

## VII.1. INTRODUCCIÓ

Fins aquest punt, s'ha establert una estratègia operacional per a la producció de Fuc-1-PA emprant la soca recombinant *d'E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrc*ful*). Aquest capítol es centra en la millora del procés desenvolupat a nivell genètic mitjançant l'estudi de sistemes d'expressió alternatius per l'expressió de Fuc-1-PA en *E.coli*.

En el sistema pTrcHis (Invitrogen), ja s'assoleixen fraccions de proteïna total intracel·lulars de Fuc-1-PA superiors al 30%. Considerant que els màxims nivells d'acumulació descrits per a vectors d'alt número de còpies en *E.coli* es situa al voltant del 35-40 % (Hannig i Makrides, 1998), no sembla d'interès invertir esforç i temps en trobar sistemes alternatius d'expressió que permetin una acumulació de Fuc-1-PA recombinant superior i/o més ràpida per tal de millorar encara més la producció. No obstant, aquest sistema pTrcHis (Invitrogen) presenta altres limitacions pròpies de sistemes d'expressió pensats per a l'estudi de proteïnes a petita escala. Principalment: la necessitat d'IPTG per induir l'expressió recombinant i d'ampicil·lina com antibiòtic de selecció per assegurar l'estabilitat plasmídica. És per millorar aquests aspectes, pensant en l'escalat del procés, que es planteja el canvi del sistema d'expressió.

Els principals desavantatges per l'ús d'IPTG són el seu elevat cost i la seva provada toxicitat tant per les cèl·lules hostes (Kosinski i col., 1992a) com per l'ésser humà (Neubauer and Winter, 2001). Quan es treballa amb CADC i, sobretot, quan es fixa la concentració d'inductor òptima per a la inducció en base a la biomassa total a assolir al final del procés, com és el cas, les quantitats d'IPTG necessàries poden ser molt elevades accentuant el problema de cost i purificació dels productes recombinants obtinguts, sobretot quan la seva aplicació final és farmacèutica.

En els sistemes d'expressió recombinant amb selecció per antibiòtics, l'estabilitat plasmídica al llarg del cultiu s'assegura incorporant al vector d'expressió un gen addicional per a l'expressió d'una proteïna que infereix resistència a antibiòtics de forma que només les cèl·lules que mantinguin el plàsmid poden créixer en medis suplementats amb el

corresponent antibiòtic. Aquests sistemes solen presentar però tot un seguit de complicacions en relació al procés de producció i a l'aplicació final dels productes recombinants obtinguts:

1.- per una banda, la necessitat d'addicionar antibiòtics al medi de cultiu encareix considerablement el cost global del procés de producció perquè són productes de cost elevat i necessaris en quantitats importants ja que la mateixa presència dels productes codificats pels gens de resistència accelera també la seva degradació quan s'alliberen al medi de cultiu (Baneyx, 1999).

2.- La FDA (Food and Drug Administration; USA) recomana evitar el seu ús (Murphy, 1998). En general, per evitar problemes d'alliberació de gens de resistència a antibiòtics al mediambient i la possibilitat, encara que baixa, de transferència horitzontal d'informació genètica entre microorganismes, rendint bacteris patògens que hagin incorporat resistència a antibiòtics (Davidson, 1999). Però, molt concretament, la FDA es manifesta contrària al seu ús per la producció de productes farmacèutics o d'aplicació alimentària ja que alguns gens de resistència a antibiòtics, com ara el gen *bla* (per la resistència a ampicil.lina), contenen seqüències anomenades CpG dinucleòtids que estimulen la resposta immunològica (Sato i col., 1996) i subministrats junt amb el producte recombinant terapèutic poden causar problemes de immunosensibilitat.

3.- El manteniment d'aquest tipus de plàsmids causa un estrès metabòlic addicional a la cèl.lula hoste degut a l'expressió constitutiva del gen de resistència a antibiòtic incorporat (Bentley i col., 1990). Sobretot quan es tracta de plàsmids d'alt número de còpies, aquest efecte sobre el metabolisme es pot traduir en un desavantatge en creixement front la soca no recombinant important. En absència del marcador de resistència, aquest desavantatge pot suposar la pèrdua completa de la població recombinant ja que no és competitiva per a creixement. (Cochoero i Villaverde, 1998).

En els darrers anys s'han vingut desenvolupant tot un seguit de nous sistemes d'expressió recombinat alternatius que permeten evitar tant l'ús de promotors tipus lac induïbles per

IPTG, com de sistemes d'estabilitat plasmídica basats en l'ús d'antibiòtics. Aquestes alternatives es presenten molt breument a continuació.

### VII.1.1. Alternatives als sistemes d'expressió regulada de proteïnes recombinants basats en promotors tipus lac

Els promotors convencionals, àmpliament establerts per la sobreexpressió de proteïnes recombinants tant a nivell de recerca com a la indústria, són els promotors derivats dels operons naturals d'*E.coli* lac i trp (per la síntesi de triptofen) i també els promotors de fags d'*E.coli* com són els promotors  $\lambda$  P<sub>L</sub> i P<sub>R</sub> controlats pel repressor sensible a la temperatura cI<sub>857</sub>. Tots ells es caracteritzen per ser promotors forts, molt ben estudiats i amb els que s'han sobreexpressats amb èxit un número molt elevat de proteïnes recombinants. Però tots ells presenten problemes per la inducció en CADC a escala de producció.

Ja s'han comentat els principals desavantatges del promotor lac i els seus derivats per la síntesi de proteïnes a escala productiva. També els promotors convencionals induïbles per temperatura, tot i que s'han utilitzat igualment a escala productiva, tenen un gran nombre de detractors. L'augment de temperatura accelera el metabolisme cel.lular i l'alta velocitat de síntesi dificulta el plegament correcte de les proteïnes, augmenta la formació d'agregats insolubles i accentua també el risc de proteòlisis i de respostes d'estrès cel.lular (Hockney, 1994).

En els darrers anys s'han vingut desenvolupant diferents sistemes alternatius per la sobreexpressió recombinant en base a promotors controlables de forma efectiva però econòmica i respectant el metabolisme cel.lular de l'hoste i la qualitat de l'expressió recombinant (Sawers i Jarsch, 1996). S'han desenvolupat promotors induïbles a baixes velocitats de creixement, per limitació de nutrients (font de carboni, amoni, fosfats, etc), i per altres situacions d'estrès com reducció del pH o temperatura de cultiu, per condicions anaeròbiques de creixement o per el canvi de la font de carboni (Neubauer i Winter, 2001). Alguns d'ells, com ara els promotors *rhaBAD* d'*E.coli* (Wilms i col., 2001), induïble per L-

rhamnosa, i el promotor *malK* (Boström i Larsson, 2002), induïble per maltosa, han mostrat la seva aplicabilitat en fermentacions d'alta densitat cel.lular.

### VII.1.2. Alternatives genètiques a la selecció per antibiòtic per evitar la segregació plasmídica

Les estratègies per evitar la segregació plasmídica en processos d'obtenció de proteïnes recombinants es poden classificar en estratègies genètiques o de bioprocés. En aquest apartat es comenten només les estratègies genètiques ja que són les d'ús més generalitzat al ser independents de l'estratègia de cultiu (per una bona revisió en relació a les estratègies de bioprocés: Kumar i col., 1991). Es poden dividir bàsicament en dos grups:

#### a) Plàsmids de complementació a auxotrofies de la soca hoste.

Aquests sistemes es basen en la complementació a una mutació al cromosoma de l'hoste que li resulta letal. Una còpia funcional d'aquest gen essencial per la supervivència de la soca s'incorpora al plàsmid recombinant de forma que la segregació plasmídica comporta la mort cel.lular.

