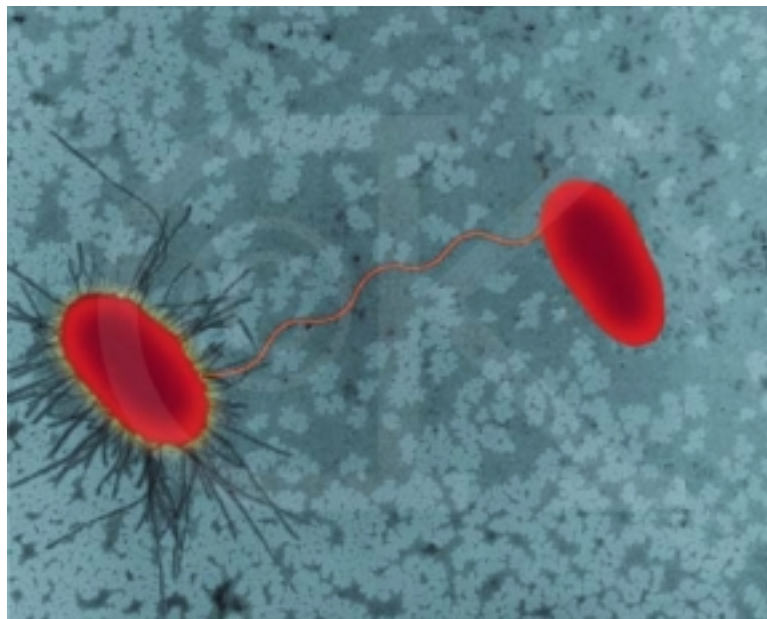




**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA**



**ENGINYERIA METABÒLICA DE CÈL·LULES
D'*Escherichia coli*. EFECTE SOBRE EL
CREIXEMENT, EL CONSUM DE GLUCOSA I LA
SECRECIÓ DE SUBPRODUCTES**

Memòria que presenta PAU VILA i CASES
per optar al grau de Doctor per la
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, Maig 2001

FRANCESC GÒDIA i CASABLANCAS, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JORDI JOAN CAIRÓ i BADILLO, Professor associat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat en Biologia **PAU VILA i CASES** ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol de: **"ENGINYERIA METABÒLICA DE CÈL·LULES D'*Escherichia coli*. EFECTE SOBRE EL CREIXEMENT, EL CONSUM DE GLUCOSA I LA SECRECIÓ DE SUBPRODUCTES"** es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per a optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per a que en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació,

Bellaterra, Maig de 2001

Francesc Gòdia i Casablanças

Jordi Joan Cairó i Badillo

ÍNDEX

ÍNDEX

Cap.	Pàg.
RESUM	1
1. INTRODUCCIÓ	6
1.1. L'ús de microorganismes per la societat humana	6
1.2. La diversitat de microorganismes emprats en biotecnologia	7
1.3. Fermentació d' <i>Escherichia coli</i>	19
1.4. Estratègies de millora de l'eficiència de processos de fermentació	28
1.5. Enginyeria Metabòlica	36
2. OBJECTIUS	43
3. CARACTERITZACIÓ FISIOLÒGICA D' <i>Escherichia coli</i> EN CULTIUS EN SUSPENSIO	45
3.1. Introducció	45
3.2. Cultiu d' <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46 en matràs agitat en medi complex LB i semicomplex CAM9E	48
3.3. Cultiu discontinu d' <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46 en bioreactor en medi complex LB	52
3.4. Cultiu discontinu-alimentat d' <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46 en medi complex LB	55
3.5. Cultiu discontinu d' <i>Escherichia coli</i> K12 en medi semicomplex CAM9	58
3.6. Cultiu discontinu-alimentat d' <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46 en medi CAM9E	66
3.7. Cultiu discontinu d' <i>Escherichia coli</i> K12 i <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46 en bioreactor en medi definit M9E	69
3.8. Efecte de l'acetat sobre el creixement i l'expressió de gens recombinants a <i>Escherichia coli</i> MC1061/pJCO46	73
3.9. Cultiu en continu i discontinu-alimentat d' <i>Escherichia coli</i> K12 en medi definit M9E en condicions de limitació de la concentració de glucosa a l'aliment	79
4. TRACTAMENT QUANTITATIU DEL METABOLISME CEL·LULAR D' <i>Escherichia coli</i> K12	91
4.1. Introducció	91

4.2	Modelització matemàtica del metabolisme: anàlisi de fluxos metabòlics	92
4.3	Plantejament matemàtic del model estequiomètric de determinació de fluxos	100
4.4	Establiment de la xarxa metabòlica i construcció de la matriu de coeficients estequiomètrics	109
4.5	Vector de velocitats específiques q	122
4.6	Composició cel·lular d' <i>Escherichia coli</i>	126
4.7	Obtenció dels fluxos metabòlics intracel·lulars d' <i>Escherichia coli</i> K12 en cultiu discontinu	129
4.8	Distribució dels fluxos metabòlics intracel·lulars durant el creixement aeròbic d' <i>Escherichia coli</i>	134
4.9	Anàlisi dels fluxos metabòlics durant el creixement aeròbic d' <i>Escherichia coli</i> en glucosa	136
4.10	Extensió a altres soques d' <i>Escherichia coli</i> i altres tipus cel·lulars	145
4.10.1	Cultiu d' <i>Escherichia coli</i> BL21	146
4.10.2	Cultiu del llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	149
4.10.3	Cultiu d ^e cèl·lules animals: l'hibridoma KB26.5	155
5.	ENGINYERIA METABÒLICA DE CÈL·LULES D' <i>Escherichia coli</i>	162
5.1.	Introducció	162
5.2.	Conseqüències metabòliques d'una modificació genètica que afecta el flux d'entrada de glucosa a la cèl·lula a través del sistema de transport PTS a <i>Escherichia coli</i>	164
5.3.	Modulació del flux glucolític mitjançant tècniques de RNA-Antisentit. Efecte de la disminució dels nivells de l'enzim EIICB ^{Glc} del PTS sobre la formació d'acetat	177
5.4.	Efecte de la sobreexpressió del gen <i>ppc</i> de la fosfoenolpiruvat carboxilasa (PEPC) a <i>Escherichia coli</i> K12 sobre la formació d'acetat	192
6.	CONCLUSIONS	204
7.	MATERIAL I MÈTODES	207
7.1.	Instrumentació general de laboratori	207
7.2.	Línies cel·lulars i vectors plasmídics	208
7.3.	Medis de cultiu	219

7.4.	Sistemes i estratègies de cultiu de cèl·lules	229
7.5.	Determinació dels paràmetres de seguiment d'un cultiu per mètodes analítics	239
7.6.	Tècniques de biologia molecular	246
8.	BIBLIOGRAFIA	267
9.	ANNEXES	293
A.1.	Nomenclatura	
A.2.	Llistat dels fluxos metabòlics intracel·lulars per les soques d' <i>Escherichia coli</i> modelitzades	

RESUM

RESUM

En l'àmbit dels processos biotecnològics molts productes d'interès es produeixen per fermentació bacteriana i especialment, pel que fa a proteïnes recombinants, a partir del cultiu d'espècies com *Escherichia coli*. Aquest bacteri ha sigut també protagonista en molts dels avenços realitzats tant en el camp dels processos de fermentació, com de la biologia molecular, i ha servit de model cel·lular per a estudis tant bioquímics, genètics com fisiològics. La facilitat del seu cultiu al laboratori, degut al relatiu baix cost dels medis emprats per al seu creixement i a l'elevada velocitat de duplicació que presenta, junt amb l'extens coneixement que es disposa de la seva fisiologia i genètica, fan que sigui un dels sistemes cel·lulars preferits per a l'estudi i obtenció de proteïnes recombinants.

Entre els processos de cultiu de cèl·lules, l'estratègia més emprada és el cultiu discontinu en bioreactors de tanc agitat. Tot i que els bioreactors on es realitzen els cultius proveeixen a la població bacteriana les condicions físiques i químiques òptimes pel seu creixement, en els cultius en discontinu l'ambient va canviant al llarg del procés i els nutrients van desapareixent a mesura que s'acumulen al brou de fermentació els productes i metabòlits. Paral·lelament a l'obtenció de productes bacterians l'acumulació de subproductes del metabolisme moltes vegades resulta tòxica per a la cèl·lula impedit continuant amb el creixement de la població i reduint l'eficiència el procés. Aquest darrer aspecte és un dels factors clau alhora d'intentar millorar l'eficiència d'un procés.

La millora de l'eficiència de processos es pot abordar tant des de l'enfoc de l'enginyeria de processos com des de l'enfoc de l'enginyeria genètica. En el primer cas la millora passa en primer lloc, per l'adequació de la composició del medi de cultiu i en segon lloc, per establir el mode d'operació de cultiu en bioreactor més apropiat. Cada cop més s'estan incorporant dins les disciplines de l'Enginyeria Bioquímica les aproximacions que lliguen el coneixement quantitatiu del

metabolisme de les cèl·lules amb la seva utilització en fermentadors i pretenen també, mitjançant les tècniques del DNA recombinant, modificar les activitats cel·lulars per tal de reconduir-les. A partir de modificacions genètiques que afecten a enzims clau de les vies centrals del metabolisme es pot incidir en la manera que la cèl·lula creix a les condicions imposades pel seu cultiu en fermentador. Aquesta disciplina de treball es coneix com Enginyeria Metabòlica i ha adquirit força interès en els darrers anys com a estratègia complementària per la millora de l'eficiència de bioprocessos.

En aquest treball s'ha realitzat una caracterització fisiològica i metabòlica d' *Escherichia coli* en cultiu en bioreactor per tal d'obtenir les claus que permetin una millora de l'eficiència del procés des de l'enfoc de l'Enginyeria Metabòlica. Per a realitzar aquesta caracterització, s'han realitzat cultius en discontinu en diferents medis, de composició nutricional complexa, semicomplexa i definida, així com cultius en discontinu-alimentat i cultius en continu en condicions de limitació de la font de carboni. Per contra de l'esperat, el cultiu en medis de composició nutricional complexa, que contenen tots els nutrients necessaris per al creixement d'aquest bacteri, no suposa el millor medi per a l'obtenció de densitats cel·lulars elevades. A partir dels resultats d'aquests estudis s'ha identificat un factor que impedeix millorar l'eficiència d'un procés: l'excreció i acumulació de subproductes. L'acetat és el principal subproducte metabòlic en cultius aeròbics d' *Escherichia coli* en medis glucosats. L'acetat impedeix perllongar el creixement i assolir elevades densitats cel·lulars, ja que inhibeix el creixement a partir de 5 g/l de concentració. El cultiu discontinu-alimentat i el cultiu en continu en condicions limitants de la velocitat específica de creixement permeten reduir, però no eliminar, la seva producció en soques d'*Escherichia coli* K12. En aquestes la producció d'acetat s'ha vist que és constitutiva. Per un altre costat l'acetat inhibeix l'expressió de gens recombinants i, per tant, si aquest és el producte desitjat, és del tot convenient reduir la seva formació i acumulació per tal de que no es vegi reduïda la producció de proteïnes recombinants.

Per tal de realitzar un estudi a nivell quantitatiu del metabolisme cel·lular i esbrinar les causes de la formació de subproductes cal caracteritzar el que succeeix dintre la cèl·lula quan creix al fermentador. Els fluxos metabòlics intracel·lulars permeten relacionar la fisiologia i el metabolisme de la cèl·lula en creixement. Aquesta informació sobre el comportament intracel·lular i la seva quantificació és necessària per tal de poder orientar i plantejar modificacions genètiques de la cèl·lula per tal de redistribuir el seu metabolisme. La necessitat de disposar d'una eina que permeti conèixer a fons el que succeeix dintre la cèl·lula quan es cultiva al laboratori va motivar el desenvolupament d'un model matemàtic d'estimació de fluxos metabòlics intracel·lulars d'*Escherichia coli* en cultiu en discontinu, basant-se en les equacions de balanç de matèria, tot assumint la hipòtesi de l'estat quasi-estacionari. Només si es disposa d'aquesta informació es pot decidir quina o quines reaccions intracel·lulars del bacteri són potencialment interessants de modificar genèticament, ja sigui accelerant o disminuint el flux a través d'elles.

