anteriors experiments.

En el següent experiment es presenten els resultats d'un cultiu en les mateixes condicions que l'anterior però, de nou, amb la soca d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46. Es pretenia apreciar la diferència de comportament entre ambdues soques pel que fa al creixement i excreció de subproductes. Es van realitzar una sèrie de cultius amb aquesta soca recombinant d' *E. coli*, en les mateixes condicions de cultiu discontinu aeròbic amb 15 g/l de glucosa com a única font de carboni i energia. A la figura 3.9 es mostra l'evolució de les variables d'aquest experiment.

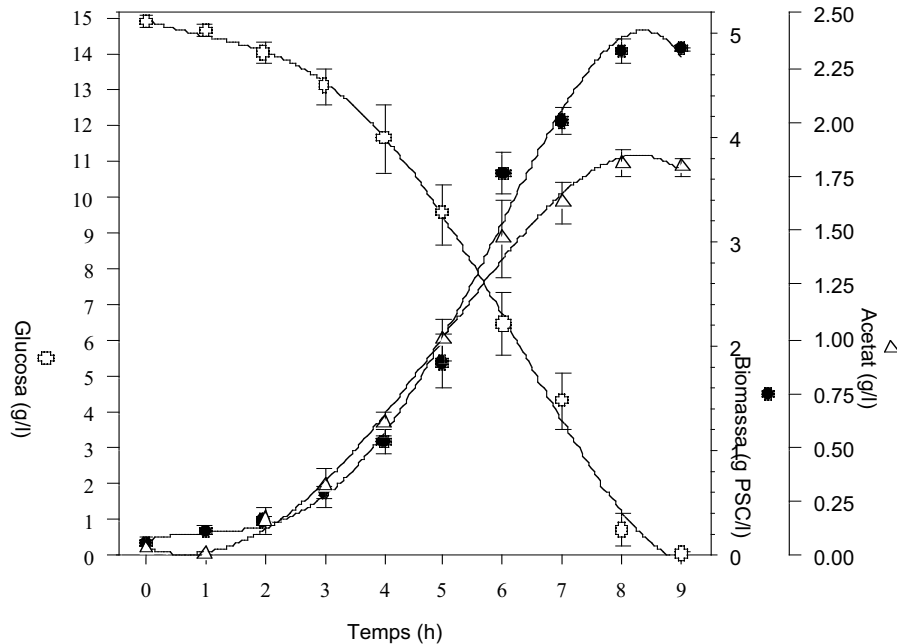


Figura 3.9: Evolució de la concentració de biomassa, glucosa i acetat durant el cultiu d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46, amb medi mineral definit amb 15 g/l de glucosa com a única font de carboni.

En aquest experiment la concentració de biomassa assolida al final del cultiu, després de 8 hores d'incubació fou de 4.9 g PSC/l, valor que indica que un 32 % de la glucosa consumida es va destinar a biomassa. La velocitat específica de creixement màxima fou de 0.70 h⁻¹. La formació d'acetat fou de quasi el doble que en la soca salvatge: es van obtenir 1.8 g/l d'acetat, mentre que en l'anterior experiment amb la soca salvatge aquest valor era de 0.91 g/l. Aquest valor suposa un 14% de la glucosa total consumida (0.14 g acetat/g glucosa), mentre que per la soca salvatge era del 6% (0.06 g acetat/g glucosa). Respecte la concentració de biomassa aquest valor suposa 0.49 g acetat/g PSC mentre que en la soca salvatge s'havien obtingut 0.16 g acetat/ g PSC. Els valors de rendiment de formació d'acetat a partir de glucosa estan dins el rang descrit a la bibliografia per *Escherichia coli* en condicions de creixement aeròbic per aquest tipus de medi de cultiu: 0.10 a 0.50 g acetat/g PSC (Reiling *et al.*, 1995). Quantitativament, com es desprèn d'aquest darrer experiment en relació al anterior, el rendiment de formació d'acetat, en les mateixes condicions de creixement, depèn a més a més de les condicions d'operació i medi de cultiu, del genotip de la soca.

El títol de β -galactosidasa d'aliquotes induïdes a 42°C va assolir un màxim de 12861 UI/ml el que representa una activitat específica de 2624 UI/ g PSC. Aquest valor suggereix que en aquest tipus de medi definit hi ha menor síntesi de proteïna recombinant que quan s'empren medis amb fonts nitrogenades complexes com són els casaminoàcids.

Si bé aquests resultats apunten a la producció d'acetat per *E. coli* K12 com a possible responsable de l'aturada del creixement en condicions aeròbies i emprant glucosa com a substrat principal, encara no es podia explicar, de forma raonada, la causa que feia que la cèl·lula produís aquest subproducte del metabolisme. Malgrat que les condicions del cultiu s'havien controlat per tal que no existís una limitació del creixement per manca d'oxigen, les cèl·lules excretaven acetat. En principi, la formació d'acetat representa un malbaratament de la font de carboni i energia i la

cèl·lula no n'obté, en principi, un benefici directe. L'excreció d'acetat per *E.coli* durant el creixement aeròbic en glucosa ha estat identificada com el principal obstacle de cara a millorar la producció de proteïnes recombinants (San *et al.* 1994). Per tots aquests motius es va decidir estudiar amb més detall el paper del acetat en el metabolisme d'*Escherichia coli*. Aquest estudi s'ha efectuat a dos nivells. En primer lloc, a l'apartat següent es descriuen els resultats d'una sèrie d'experiments en que s'intenta correlacionar la concentració d'acetat amb la inhibició del creixement i de l'expressió de gens recombinants a *Escherichia coli*. En segon lloc, es planteja un estudi quantitatiu del metabolisme d'*Escherichia coli*, per tal d'establir una interpretació a nivell intern del funcionament de la cèl·lula, del fenomen d'acumulació d'acetat en condicions aeròbies. Aquest estudi, basat en l'anàlisi dels fluxos intracel·lulars mitjançant un model estequiomètric es presenta al capítol 4.