Vectors que contenen el gen *thyA* (essencial per la síntesi de timina) s'han utilitzat amb èxit per garantir l'estabilitat plasmídica en soques d'*E.coli thyA*<sup>-</sup> (Morona i col., 1991). De forma similar, s'han basat sistemes en la manipulació del gen *glnA* (essencial per la síntesi de glutamina) (Ryan i col., 2000). Una limitació comú d'aquests tipus de sistemes basats en auxotrofies per aminoàcids essencials és que funcionen en medis definits però no en medis complexes tipus LB en que el mateix medi aporta els aminoàcids necessaris. No obstant, amb la mateixa idea s'han desenvolupat altres sistemes que assegurin l'estabilitat plasmídica independentment del medi de cultiu emprat per al creixement, per exemple, amb la modificació del gen *dapD* (essencial per la construcció de la paret bacteriana) (Degryse, 1991).

b) *Plàsmids amb mecanismes per induir la mort cel.lular post-segregació.*

Aquests sistemes es diferencien dels anteriors en que la pèrdua del plàsmid provoca la mort cel.lular però no per manca d'un gen essencial per la seva supervivència sinó perquè codifiquen per una proteïna o RNA que inhibeix un mecanisme de mort cel.lular.

Per posar un exemple, s'han utilitzat amb èxit els sistemes basats amb plàsmids que codifiquen per una parella toxina-antitoxina complementàries però sent la toxina més estable que la antitoxina de forma que qualsevol cèl.lula filla lliure del plàsmid conservarà la toxina quan l'antitoxina ja s'hagi degradat i morirà (Galen i col., 1999; Thisted i col., 1994; Schweder i col., 1992).

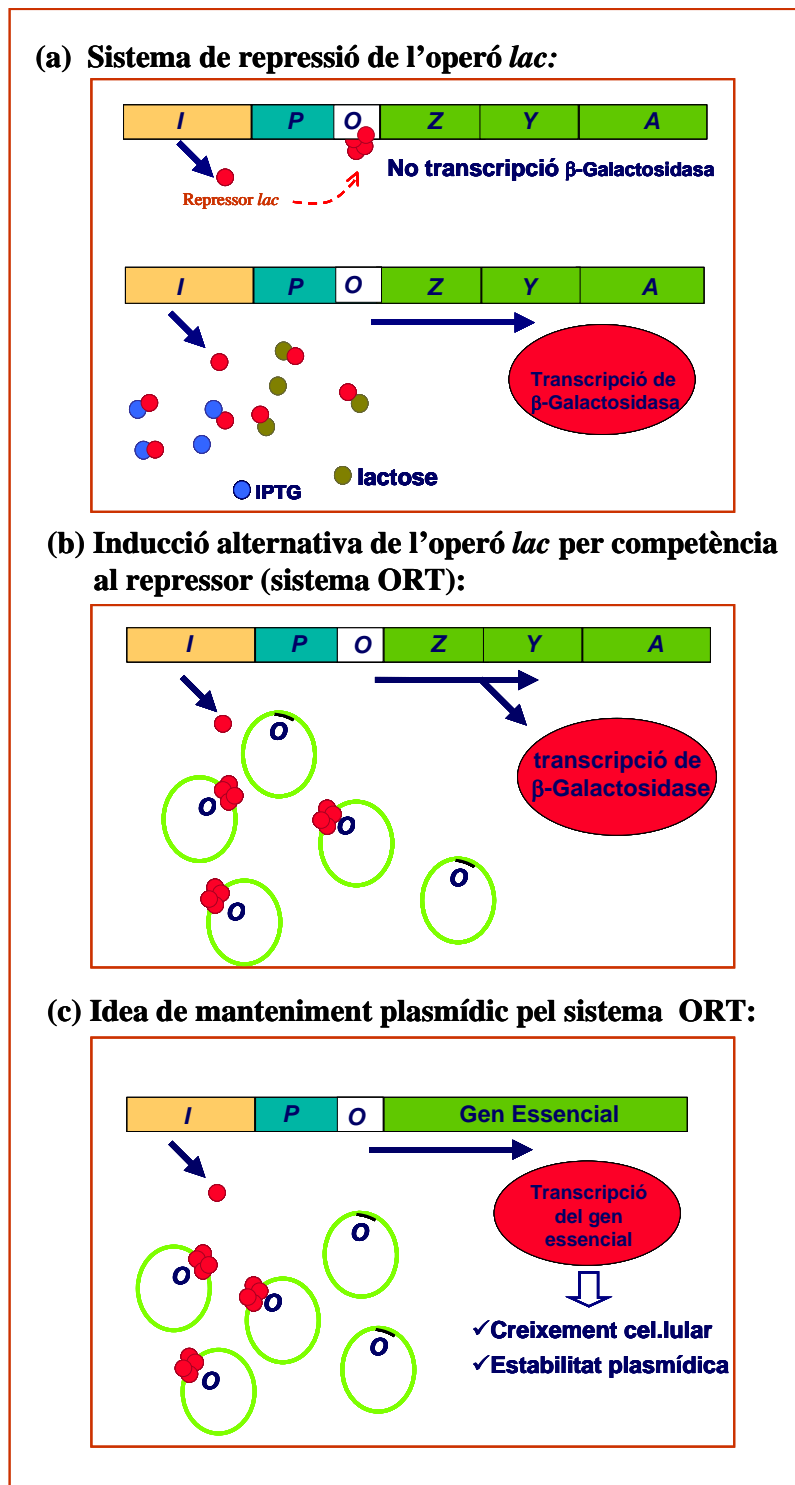
Totes aquestes estratègies, punts a) i b), es caracteritzen per la construcció de vectors que incorporen un gen específic encarregat d'evitar la segregació plasmídica. Per tant, tot i que s'evita la suplementació d'antibiòtics al medi de cultiu mantenen encara un dels principals desavantatges dels sistemes basats la selecció per antibiòtics: s'incrementa de forma innecessària la mida dels vectors i l'estrès metabòlic associat al seu manteniment independentment de la inducció.

El grup del Dr. Sherratt (Universitat d'Oxford, UK) ha desenvolupat un sistema que permet superar també aquesta segona limitació (Cranenburgh i col., 2001; Williams i col., 1998). Aquest sistema, anomenat sistema d'expressió per competència al repressor (ORT; *Operator Repressor Titration Expression System*) es descriu àmpliament al següent aparta ja que és el sistema finalment triat en aquest treball com alternativa per l'expressió de Fuc-1-PA.