Per tal de construir aquest model, s'ha establert la xarxa metabòlica de la cèl·lula en qüestió i s'han determinat experimentalment les velocitats específiques de creixement, de consum de substrats i de producció de metabòlits. A partir del model plantejat, el coneixement de la composició cel·lular d'*Escherichia coli* i les dades experimentals de consum i producció, s'han obtingut els fluxos metabòlics intracel·lulars.

L'anàlisi dels resultats (distribució dels fluxos a través de la xarxa metabòlica del model) ha revelat que existeix un desajust entre la capacitat de captació i degradació de la glucosa fins a piruvat, producte final de la glucòlisi, i la d'incorporació d'Acetil-CoA al cicle dels àcids tricarboxílics (CAT), cicle que proveeix a la cèl·lula dels intermediaris necessaris per a la formació de nova biomassa i l'energia necessària per a la seva formació. Aquest desajust impedeix a la cèl·lula aprofitar tota la glucosa captada per a funcions de biosíntesi i l'excreció

d'acetat representa una vàlvula de seguretat pels excedents que la cèl·lula no pot aprofitar en la generació de nova biomassa i CO_2 . L'acumulació d'acetat al brou de fermentació representa un esforç creixent per al manteniment de la homeòstasi cel·lular i la cèl·lula ha de destinar cada cop més recursos en aquesta tasca. Aquest fet suposa una disminució de l'eficiència de conversió de substrats en biomassa i productes, fet que es tradueix en un efecte d'inhibició del creixement i reducció de la síntesi de proteïnes recombinants.

Aquest desajust metabòlic no és un fet aïllat d'*Escherichia coli* K12. La soca d'*Escherichia coli* BL21 produeix lactat enlloc d'acetat com a subproducte majoritari. Altres sistemes cel·lulars com els llevats del gènere *Saccharomyces* o cèl·lules animals, com un hibridoma, presenten comportaments anàlegs quan les cultivem fora del seu hàbitat natural. *Saccharomyces* produeix etanol com a subproducte del metabolisme aeròbic quan hi ha excés de glucosa al medi. L'hibridoma i altres línies cel·lulars animals, produeixen una gran quantitat de lactat com a resultat del seu metabolisme aerobi quan es cultiva en bioreactor. En tots els casos la cèl·lula ha de dissipar l'excedent de glucosa en forma d'un o altre subproducte, que a banda de resultar tòxic a elevades concentracions, representa un malbaratament de la font de carboni.

Per tal de modificar aquest comportament a *Escherichia coli*, s'han identificat els enzims involucrats en les reaccions, suposadament causants del desajust metabòlic, s'han aïllat els gens i regulat la seva expressió mitjançant plasmidis d'expressió adequats, que es mantenen establement en la soca d'*Escherichia coli*. Així, en base a l'anàlisi de fluxos metabòlics intracel·lulars realitzat en aquest treball, s'han escollit com a dianes, la reacció d'incorporació de glucosa a la cèl·lula a través del sistema de transport de la fosfotransferasa dependent de fosfoenolpiruvat (PTS) i la reacció anapleròtica de reompliment del CAT catalitzada per l'enzim fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC). En el primer cas es pretén reduir la velocitat de captació de glucosa, i en el segon cas, augmentar la

velocitat de reompliment del CAT, alhora que reduir el col·lapse a nivell de l'Acetil-CoA. En ambdós casos es pretén balancejar el creixement en cultiu discontinu, reduint la formació de subproductes.

Un cop obtinguts els clons recombinants, el cultiu discontinu aeròbic en bioreactor de les soques modificades genèticament i, l'anàlisi dels fluxos metabòlics intracel·lulars estimats a partir del model desenvolupat, han revelat l'efecte de les modificacions de manera quantitativa. La sobreexpressió o reducció dels nivells d'expressió dels gens diana, específics de les reaccions escollides, ha permès modificar el metabolisme cel·lular redistribuint els fluxos metabòlics. El plasmidi d'expressió induïble del gen *ptsG* que codifica per el component EIICB^{Glc} del PTS no ha permès reduir la velocitat de captació de glucosa i la secreció d'acetat. No obstant, la reducció dels nivells de traducció del gen *ptsG* per tècniques de RNA-antisentit, i per tant la disminució del nombre de components transportadors EIICB^{Glc} disponibles, sí que ha permès reduir lleugerament la velocitat de captació de glucosa i, de manera més apreciable, la formació d'acetat respecte la soca control, que expressa constitutivament el gen *ptsG*. Per un altra banda, la redistribució dels fluxos per sobreexpressió del gen *ppc* de la fosfoenolpiruvat-carboxilasa, ha permès reduir la formació d'acetat a *Escherichia coli* K12 fins a un 20% respecte la soca salvatge, tot i que aquest fet no ha resultat en una millora de l'eficiència del procés, ja que també s'ha vist afectat el creixement.

La modificació dels fluxos metabòlics, no sempre ha operat en el sentit desitjat fent que la modificació genètica tingui un efecte favorable sobre el metabolisme de la cèl·lula. Malgrat tot, l'estratègia que ofereix l'Enginyeria Metabòlica demostra tenir un gran potencial, i s'ha de seguir explorant cada cop més, desenvolupant models més fidedignes que tinguin en compte els mecanismes de control i regulació cel·lular, i realitzant modificacions genètiques múltiples, per tal d'obtenir sistemes més eficients i senzills de cultivar.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. L'ÚS DE MICROORGANISMES PER LA SOCIETAT HUMANA

Els microorganismes són importants per varies raons, entre elles particularment, perquè produeixen una gran quantitat de productes d'interès per a la societat humana (Demain, 1990). Intervenien en l'elaboració de molts productes alimentaris de consum: el pa, el vi, la cervesa i qualsevol altre beguda alcohòlica, els derivats làctics, com el iogurt, els formatges i els embotits, són exemples ben quotidians de productes de les transformacions per microorganismes. Gràcies a l'acció de determinats microorganismes es pot preservar la carn, la llet o la fruita de malmetres per efecte de microorganismes no desitjats. Per exemple, l'acció de bacteries productores d'àcid làctic com *Lactobacillus* o *Streptococcus* (que produeixen i toleren concentracions relativament elevades d'àcid làctic), impedeix la contaminació per altres bacteries que no tenen la capacitat de créixer en ambients acidificats (per acumulació d'àcid làctic). D'aquesta manera els competidors són eliminats, quasi per complert, a mesura que els lactobacils colonitzen el medi, alhora que els aliments "fermentats" adquireixen propietats organolèptiques addicionals. En aquest sentit es pot dir que l'home utilitza els microorganismes des de l'inici de les civilitzacions, tot i que fos de manera inconscient.

Fins al segle XIX es creia que aquestes transformacions que patien els aliments eren generades per les condicions ambientals de manera espontània. Els treballs de científics com Robert Koch (1843-1910) o Louis Pasteur (1822-1895) van demostrar per primer cop que tant les transformacions que sofrien els aliments com la descomposició de la matèria orgànica o el desenvolupament de les malalties infeccioses eren conseqüència de l'acció de microorganismes, i van posar de manifest

la importància de desxifrar i conèixer la naturalesa i la forma d'actuar d'aquests (Buican, 1994). El desenvolupament de mètodes microbiològics, sobre tot motivats per aplicacions mèdiques, va permetre aïllar-los i posteriorment mantenir-los en cultiu pur. La identificació en primer lloc, i el coneixement progressiu de la genètica, bioquímica i fisiologia dels microorganismes, va permetre determinar en molts casos la relació causa/efecte d'una transformació microbiana d'interès per a l'home. Aquesta fou la base per al ús creixent dels microorganismes en la indústria, i va impulsar el naixement d'una nova disciplina que coneixem com a biotecnologia. Els camps mèdic i farmacèutic, químic, veterinari, agro-alimentari i medi ambiental entre d'altres, s'han beneficiat dels avenços que s'han realitzat en l'àrea de la biotecnologia. L'ús de microorganismes o productes derivats del seu cultiu amb fins mèdics i terapèutics és un camp en continua expansió i d'una importància capital, avui en dia, en la nostra societat.

Tot i que pot tenir diferents lectures, en general s'entén per *biotecnologia* l'explotació de sistemes i processos biològics, aprofitant el seu potencial en catalitzar un ampli ventall de reaccions bioquímiques amb un extraordinari nivell d'especificitat. La biotecnologia integra les ciències de la vida amb l'enginyeria per aconseguir que l'aplicació dels organismes, cèl·lules, parts de la cèl·lula i/o molècules derivades, reverteixi en la producció de bens i serveis d'interès per a la societat humana (European Federation of Biotechnology).

1.2. LA DIVERSITAT DELS MICROORGANISMES EMPRATS EN BIOTECNOLOGIA

Dins el terme microorganisme s'hi inclouen organismes tant diversos que pràcticament l'únic que tenen en comú és el fet de ser microscòpics. La gran majoria d'organismes utilitzats en biotecnologia són membres del regne Protista. Aquest regne, inclou els

bacteris, els fongs i dins aquests els llevats, les algues i els protozous. També inclou, com a representants no cel·lulars, els virus, paràsits intracel·lulars obligats. Comparteixen freqüentment l'estructura unicel·lular que els fa necessàriament petits i per tant, són considerats microorganismes. Malgrat aquesta característica comú, la diversitat d'aquest Regne ve exemplificada per la presència de membres tant d'estructura cel·lular procariota com eucariota. Fongs i llevats, i bacteris produeixen de forma natural un ampli ventall de substàncies amb aplicació en múltiples i variats camps d'interès per a la societat humana. En general els microorganismes produeixen aquests productes en molt baixes concentracions, les que necessiten per al seu propi benefici. La principal raó en utilitzar els microorganismes per a l'obtenció de productes, que també es poden aïllar d'altres fonts naturals vegetals o animals, és que es pot augmentar la seva producció per modificacions en l'ambient on creixen o bé per mutació i per manipulació genètica i, d'aquesta manera, fer més interessants els processos, tant en termes de reproducibilitat com des del punt de vista productiu. Un cop identificat un producte d'interès i la soca productora, es pot desenvolupar un programa de millora que permeti augmentar l'obtenció del producte (Demain, 1988). Els antibiòtics en són, per la enorme importància mèdica i econòmica del seu ús, un bon exemple.

A part dels avenços realitzats en la tecnologia de fermentació que han estat essencials en el desenvolupament de la biotecnologia, els avenços en genètica, bioquímica i biologia molecular dels darrers vint-i-cinc anys, han estat els impulsors del seu creixement actual. Els mètodes de recombinació del DNA, han proveït de noves estratègies per augmentar l'eficiència de processos, i han permès l'obtenció d'un gran nombre de substàncies d'interès. Avui en dia, és possible introduir de manera rutinària gens d'origen divers en cèl·lules hoste com bacteris i llevats per a obtenir-ne un producte d'interès per a l'home. L'espectre de processos biotecnològics que es poden realitzar a escala industrial, per obtenir tant productes naturals dels

microorganismes com nous productes recombinants augmenta de forma progressiva (Murooka 1990; Demain i Solomon, 1981).

A tall d'exemple, i per tal d'il·lustrar la gran diversitat de microorganismes que s'empren en múltiples bioprocessos, s'en fa a continuació un recull. En aquest, es diferencien quatre tipus de processos, segons si el producte són les pròpies cèl·lules, si es tracta de biotransformacions degudes a elles, si es tracta de l'obtenció de productes microbians de baix pes molecular, i finalment si es tracta de l'obtenció de productes d'elevat pes molecular (Higgins *et al.* 1985; Demain, 2000).

Obtenció de cèl·lules

Hi ha nombrosos exemples en que el producte desitjat són les pròpies cèl·lules o transformacions degudes al metabolisme general d'aquestes.