3.8. EFECTE DE L'ACETAT SOBRE EL CREIXEMENT I L'EXPRESSIÓ DE GENS RECOMBINANTS A *Escherichia coli* MC1061/pJCO46

Un cop identificat l'acetat com a principal subproducte del metabolisme aeròbic del cultiu d' *E. coli* en medi mínim, amb glucosa com a única font de carboni i energia, es volia veure l'efecte de la seva concentració, tant sobre el creixement de les cèl·lules, com sobre els nivells d'expressió de la proteïna recombinant β -galactosidasa.

Es va realitzar un experiment de cultiu en bioreactor en medi mínim i amb diferents concentracions d'acetat addicionat exògenament a fi i efecte de comparar les velocitats específiques de creixement, la concentració de biomassa final obtinguda i els nivells d'activitat enzimàtica β -galactosidasa assolits. Es va preparar un medi mínim (M9E) amb 15 g/l de glucosa i es va suplementar amb àcid acètic a concentracions de 0, 5 i 10 g/l. Abans d'esterilitzar el medi es va ajustar el pH amb NaOH 7M a 7.0 per tal de corregir les diferències degudes a l'addició de l'àcid acètic. Les condicions de cultiu foren: temperatura 37°C, pH 7.0 i pO_2 al

30% de saturació d'O₂, amb control en cascada amb l'agitació. Per comprovar l'efecte de l'addició d'acetat al medi de cultiu sobre l'expressió de gens recombinants, es van extreure aliquotes de 10 ml de volum a diferents temps, i es va induir l'expressió dels gens recombinants en un incubador a 42°C i 250 rpm. A la figura 3.9A es presenten els resultats de la evolució de la concentració de biomassa final obtinguda i a la figura 3.9 B de l'activitat final de la proteïna recombinant obtinguda. En la taula següent es sumariuen els resultats dels cultius realitzats:

Medi cultiu	Biomassa màx.	Veloc.sp.creix.	Activitat β-gal. sp.
M9E	4.6 g PSC/l	0.73 h ⁻¹	2542 U/g PSC
M9E+5g/l Ac	2.4 g PSC/l	0.21 h ⁻¹	2159 U/g PSC
M9E+10g/l Ac	0.26 g PSC/l	0.01 h ⁻¹	1516 U/g PSC

Taula 3.3: Resultats dels cultius d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 en medi M9E (control), M9E amb 5 g/l d'acetat i M9E amb 10 g/l d'acetat (Ac) addicionat exògenament. Efecte sobre la concentració de biomassa, velocitat específica de creixement i activitat β-galactosidasa.

El cultiu control va assolir al cap de 8 hores d'incubació una concentració de biomassa de 4.6 g PSC/l. La velocitat específica màxima de creixement fou de 0.73 h⁻¹. L'acetat produït durant aquest període fou de 1.2 g/l. La concentració de biomassa del cultiu d' *E coli* creixent amb un suplement d'acetat de 5 g/l fou inferior en quasi un 50% a la del cultiu control: 2.4 g PSC/l. La velocitat específica de creixement en aquest cultiu, tot i que en una primera fase no semblava afectada respecte la del cultiu control, a partir de les 4 hores va disminuir fins a 0.21 h⁻¹. En aquest moment es detectaven al medi fins a 6 g/l d'acetat, els 5 addicionats inicialment més 1 g/l produït per la soca durant el creixement. El cultiu amb un suplement de 10 g/l va presentar un creixement pràcticament nul al llarg de

l'experiment ($\mu = 0.01 \text{ h}^{-1}$). En aquest últim cas, després de 8 hores d'incubació només s'havien obtingut 0.26 g PSC/l.

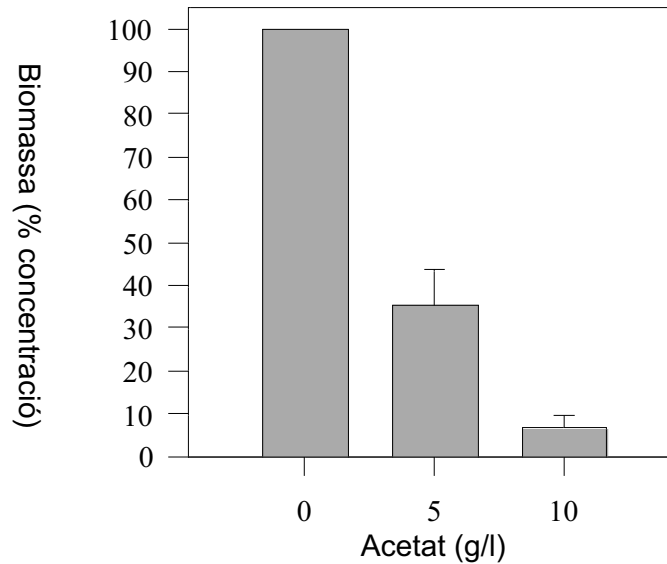


Figura 3.10A: Comparació en % de la concentració de biomassa final obtinguda del cultiu d'*Escherichia coli* MC1061/pJCO46 segons l'acetat addicionat exògenament (0, 5 i 10 g/l).

Els resultats obtinguts van mostrar com l'acetat acumulat al medi té efectes clars sobre el cultiu d' *Escherichia coli* inhibint el seu creixement, com a mínim, a partir de 5 g/l de concentració. Aquest fet està d'acord amb el comportament observat per *Escherichia coli* MC1061/pJCO46 en cultiu discontinu-alimentat en medi CAM9E (apartat 3.6), on s'ha pogut apreciar una aturada del creixement quan s'havien acumulat al medi quasi 10 g/l d'acetat. De fet, a partir de les 14 hores de durada del cultiu, quan s'havien acumulat al brou de fermentació 5 g/l d'acetat es va començar a apreciar l'efecte d'inhibició del creixement, fet que es reflexa en la disminució de la velocitat de creixement. Per una altra banda, aquests resultats també estan d'acord amb alguns valors d'inhibició del creixement d'*Escherichia coli* per acetat, referenciats a la bibliografia. L'acetat resulta inhibitori del creixement, com a mínim, a partir de 10 g/l de concentració per uns autors (Andersen i von Meyenburg, 1980; Pan *et al.* 1987; Fass *et al.* 1989), i a partir de 5