### VII.1.3. El sistema d'expressió per competència al repressor (ORT; Operator Repressor Titration Expression System)

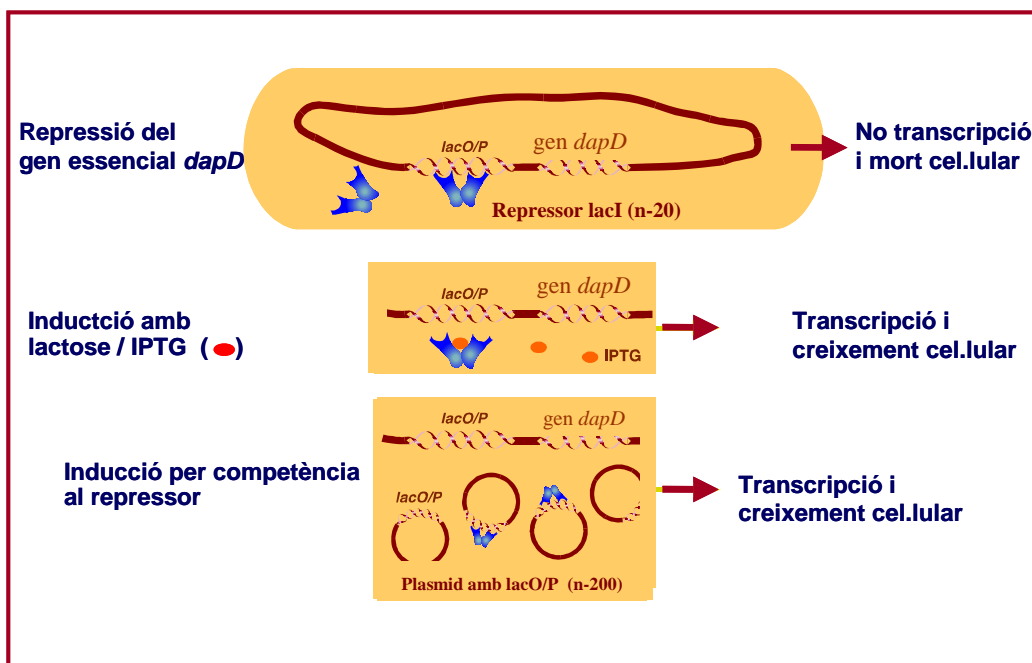
El sistema d'expressió ORT, per competència al repressor (*Operator Repressor Titration Expression system*), es fonamenta en la idea general de modificar el microorganisme hoste per tal que un gen essencial per a la seva supervivència es trobi integrat al cromosoma sota el control d'expressió d'un operador amb control per repressió negativa. En condicions normals una proteïna repressora s'uneix a l'operador evitant la transcripció i provocant la mort cel.lular. En presència de l'inductor del sistema, l'operador queda lliure del repressor perquè s'uneix a l'inductor per qui té major afinitat. Però, alternativament, també es pot induir la transcripció d'aquest gen essencial en presència d'un excés molar de la seqüència de l'operador en un plàsmid multicòpia amb el qual es transforma la soca modificada. En aquest cas s'estableix una competència per la unió del repressor quedant lliure l'operador al cromosoma i permeten la supervivència del microorganisme. D'aquesta forma, en absència de l'inductor, només serà possible el creixement si es manté el plàsmid en excés en les consecutives divisions cel.lulars. Es tracta doncs d'un sistema de selecció plasmídica lliure d'antibiòtics i de la incorporació de cap altre gen al plàsmid, a banda dels d'interès per a la seva sobreexpressió.

El grup del Dr. Sherratt ha triat el sistema de repressió de l'operador *lac* per construir una primera família de soques modificades que permetin utilitzar aquesta idea de competència per repressió en un nou sistema d'expressió lliure d'antibiòtics (Williams i col., 1998). A la Figura VII.1 (a) es recorda esquemàticament el funcionament de l'operador natural *lac* per al control d'expressió de la  $\beta$ -galactosidasa (per més detall veure l'Apèndix.1.). Només en presència de lactosa, substrat natural d'aquest enzim, o d'IPTG, com anàleg estructural de la lactosa no metabolitzable, el repressor allibera l'operador i permet la transcripció. A la Figura VII.1.(b) es presenta la inducció alternativa del sistema en base a la transformació de la soca amb un vector multicòpia i, a la Figura VII.1.(c), com funcionaria el sistema de selecció al substituir el gen d'expressió per a la  $\beta$ -galactosidasa per un gen essencial per al microorganisme.



**Figura VII.1.** Fonament del sistema d'expressió per competència al repressor (ORT; *Operator Repressor Titration Expression System*)

Les soques *E. coli* DH1*lacdapD* i *E. coli* DH1*lacP2dapD* (Cranenburgh i col., 2001), contenen el gen cromosòmic essencial *lapD* sota el control de l'operador *lac*. Aquest gen codifica per a l'enzim tetrahidrodipicolinato N-succiniltransferasa (DAP) que té la funció d'entrecreuar les cadenes de peptidoglicà a la paret cel.lular i és un precursor per a la biosíntesi de lisina. Els mutans que no poden expressar DAP són auxotròfics per a DAP i lisina. DAP no es troba en medis complexos tipus LB i, per tant, els mutants en *dapD* no sobreviuran en aquests tipus de medi. A la Figura VII.2. es mostra el funcionament del sistema ORT utilitzant aquestes soques auxotròfiques per DAP.



**Figura VII.2.** Estabilitat plasmídica en base al sistema d'expressió per competència al repressor (ORT; *Operator Repressor Titration Expression System*) emprant les soques d'*E. coli* DH1*lacdapD* i *E. coli* DH1*lacP2dapD*. (Adaptació de (Cranenburgh i col., 2001)).

Encara que el sistema de selecció funciona per al manteniment de qualsevol plàsmid que garanteixi un excés molar de la seqüència de l'operador *lacO*<sub>1</sub> per a la unió competitiva del repressor, aquest mateix equip ha dissenyat un plàsmid específic per facilitar la producció de DNA plasmídica amb aquest sistema: els vectors anomenats pORT1 (Cranenburgh i col., 2001). Els vectors pORT1 contenen l'origen de replicació pMB1 per a alt número de



còpies, les seqüències de l'operador lac (principal, lacO<sub>1</sub>, i secundària, lacO<sub>3</sub>) òptimament espaiades per garantir la selecció en base a la competència per repressor (Müller i col., 1996), un fragment amb nombroses dianes per a enzims de restricció per a la fàcil introducció d'inserts que interressi amplificar o expressar i el gen *bla*, per a la resistència a ampicil.lina, flanquejat per dues seqüències idèntiques que contenen dianes per a un reduït número d'enzims de restricció molt inusuals de forma que es facilita la seva eliminació en l'últim pas de manipulació prèvia transformació. Aquests vectors pORT1 es caracteritzen per eliminar totes les seqüències que no siguin estrictament necessàries i reduir al màxim la seva mida. A la Figura VII.3 es mostra un esquema dels vectors pORT1.

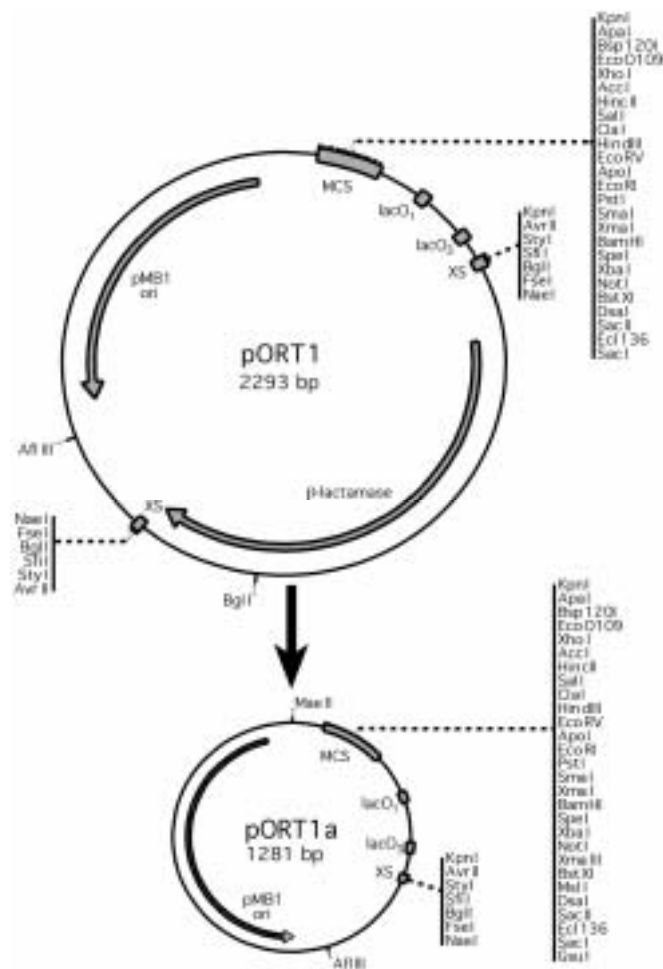


Figura VII.3. Plàsmids pORT1 i pORT1a. S'indiquen els principals components del plàsmid i els enzims de restricció amb lloc de tall únic.