Proteïna unicel·lular: degut a que la producció de proteïna microbiana és més eficient i assequible que la proteïna animal (1 Kg d'aliment per a una vedella rendeix 68 grams de carn, mentre que 1 Kg de sucre i algunes sals inorgàniques de nitrogen rendeixen quasi 10 vegades més de biomassa cel·lular del fong *Fusarium graminearum* (Kharatyan, 1978)), en els anys 50 es va considerar la possibilitat de produir-la per a consum humà i animal. Es va englobar dins el terme "single-cell protein" (SCP) qualsevol producte alimentari format per cèl·lules de bacteris, llevats, fongs, algues, o extractes proteics d'aquests per ús alimentari humà i animal. Tot i l'elevat contingut en proteïnes també conté greixos, carbohidrats, àcids nucleics, vitamines i minerals. L'aplicació al consum humà no ha progressat sobretot per l'elevat contingut en àcids nucleics presents en aquest producte. Es van arribar a comercialitzar amb èxit varis productes per consum animal (per ex. *Pseudomonas methylophilus* o *Candida utilis* (Ciferri *et al.* 1985)). Avui en dia són suplementos nutricionals comuns en pinso i aliments per animals, però la seva viabilitat depèn en gran mesura del cost dels substrats utilitzats pel creixement del microorganismes i del rendiment d'obtenció de biomassa a partir d'aquests. No

obstant, la millora de la qualitat de l'alimentació humana amb l'enriquiment d'aliments amb cèl·lules d'origen bacterià (flora intestinal humana: *Bifidus*) o de llevats (llevat de cervesa: *Saccharomyces*), o amb cèl·lules vives que milloren la flora intestinal, és un factor cada dia més considerat, contraposat a la utilització en massa de proteïna unicel·lular, però que reforça la qualitat d'un aliment afegint un component de qualitat.

Cultius iniciadors ("starter cultures"): La indústria alimentària utilitza els cultius de cèl·lules com a desencadenant de tota una sèrie de transformacions d'aliments. Els cultius iniciadors per a la transformació de la llet en iogurt (cultius de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, i més recentment els bacteris d'origen humà com *Bifidobacterium bifidus*), o en formatges (on són apreciats per exemple els gèneres com *Leuconostoc* o *Penicillium roquefortii* i *P.camembertii* pel curat de formatges blaus (Venema *et al.* 1987)) i altres derivats lactis permeten preservar els nutrients de la llet fent-los més estables a la degradació per microorganismes indesitjats i representen un bon exemple d'aquests productes. Si bé antigament aquestes transformacions les realitzaven els microorganismes contaminants de la flora de la llet, avui en dia, un cop pasteuritzada, s'afegeixen de manera controlada. Els llevats de panificació o de producció de begudes alcohòliques (*Saccharomyces cerevisiae* i altres espècies relacionades) en són un altre exemple de productes d'enorme importància per l'home. En el sector càrnic són també imprescindibles pel curat i maduració de la carn en la producció d'embotits (moltes espècies del gènere *Lactobacillus*, *Micrococcus* o *Staphylococcus* són exemples comuns de transformacions de la carn en processos industrials (Walker *Ed.*, 1988)).

Vacunes bacterianes i víriques: L'ús de bacteris sencers inactivats per a la producció de vacunes és un altre exemple d'aquest grup de productes. Algunes vacunes com la de la diftèria o el tètanus estan formades per exotoxines, produïdes per bacteris, inactivades per calor (*Corynebacterium diphtheriae* i *Clostridium tetani* respectivament), altres per components cel·lulars, com flagels i fimbries de bacteris Gram negatius, que un cop purificats s'utilitzen com immunògens. No obstant, moltes

altres vacunes com la del còlera, febre tifoidea i paratifoidea són suspensions de bacteris inactivats amb agents químics com el fenol o l'acetona. La vacuna contra la tuberculosi usa bacteris vius atenuats (*Mycobacterium bovis*). El risc potencial d'infecció per l'hoste mostrat per algunes d'aquestes vacunes va fer que, amb l'aparició de la tecnologia del DNA recombinant, es comencessin a obtenir vacunes, anomenades de nova generació, que contenen només els antigens específics que indueixen la generació d'anticossos per l'hoste, sense que aquest estigui en contacte directament amb l'agent causal. L'exemple més característic és el de la vacuna de l'hepatitis B, formada per l'antigen de superfície del virus produït pel cultiu d'un llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) recombinant.

Biotransformacions

S'engloben en aquest apartat tots aquells productes obtinguts per biotransformacions degudes a l'activitat cel·lular. També s'inclouen en aquest primer grup els compostos de baix pes molecular obtinguts per bioconversió de substrats senzills. L'aplicació de microorganismes en l'indústria alimentària, com són la fermentació de la llet (per *Lactobacillus* i *Streptococcus*) o la producció de CO₂ en la indústria de panificació i la fermentació alcohòlica per llevats (com *Saccharomyces*) en la indústria enològica, són exemples de productes obtinguts per l'activitat cel·lular o biotransformació de substrats. Les bioconversions són processos en els quals el microorganisme transforma un substrat present en el medi en el producte desitjat i, en que no hi ha un producte com a tal, sinó que el resultat és producte de l'acció dels microorganismes sobre un substrat que pateix una transformació. La biotransformació té lloc mitjançant un petit nombre de reaccions enzimàtiques, per contraposició amb els productes obtinguts per fermentació (múltiples etapes de reaccions). Un dels exemples més coneguts de bioconversió és la transformació estereoselectiva de molècules amb grups funcionals. La conversió d'àcid fenilpirúvic en L-fenilalanina per *Escherichia coli*, o la conversió de progesterona en II- α -Hidroxiprogesterona per

Rhizopus nigricans i la conversió de D-sorbitol en L-sorbose per *Acetobacter suboxydans* són exemples representatius de bioconversions industrials.

Per una altra banda, però també dins aquest grup, trobem un dels processos que més efecte té en la qualitat de vida en els països desenvolupats, com és el tractament d'aigües residuals tant urbanes com agrícoles i ramaderes o industrials. El tractament biològic tant d'aigües residuals urbanes com industrials s'ha estès d'una forma molt notable en els darrers anys, de manera complementaria a les accions físiques i químiques comunament emprades en les depuradores. L'eliminació d'un substrat o conjunt de substrats no desitjats per acció de microorganismes és cada dia més utilitzada arreu, i contínuament s'estan desenvolupant processos més específics de depuració biològica d'aigües residuals. S'han identificat varis gens responsables de la degradació d'olis (Jack, 1991), pesticides, surfactants i hidrocarburs, i s'ha modificat genèticament gèneres com *Pseudomonas* per tal d'explotar aquestes possibilitats (Bu'Lock *et al.* 1982). Els llots actius o conjunt de microorganismes resultants de la depuració de les aigües residuals urbanes, són alhora el cultiu iniciador pels compartiments biològics de moltes estacions depuradores.

Una altra aplicació coneguda del ús de microorganismes o de la seva activitat és la dissolució de metalls a partir de minerals, principalment per recuperar coure, ferro i urani. L'extracció metal·lúrgica per biolixiviació la realitzen gèneres com *Thiobacillus*, *Leptosporillum* i *Sulpholobus* (Hutchins *et al.* 1986).

Compostos de baix pes molecular

Els microorganismes s'utilitzen per a la producció de compostos de baix pes molecular com aminoàcids, vitamines, àcids orgànics, alcohols i antibiòtics (Walker Ed., 1988). Aquests compostos, generalment produïts de forma natural durant el creixement, es poden subdividir en funció de la fase del creixement en que són produïts en metabòlits primaris i metabòlits secundaris. Els primers són productes essencials pel

creixement cel·lular. Els segons són metabòlits que es produeixen en fase estacionària del creixement i, per tant, no van associats ni són essencials directament a aquest.

Metabòlits primaris: les vitamines i aminoàcids són exemples de productes associats al creixement que es produeixen en petites concentracions (productes intermediaris del metabolisme), mentre que dissolvents com l'etanol o àcids com l'àcid làctic, es produeixen en concentracions més elevades (productes finals del metabolisme). Els productes finals del metabolisme com l'etanol, l'acetona o el butanol són els productes tradicionals per excel·lència de la indústria biotecnològica. Són productes obtinguts per fermentació en el sentit estricte ja que s'obtenen com a resultat del metabolisme anaerobi de carbohidrats. Els llevats, per exemple *Saccharomyces cerevisiae*, són freqüentment utilitzats per a la producció de dissolvents com l'etanol. El bacteri *Clostridium acetobutylicum* produeixen acetona i butanol en diferent proporció depenent de la soca. *Acetobacterium* i *Clostridium* produeixen eficientment àcid acètic. Diverses espècies de *Lactobacillus* produeixen àcid làctic. El gènere *Aspergillus* és utilitzat també per a la producció d'àcids orgànics com el cítric, glucònic i itacònic. Molts additius alimentaris, aromatitzants, preservants i acidulants són productes primaris del creixement. El glutamat monosòdic, potenciador del sabor produït per *Micrococcus glutamicus* o *Corynebacterium glutamicum*, la treonina, la lisina, el triptòfan o la fenilalanina s'obtenen del cultiu de soques sobreproductores d'aquests aminoàcids (gèneres *Brevibacterium* i *Corynebacterium* principalment). La riboflavina (vitamina B₂) és un altre exemple de producte usat com a suplement alimentici dins d'aquest grup. Vitamines, aminoàcids, i pigments són productes comunment emprats en la indústria de l'alimentació (Armstrong *et al.* 1986).

Metabòlits secundaris: els antibiòtics van ser els primers metabòlits microbians obtinguts industrialment que no eren productes finals del metabolisme (Strohl, 1997). Són productes inhibitoris del creixement de microorganismes diferents als productors que els hi confereixen una avantatge ecològica davant de possibles competidors. Són una de les principals substàncies terapèutiques humanes i animals.

La majoria són produïts per fongs i bacteris i van constituir els primers processos industrials que es van portar a terme a gran escala, degut a la elevada necessitat d'antibiòtics als anys 40. Són un exemple dels inicis de la indústria biotecnològica, amb la producció industrial de penicil·lina. Els gèneres *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cephalosporium* són els més interessants i comunament cultivats per la indústria farmacèutica per a l'obtenció d'antibiòtics antibacterians d'origen fúngic (Aoki *et al.* 1980), mentre que el gènere *Streptomyces* (bactèries filamentoses Gram positives de la línia dels Actinomicets) és el principal productor d'antibiòtics d'origen bacterià (estreptomicina, eritromicina, tetraciclina, etc.) (Parenti *et al.* 1979).

Compostos d'elevat pes molecular

Els productes d'aquest grup inclouen bàsicament els polisacàrids i les proteïnes. La producció comercial, sobretot de proteïnes, s'ha incrementat dràsticament en els últims anys gràcies a la tecnologia del DNA recombinant. Actualment és possible sobreproduir una proteïna, que normalment era sintetitzada en molt baixes concentracions, per sobreexpressió en un microorganisme diferent de l'original. Aquest fet ha permès augmentar les productivitats i fer viables molts d'aquests processos a nivell industrial.

Els polisacàrids han estat tradicionalment extrets de plantes, especialment de les llavors. L'obtenció d'aquest compostos mitjançant processos de fermentació enlloc dels teixits naturals on es troben, també ha facilitat molt la seva producció. El valor industrial dels polisacàrids resideix bàsicament en les seves propietats d'alterar el comportament reològic de solucions aquoses. S'usen com a gelificants, emulsionants, espesants, surfactants i tensioactius i tenen especial aplicació en la indústria alimentària i cosmètica (Byrom, 1987). També s'utilitzen en la indústria del petroli per a facilitar-ne la seva extracció. Alguns exemples de polisacàrids en són el xantà, additiu alimentari i gelificant en gelats (produït per *Xanthomonas campestris*), el

gellan, solidificant d'aliments (*Pseudomonas sp.*), el pullulan (*Aureobasidium pullulans*), o els dextrans (*Leuconostoc mesenteroides*).