g/l segons altres autors (Lee *et al.* 1989). De fet, hi ha soques que podrien ser més sensibles a la inhibició per acetat que altres, al igual que es troben productivitats d'acetat diferents segons la soca, i per tant aquestes concentracions poden presentar valors molt diferents. S'ha descrit també que, la formació de subproductes del metabolisme representa el principal impediment alhora d'obtenir elevades densitats cel·lulars en cultius d'*Escherichia*. Les màximes concentracions de biomassa que es poden assolir si no es retiren els subproductes com l'acetat es situen al voltant dels 30 g PSC/l (Meyer *et al.* 1984). Tot i que algunes soques es veuen menys afectades per la concentració d'acetat o mostren menor productivitat específica de producció d'acetat, les diferències entre soques no són tant grans com per permetre l'obtenció d'elevades densitats cel·lulars, sense que el procés de fermentació sigui extensament modificat mitjançant estratègies convencionals de millora, com les ja exposades de cultius en discontinu-alimentat (Luli i Strohl, 1990).

Pel que fa a l'activitat β -galactosidasa, després de la inducció durant 2 hores de les aliquotes obtingudes dels cultius anteriors en matràs agitat a 42°C i 250 rpm es va determinar la seva activitat. El valor d'activitat β -galactosidasa es va normalitzar per la concentració de biomassa (activitat específica) per a una millor comparació dels resultats (figura 3.10 B).

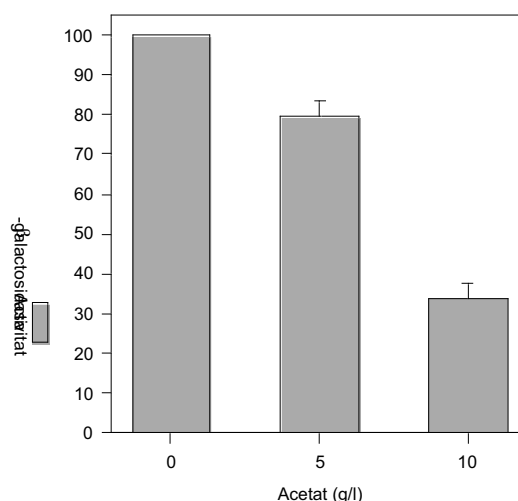


Figura 3.10 B: Efecte de l'acetat addicionat exògenament sobre l'expressió de β -galactosidasa recombinant a *Escherichia coli* MC1061/pJCO46.

En aquesta figura es mostra el nivell d'activitat específica final, en percentatge, per cadascun dels cultius en comparació amb el cultiu control després de 2 hores d'inducció a 42°C de l'expressió del gen recombinant. Com es pot apreciar a la figura 3.10B, l'expressió del gen recombinant de la β -galactosidasa es veu també afectada per la concentració creixent d'acetat present al medi. Es pot apreciar com l'expressió del gen *lacZ* disminueix de manera proporcional a la concentració d'acetat addicionat al medi. En el cultiu amb de 5 g/l d'acetat el títol específic es redueix en un 17.7 %, mentre que en el cultiu amb 10 g/l d'acetat disminueix un 67.6 % respecte del cultiu control, sense cap addició exògena d'acetat.

Aquest fet també està d'acord amb altres investigadors que han estudiat diferents sistemes d'expressió de gens recombinants a *E. coli*. De tots els subproductes que excreta *E. coli*, l'acetat és el que més afecta l'expressió de gens recombinants i, l'augment de la seva secreció es correlaciona amb una disminució de l'obtenció de proteïnes recombinants (Rinas *et al.* 1989; Brown *et al.* 1985; Meyer *et al.* 1984; Zabriskie *et al.* 1986). Bech i Carlsen (1990) van efectuar un experiment de cultiu en continu en condicions limitants de glucosa d'una soca d' *E. coli* que expressa el gen de l'hormona del creixement de ratolí, observant com l'addició d'acetat fins a 2.4 g/l reduïa la velocitat específica de producció de proteïna recombinant en un 38%, tot i no veure's reduïda la concentració cel·lular. Aquests autors atribueixen la inhibició del creixement deguda a l'acetat, a més a més, a l'augment de la pressió osmòtica deguda a l'addició d'agents correctors del pH, com NaOH.

Tot i que no està del tot clar el mecanisme inhibitori de l'acetat sobre el creixement, la teoria més acceptada del mecanisme pel qual l'acetat resulta tòxic per a la cèl·lula és que actua com a agent de desacoblament del transport de protons a través de la membrana cap al citoplasma, de manera que es reduiria la força protó-motriu (definida com la diferència de potencial electroquímico a través de la membrana citoplasmàtica) essencial per la fosforilació oxidativa, principal mecanisme d'obtenció d'energia en condicions aeròbies (Repaske i Adler, 1981;

Douglas i Bailey, 1995). Segons els primers autors la inhibició per àcid acètic depèn del subministrament d'oxigen i del pH, de manera que a menor oxigen dissolt i a pH més baix major inhibició per acetat. En el seu treball, atribueixen la producció d'acetat en condicions aeròbiques a l'excés de glucosa al medi (20 g/l).

D'aquests resultats es dedueix que és del tot desitjable reduir la formació d'acetat si es vol millorar l'eficiència d'un procés, tant pel que fa a l'obtenció d'elevades densitats de biomassa, com de títols elevats de proteïna recombinant. No obstant això, per a intentar reduir la seva formació, convé esbrinar la causa metabòlica que fa que *Escherichia coli* es vegi forçada a produir aquest àcid com a subproducte del metabolisme, fins i tot en condicions aeròbiques. Hi ha referències de millora d'obtenció de proteïna recombinant en cultius en discontinu-alimentat amb control de l'addició de glucosa de manera que la velocitat de creixement es mantingui baixa i no s'acumuli massa acetat al medi i així es millora el rendiment de producció de proteïna recombinant (Brown *et al.* 1985; Meyer *et al.* 1984).