El cultiu d'*E. coli DH1lacdapD* i *E. coli DH1lacP2dapD* transformades amb vectors pORT1 permet l'amplificació de DNA i l'expressió de proteïnes recombinants garantint l'estabilitat plasmídica. En el cas d'expressió recombinant, la transcripció del gen d'interès pot estar sota el control d'un promotor diferent de *lac*, sent necessari la inducció específica de la sobreexpressió, o bé, pot estar controlada pel mateix sistema *lac*. En aquest últim cas, caldrà veure si la competència per repressor permet l'expressió recombinant de forma constitutiva a nivells considerables i sense necessitat d'inducció o bé és necessari l'addició d'IPTG. La suplementació d'IPTG garanteix la supervivència de la soca modificada independentment del manteniment del plàsmid i, en el cas de suplementar IPTG per activar l'expressió recombinant, a partir d'aquest moment podria fallar el sistema de selecció ORT.

#### VII.1.4. Projecte de col.laboració amb Cobra Bio-Manufacturing plc.

Cobra Bio-Manufacturing plc (Keele University Science Park, Regne Unit; Website: [www.cobramanufacturing.com](http://www.cobramanufacturing.com)) és una empresa dedicada al desenvolupament de nova tecnologia per al subministrament i expressió de DNA emprat en teràpia gènica per al tractament de malalties humanes. Una de les seves àrees d'activitat es centra en el desenvolupament de processos per a l'obtenció de DNA plasmídic. El seu departament de Genètica Molecular treballa en el desenvolupament de nous sistemes d'expressió recombinant amb possibilitats d'explotació industrial (per a la producció de DNA plasmídic a escala mínima de gram) i, al mateix temps, segurs per a aplicacions terapèutiques. En concret, han col·laborat amb el grup del Dr. Sherratt (Universitat d'Oxford, UK) en el desenvolupat del sistema d'expressió ORT i l'exploten actualment sota dret de patent.

La utilització d'aquests sistemes d'expressió ORT per a la sobreexpressió de Fuc-1-PA ha estat possible gràcies a un projecte de col.laboració amb Cobra Bio-Manufacturing plc. Aquests vectors es venen utilitzant en diversos projectes per a l'obtenció de DNA a nivell de producció però encara no s'ha estudiat el seu potencial per a la producció de proteïnes recombinants. Per aquest motiu es proposa estudiar la producció de Fuc-1-PA en aquest sistema d'expressió.

Els objectius fixats per al projecte de col.laboració són els següents:

- 1.- Disseny i obtenció de nous vectors d'expressió per a la producció de Fuc-1-PA basats en els vectors pORT1.
- 2.- Transformació de les soques *DH1lacdapD* i *DH1lacP2dapD* amb els nous vectors i caracterització a petita escala de les noves soques recombinants a nivell de creixement i sobreexpressió de Fuc-1-PA.
- 3.- Estudi del comportament de les soques recombinants seleccionades en processos de fermentació a diferents escales.

Tota la part experimental relacionada amb aquest projecte de col.laboració s'ha realitzat a les instal.lacions de Cobra Bio-Manufacturing plc. i els resultats obtinguts es descriuen en tres subcapítols atenent a aquests tres punts d'objectius fixats a l'inici del projecte.

## VII.2. RESULTATS I DISCUSSIÓ.

### VII.2.1. Disseny i obtenció de nou vectors tipus pORT per a la producció de Fuc-1-PA.

El plàsmid pTrcHis consta bàsicament d'un origen de replicació ColE1 per a alt nombre de còpies, del gen *lacI<sup>q</sup>* per a la sobreexpressió del repressor de promotors tipus *lac* i del gen *bla* per a la resistència a  $\beta$ -lactamasa (ampicil.lina) (veure figura del plàsmid a IV.2.1.1. Descripció de soques i vectors). Encara que conté les dues seqüències de l'operador *lac* (*lacO<sub>1</sub>* i *lacO<sub>3</sub>*) necessàries per a la selecció i manteniment dels plàsmids mitjançant el sistema ORT, aquestes seqüències no es troben correctament espaiades per garantir la repressió (Müller i col., 1996).

Es plantegen tres estratègies per optimitzar l'expressió de Fuc-1-PA en soques del sistema ORT.

#### a) Eliminació dels gens *bla* i *lacI<sup>q</sup>* del vector pTrcfuc.

La via més simple per aplicar el sistema ORT en l'expressió de Fuc-1-PA passaria per a utilitzar el mateix vector pTrcfuc eliminant-n'hi el gen *bla*. La sobreexpressió del repressor de *lac* a partir de gen *lacI<sup>q</sup>* del mateix vector podria afectar a la competència per llocs d'unió en que es basa el sistema ORT i es considera també necessària l'eliminació d'aquest gen. Tot i així, l'incorrecte espaiat entre les dues seqüències de l'operador *lac* (*lacO<sub>1</sub>* i *lacO<sub>3</sub>*) del plàsmid pTrcfuc no garanteixen el funcionament del sistema ORT i, finalment, es desestima aquesta alternativa.

#### b) Transferència del *cassette* d'expressió de Fuc-1-PA al vector pORT1a.

El vector pORT1a ha estat especialment dissenyat per a la producció de DNA mitjançant el sistema ORT. És un plàsmid d'alt nombre de còpies, no conté cap gen de resistència a antibiòtic i assegura el correcte espaiat entre les seqüències *lacO<sub>1</sub>* i *lacO<sub>3</sub>* per a la unió del repressor (veure Figura VII.3.). Aquesta estratègia passa per l'escissió del *cassette* per a l'expressió de Fuc-1-PA original de pTrcfuc i la seva introducció a pORT1a. Aquest

*cassette* consta bàsicament de: el promotor Trc, el lloc de unió a ribosoma T7g10, la seqüència per la transcripció d'un mini cistró i la seqüència de *fucA* per l'expressió de Fuc-1-PA com a proteïna de fusió a una cua de sis histidines (*veure* Figura a l'Apèndix 4). S'obté la nova construcció plasmídica pORT1afuc per a l'expressió del gen *fucA* sota el control del promotor Trc induïble per IPTG.

L'estratègia experimental per a l'obtenció de pORT1afuc s'esquematitza a la Figura VII.4. Els passos següents són els següents:

- 1.- Extracció del *cassette* d'expressió de Fuc-1-PA de pTrcfuc mitjançant els enzims de restricció *SspI* i *EcoRI*.
- 2.- Linialització de pORT1 amb *HincII* i *EcoRI*.
- 3.- Ligació del dos fragments obtinguts (passos 1 i 2) per rendir pORT1fuc.
- 4.- Eliminació del gen *bla* de pORT1fuc tallant als llocs d'escissió amb *FseI* i relligant el fragment obtingut lliure d'aquest gen per rendir pORT1afuc.

c) Creació d'un nou vector tipus pORT per a l'expressió de Fuc-1-PA sota el control del promotor  $\lambda P_L/P_R$ .