Les proteïnes produïdes per microorganismes es poden subdividir segons el camp d'aplicació en dos grans grups: els enzims tècnics o d'utilització industrial que es produeixen en grans quantitats i les proteïnes terapèutiques, productes d'alt valor afegit que es produeixen en quantitats relativament petites. Els enzims tècnics o industrials presenten una gran varietat d'aplicacions i representen un elevat volum de negoci en l'àmbit de la biotecnologia, sobretot en la indústria de l'alimentació, farmacèutica i química en general. El primer enzim que es va produir a nivell industrial fou una α -amilasa d'*Aspergillus oryzae* per a la preparació de xarops de glucosa mitjançant la hidròlisi del midó. A partir del 1960 es van començar a incorporar als detergents proteases obtingudes del cultiu d'*Aspergillus oryzae* i de *Bacillus sp.* (proteasa alcalina). Les proteases alcalines representen el 25% de la producció total d'enzims d'origen microbià. Les amilases i la renina un altre 25%, i els enzims per a diagnòstic mèdic i anàlisi clínica un 10% del mercat (Walker Eds. 1988). Altres exemples són les isomerases com la glucosa isomerasa (*Bacillus coagulans*), les lipases (*Candida lipolytica*), les pectinases (*Aspergillus sp.*), β -glucanases (*Aspergillus niger*) i cel·lulases. Les endonucleases o enzims de restricció de DNA han adquirit una gran importància, i encara que en volum són minoritàries respecte els altres enzims esmentats, són proteïnes d'alt valor afegit, donada la seva aplicació a nivell de biologia molecular.

Un gran nombre de proteïnes terapèutiques s'obtenen actualment de microorganismes recombinants, és a dir soques o línies cel·lulars que expressen gens d'origen forani introduïts per tècniques de recombinació de DNA (Anicetti *et al.* 1989). S'han desenvolupat cèl·lules que sintetitzen proteïnes humanes amb potencial ús terapèutic. La majoria d'aquestes proteïnes es produeixen en concentracions traça en el cos, particularment si són hormones, i abans de la utilització de la tecnologia del DNA recombinant, moltes no eren comercialitzades degut al seu elevat cost d'obtenció i

purificació a partir dels teixits productors naturals. Alguns exemples de proteïnes recombinants amb aplicacions terapèutiques en humans són: els interferons per al tractament d'infeccions víriques o del càncer (Baron *et al.* 1990), la hormona humana del creixement, la insulina pel tractament de la diabetis, l'activador tissular del plasminògen (t-PA) i la uroquinasa per evitar la trombosi, l'interleuquina-2 i el factor de necrosi tumoral per a la teràpia del càncer, l' α_1 -antitripsina pels enfisemes, i l'eritropoietina pel tractament de l'anèmia. Altres exemples serien les vacunes de nova generació on l'immunògen és un antígen o part d'ell obtingut pel cultiu *in vitro* d'una cèl·lula hoste (Shuster, 1991).

Tot i que la tecnologia del DNA recombinant ha permès la introducció de gens foranis que codifiquen per proteïnes d'origen animal en bacteris i llevats, moltes d'elles requereixen modificacions post-traduccionals per a ser funcionals, i en aquests sistemes cel·lulars sovint no es poden realitzar (taula 1.1). Per exemple, els bacteris no són capaços de produir proteïnes glicosilades, mentre que tant els fongs i llevats com les cèl·lules animals sí. En molts casos els patrons de glicosilació són determinants per a l'activitat biològica de les proteïnes, i els fongs i llevats els poden tenir diferents de les cèl·lules animals. Altres modificacions post-traduccionals característiques dels organismes eucariotes són l'amidació, l'acilació i el trencament proteolític del pèptid precursor de la proteïna (Bebbington i Hentschel, 1985). L'estructura tridimensional i l'activitat resultant és potser l'aspecte més important per a la correcta funcionalitat d'una proteïna (Bermann i Lasky, 1985). Entre les glicoproteïnes que únicament poden dur a terme les respectives funcions en la seva forma nativa es troben, per exemple, l'antitrombina III, l'eritropoietina, el Factor IV de coagulació sanguini, l'hormona del creixement humà, l'activador del plasminògen (t-PA) i els anticossos monoclonals (Werner, 1993). Aquesta configuració tridimensional o no es pot formar o no es forma correctament en bacteris, fongs i llevats. Fins i tot, en el cas que la proteïna es sintetitzi correctament, és possible que el bacteri no tingui capacitat de secretar-la correctament a l'espai extracel·lular, dificultant així la recuperació del producte.

	Bacteris	Fongs i Llevats	Cèl·lules animals
Glicosilació	-	+	+
Fosforilació	-	+	+
Acilació	-	+	+
Amidació	-	+	+
Plegament	+/-	+/-	+
Proteolisi	+/-	+/-	+
Secreció	+/-	+	+

Taula 1.1: Comparació del processament post-traduccional de proteïnes recombinats expressades en bacteris, fongs i llevats i cèl·lules animals (Hu i Dodge, 1985).

L'espectre de productes d'interès sobretot en el camp del diagnòstic clínic i veterinari, així com pel tractament de malalties, ha augmentat considerablement gràcies al cultiu de cèl·lules animals en bioreactors a gran escala. Actualment s'estan obtenint vacunes virals (vacuna de la poliomelitis, xarampió, varola, ràbia...), limfocines (interferons i interleucines amb propietats antivirals i antitumorals), enzims terapèutics (com l'activador tissular de plasminògen (t-PA) fàrmac fibrinolític en l'infart de miocardi), hormones (com la eritropoietina o l'hormona del creixement), antígens tumorals (pel diagnòstic de tumors malignes) i anticossos monoclonals (per recerca científica, diagnòstic, purificació de proteïnes, teràpia...). La línia més utilitzada a nivell industrial, la CHO (cèl·lules d'ovari de hàmsster xinès) és força coneguda i s'han desenvolupat varis vectors d'expressió de gens per a l'obtenció de productes recombinants en aquesta línia cel·lular. També cal destacar l'ús d'hibridomes per a la producció d'anticossos terapèutics. Molts d'ells estan en fases avançades d'avaluació clínica i tenen un ús potencial molt important en medicina (Pharmaceutical Research and Manufacture of America: www.phrma.org).

En general, qualsevol tipus de cèl·lula adaptada a créixer en condicions de laboratori, i que pugui ser mantinguda de forma estable en cultiu pur, és susceptible de ser utilitzada en un procés industrial. Tot i la diversitat de sistemes cel·lulars emprats en biotecnologia, l'ús de bacteris i llevats segueix sent majoritari degut a la facilitat de cultiu que presenten, les elevades productivitats específiques que s'obtenen i a l'ús de sistemes i medis de cultiu més barats que en el cas de cèl·lules animals. Cada sistema cel·lular presenta avantatges i inconvenients, i segons el producte i l'aplicació que es requereixi, serà més apropiat un determinat sistema cel·lular.

D'entre tots els organismes esmentats, s'ha de destacar la contribució que ha suposat en el camp de la biotecnologia el bacteri Gram negatiu *Escherichia coli*, sobretot per la seva utilització tant en estudis de desenvolupament i millora de bioprocessos, com en estudis fonamentals per la innovació en la metodologia de recombinació del DNA (Plückthun, 1991). Aquest bacteri, va ser protagonista del descobriment dels vectors d'expressió plasmídics i pioner en el desenvolupament de la tecnologia de clonació gènica. És, avui en dia, la cèl·lula hoste més àmpliament utilitzada per a l'obtenció de proteïnes recombinants, i model d'estudi per a molts investigadors en l'àmbit de la fermentació bacteriana i genètica molecular (Murooka, 1990). Convé destacar que, a més a més, molts productes recombinants s'obtenen en els estadis inicials de desenvolupament dels processos productius, en sistemes d'expressió basats en el bacteri *Escherichia coli* i, posteriorment s'introdueixen en la línia cel·lular receptora final. Així, en molts casos, el pas per *Escherichia coli* és quasi obligat, prèviament a la introducció del gen heteròleg en la cèl·lula hoste productora final.

En el següent apartat es fa esment de la varietat de productes recombinants que s'obtenen del seu cultiu i, es mostra una llista d'exemples de proteïnes recombinants amb ús principalment terapèutic obtingudes pel cultiu d'*Escherichia coli* (taula 1.2).

1.3. FERMENTACIÓ D'*Escherichia coli*

Un dels processos més comú en el camp de la biotecnologia és la fermentació. El terme fermentació, derivat del llatí *fervere*, prové de descriure l'aparent ebullició o efervescència que es produeix per efecte del creixement de llevats al desprendre CO₂ en extractes de fruites i gra maltejat durant la producció de begudes alcohòliques. El procés de fermentació va ser descrit en primer lloc per L. Pasteur per definir un tipus de metabolisme que es realitza en absència d'oxigen. Avui en dia s'utilitza en dos sentits diferents tot i que sovint es solapen. Des d'un punt de vista estricte el terme defineix un grup de reaccions bioquímiques productores d'energia en forma d'ATP, que es donen en una cèl·lula creixent en condicions anaeròbies, on tant el donador com l'acceptor d'electrons són compostos orgànics. En un sentit més ampli, sovint utilitzat a nivell industrial, s'entén per fermentació tot procés en que el producte desitjat és obtingut pel creixement controlat i/o per l'activitat d'un microorganisme.

Els bacteris són organismes unicel·lulars que sovint presenten característiques compartides amb el món animal i vegetal. Possiblement des de el punt de vista evolutiu siguin les cèl·lules precursoras dels Regnes Vegetal i Animal. Els bacteris existeixen a la Terra des de fa 3500 milions d'anys, i han colonitzat qualsevol hàbitat, des del gel de l'Antàrtida fins a les fonts hidrotermals al fons dels oceans. No hi ha pràcticament cap hàbitat natural en el que no s'hi pugui aïllar algun bacteri. Han desenvolupat la majoria de rutes bioquímiques presents en els organismes vius actuals, així com rutes específiques restringides als bacteris, com per exemple la fixació de nitrogen. D'entre tots els protistes, els bacteris són els més simples en organització biològica. Les seves cèl·lules són d'estructura procariota. No presenten compartimentalització interna, ni orgànuls cel·lulars, típics de les cèl·lules eucariotes animals, vegetals, de protozous, algues i fongs (figura 1.1).

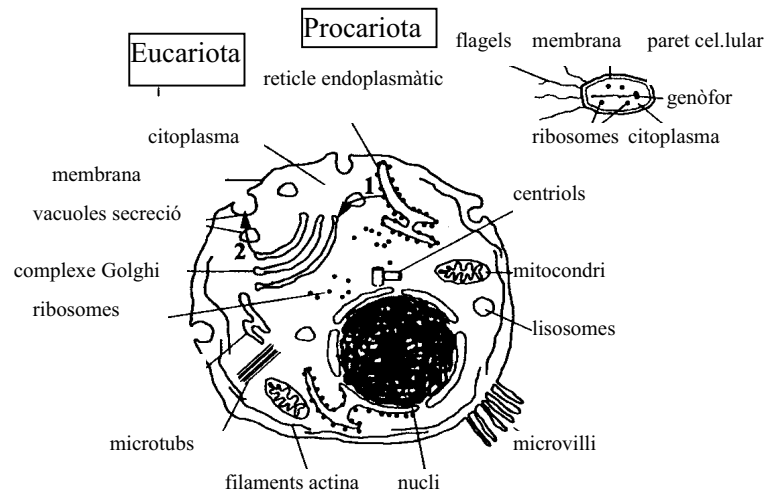


Figura 1.1: representació esquemàtica d'una cèl·lula eucariota animal i d'una cèl·lula procariota bacteriana.

La membrana citoplasmàtica és l'únic sistema de membrana unitària de la cèl·lula procariota. Tenen, a més a més, una grossa paret cel·lular, i alguns presenten una segona envolta anomenada membrana externa. El material genètic no està organitzat en cromosomes, i presenta una disposició irregular dins el citoplasma. Es parla de genòfor o cromosoma bacterià, per a diferenciar-lo del cromosoma de les cèl·lules eucariotes. Molts bacteris contenen també petites molècules circulars d'ADN extragenofòric, que es poden replicar de forma autònoma: els plasmidis. Sovint els hi confereixen propietats avantatjoses com resistència a antibiòtics o noves rutes bioquímiques que els permeten viure fora del seu ambient natural o competir amb avantatge per un substrat davant d'altres soques de la població característica de l'hàbitat.