Si la causa de que la cèl·lula produeixi acetat, tal com sembla, és l'excés de glucosa al medi i les elevades velocitats de creixement que es donen en aquest mode d'operació en discontinu (tal i com apunten Brown *et al.* 1985 i Meyer *et al.* 1984.), en un cultiu en continu a velocitats específiques de creixement moderades i a concentracions limitants del creixement per la font de carboni, la cèl·lula hauria de trobar-se en condicions d'aprofitar millor la font de carboni i obtenir més biomassa per gram de glucosa consumida. El cultiu en continu a concentració limitant de glucosa en el corrent d'entrada, o el cultiu discontinu-alimentat limitat per glucosa hauria de permetre obtenir un creixement on l'excreció d'acetat fos nul·la o molt petita, i on només s'excretés CO_2 i energia en forma de calor. Per tal d'investigar aquesta possibilitat es va realitzar un experiment de cultiu en continu, com es descriu en el següent apartat.

3.9. CULTIU EN CONTINU I DISCONTINU-ALIMENTAT D'*Escherichia coli* K12 A EN MEDI DEFINIT M9E EN CONDICIONS DE LIMITACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA A L'ALIMENT

L'experiment de cultiu en continu es va plantejar mantenint constant la velocitat de dilució al reactor, per tant fixant una velocitat de creixement de les cèl·lules, i variant la concentració de glucosa a l'entrada. Amb aquest experiment es pretenia veure si existeixen unes condicions en les que la cèl·lula pot utilitzar tota la font de carboni subministrada sense malbaratar-ne un a part en forma d'acetat. Es pretenia confirmar o rebutjar la hipòtesi que el rendiment de producció d'acetat depèn de la concentració de glucosa disponible al medi de cultiu i de la velocitat específica de creixement, i que en determinades condicions, la cèl·lula, és capaç d'aprofitar gran part o tota la font de carboni per a síntesi de noves cèl·lules i la resta en forma de CO_2 , i no produir subproductes metabòlics.

La soca utilitzada en aquest experiment fou la mateixa *E. coli* salvatge dels experiments en discontinu en medi mínim, i el medi de cultiu el mateix medi mínim definit enriquit (M9E) amb 10 g/l de glucosa com a concentració inicial. L'experiment es va iniciar amb una primera fase en discontinu, amb les següents condicions d'operació: 37°C de temperatura, pO₂ al 30% de saturació amb 300 rpm de velocitat d'agitació inicial, 1 vvm de cabal d'aire, i pH 7.0 (control amb NaOH al 30 %). Un cop inoculat el reactor i després de 5 hores de cultiu en discontinu per obtenir un cert nivell de cèl·lules, es va iniciar l'estratègia de cultiu en continu amb una concentració de cèl·lules de 1.6 g PSC/l. El cabal emprat va ser de 8.3 ml/minut. La velocitat de dilució al llarg de tot el cultiu fou de $D = 0.498 \text{ h}^{-1}$, que correspon a un temps de residència de 2 h. Es va escollir aquesta velocitat de dilució d'acord amb la velocitat específica de creixement màxima de la soca en aquest medi en cultiu discontinu, que era de 0.73 h^{-1} de forma que la velocitat de treball fos prou baixa per evitar el rentat de cèl·lules del reactor, però al mateix temps prou alta per permetre dur a terme l'experiment en un temps relativament curt. Les mostres es van analitzar per determinar la concentració de biomassa,

glucosa a l'entrada i a la sortida i acetat o altres metabòlits en el brou de fermentació.

Es van assolir cinc estats estacionaris, variant la concentració de glucosa al medi d'entrada, tot i mantenint sempre la mateixa velocitat de dilució. Per a cada estat estacionari s'esperava un rang de temps de residència de 3 a 5 a unes condicions constants. Es va estudiar el comportament del cultiu, des d'una concentració de glucosa en el primer estat estacionari de 18 g/l, fins a 2.7 g/l en el darrer. Els resultats d'aquest cultiu es mostren a la figura 3.11 i es sumarietzen a la taula 3.3.

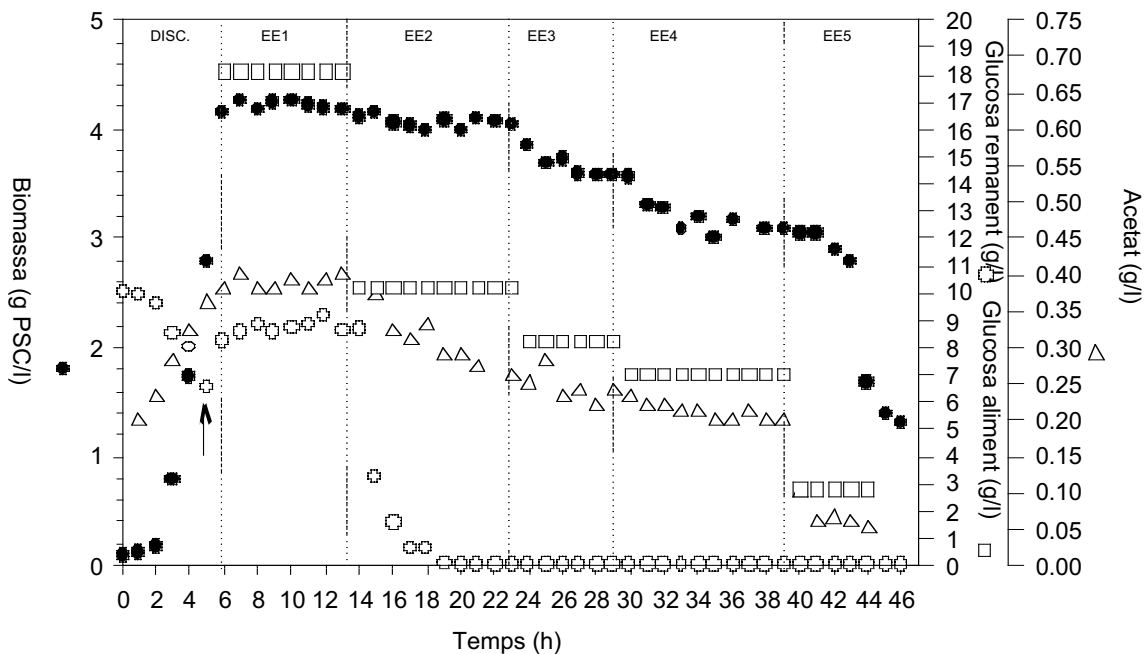


Figura 3.10: Evolució de la concentració de biomassa, glucosa a l'entrada i a la sortida del tanc i acumulació d'acetat en un cultiu continu de *E. coli* K12 salvatge, a una velocitat de dilució $D = 0.49 \text{ h}^{-1}$. Cada estat estacionari (EE) es troba separat per una línia vertical, que indica el període en que es va mantenir sense canvis d'operació.