Com alternativa a la inducció per IPTG, es planteja l'expressió de Fuc-1-PA en un plàsmid tipus pORT però sota el control d'un promotor induïble per temperatura. Aquesta estratègia requereix, en un primer pas, la construcció d'un nou plàsmid, pORT1Lfuc, introduint el repressor induïble per temperatura lambda cI857 i els promotors lambda P<sub>L</sub> i P<sub>R</sub> a pORT1. Finalment, introduint la seqüència del gen *fucA* sota el control dels promotors lambda s'obté pORT1aLfuc per a l'expressió de Fuc-1-PA induïble per temperatura.

Els passos següents experimentalment per a l'obtenció de pORT1aLfuc s'esquematitzen a la Figura VII.5 i són els següents:

- 1.- Mitjançant els enzims de restricció *EcoRI* i *PstI*, extracció de la regió que conté el repressor lambda cI857 i els promotors lambda P<sub>L</sub> i P<sub>R</sub> d'un plàsmid preexistent per al control d'expressió sota aquest sistema però inadequat per al sistema ORT.
- 2.- Linialització de pORT1 amb *PstI* i *EcoRI*.

**Figures VII.4 i VII.5**



- 3.- Ligació del dos fragments obtinguts (passos 1 i 2) per rendir pORT1L.
- 4.- Extracció del gen *fucA* del vector d'expressió original pTrc*fuc* amb *NcoI* i *BstBI*.
- 5.- Linialització de pORTL amb *EcoRV* i *BspDI*.
- 6.- Ligació del dos fragments obtinguts (passos 4 i 5) per rendir pORT1L*fuc*.
- 7.- Eliminació del gen *bla* de pORT1L*fuc* tallant als llocs d'escissió amb *FseI* i relligant el fragment obtingut lliure d'aquest gen per rendir pORT1aL*fuc*.

El mini cistró anterior al gen *fucA* a la seqüència del *cassette* d'expressió original Trc no s'inclou en aquesta estratègia de clonatge però es manté el cistró per a l'expressió de Fuc-1-PA com a proteïna de fusió a una cua de sis histidines. D'aquesta forma, la Fuc-1-PA obtinguda per qualsevol d'aquestes dues estratègies serà comparable amb l'obtinguda amb el vector pTrc*fuc* i conservarà el mateix avantatge de cara a purificació per afinitat.

Els resultats de seqüenciació nucleotídica dels nous vectors, pORT1a*fuc* i pORT1aL*fuc*, confirmen les construccions esperades amb l'excepció, en ambdós casos, d'una mutació puntual al *cassette* d'expressió de *fucA*. No obstant, aquesta mutació puntual no afecta a la seqüència codificant per al gen *fucA* d'interès ja que es troba a la regió posterior al fragment codificant per la cua d'histidines (*veure* Apèndix.4.). Aquesta mutació correspon a la modificació del nucleòtid C en posició 506 pel nucleòtid G i implica, segons el marc de lectura de la proteïna de fusió His-Xpress-(Fuc-1-PA), el canvi d'histidina (H) a àcid aspàrtic (D) per a l'aminoàcid en posició 32 de la seqüència d'aquesta proteïna de fusió. La seqüenciació nucleotídica posterior del *cassette* d'expressió de *fucA* del vector pTrc*fuc*, demostra que aquesta mutació ja es trobava en la seqüència de Fuc-1-PA expressada en XL1 Blue MRF' (pTrc*fuc*) i que no afecta a l'expressió de l'enzim en forma soluble activa.

En tots els passos intermedis per arribar a obtenir els nous vectors, pORT1a*fuc* i pORT1aL*fuc*, i per confirmar la seva seqüència s'utilitza una soca estàndard d'alta eficiència en transformació, *E.coli* XL10-Gold *Kan<sup>r</sup>* (Stratagene). Les soques DH1lac*dapD* i DH1lacP2*dapD*, pròpies del sistema ORT (Cranenburgh i col., 2001), es transformen amb els nous vectors pORT1a*fuc* i pORT1aL*fuc* únicament en l'últim pas del procés, havent eliminat el gen de resistència a ampicil.lina. L'eficiència de transformació en DH1lac*dapD*



és alta i no es presenten problemes per l'aïllament de transformants *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*. En canvi, va ser impossible obtenir clons transformants derivats de la soca *DH1lacP2dapD*. L'única diferència entre ambdues soques correspon a la mutació de dos nucleòtids a la seqüència del promotor *lac* per evitar l'expressió basal de DAP, que en *DH1lacDapD* permet el creixement de la soca no induïda en medi complex líquid (però no en medi sòlid). Aquest canvi fa que les soques recombinants de *DH1lacP2dapD* siguin més estrictes en relació al manteniment dels plàsmids amb el promotor *lac* que garanteixen la seva supervivència (Cranenburgh i col., 2001). Donat que en tots els estudis realitzats amb *DH1lacdapD* en sistemes ORT no s'ha detectat problemes de segregació plasmídica (comunicació personal Dr. R. Cranenburgh, Cobra Bio-manufacturing plc.) es decideix seguir endavant sense aquestes soques alternatives.

#### VII.2.2. Caracterització de les noves soques recombinants *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*.

Per a la caracterització de les noves soques ORT s'estudia el seu comportament a nivell de creixement, capacitat d'expressió de Fuc-1-PA i estabilitat plasmídica. La soca XL1 Blue MRF' (*pTrefuc*) s'inclou també a l'estudi a mode de control.