Escherichia coli, membre de les bactèries del grup entèric (Eubactèries Gram negatives anaerobis facultatius no fotosintètics) fou aïllat a finals del segle XIX per un pediatra (Dr. Escherich) de les femtes d'un pacient malalt de còlera. Es va identificar posteriorment com a habitant natural de l'intestí de l'home i altres

vertebrats. Es troba universalment en les seves femtes i rarament en el sòl i aigua. És un bacil de forma recta o corba (figura 1.2), petit, d'aproximadament 1 μm de longitud i 0.5 μm d'amplada. És incapaç d'esporejar. És d'estructura Gram negativa, i per tant, presenta a més a més de la membrana cel·lular, una paret cel·lular o capa rígida de peptidglicà més petita que la dels bacteris Gram positius, una segona capa anomenada membrana externa i a vegades una segona envolta més laxa (que conté proteïnes, lipopolisacàrids i lipoproteïnes). Pel seu caràcter anaerobi facultatiu pot metabolitzar la glucosa i la lactosa tant en presència com en absència d'oxigen. *Escherichia coli* està adaptada a créixer en l'hàbitat intestinal. La seva contribució permet tenir una font suplementària de vitamines i permet aprofitar millor els aliments en el tram final del sistema digestiu. En aquest hàbitat es troba en competició directa amb un gran nombre de microorganismes de la flora intestinal, i té que adaptar-se a la situació intermitent de limitació nutricional imposada per l'hoste vertebrat. Per això utilitza molt efectivament els recursos disponibles a l'intestí. Capta sucres com la glucosa i la lactosa, petits pèptids i aminoàcids a més d'alguns àcids carboxílics amb gran avidesa.

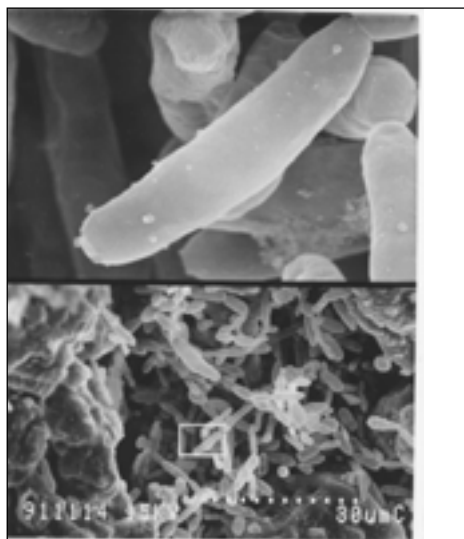


Figura 1.2: microfotografia electrònica de cèl·lules d'*Escherichia coli* (Servei de M.E./UAB). La línia puntejada correspon a 30 μm de longitud.

El cultiu de cèl·lules és un procés de tipus autocatalític, ja que el producte del seu metabolisme i creixement és l'augment de la seva concentració. El metabolisme cel·lular, a nivell bioquímic, es pot dividir segons si es tracta de reaccions de degradació o de biosíntesi. En les reaccions de degradació de substrats, el catabolisme, es dona una sèrie de reaccions que subministren principalment l'energia i els monòmers que conformaran els precursors dels components cel·lulars i, en les de biosíntesi, l'anabolisme, tenen lloc les reaccions de síntesi de molècules complexes i els seus precursors intermediaris. Aquestes dues activitats estan estretament lligades a nivell metabòlic. Trobem microorganismes que poden dur a terme aquestes funcions utilitzant l'oxigen, parlant-se en aquest cas de microorganismes aerobis, o bé sense utilitzar-lo, parlant-se en aquest altre cas de microorganismes anaerobis. També hi ha microorganismes de metabolisme facultatiu, és a dir que segons la disponibilitat d'oxigen o no, realitzen un tipus de metabolisme o altra. *Escherichia coli* pertany a aquest darrer grup. Respecte la temperatura òptima de creixement, trobem microorganismes que creixen a temperatures per sota de 20°C (psicròfils), altres amb una temperatura òptima entre 20 i 45°C (mesòfils) i altres per sobre de 45°C (termòfils). *Escherichia coli* creix òptimament a 37°C. El pH òptim pel creixement de la majoria de microorganismes, *Escherichia coli* entre ells, es troba prop de la neutralitat (pH 7.0) tot i que la majoria són resistents a pH àcids de fins a 5.0 i bàsics de fins a 8.0. Hi ha algunes excepcions, com els bacteris de l'àcid làctic que suporten bé valors de pH inferiors a 5.0, o algues que viuen en ambients amb valors de pH per sobre de 10 (Stanier *et al.* 1986).

Tots els microorganismes necessiten per a la seva activitat la presència de varis nutrients. Els carbohidrats són els nutrients més utilitzats per tots ells. La glucosa és el sucre emprat preferentment per la majoria com a font de carboni i energia. Les necessitats de nitrogen són també importants. L'obtenen fonamentalment de fonts orgàniques proteiques però també a partir de sals d'amoni. Els aminoàcids, en la seva

forma L-aminoàcid, són també requeriments nutritius pels microorganismes. També requereixen lípids com l'àcid linoleïc o l'oleïc (àcids grassos de cadena llarga) encara que la majoria de microorganismes no els necessiten de forma essencial, ja que els poden sintetitzar a partir d'altres fonts. Els requeriments de vitamines i factors de creixement són molt variables entre els microorganismes. La majoria requereixen vitamines del grup B, més que no pas del grup A, C, D i K. Uns altres elements necessaris són el sofre en forma de sulfats i el fòsfor en forma de fosfats. Finalment els elements minerals són nutrients requerits per molts microorganismes a concentracions traça com el Fe, K, Mg i Mn a més de Ca, Co, Cu, i Zn entre d'altres (Gottschalk, 1979).

Així, pel cultiu de bacteris es requereix l'ús de medis apropiats que subministrin a les cèl·lules tots els nutrients i substàncies necessàries per a la síntesi del seu material cel·lular i per la generació d'energia, en les quantitats apropiades als requeriments específics dels microorganismes pels quals han estat dissenyats. Donada la gran varietat de microorganismes que existeixen s'han desenvolupat un important nombre de medis específics per assegurar el seu creixement (Gerhardt, 1981). Molts d'ells són de composició indeterminada donat que inclouen en la seva formulació productes que al seu temps estan formats per una gran varietat de compostos, sovint no coneguts completament (exemples d'aquests composts són l'extracte de llevat, de malta, els hidrolitzats de proteïnes...) i els seus fonaments són empírics. Quan s'utilitza aquests medis, es parla de medis de composició *complexa* per contraposició dels medis sintètics o de composició *definida*. De manera habitual, aquests medis han estat formulats per operar només en cultius en discontinu, en que s'addicionen tots els nutrients a l'inici del cultiu i la durada d'aquest depèn del nutrient que s'esgota en primer lloc o bé per la generació d'un subproducte que resulta tòxic per la cèl·lula. Aquest medis de cultiu solen incloure una o varies fonts de nitrogen orgànic, molt riques en petits polipèptids, aminoàcids i factors de creixement com vitamines. També

porten moltes sals i poden suplementar-se amb una font de carboni. Tot i que molts bacteris poden sintetitzar-se quasi tots els elements necessaris pel seu creixement, l'ús de medis complexes és el més habitual quan es cultiven al laboratori. Aquesta composició possiblement s'allunyi bastant de la que es troben els bacteris en el seu hàbitat natural i, per tant, les condicions de cultiu a les que es sotmeten les cèl·lules que participen en processos, difereixen molt de les condicions de cultiu *in vivo*.

A diferència que molts altres procariotes i eucariotes, *Escherichia coli* no requereix de forma essencial pel seu creixement molècules complexes preformades. Pot sintetitzar-se totes les molècules que necessita a partir d'ingredients simples: aigua, aire, una font de carboni, que sovint és a més font d'energia, i alguns elements simples com sals inorgàniques de nitrogen, fòsfor, sofre, potassi, sodi, calci, magnesi, clor i alguns elements metàl·lics addicionals, com el ferro. Ocasionalment algunes soques poden requerir també alguna vitamina del grup B (B_1), algun aminoàcid, o una base nitrogenada com a factors de creixement. Aquests trets nutricionals han fet que fos molt fàcil aïllar-la i cultivar-la al laboratori en medis simples definits. La glucosa és el substrat energètic més comú en les formulacions de medis de cultiu, però en principi qualsevol carbohidrat pot ser utilitzat com a font de carboni i energia.

Els fermentadors són els reactors on es realitzen de forma habitual les fermentacions microbianes. Normalment es pot considerar que tenen fins a tres fases diferenciades: sòlid, líquid i gas. La fase líquida conté els nutrients i metabòlits en dissolució. La fase sòlida consisteix en les cèl·lules individuals, els substrats insolubles o metabòlits precipitats i la fase gasosa permet el subministrament d'oxigen i l'alliberació del CO_2 format per acció del metabolisme. El sistema d'agitació permet l'homogenització del brou de fermentació dins el bioreactor. L'agitació permet la dispersió i dissolució de l'aire, la homogenització de la temperatura i concentració de nutrients, la suspensió dels microorganismes i la dispersió dels líquids immiscibles. La viscositat és el paràmetre més significatiu que afecta el comportament reològic del

fluid. Aquest paràmetre té importància sobretot pel que fa a les seves propietats de mescla, transferència de calor i de matèria, i aireació. Un dels paràmetres més crítics en l'operació dels bioreactors és la provisió de l'adequat intercanvi gasos. L'oxigen és el substrat més important pel metabolisme microbià que es subministra per la fase gas i, el CO_2 , el producte metabòlic més característic de la fermentació. L'oxigen, quan és requerit com a substrat pel creixement, pot esdevenir un factor limitant degut a la seva baixa solubilitat, sobretot en metabolismes aeròbics. Per aquesta raó, el consum d'oxigen s'ha de mantenir mitjançant un aport constant des de la fase líquida, normalment per bombolleig d'aire (o inclòs oxigen pur). També es pot millorar augmentant l'agitació, fet que promou que les bombolles d'aire siguin més petites (i per tant es millori l'àrea d'interfase gas-líquid i que el coeficient de transferència gas-líquid (K_La) sigui més elevat. Generalment, concentracions per sota el 25% de saturació d'oxigen en el medi són crítiques per la respiració dels microorganismes (Andersen i von Meyenburg, 1980). Per sobre d'aquests valors es considera que no hi ha dependència entre la velocitat de respiració i la de dissolució d'oxigen. Els fermentadors operen normalment amb velocitats d'aireació d'entre 0.5 i 2 vvm (volum d'aire/volum líquid per minut). Un altre factor important en els sistemes de cultiu és el manteniment de la temperatura. La producció de calor deguda a l'agitació, l'aireació i l'activitat metabòlica del microorganisme es compensa mitjançant l'evaporació i el refredament del sistema. Per evitar la pèrdua d'aigua per evaporació els bioreactors disposen de sistemes de condensació de vapor. L'evolució de la formació de calor durant una fermentació es relaciona amb la utilització de la font de carboni i d'energia, i per tant es relaciona amb l'activitat microbiana. Quan la font de carboni s'està incorporant activament a la cèl·lula durant el creixement, fins el 40-50% de l'entalpia del substrat es conserva en forma de biomassa i la resta es dissipa en forma calor.

Una característica comú de tot procés de fermentació és l'esterilitat. S'ha de prevenir la contaminació en tots els estadis de desenvolupament d'un cultiu, des dels cultius preliminars fins al fermentador. El fermentador es pot esterilitzar per calor en un autoclau a 121°C durant 20 o 30 minuts si té un volum petit, o mitjançant esterilització "*in situ*" quan el volum és més gran. Molts components del medi de cultiu es poden esterilitzar conjuntament amb el vas del bioreactor, altres s'han d'esterilitzar separatament per filtració. L'aire s'ha de filtrar també a l'entrada per a que el seu subministrament sigui estèril. L'aire conté, com a mitjana, uns 2000 microorganismes per m³, dels quals el 50% són espores de fongs i el 40% bacteries Gram negatives.