Es va iniciar el cultiu en continu amb una concentració de glucosa de 18 g/l perquè es pretenia començar l'experiment amb una concentració de glucosa que estigués en excés per a les cèl·lules. Després de 8 hores d'alimentació, la concentració de biomassa es va mantenir estacionària en uns 4.2 g PSC/l de concentració durant 4

temps de residència. En aquestes condicions la glucosa no era completament utilitzada i a la sortida hi havia 9.3 g/l de glucosa sobrant. L'acetat detectat a la sortida del reactor, en aquestes condicions, era d'uns 0.50 g/l. En aquesta situació, per cada gram de glucosa consumida es generaven 0.48 g de cèl·lules (PSC) i 0.05 d'acetat, i per cada gram de cèl·lules (PSC), 0.12 g d'acetat. Aquests valors estan d'acord amb els obtinguts en els cultius en discontinu i indiquen que per a un a concentració de glucosa en excés i a una velocitat específica de creixement de quasi 0.5 h^{-1} ($t_d=1\text{h}23 \text{ min}$) l'acetat segueix sent l'únic subproducte del metabolisme aeròbic, constituint aproximadament un 5% dels recursos que utilitzen les cèl·lules. Posteriorment es va reduir la concentració de glucosa al tanc d'entrada a 10 g/l. S'observà que la glucosa s'acabava consumint totalment i la població de cèl·lules, al veure limitats els seus recursos, anava disminuint la seva concentració dels 4.2 g PSC/l als 4.0 g PSC/l. Aquest segon estat estacionari s'allargà quasi 9 hores.

	Glucosa _{ent}	Glucosa _{sor}	Biomassa	Acetat	$Y_{X/Glc}$	$Y_{Ac/Glc}$
D=0.49 h^{-1}	g/l	g/l	g PSC/l	g/l	g PSC/g Glc	g Ac/g Glc
EE1	18	9.3	4.2	0.50	0.48	0.050
EE2	10	0	4.0	0.30	0.40	0.042
EE3	8	0	3.5	0.25	0.43	0.031
EE4	7	0	3.3	0.20	0.47	0.030
EE5	2.5	0	1.3	0.06	0.40	0.024

Taula 3.3: Resultats experimentals del cultiu en continu d' *Escherichia coli* K12 en medi mínim (M9E) amb alimentació de glucosa a diferents concentracions.

En els següents estats estacionaris, en que es va disminuir la concentració de glucosa en l'aliment des de 8 g/l fins a 2.5 g/l, no es va detectar, en cap cas, glucosa a la sortida del reactor. Es va poder apreciar com la concentració de cèl·lules va anar minvant des dels 4.2 g PSC/l inicials a 3.5 g PSC/l, quan l'alimentació era de 8 g/l. Quan es va assolir el següent estat estacionari

corresponent a una concentració de glucosa de 7 g/l es va reduir la concentració de biomassa a 3.3 g/l. En l'últim estat estacionari per una concentració de glucosa al aliment de 2.5 g/l, la concentració de biomassa es va reduir fins a 1.3 g PSC/l, es a dir de 2 g PSC/l menys de cèl·lules que en l'anterior estat estacionari. Aquest fet indicava que la glucosa no era suficient per a mantenir la població cel·lular, i que la glucosa era clarament limitant del creixement.

Pel que fa a l'excreció d'acetat, al anar disminuint la concentració de glucosa al tanc, tot i no detectar-se glucosa a la sortida es va seguir detectant acetat. Dels 0.5 g/l inicials es va passar a 0.30, 0.25 i 0.20 g/l en els successius estats estacionaris. Les cèl·lules, tot i trobar-se en situació de limitació de glucosa, seguien produint acetat. Es va reduir l'excreció d'acetat des dels 0.5 g/l inicials a 0.06 g/l, quan la població de cèl·lules era de 1.3 g PSC/l i l'alimentació de glucosa de 2.5 g/l. Això suposava que s'havia aconseguit reduir l'excreció d'acetat, però a costa de reduir la població de cèl·lules. El rendiment de producció d'acetat envers la glucosa (Y_{SHAc}) consumida fou de 0.05, 0.042 g/g, 0.031 g/g, 0.030 g/g i 0.024 g/g per cadascun dels estats estacionaris, el que representa entre un 5.7% i un 2.4% de la glucosa consumida. Aquest fet posava de manifest com la glucosa representa un factor important pel que fa a la producció d'acetat, i que la seva metabolització té un pes específic en l'acumulació d'aquest subproducte metabòlic.

Aquests valors de rendiment coincideixen amb els trobats per altres investigadors en cultius en continu per diferents soques d'*Escherichia*. Els rendiments de biomassa per quatre soques diferents d' *Escherichia coli* en cultius en continu en condicions limitants de glucosa a l'aliment es situen entre 0.44 i 0.47 g PSC/g glucosa consumida (Tempest i Neijssel, 1987). Reiling (Reiling *et al.* 1985), en canvi, situa el rendiment en 0.5 g PSC/g glucosa d'una soca d' *Escherichia coli* B. Per un altra banda Meyer i col·laboradors (Meyer *et al.*, 1984), en un experiment de cultiu en continu amb una soca recombinant de *E.coli* K12 i, a una taxa de dilució de 0.35 h⁻¹ en medi mínim amb 17 g/l de glucosa, troben que la velocitat específica màxima

de producció d'acetat és de 0.03 g acetat/g glucosa·h. En aquest treball, a més a més, comparen la productivitat en medi definit i medi complex, essent en aquest darrer el doble que en el primer (0.07 g/g·h). Els mateixos autors mostren com a molt baixes velocitats de dilució ($D < 0.2 \text{ h}^{-1}$) arriben a no detectar acetat al corrent de sortida. Hi ha varis treballs en que s'intenta demostrar que a partir d'una velocitat de dilució determinada, les cèl·lules d' *Escherichia coli* deixen de produir acetat. Aquesta velocitat de dilució crítica varia segons les soques i condicions de cultiu, però es situa entre 0.17 h^{-1} (Korz *et al.* 1995) i 0.35 h^{-1} (Riesenberg *et al.* 1991).