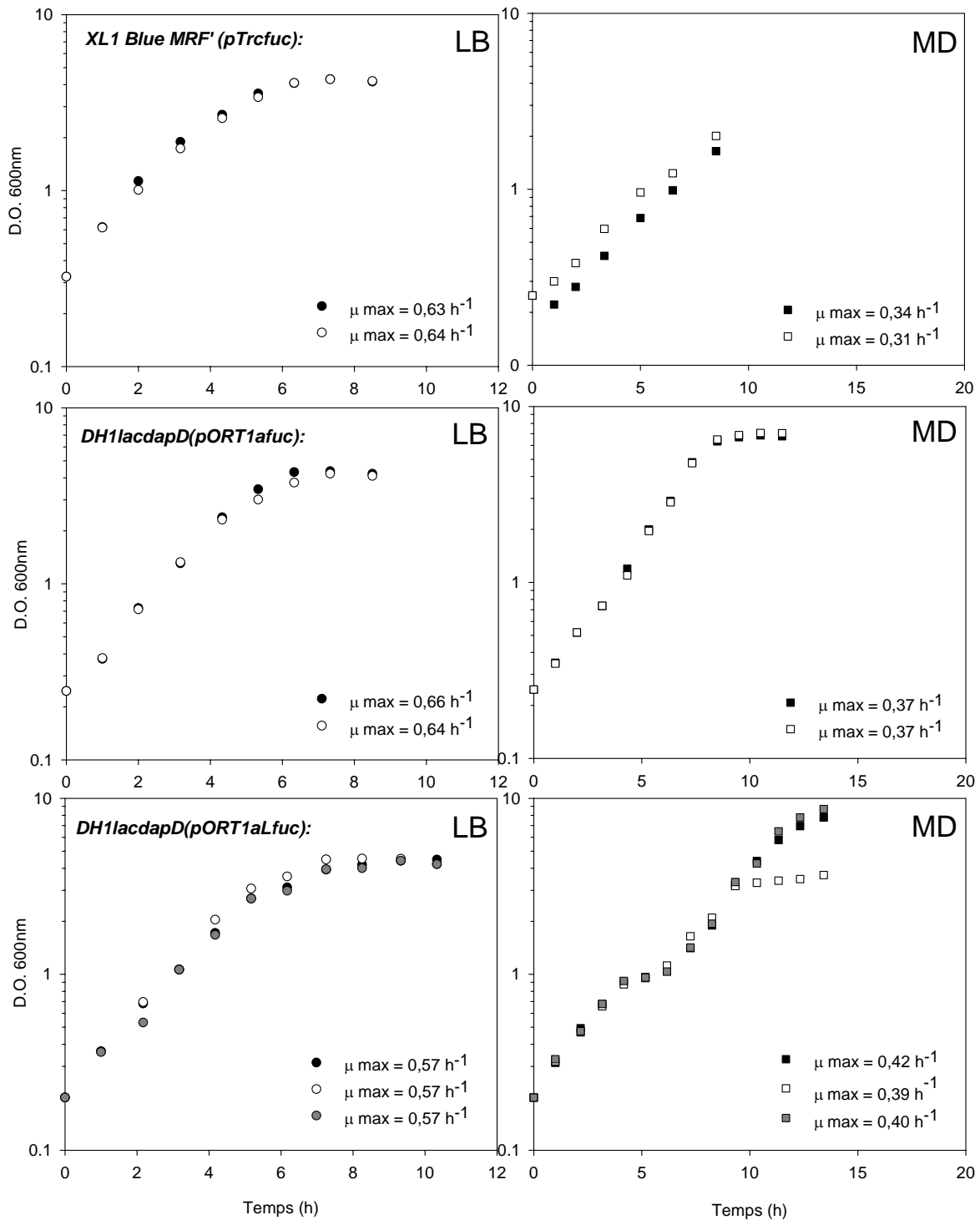
#### Creixement de *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* en LB i MD-FB.

*DH1lacdapD* és auxotròfica per L-prolina i tiamina segons estudis preliminars de caracterització de la soca en medi mínim mineral (comunicació personal Dr. R. Cranenburgh, Cobra Bio-manufacturing plc.). Quan es treballa amb les soques recombinants derivades de *DH1lacdapD*, s'inclou L-prolina a concentració final 0,5 g/l a la composició del medi MD-FB (a 10g glucosa /l).

L'estudi es realitza en matrassos Erlenmeyer de 250 ml de capacitat tal com es descriu a l'apartat IV.3.b. de Materials i Mètodes. Es treballa a la temperatura òptima de creixement

per a cada soca (37°C per *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i XL1 Blue MRF' (pTrcfuc), 30°C per *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*) i, paral·lelament, en medi complex LB i definit MD. Per l'estudi de sobreexpressió recombinant de Fuc-1-PA, les soques Blue MRF' (pTrcfuc) i *DH1lacdapD(pORT1afuc)* s'indueixen a 500 µM d'IPTG a l'inici de l'etapa exponencial de creixement ( $D.O_{.600nm} \approx 1.00$ ). En el sistema *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* s'indueix l'expressió recombinant augmentant la temperatura de 30°C a 42°C. En aquest cas s'indueix l'expressió al principi i al final de la fase exponencial de creixement ( $D.O_{.600nm} \approx 1.00$  i  $D.O_{.600nm} \approx 4.00$  respectivament).

A la Figura VII.6 es mostren els resultats obtinguts en aquest experiment.



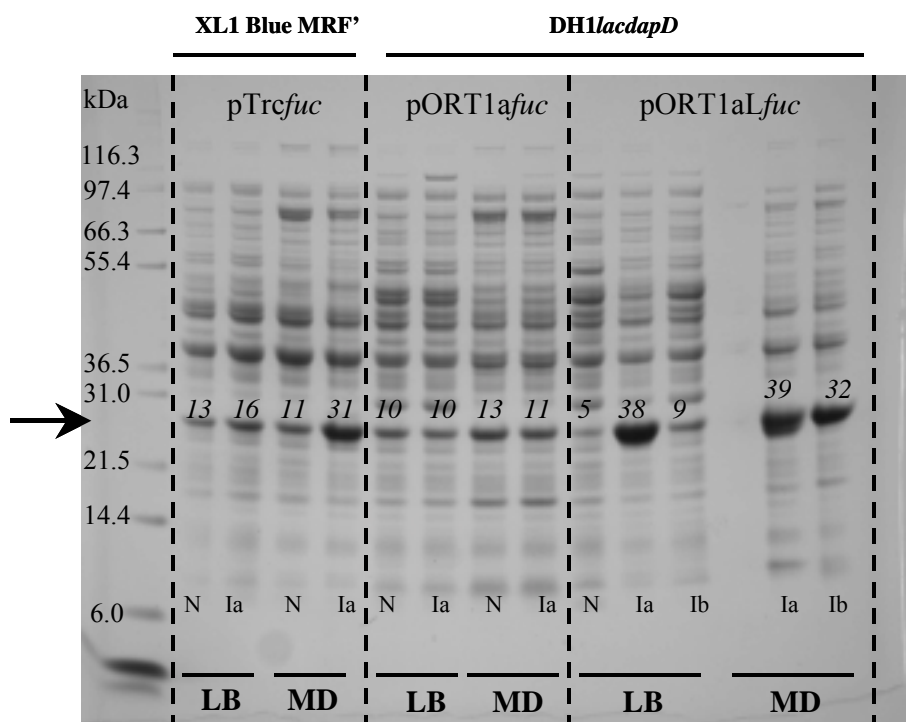
**Figura VII.6.** Perfils de creixement de les soques XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i DH1lacdapD(pORT1afuc), a 37°C, i DH1lacdapD(pORT1aLfuc), a 30°C, en LB(cercles) i MD (quadrats). (●, ■) No induït, (○, □) induït a D.O.<sub>600nm</sub> = 1,00, (●, ■) induït a D.O.<sub>600nm</sub> = 4,00.

Després de la inducció, no s'observen modificacions del perfil de creixement respecte al cultiu control no induït que indiquin un estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant significatiu per cap de les soques incloses a l'estudi. En el cas de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) aquest resultat ve a corroborar els obtinguts als capítols anteriors. Només en el creixement de *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* en medi MD induït a l'inici de la fase exponencial, el creixement s'atura amb anterioritat assolint una concentració cel.lular màxima 2,5 cops inferior que el cultiu control no induït. Diversos aspectes en relació a l'increment de temperatura poden influir en aquest comportament: la disminució de la solubilitat d'oxigen al medi, la necessitat d'augmentar la velocitat de transferència d'oxigen per mantenir el creixement cel.lular a l'incrementar-se la velocitat de creixement i també l'efecte de la sobreexpressió recombinant sobre el creixement.

En medi LB, les velocitats específiques màximes de creixement són molt similars per les dues soques induïbles per IPTG, XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i *DH1lacdapD(pORT1afuc)*, amb valors al voltant de  $0,65 \text{ h}^{-1}$ . Per la soca *DH1lacdapD(pORT1afuc)*, tot i la reducció de temperatura, aquest valor és només lleugerament inferior,  $0,57 \text{ h}^{-1}$ , i es pot considerar també del mateix ordre. Aquests resultats es venen a repetir en medi MD, un altre cop les velocitats específiques màximes de creixement són del mateix ordre per les dues soques induïbles per IPTG, XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i *DH1lacdapD(pORT1afuc)*, amb valors de  $0,33 \text{ h}^{-1}$  i  $0,37 \text{ h}^{-1}$  respectivament. Tot i la reducció de temperatura, la velocitat específica màxima de creixement de *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* és en aquests cas fins i tot lleugerament superior,  $0,40 \text{ h}^{-1}$ .