En tot procés de fermentació es contemplen 3 etapes: la preservació del cultiu inòcul, el desenvolupament del cultiu inòcul, i el cultiu en fermentador. La primera etapa permet mantenir les soques durant llarg temps sense divisió cel·lular. Els mètodes més comuns de preservació són la congelació i la liofilització. La segona etapa permet revificar la soca i adaptar-la al cultiu en bioreactor. Comunament es realitza en matrassos Erlenmeyer amb agitació en un incubador de temperatura controlada. Generalment, aquesta etapa inclou un parell de passos en matrassos de volum creixent fins a disposar del volum necessari per a inocular el bioreactor (2 a 10% v/v). Per últim, en el cultiu en bioreactor, s'opera amb el medi apropiat i en les condicions d'operació més adequades pel microorganisme.

La soca més coneguda i utilitzada d' *Escherichia coli* és la soca K12, una de les primeres que va ser emprada en treballs de clonació de gens i que va permetre descobrir la resistència a antibiòtics per part dels plasmidis. Aquest fet ha afavorit la seva utilització a nivell industrial en un gran nombre de processos, com ara els reflexats a la taula 1.2, en que es mostren alguns exemples de proteïnes recombinants amb ús terapèutic obtingudes mitjançant el cultiu d'*Escherichia coli*.

Proteïna	Funció	Ús
α -1 Antitripsina	Inhibidor de proteases	Tractament emfisemes pulmó
Calcitonina	Metabolisme fosfat i calci	Tractament osteomalàcia
Factor estimulació colònies	Estimulació hematopoiesis	Antitumoral
Factor creixement epidèrmic	Creixement cèl·lules epitelials	Tractament ferides
Eritropoietina	Estimulació hematopoiesis	Tractament anèmia
Factor VIII i IX	Factors coagulació de la sang	Prevenició hemorràgies
Factor d'alliberament de l'Hormona Creixement (HC)	Estimulació de l'excreció HC	Promoure el creixement
Interferons (α, β, γ)	Resistència cel·lular enfront virus	Antivirals, antitumorals
Interleuquines 1,2 i 3	Estimulació cèl·lules del sistema immunitari	Antitumorals
Limfotoxina	Factor de reabsorció d'ossos	Antitumoral
Somatomedina C (IGF-I)	Captació de sofre pel cartílag	Promoure creixement
Albúmina sèrica	Proteïna plasmàtica	Suplement plasma
Superòxid dismutasa	Descomposició radicals sang	Tractament cardíac i transplant. d'òrgans
Factor de necròsi tumoral	Producte del fagòcits citotòxics	Antitumoral
Urogastrona	Secreció gastrointestinal	Llagues estómac
Urokinasa	Activació plasminògen	Anticoagulant

Taula 1.2: Proteïnes recombinants amb ús terapèutic humà obtingudes mitjançant el cultiu de soques d'*Escherichia coli* recombinants.

Com ja s'ha comentat, en l'apartat 1.2 d'aquest mateix capítol, un cop identificat un producte d'interès i la soca productora, i atès a que normalment s'obtenen concentracions molt baixes de producte, es convenient desenvolupar un programa de millora que permeti augmentar l'eficiència dels processos, per a que siguin interessants des del punt de vista econòmic.

1.4. ESTRATÈGIES DE MILLORA DE L'EFICIÈNCIA DE PROCESSOS DE FERMENTACIÓ

L'objectiu fonamental en els processos de fermentació és controlar el creixement del microorganisme productor per tal d'obtenir la màxima concentració (i productivitat) del producte desitjat.

Donat que de forma general l'obtenció de quantitats importants de productes recombinants del cultiu de bacteris és proporcional a la concentració de cèl·lules presents al cultiu, una manera d'augmentar la productivitat d'un procés d'obtenció de proteïnes recombinants és augmentant la concentració màxima de cèl·lules i la durada total del cultiu. Les estratègies de millora del creixement i, per tant, de l'obtenció de proteïnes recombinants es poden englobar en dos grups segons les metodologies que s'apliquen. Per un costat trobem les estratègies de millora del creixement per actuació sobre variables extracel·lulars, és a dir per actuació sobre factors externs a la cèl·lula o ambientals, que permeten millorar el creixement i conseqüentment la producció del producte desitjat. Aquestes estratègies s'aplicarien a tot tipus de cèl·lules, tant salvatges com recombinants. Per un altre costat, es troben les estratègies de millora del creixement per actuació sobre variables intracel·lulars. Aquest tipus d'estratègies, que s'apliquen sobretot en soques recombinants, consisteixen en augmentar la dotació gènica, modificar la informació genètica de la cèl·lula hoste o dels vectors d'expressió per tal de millorar l'expressió dels gens

recombinants, la seva traducció, l'estabilitat dels productes gènics intermediaris, etc., i que en últim terme, incideixen en l'augment de la síntesi de producte.

La primera d'aquestes dues aproximacions consisteix en la forma més clàssica de tractar el problema des del punt de vista de l'Enginyeria Bioquímica. La segona aproximació, en la que s'intenta augmentar la producció a nivell de transcripció i traducció de la proteïna d'interès són aquelles accions que es troben englobades dins de la disciplina de l'Enginyeria Genètica. La modificació genètica de les cèl·lules no es limita a la millora de l'excreció del producte, si no també a la d'altres activitats cel·lulars, el que es coneix com Enginyeria Metabòlica.

L'Enginyeria Metabòlica ha estat definida com la millora directe de la formació de productes o propietats cel·lulars mitjançant modificacions genètiques que afecten reaccions bioquímiques específiques, o que comporten la introducció de noves reaccions per tècniques de recombinació de DNA (Stephanopoulos, 1999).

Estratègies de millora per intervenció sobre les variables extracel·lulars

Quan es realitza l'aproximació a nivell extracel·lular hi ha diferents punts a considerar. En primer lloc la millora es pot obtenir reformulant el medi de cultiu de manera que s'ajusti a les necessitats cel·lulars, establint la concentració més adequada dels nutrients requerits per tal d'afavorir el creixement. Podria semblar raonable, a primera vista, que preparant un medi de cultiu el més ric possible, és a dir aportant tots els nutrients en excés, s'obtingués un bon creixement. No obstant, com es veurà més endavant en el capítol 3, aquest plantejament no sempre s'acompleix.

Una correcta formulació del medi és un dels aspectes inicials en que cal començar a treballar a l'hora de millorar el creixement del cultiu de cèl·lules i, de manera concomitant, l'obtenció de productes. Per arribar a assolir aquesta optimització cal

realitzar una sèrie d'estudis previs que permetin determinar quins són els medis de cultiu més apropiats, i els suplementes requerits per tal de millorar el creixement. S'ha de conèixer bé el metabolisme de la cèl·lula en estudi, i quins dels substrats del medi s'esgoten en primera instància i poden arribar a limitar el creixement del cultiu, i també quins d'aquests nutrients originen subproductes cel·lulars que al acumular-se al medi poden resultar tòxics per a la cèl·lula, implicant allargar la durada del procés.

En segon lloc s'ha de proveir a la cèl·lula de les condicions fisico-químiques òptimes de cultiu. El cultiu en bioreactor compleix aquest requisits i permet cultivar les cèl·lules dins els rangs òptims de temperatura, oxigen dissolt i pH. Cal conèixer quins són els valors òptims de cadascun d'aquest paràmetres per la soca d'estudi i disposar d'un sistema que pugui mantenir-los. Aquests paràmetres s'han de completar sovint amb mesures més complexes com la velocitat de consum d'oxigen (OUR), la de producció de CO_2 (CER), el consum de substrats i l'anàlisi de metabòlits. La presència de sistemes de monitorització en línia que permeti conèixer en cada moment la concentració cel·lular, la activitat de la població, la concentració de substrats, de productes i subproductes, i en general l'evolució del cultiu permet definir estratègies de control del procés que ajudin a mantenir durant més temps les condicions apropiades de cultiu, millorant-ne el seu rendiment. Tot i que el cultiu en bioreactor permet controlar els principals paràmetres del cultiu i que, de per si suposa una millora, s'ha de caracteritzar molt bé cada sistema cel·lular per tal d'ajustar les condicions de cultiu i establir mecanismes de control apropiats per obtenir un bon rendiment. Per altra banda, també cal tenir en compte que la monitorització de processos és una disciplina cada cop més complexa i tecnificada i requereix d'un elevat nivell d'esforç.

En tercer lloc s'ha de determinar quin és el mode d'operació més adequat per tal de portar a terme el procés. Els processos de fermentació es poden categoritzar bàsicament en tres modes d'operació, segons si hi ha o no addició de nutrients i

recuperació del brou de fermentació durant el procés de cultiu: cultius en discontinu (batch), cultius en discontinu-alimentat (fed-batch) i cultius en continu. Si tenim en compte, en canvi, la localització de les cèl·lules respecte els nutrients o el brou de fermentació, podem categoritzar els processos en dos grups: en el primer trobaríem els cultius de cèl·lules en suspensió o cèl·lules lliures. En aquest cas es poden aplicar els tres modes d'operació anteriors. En el segon hi trobaríem aquells processos en que les cèl·lules estan immobilitzades o bé confinades en un sistema que les separa físicament del medi de cultiu. El confinament de les cèl·lules dins d'una matriu sòlida implica l'aparició de limitacions difusionals. En aquest cas, tot i que també es pot operar en discontinu, s'utilitzen habitualment estratègies de cultiu en perfusió en llit fix, llit fluiditzat o bé cultius amb mòduls de perfusió interns o externs al vas de cultiu, que permeten retirar el brou de fermentació sense cèl·lules augmentant-se d'aquesta manera la concentració de cèl·lules dins el compartiment de cultiu (figura 1.3).

En els processos en discontinu tots els nutrients requerits pel creixement s'afegeixen inicialment al vas de cultiu del bioreactor i els productes són recuperats després de completat el creixement. Durant el cultiu només s'addicionen gasos (aire, O_2 , CO_2 i N_2), agents correctors del pH com àcid o àlcali, i antiescumejant si cal. Com que no hi ha addició de nutrients durant el procés, el creixement màxim que s'obté és el que permet el substrat que s'esgota en primer lloc i que és imprescindible pel creixement.

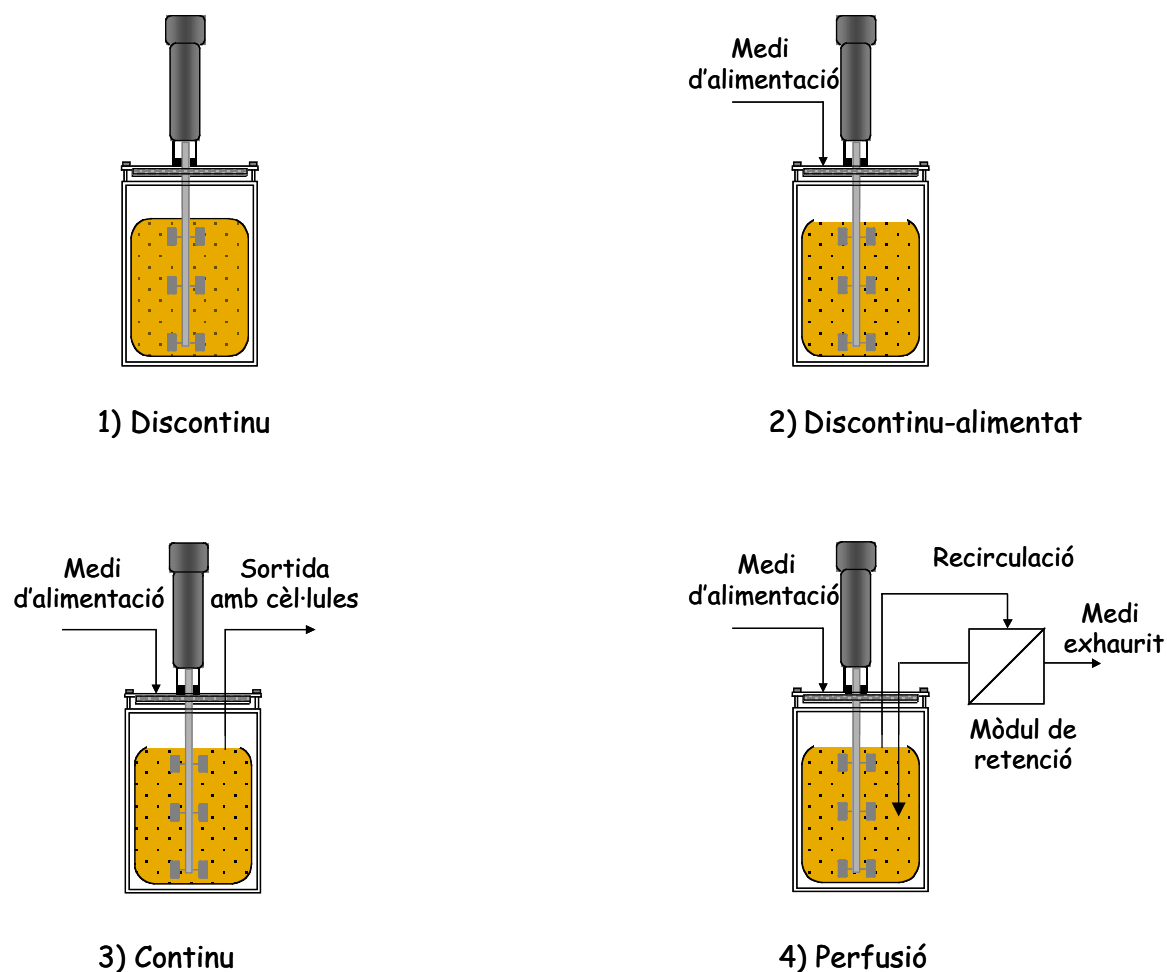


Figura 1.3: Representació esquemàtica dels diferents modes d'operació de cultiu en bioreactor segons si hi ha o no alimentació de medi fresc i recuperació del brou de fermentació.