Per tal de comprovar els resultats obtinguts en aquesta sèrie d'experiments en continu, es va realitzar un altre experiment en discontinu-alimentat, en que es forçaven unes condicions de limitació per glucosa. El medi inicial era M9E amb només 1 g/l de glucosa i s'afegia de forma constant un cabal de medi amb una concentració limitant de glucosa (1 g/l·h).

Les condicions de cultiu foren les habituals de temperatura 37°C , pH 7.0 amb ajust per addició de NaOH 7M, $p\text{O}_2$ al 30% de saturació, amb control per agitació entre 300 i 900 rpm, i cabal d'aire 1 vvm. El reactor utilitzat fou el Biostat-B i la bomba d'addició una bomba peristàltica de velocitat variable. Es va arrencar un cultiu discontinu segons el protocol habitual i quan la glucosa va esdevenir limitant pel creixement, fet que es detectava per una disminució sobtada del consum d' O_2 , es va arrencar la bomba d'alimentació i va començar l'addició constant de glucosa. Es van anar prenent mostres regularment i determinant la concentració cel·lular i de metabòlits en el brou. A la figura 3.12 es mostra el perfil de la corba de creixement i les concentracions de glucosa i acetat.

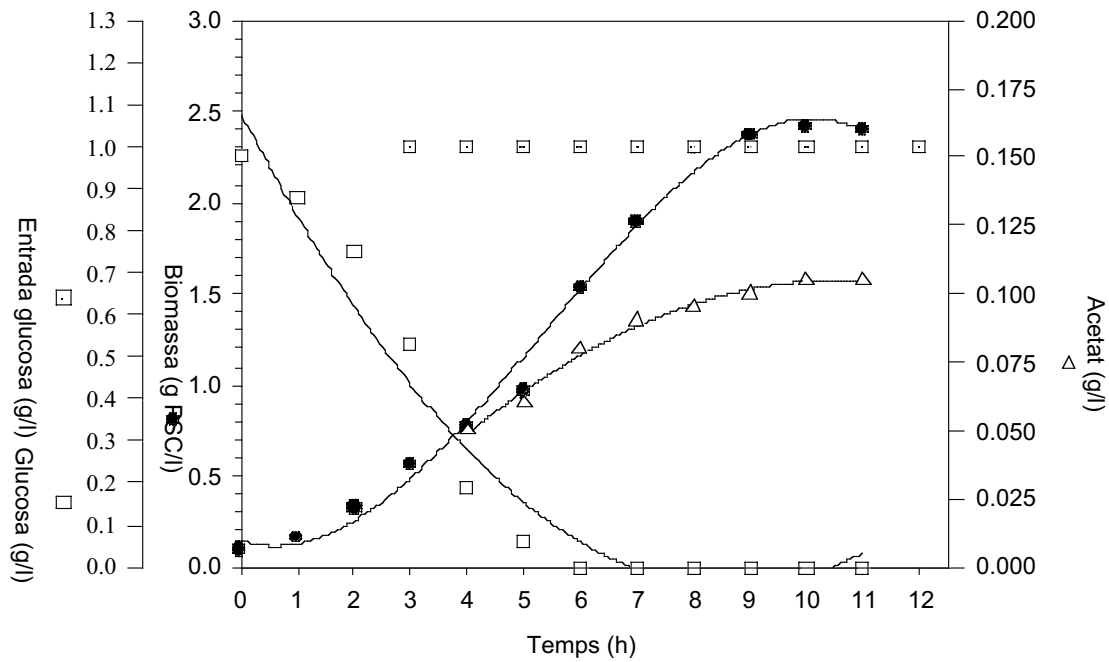


Figura 3.12: Evolució de la concentració de biomassa, glucosa i acetat en un cultiu discontinu-alimentat de *E. coli* K12 salvatge, a una velocitat d'alimentació de glucosa de 1 g/l·h.

La població de cèl·lules va assolir un valor de 2.4 g PSC/l a les 8 hores. A partir d'aquest moment no es va detectar increment de la concentració de cèl·lules i es va mantenir una velocitat de creixement zero durant la resta del cultiu. El consum de glucosa s'havia estabilitzat, un cop la concentració de biomassa havia assolit el seu màxim valor, donat que l'alimentació era constant i la concentració al reactor es mantenia nul·la. Durant les 4 hores següents la concentració d'acetat va anar augmentant progressivament. Aquest fet corroborava la constitutivitat de la síntesi d'acetat, ja que al no haver-hi extracció de brou de fermentació, com en el cultiu en continu, l'acetat s'anava acumulant malgrat que la concentració de biomassa es mantenia amb velocitat de creixement nul·la.

D'aquests resultats es desprèn que la soca d'*Escherichia coli* K12 produïa acetat inclòs en situacions de limitació de la font de carboni i creixement nul, i confirmava la hipòtesi que, a més a més de l'excés de glucosa, hi havia algun altre factor bioquímic amb base de tipus genètic, que feia que la cèl·lula produís acetat. Per una

altra banda l'alimentació de glucosa fa que la cèl·lula no activi els enzims del cicle del glicoliat, i per tant, l'acetat no pot ser utilitzat com a font de carboni alternativa a la glucosa, com s'observava en la fase final dels experiments en discontinu.