#### Expressió de Fuc-1-PA en *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*

A la Figura VII.7 es presenten els resultats obtinguts de la quantificació de la fracció de Fuc-1-PA intracel.lular a final del creixement per a cada un d'aquests cultius. En paral.lel, s'analitza l'activitat específica per a les mateixes mostres (Taula VII.1.).



**Figura VII.7.** Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE i quantificació densitomètrica de mostres de la fracció intracel·lular corregides per biomassa a final de creixement. (N) no induït (Ia) induït a D.O. 600nm = 1,00 (Ib) induït a D.O. 600nm = 4,00. La soca recombinant (part superior), el medi de cultiu (part inferior en majúscules) i l'estimació de % de proteïna total intracel·lular corresponent a Fuc-1-PA (*cursiva*) s'indiquen sobre el gel.

**Activitat específica Fuc-1-PA a final de creixement (UA·g<sup>-1</sup>PS)**

	XL1 Blue MRF'(pTrcfuc)		DH1lacdapD (pORT1afuc)		DH1lacdapD (pORT1aLfuc)	
	LB	MD	LB	MD	LB	MD
<b>No induït</b>	218,7	213,1	(106,3)	(115,8)	(25,6)	(38,0)
<b>Ind. inici</b>	320,0	628,6	(149,3)	(40,2)	823,7	404,2
<b>Ind. final</b>	—	—	—	—	(124,7)	(259,3)

**Taula VII.1.** Quantificació d'activitat Fuc-1-PA específica a final de creixement. (En cursiva i entre parèntesi): per indicar valors en el límit de detecció de l'assaig enzimàtic.

Els resultats obtinguts per a XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) corroboren els obtinguts prèviament per a aquesta soca (veure Capítol I): l'efecte de la inducció en LB és molt petit i, en canvi, en MD, l'acumulació de Fuc-1-PA citoplasmàtica supera el 30 per cent de proteïna intracel.lular a final de creixement i correspon a un increment de 3 cops l'activitat específica respecte al cas de no inducció.

De l'anàlisi densitomètrica de DH1lacdapD (pORT1afuc) s'extreu que l'efecte de la inducció és inapreciable en ambdós medis de cultiu mantenint-se els nivells d'expressió constitutiva obtinguts per al cultiu no induït (al voltant del 10%). L'activitat específica a final de creixement per als mateixos cultius de DH1lacdapD (pORT1afuc) (veure Taula VII.1.) es situa sobre el límit de detecció de l'assaig enzimàtic i l'error en les mesures d'activitat corresponents dificultant la interpretació d'aquests resultats. Només globalment, i de forma semi-quantitativa, es pot afirmar que, independentment del medi de cultiu i que s'hagi induït o no l'expressió recombinant, l'activitat Fuc-1-PA és reduïda al voltant del 50% respecte a l'obtinguda amb el cultiu de XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) control no induït (de 200 a 100 UA/g PS). Aquests resultats fan pensar que DH1lacdapD (pORT1afuc) no respon a la inducció i té problemes per al correcte plegament de Fuc-1-PA cap a la seva forma activa.

Per a DH1lacdapD (pORT1aLfuc), al canviar a un promotor del bacteriòfag lambda induïble per temperatura, l'expressió basal es reduïx en un 50% en ambdós medis respecte a XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) (passa de l'ordre del 10% al 5% de la proteïna intracel.lular). En LB, induït a l'inici de la fase exponencial de creixement s'assoleix una acumulació de Fuc-1-PA màxima per sobre del 35% de la proteïna intracel.lular total. En canvi, quan en el mateix medi s'indueix a una densitat òptica superior, la inducció coincideix amb el final del creixement i pràcticament no s'aprecia el seu efecte. En MD, la velocitat de creixement és reduïda lleugerament en relació a LB, de  $0,57 \text{ h}^{-1}$  a  $0,40 \text{ h}^{-1}$ , i és possible assolir màxims d'acumulació intracel.lular superiors al 30% independentment del moment d'inducció (a  $D.O_{600\text{nm}} = 1,00$  o  $D.O_{600\text{nm}} = 4,00$ ). Aquests resultats evidencien que l'expressió recombinant va lligada a creixement i que, com succeïa en XL1 Blue MRF'(pTrcfuc), és necessari mantenir el creixement del cultiu induït un mínim d'hores per assolir la màxima

acumulació de Fuc-1-PA. Sembla que, per a *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* i per a ambdós medis de cultiu, 4 hores de creixement induït és suficient per que la fracció de proteïna total intracel.lular corresponent a Fuc-1-PA superi el 30%.

Per a aquesta soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* creixent en LB s'assoleix l'activitat específica màxima per a cultius en Erlenmeyer obtinguda en aquest treball, 824 UA·g<sup>-1</sup> PS, corresponents a un increment de 30 cops l'activitat en cas de no inducció. Per al cultiu en MD amb la mateixa acumulació de Fuc-1-PA intracel.lular al voltant del 38%, l'activitat específica es redueix al 50%, 404 UA·g<sup>-1</sup> PS, però, tot i així, suposa incrementar 10 cops l'obtinguda per a la situació de no inducció. De forma contrària al que succeïa amb XL1 Blue MRF' (pTrc<sub>fuc</sub>), en aquest cas la naturalesa complexa del medi és un avantatge per al plegament correcte de l'enzim sobreexpressat cap a la seva forma activa a les condicions de treball.

Amb el canvi de temperatura, al mateix temps que s'indueix l'expressió recombinant, s'incrementa la velocitat de creixement del microorganisme i la seva activitat metabòlica. L'efecte de la temperatura sobre la sobreexpressió recombinant en aquest tipus de sistemes ha estat àmpliament estudiat. L'augment de temperatura incrementa la síntesi de proteïnes codificades als plàsmids: en termes absoluts, perquè s'accelera la síntesi proteica en general (Farewell i Neidhardt, 1998), però, també, en relació a la síntesi de proteïnes de la cèl.lula hoste al incrementar-se el número de còpies del plàsmid per unitat cel.lular (Kaprálék i col., 1998 i Hoffman i Rias, 2001). Si, per altra banda, es treballa amb promotors d'expressió recombinant induïbles per temperatura, l'estrès metabòlic associat al canvi de temperatura pot ser encara més important i en aquesta situació es solen activar respostes metabòliques específiques al xoc tèrmic i a la situació d'estrès per la màxima activitat sintètica (*Heat-shock response* i *stringent response*) (Goff i Goldberg, 1985; Harcum i Bentley, 1999). S'accelera, entre altres mesures, la síntesi d'un gran nombre de xaperones per intentar evitar el plegament incorrecte de proteïnes cap a formes no actives. En aquesta situació de màxima activitat sintètica, molts autors coincideixen en l'avantatge que suposa treballar amb medis de composició complexa que aporten aminoàcids que directament es poden

utilitzar per allargar les cadenes proteiques i ajuden a alleugerar tota la sobrecàrrega sintètica (Li i col., 1990; Han i col., 2001).