El cultiu discontinu és un mode de cultiu on el creixement és limitat en el temps, i per tant s'obtindrà com a molt una concentració de biomassa relativa al nivell d'inòcul, al temps de duplicació cel·lular i a la durada del cultiu. El cultiu discontinu en matràs agitat permet obtenir concentracions d'*Escherichia coli* d'entre 1 i 3 g PSC/l (PSC/l: mesura de la concentració de biomassa en grams de Pes Sec Cel·lular per litre de medi) mentre que en bioreactor s'obtenen fins a 10 g PSC/l (Riesenberg, 1991).

En els cultius en continu els nutrients són contínuament addicionats al vas de cultiu i els productes contínuament retirats d'aquest. Els cabals d'addició de medi fresc i d'extracció de medi exhaurit són iguals i el volum de líquid al vas de cultiu del bioreactor es manté constant al llarg del cultiu. No es solen aplicar a nivell industrial donada la baixa concentració de cèl·lules que s'assoleix degut a l'eliminació continuada de cèl·lules en el corrent de sortida. Una manera de paliar aquest desavantatge és la utilització d'elements externs al reactor (sedimentadors, mòduls d'ultrafiltració o sistemes de diàlisi...) o interns (sistemes de confinament de cèl·lules en suspensió o immobilitzades) que permeten obtenir cultius amb elevada concentració cel·lular operant en continu. Per altra banda, són una eina valuosa en recerca bàsica a nivell de laboratori ja que permeten obtenir dades cinètiques en un cultiu en estat estacionari on totes les cèl·lules experimenten les mateixes condicions. L'establiment de la composició més adequada del medi i de les concentracions idònies de nutrients d'un cultiu és un dels exemples típics d'aplicació del cultiu continu. També són una eina destacada en l'establiment de la millor estratègia d'alimentació en cultius discontinu-alimentat.

El cultiu discontinu-alimentat està a cavall entre els dos anteriors. En aquest cas es carrega amb un determinat volum de medi el fermentador. Durant una primera fase del cultiu, aquest es manté sense addicionar nutrients (fase de cultiu discontinu), i les cèl·lules creixen a la seva màxima velocitat específica de creixement. Posteriorment s'alimenta el bioreactor, mitjançant l'addició d'un o més nutrients al llarg del temps que es perllonga l'operació (fase de cultiu alimentat), i el producte és recuperat al completar-se el procés. Com a resultat de l'addició controlada de nutrients i de la seva concentració en l'aliment es pot regular la velocitat específica de creixement i la concentració de substrat més apropiada. El cultiu discontinu-alimentat és un dels modes d'operació de cultius més usat a nivell industrial i és especialment indicat quan es produeixen inhibicions per substrat o quan es vol assegurar que un determinat

component no quedi exhaurit. Els cultius en discontinu-alimentat són sovint utilitzats per a obtenir altes concentracions cel·lulars i per a millorar la productivitat d'un procés, donat que la concentració final del producte que s'obté és proporcional a la concentració final de cèl·lules que s'assoleix (Yamane i Shimizu, 1984; Lee i Blanch, 1992). El cultiu discontinu-alimentat permet assolir concentracions de biomassa de fins a 55 g PSC/l d'*Escherichia coli* (Bauer *et al.* 1974; Riesenber, 1991) i en alguns casos està descrit que s'aconsegueixen fins a 100 g PSC/l. (Mori *et al.* 1979; Cutayar i Poillon, 1989). L'obtenció de concentracions de biomassa tant elevades no s'ha pogut obtenir amb soques d'*Escherichia coli* recombinants. Per aquestes la màxima concentració de biomassa descrita és de l'ordre de 60 g PSC/l. (Riesenber *et al.* 1990; Strandberg i Enfors, 1991; Fieschko i Ritch, 1986).

Els sistemes de cultiu d'alta densitat cel·lular presenten limitacions que poden afectar a la productivitat general del cultiu (Kleman i Strohl, 1992). La limitació de l'oxigen dissolt, l'augment de la viscositat, la generació de calor o els elevats nivells de CO₂ que s'assoleixen en aquest sistemes poden fer disminuir la velocitat de creixement i afavorir la formació de subproductes del metabolisme tòxics per a la cèl·lula, i consegüentment reduir l'eficiència de la fermentació (Meyer *et al.* 1985). Un altre factor limitant és que al augmentar la densitat cel·lular disminueix la productivitat específica (DeLisa *et al.* 2000). Per aquest motiu és desitjable caracteritzar cada sistema cel·lular en diferents condicions, i valorar els resultats per obtenir un coneixement més ampli de les causes metabòliques que impedeixen millorar l'eficiència del procés.

S'ha de tenir en compte que les estratègies de millora de processos per optimització de les variables extracel·lulars, en realitat, afecten la fisiologia cel·lular, i tant el creixement, la traducció de les proteïnes (tant cel·lulars com recombinants), l'activitat proteolítica i la secreció i nivells de producció d'aquestes es veu afectat per

aquestes intervencions. Per tant, tot i que no hi ha una intervenció dirigida a nivell intracel·lular, s'intervé en aquestes variables de forma empírica a partir de l'observació del comportament de les cèl·lules en cultiu.

Estratègies de millora per intervenció sobre variables intracel·lulars

Tota resposta fisiològica és en últim terme resultat de l'expressió de determinats gens i del control inherent de la cèl·lula sobre els nivells d'expressió d'aquests. Es pot millorar l'obtenció d'un producte per modificació dels processos genètics i bioquímics a diferents nivells:

Millora per mutació i selecció natural *in vivo*: Cada cop que una cèl·lula es divideix hi ha una petita probabilitat de que es produeixi un canvi a nivell genètic. Si el canvi no li és desfavorable la soca resultant és una soca viable mutant. La probabilitat de que es produeixi una mutació es pot incrementar exposant el cultiu a un agent mutàgen, com la llum U.V. o varis agents químics (com per exemple la nitrosoguanidina o l'àcid nítrós). Segons la dosi s'obtindran més o menys mutants que hauran sobreviscut, i algun d'ells pot haver adquirit propietats favorables en termes de producció del producte d'interès. Aquesta tècnica s'ha utilitzat força a nivell industrial per augmentar la producció de metabòlits tant primaris, per exemple aminoàcids, com secundaris, típicament antibiòtics. Per exemple, la millora i selecció genètica de *Penicillium chrysogenum* ha permès que en els últims 40 anys s'hagi passat d'obtenir 2 U/ml a obtenir 50.000 U/ml de penicil·lina.

Millora per manipulació del DNA *in vitro* dels sistemes d'expressió: L'expressió eficient de gens recombinants a *Escherichia coli* depèn de les característiques estructurals dels diferents gens i dels transcrits de mRNA generats. Per això, és difícil establir unes pautes generals de millora de l'expressió gènica. Les estratègies de millora de l'expressió de proteïnes heteròlogues a *Escherichia coli* es troben descrites àmpliament a la bibliografia (Hannig i Makrides, 1998). Els vectors d'expressió procariòtics contenen una sèrie d'elements genètics que afecten a la

transcripció i traducció de les proteïnes. Es pot optimitzar l'eficiència dels mecanismes de síntesi de les proteïnes recombinants a *E. coli* modificant genèticament els sistemes d'expressió. La manipulació genètica dels sistemes d'expressió per augmentar l'eficiència de transcripció i traducció són:

- l'augment de la dotació gènica, per ex. més nombre de còpies plasmídiques.
- el disseny de sistemes promotors de l'expressió gènica més forts.
- la modulació de l'estructura secundària del mRNA.
- la modificació del lloc d'unió ribosomal.
- l'augment del nombre de ribosomes.
- l'augment de l'estabilitat plasmídica, del mRNA, de la proteïna recombinant.
- la inhibició de la proteolisi per delecció dels gens de síntesi de proteases.
- la reducció de la formació de cossos d'inclusió.

Per últim es pot incidir sobre la maquinària cel·lular, modificant el genoma de la cèl·lula per tal de que sigui més apte fisiològicament en l'ambient on creix (el fermentador) i així poder augmentar la productivitat general del cultiu. Per la rellevància que té aquesta darrera metodologia emergent coneguda com Enginyeria Metabòlica i, per la novetat que suposa en l'enfoc d'estratègies de millora de processos, s'exposen alguns conceptes importants en aquest context, els trets més característics i alguns exemples en el següent apartat.

1.5. ENGINYERIA METABÒLICA

Com ja s'ha comentat anteriorment, en un bioprocés les cèl·lules es cultiven normalment fora del seu context natural, el que provoca a la cèl·lula haver d'adoptar un comportament metabòlic diferent a l'habitual. Aquest fet requereix que les cèl·lules s'adaptin modificant les seves reaccions bioquímiques intracel·lulars. Tot i que hi ha molta informació sobre regulació genètica i bioquímica del metabolisme cel·lular en condicions *in vitro*, en realitat es coneix poca cosa sobre la distribució i els

mecanismes de regulació dels fluxos metabòlics d'una cèl·lula *in vivo*. Aquest coneixement és bàsicament difícil d'obtenir degut a l'enorme complexitat del metabolisme d'un organisme. L'activitat metabòlica d'una cèl·lula viva comprèn múltiples reaccions catalitzades per enzims i sistemes selectius de transport de membrana que permeten el pas dels substrats a l'interior de la cèl·lula. Les múltiples reaccions estan enllaçades a través d'una xarxa de metabòlits que interactuen a diferents nivells genètics i metabòlics. La informació obtinguda de processos cel·lulars aïllats no té perquè coincidir necessàriament amb la dels processos que es donen en sistemes *in vivo* en els que les reaccions no funcionen independentment unes de les altres (Emmerling *et al.* 1999). De la mateixa manera, les reaccions que es donen en condicions naturals no tenen perquè afavorir els interessos d'un bioprocés, sinó que són les que la cèl·lula ha desenvolupat al llarg dels anys per competir amb èxit i sobreviure, per exemple per créixer en un hàbitat determinat, o a unes condicions donades a les que s'hagi hagut d'adaptar. Cal observar que moltes vegades el producte final que s'identifica com l'objectiu del procés, no deixa de ser més que un producte final natural del metabolisme de la cèl·lula. Segurament els exemples més clars d'aquest fet es troben a les fermentacions bacterianes, on el producte natural final del metabolisme de la cèl·lula és el producte desitjat del bioprocés. Des d'aquest punt de vista, l'enginyeria metabòlica pretén modificar genèticament l'activitat metabòlica d'una cèl·lula per tal de re-distribuir el seu metabolisme i millorar-ne el creixement i/o l'obtenció d'un producte d'interès, sigui natural o recombinant.