Si es recapitula la informació acumulada sobre aquest aspecte en els diferents experiments, discontinus, continus i discontinu-alimentat, es pot observar que, com més glucosa hi ha al medi, les cèl·lules són menys eficients en l'aprofitament de la font de carboni. A velocitats específiques màximes de creixement, com les que es donen en cultiu en discontinu, el rendiment de formació d'acetat és superior al que en condicions limitants del creixement per glucosa, com en el cas del cultiu en continu i discontinu-alimentat. Quan la glucosa es troba en excés hi ha la màxima conversió en acetat, que en la soca salvatge d'*Escherichia coli*, en medi mínim i amb una velocitat específica de creixement de quasi 0.50 h^{-1} és de l'ordre del 5% de la glucosa consumida: En condicions de limitació aquesta valor es redueix fins al 2%. Com s'ha vist anteriorment en cultiu discontinu en medi definit, quan les cèl·lules creixien més ràpid, prop de 0.70 h^{-1} , la taxa de conversió és de fins el 7% en la soca salvatge o del 14 % en la soca recombinant MC1061/pJCO46. A la bibliografia trobem soques que en determinades condicions arriben a desviar fins a un 28% de la font de carboni a la conversió d'acetat (El-Mansi i Holms, 1989). Quan es redueix la disponibilitat de glucosa al medi disminueix la seva conversió en acetat, però no s'arriba mai a eliminar completament la producció d'aquest subproducte metabòlic.

Al anar reduint la disponibilitat de glucosa es redueix proporcionalment l'excreció d'acetat. Reduir la velocitat d'alimentació de glucosa en cultiu en continu o en discontinu-alimentat, de manera que s'imposin concentracions limitants pel creixement, permet reduir la formació d'acetat i obtenir millors rendiments cel·lulars. Segons alguns autors (Rinas *et al.* 1989) la reducció de la velocitat específica de creixement i el manteniment de concentracions de glucosa limitants

del creixement al llarg del cultiu, permet millorar el creixement i alhora l'obtenció de proteïnes recombinants. Per aquest motiu són, ara per ara, les estratègies preferides de millora de l'eficiència de processos amb *Escherichia* (Riesenberg *et al.*, 1991).

Es pot afirmar, en base als resultats experimentals, que la soca K12 utilitzada en aquest treball excreta acetat de manera constitutiva, tant més com més elevada és la concentració de glucosa. Aquest fet és compartit per altres autors (Brown *et al.*, 1977) que demostren que l'expressió dels gens de síntesi/captació d'acetat (acetoquinasa i fosfotransacetilasa) és constitutiva al menys en les soques K d'*E.coli* quan creixen amb glucosa com a font de carboni. Per tant, l'eliminació de la seva formació hauria de tractar-se des d'un altre punt de vista, de manera que contemplés la modificació dels nivells d'expressió dels gens involucrats o responsables de la seva formació, però sense que això afectés el creixement cel·lular.

Es pot considerar que hi ha un factor genètic que determina la producció d'acetat. Cada soca, en funció de les condicions ambientals i en funció del seu genotip es comporta d'una o altra manera, adaptant-se enfront les diferents situacions d'excés i manca de glucosa, per aprofitar millor els recursos. Variant les condicions d'operació es pot regular en part la formació d'acetat. Malgrat això, l'eliminació de la producció d'acetat en soques K12 només podria ser aconseguida modificant el genotip de la soca bacteriana.

La explicació a aquesta situació pot venir donada si es considera que la producció d'acetat actua com una vàlvula de seguretat del metabolisme lligada al creixement. La cèl·lula modifica el seu metabolisme adaptant-lo a situacions de limitació de la font de carboni i, a major limitació de substrat, més eficient és en produir biomassa. El rendiment de formació de cèl·lules augmenta al disminuir la concentració de glucosa disponible en cultiu en continu. Aquest fet pot tenir una

explicació en el sentit de que les cèl·lules estan més acostumades a situacions de manca de nutrients que no pas d'excés. Els cultius en condicions limitants pel creixement són, de fet, més reals que els cultius en condicions d'excés, com els cultius en discontinu amb medis de composició complexa. El cultiu al laboratori normalment es realitza en condicions d'excés, condicions que s'allunyen de les que realment troba la cèl·lula en el seu hàbitat natural. Per això, la cèl·lula podria no estar metabòlicament preparada per a les situacions d'excés i respondria reconduint l'excedent de carboni en acetat. En certa manera, la producció d'acetat és la millor solució a la oxidació dels excedents de glucosa, ja que rendeix millor en termes energètics que d'altres subproductes no completament oxidats com el lactat i l'etanol. La principal diferència entre la formació d'acetat i la d'altres subproductes de la glucosa parcialment oxidats, és l'absència de l'oxidació del NADH_2 (figura 3.13) en la síntesi d'acetat. El NADH_2 és oxidat a NAD^+ durant la síntesi de lactat i etanol, fet que permet a la cèl·lula restituir el nivell de cofactors necessari per la glucòlisi. A més a més, l'acetat és, com ja s'ha comentat, el més tòxic dels subproductes que pot produir la cèl·lula.

Una vegada esgotada la glucosa la cèl·lula pot metabolitzar l'acetat i incorporar-lo a les VCM a nivell del CAT. No obstant, els enzims del cicle del glioxilat que permeten l'entrada d'Acetil-CoA, producte de la degradació de l'acetat per aquesta via, es troben inhibits durant el creixement en glucosa, i s'activen a *E. coli* només quan aquesta s'ha esgotat (Holms i Bennet, 1971). Per aquest motiu *Escherichia* no consumeix acetat fins que no s'ha esgotat per complert la glucosa. Tot i que la síntesi d'acetat és el segon mecanisme generador d'energia a partir de glucosa, la seva formació genera menys ATP i NADH_2 que la completa oxidació de la glucosa.

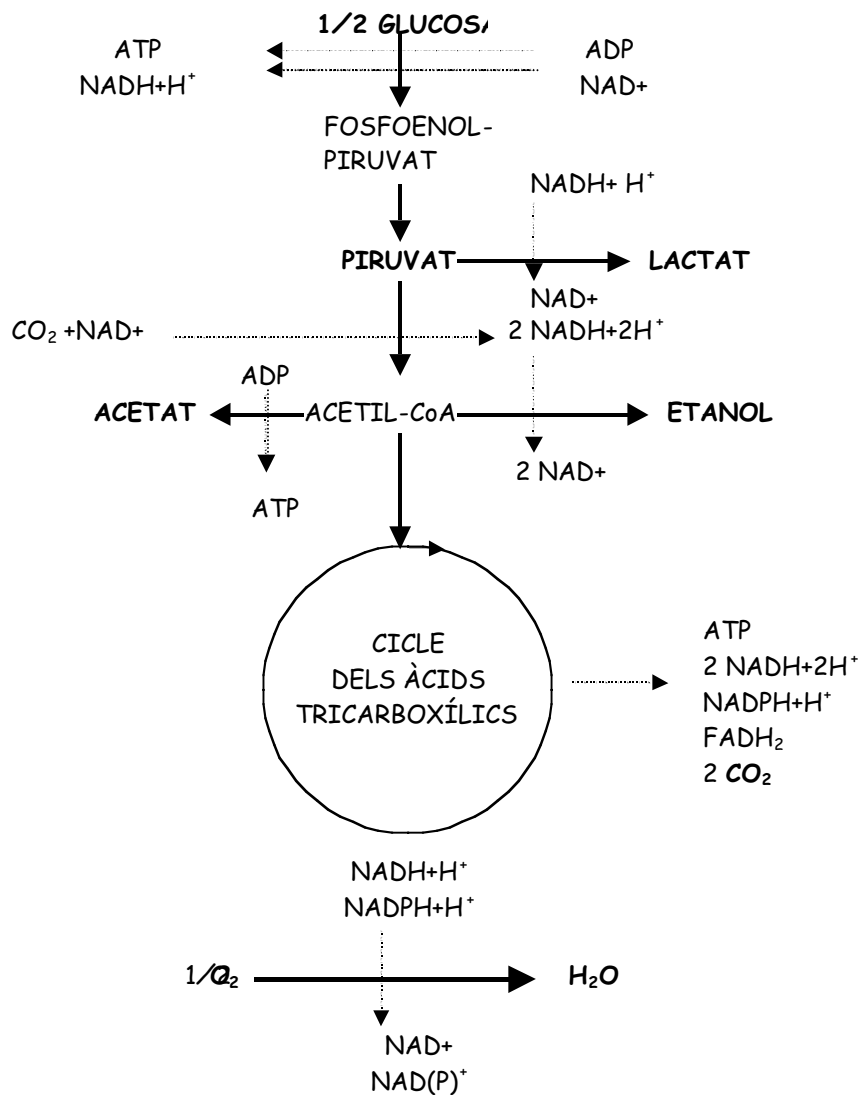


Figura 3.13: Representació de les vies centrals del metabolisme aerobi de glucosa a *Escherichia coli*. Les fletxes discontinues representen els llocs de fosforilació a nivell de substrat i els llocs de generació i regeneració de cofactors. El piruvat és reduït a lactat pel NADH. L'etanol un cop decarboxilat és reduït pel NADH. La respiració permet obtenir energia alhora que restituir els nivells de cofactors oxidats, necessaris per la oxidació de la glucosa en la glucòlisi.

Les possibles causes, que es recullen a la bibliografia per explicar la producció d'acetat a *Escherichia coli* són, que la cèl·lula té una capacitat limitada pel que fa a la velocitat de captació d'oxigen (Reiling *et al.*, 1985). Aquest autors justifiquen que quan la cèl·lula assoleix la seva màxima velocitat de captació d'oxigen, l'excedent de glucosa que no pot ser metabolitzada completament, és destinada a generar una molècula addicional d'ATP a través de la síntesi d'acetat. De fet l'explicació coincideix amb la donada per explicar la producció d'etanol pels llevats en condicions aeròbies (Sonnleitner i Käppeli, 1986). La segona possible causa justifica que l'acumulació de NADH_2 deguda a l'elevada activitat glucolítica, actuaria com a senyal per redirigir el flux de carboni cap a la síntesi d'acetat (Doelle *et al.*, 1982), tot i que aquest mecanisme no permet la seva regeneració. Segons aquests autors, elevades velocitats de dilució en cultiu en continu o elevades concentracions de glucosa en l'aliment inhibirien els enzims del cicle dels àcids tricarboxílics (CAT) i la cadena de transport d'electrons, fet que conduiria a l'acumulació intracel·lular de NADH_2 . Aquesta acumulació activaria la oxidació de piruvat fins acetat. Per últim, s'atribueix la síntesi d'acetat a la limitació de la capacitat del CAT en primera instància i a la de la cadena de transport d'electrons quan s'assoleixen elevades velocitats de creixement en segona instància (Han *et al.* 1991; Majewsky i Domach, 1990). A baixes velocitats de creixement els requeriments anabòlics i catabòlics podrien ser satisfets pel metabolisme oxidatiu, mentre que a elevades velocitats de creixement, ambdós requeriments excedirien la capacitat del metabolisme oxidatiu.

En aquest context es va plantejar examinar més a fons aquestes possibles causes de la formació d'acetat realitzant un model estequiomètric del metabolisme intracel·lular. Per assolir aquest objectiu, es requeria d'una eina que permetés interpretar el que succeeix a l'interior de la cèl·lula quan creix en condicions aeròbies amb glucosa com a única font de carboni i energia. Es va considerar que l'anàlisi dels fluxos metabòlics intracel·lulars mitjançant la seva estimació a partir d'un model matemàtic permetria obtenir una interpretació més concisa del

desacoblament del metabolisme i, ahora, proposar alguna modificació genètica que redistribuis els fluxos en el sentit de reduir la formació d'acetat i millorar el comportament de les cèl·lules. Aquesta eina, que es presenta en el següent capítol i s'utilitza per quantificar els fluxos metabòlics intracel·lulars d'*Escherichia coli*, servirà també per quantificar els canvis deguts a les modificacions genètiques que es van realitzar i que es presentaran en el darrer capítol.