El concepte de modificació del metabolisme per tal de millorar el comportament de microorganismes amb propietats més desitjables no és nou. Hi ha molts exemples en que aquesta estratègia ha sigut emprada per a la millora de producció d'aminoàcids, antibiòtics, vitamines, solvents, etc. Aquests mètodes s'han basat en l'ús de mutàgens químics i tècniques de selecció per identificar les soques més productives, com s'ha exposat en l'apartat 1.4.2. Malgrat l'èxit d'aquestes tècniques en la millora de

processos, el perfil genètic i metabòlic de la soca mutant ha quedat poc o gens caracteritzada.

El desenvolupament de les tècniques de biologia molecular i en especial de recombinació del DNA van introduir una nova dimensió en la manipulació del metabolisme. L'enginyeria genètica ha permès la modificació precisa i específica de reaccions enzimàtiques en vies metabòliques concretes i la construcció de clons recombinants completament caracteritzats amb propietats més desitjables en termes d'eficiència de producció. Una característica essencial de la definició d'Enginyeria Metabòlica (apartat 1.4) és l'especificitat de la reacció bioquímica modificada o introduïda de nou. Un cop identificada aquesta reacció, s'han d'establir les tècniques que s'aplicaran per a amplificar, inhibir o deleccionar, transferir o desregular els corresponents gens o enzims. Les tècniques de recombinació del DNA s'utilitzen rutinàriament en varies etapes d'aquest procés de modificació del metabolisme cel·lular.

La direccionalitat o especificitat de la modificació és un aspecte clau en l'enginyeria metabòlica en comparació amb els processos de millora genètica clàssics. Tot i que els primers esforços d'enginyeria metabòlica aplicada es van centrar en obtenir cèl·lules modificades específicament en reaccions bioquímiques escollides com a determinants per a millorar alguna característica, fent-les més interessants per algun procés productiu, l'anàlisi de les conseqüències de la modificació genètica va resultar igualment important. Una simple modificació genètica que afecti a l'actuació d'un enzim no és suficient per tal d'obtenir soques millorades. Sovint la cèl·lula redirecciona alguna altra reacció per contrarestar l'efecte de la nova modificació. Així, l'anàlisi de l'efecte de les modificacions és igualment important en el camp de l'enginyeria metabòlica. Per això, s'ha de considerar el conjunt de reaccions que conformen les vies metabòliques més que no pas les reaccions aïllades. El control

sobre els fluxos metabòlics de la cèl·lula és un aspecte important a tenir en compte des d'aquest punt de vista. De fet, la millor guia per a un anàlisi racional de la xarxa metabòlica són les observacions sobre el comportament de la cèl·lula. L'estudi dels mecanismes de control de fluxos a través de la xarxa de reaccions és, també, un aspecte important de l'enginyeria metabòlica, tot i que la seva determinació és complexa, i per tant, els models actuals són encara força reduccionistes i es tenen que considerar com a simplificacions del que succeeix realment. La major contribució de l'enginyeria metabòlica és potser l'enfoc de l'estudi dels fluxos metabòlics *in vivo*. La combinació dels mètodes analítics de determinació de fluxos i el seu control per tècniques de biologia molecular per implementar les modificacions genètiques suggerides és l'essència de l'enginyeria metabòlica. Quan es practica de manera iterativa proveeix d'un mètode per a la millora sistemàtica de les propietats cel·lulars en un ampli ventall d'aplicacions i contextos.

Una eina molt apropiada per a l'anàlisi del metabolisme cel·lular és el coneixement dels fluxos metabòlics intracel·lulars dels principals compostos, el que permet saber de quina manera la cèl·lula utilitza els diferents nutrients necessaris pel seu creixement. Aquestes dades poden ser utilitzades a l'hora de millorar d'una manera racional el medi de cultiu, o bé poden donar indicacions sobre quins són els fluxos metabòlics importants que pot ser interessant modificar per tècniques de biologia molecular, per tal d'obtenir un comportament diferent de les cèl·lules, és a dir, un re-direccionament del seu metabolisme.

Degut a que l'espectre de possibilitats de modificacions genètiques és tan ampli i el seu efecte sobre l'expressió d'altres activitats diferents de la manipulada és incert, s'ha fet necessari sovint utilitzar mètodes empírics per tal d'escollir un pas concret d'una via de la xarxa, susceptible de ser modificat. La iteració modificació genètica, anàlisi de les conseqüències i disseny d'un futur canvi és el camí emprès sovint per tal

d'obtenir un sistema de cèl·lula hoste òptim. Si bé la modificació genètica és freqüentment assolida, l'anàlisi de les conseqüències és més complicat. Sovint els resultats són inesperats, i no sempre en la direcció desitjada (Stephanopoulos *et al.* 1998). Per a analitzar les conseqüències d'una modificació genètica es requereix en primer lloc un bon coneixement de l'estructura de la xarxa de reaccions metabòliques, de la seva cinètica i regulació i en molts casos aquest coneixement només és parcial, sobretot en condicions *in vivo*. En segon lloc cal quantificar la mesura del canvi, i per això és necessari realitzar una descripció matemàtica del metabolisme. Les vies centrals del metabolisme (VCM) de la majoria de microorganismes freqüentment utilitzats en l'obtenció de productes està ben definida i es troba àmpliament descrita a la bibliografia. La modificació d'aquestes vies per a la producció d'una substància d'interès parteix de la identificació dels enzims involucrats en la transformació, del rendiment de formació i de l'òptima distribució dels fluxos de components a través de la via. En la majoria de casos la identificació de les vies involucrades s'obté de l'estudi dels mapes metabòlics, definint les possibles vies que porten a la formació del producte. Un cop les reaccions han sigut determinades, s'han de calcular el fluxos a través d'aquestes, per cadascun dels components involucrats, mitjançant un balanç estequiomètric.

Un cop seleccionada la reacció o reaccions bioquímiques que es vol modificar, eliminar o introduir de nou, les tècniques de biologia molecular han de permetre:

- amplificar l'expressió d'un o varis gens per augmentar la velocitat d'una reacció.
- inhibir l'expressió d'un o varis gens d'una via per reduir la velocitat d'una reacció.
- deleccionar un o varis gens per eliminar una reacció.
- regular l'expressió d'un o varis gens per adaptar l'acció catalèptica de l'enzim o enzims implicats en una reacció a les condicions de cultiu.

L'èxit d'una modificació s'haurà de comprovar comparant el comportament de la cèl·lula abans i després de la modificació genètica. No obstant, la cèl·lula és un element molt flexible i la xarxa de reaccions metabòliques és prou dinàmica per respondre a la modificació introduïda en molts punts diferents i no només en el modificat i sovint l'efecte de la modificació és compensat pels mecanismes reguladors de la pròpia cèl·lula impedit observat canvis en els seu comportament (Stephanopoulos i Vallino, 1991).

L'enginyeria metabòlica ha estat aplicada a la millora de l'obtenció de productes naturals sintetitzats per microorganismes. Trobem, com a exemples d'aquesta aplicació, la sobreproducció d'aminoàcids aromàtics o de succínic a *Escherichia coli* (Patnaik i Liao, 1994; Flores *et al.* 1996; Sanville *et al.* 1996), de tirosina i fenilalanina a *Corynebacterium glutamicum* o d'isoleucina a *Corynebacterium lactofermentum* (Ikeda i Katsumata, 1992). Una altra aplicació ha sigut augmentar el rang de substrats metabolitzables per microorganismes, per exemple la utilització de lactosa per part de *Corynebacterium glutamicum* (Cameron i Tong, 1993; Stephanopoulos, 1999). Un altre aplicació de l'enginyeria metabòlica és la producció de productes nous per la cèl·lula hoste, com per exemple la producció de nous antibiòtics a *Streptomyces*, la síntesi d'indigo per *E. coli* o del pigment melanina també per *E. coli*. (Bailey, 1991). També podem trobar aplicacions de millora de les propietats cel·lulars a nivell de millorar el comportament en condicions hipòxiques: per exemple la clonació a *E. coli* del gen *VHb* de *Vitreoscilla* (Khosla i Bailey, 1988; Tsai *et al.* 1995), o la prevenció de l'excreció de subproductes (Aristidou *et al.* 1994). Cada cop apareixen més aplicacions de l'enginyeria metabòlica i s'en troben exemples en les diferents línies cel·lulars comunament emprades en processos biotecnològics.

En el present treball s'apliquen i discuteixen les diferents estratègies de millora del creixement i d'obtenció de productes en base als resultats fisiològics i metabòlics

observats del cultiu d'*Escherichia coli* K12 en diferents condicions. El comportament observat durant el seu creixement, tant en diferents medis de cultiu de composició complexa o definida, com per diferents modes d'operació permet identificar un problema associat al seu creixement que impedeix millorar l'eficiència de processos, la producció de subproductes tòxics del metabolisme. L'anàlisi dels fluxos metabòlics intracel·lulars, realitzat a partir d'un model matemàtic, permet aprofundir en les causes d'aquest comportament observat i, alhora, relacionar el coneixement quantitatiu del metabolisme de les cèl·lules amb la seva utilització en fermentadors.

2.OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és caracteritzar fisiològica i metabòlicament el comportament del bacteri *Escherichia coli* en cultiu en bioreactor, quantificant el seu metabolisme a nivell intracel·lular, per tal d'identificar estratègies de millora de l'eficiència d'un procés, mitjançant tècniques d'enginyeria metabòlica, i a partir d'aquesta anàlisi realitzar les modificacions seleccionades i observar els efectes sobre el creixement, consum de glucosa i secreció de subproductes.

Per tal d'assolir aquest objectiu cal:

- Caracteritzar el creixement d'*Escherichia coli* en cultius en suspensió en diferents medis de cultiu per tal d'establir les diferències metabòliques, segons la composició nutricional del medi de cultiu.
- Caracteritzar el creixement d'*Escherichia coli* en cultius en suspensió per diferents soques, salvatges o recombinants.
- Caracteritzar el creixement d'*Escherichia coli* segons les diferents estratègies d'operació de cultiu en bioreactor. Es tracta de veure quines són les claus per assolir elevades densitats cel·lulars en cultiu discontinu i discontinu-alimentat, i quines limitacions es poden trobar segons el mode d'operació i la concentració dels principals substrats del medi de cultiu.
- Estudiar l'efecte de l'acumulació de subproductes metabòlics en el brou de fermentació sobre el creixement, i quins factors afavoreixen la seva formació.
- Estudiar l'efecte de l'acumulació de subproductes metabòlics en el brou de fermentació sobre l'expressió de gens recombinants, i com afecten l'obtenció de proteïnes recombinants.
- Comparar el comportament de diferents soques d'*Escherichia* (K12 i BL21), per veure si hi ha diferències que facin que siguin més apropiades unes que altres, en l'objectiu d'assolir elevades densitats cel·lulars.

- Realitzar un estudi quantitatiu del metabolisme d'*Escherichia coli* per tal d'identificar possibles colls d'ampolla metabòlics i les causes de la formació de subproductes. El tractament quantitatiu ha de permetre també, comparar els diferents resultats experimentals per les soques salvatges i recombinants. Per tal d'assolir aquest objectiu s'ha de desenvolupar un model matemàtic d'estimació de fluxos metabòlics intracel·lulars, realitzar una anàlisi dels mateixos, i identificar potencials llocs d'actuació (enzims clau) per tal de, mitjançant modificacions genètiques, redistribuir el metabolisme, en el sentit desitjat: reduir la formació de subproductes fent la cèl·lula més eficient en l'aprofitament dels recursos (glucosa).
- Realitzar modificacions genètiques senzilles sobre gens que codifiquen per enzims clau del metabolisme d'*Escherichia coli* que permetin redistribuir els fluxos metabòlics segons els resultats de l'anàlisi realitzat, i estudiar l'efecte sobre el creixement, el consum de glucosa i la secreció de subproductes.