*Estabilitat plasmídica de DH1lacdapD(pORT1afuc) i DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*

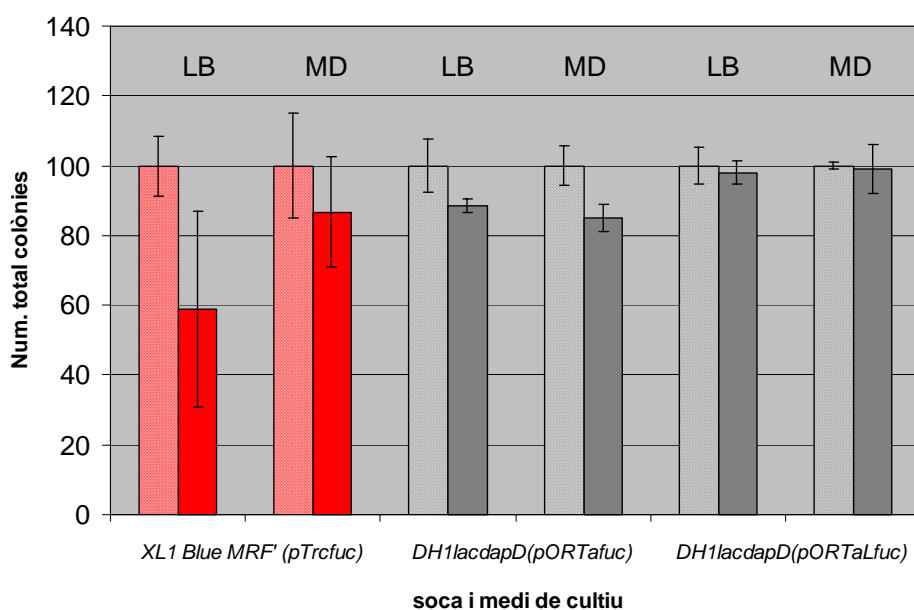
Per comprovar l'efectivitat del sistema ORT per al control de segregació plasmídica en cultius de *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*, es realitza un experiment en Erlenmeyer en que es manté el creixement de cultius no induïts un mínim de 35 generacions i es comprova el contingut plasmídic per unitat cel.lular al llarg del temps. D'aquesta manera s'intenta preveure la possible inestabilitat plasmídica al llarg d'un cultiu semicontinu.

No és possible mantenir un creixement en Erlenmeyer més enllà de les 7 o 9 generacions, depenent de la soca i condicions de treball. Per poder simular els problemes de segregació plasmídica associats a cultius llargs es fa necessari emprar el brou final de creixement d'un cultiu de 24h com a inòcul del següent i repetir aquesta operació tants cops com sigui d'interès. Per assegurar 35 generacions de cultiu (equivalent a més de 100 h de cultiu semicontinu en MD controlant la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ ) es repeteix aquesta operació cinc cops. S'inclou també a l'estudi XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*) sense suplementar el medi de cultiu amb ampil.lina com a marcador de selecció. Els cultius es realitzen a la temperatura òptima de creixement per a cada soca ( $37^{\circ}\text{C}$  per *DH1lacdapD(pORT1afuc)* i XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*),  $30^{\circ}\text{C}$  per *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*) i paral.lelament en LB i MD.

Per determinar l'estabilitat plasmídica s'utilitzen dues tècniques diferents: anàlisi de DNA plasmídic i la resposta al marcador de selecció. Per una banda, es compara el contingut plasmídic relatiu a biomassa al llarg del temps sobre gels d'agarosa utilitzant mostres de cada 24 hores de cultiu corregides per biomassa i processades per a l'extracció del DNA plasmídic. De forma complementària, al final del procés es determina el tant per cent de cèl.lules que responen a la presència del marcador de selecció i que per tant, han mantingut el contingut plasmídic al llarg de les generacions de cultiu (*veure* Materials i Mètodes



IV.5.4.1.). Per a les soques basades en el sistema ORT, s'utilitza com a marcador de selecció IPTG: només les cèl.lules que han mantingut el plàsmid han de sobreviure en creixement en medi sòlid sense suplementació amb IPTG. En el cas de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) només les cèl.lules que mantenen el gen codificant per a la resistència a ampicil.lina sobreviuran a la suplementació del medi sòlid amb aquest antibiòtic.

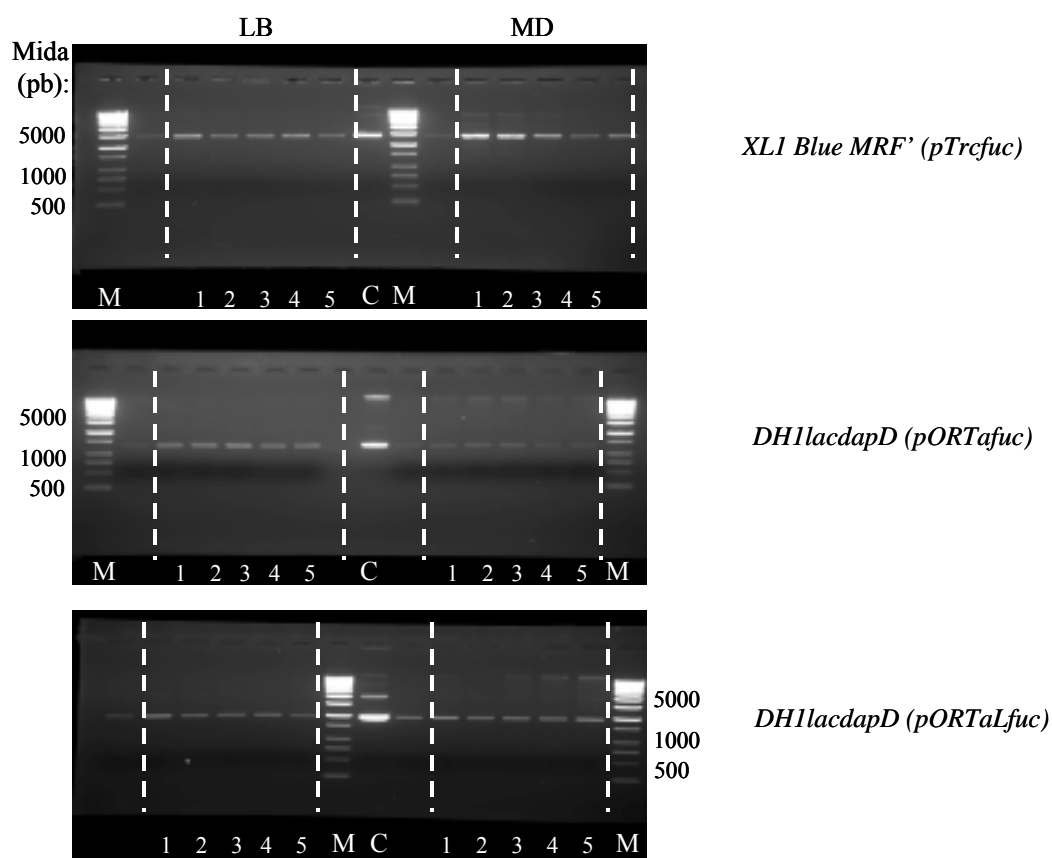


**Figura VII.8.** Resultats de segregació plasmídica per seguiment de la fracció de cèl.lules que mantenen la seva capacitat de divisió en cultiu en LB amb/sense el marcador específic de selecció. (▨▨▨▨, ▨▨▨▨) sense marcador de selecció: sense ampicil.lina i amb IPTG respectivament. (■, ■) amb marcador de selecció: amb ampicil.lina i sense IPTG respectivament.

Els resultats obtinguts es mostren a les Figures VII.8 i VII.9. Si s'analitzen primer els resultats de resposta al marcador de selecció (veure Figura VII.8), l'únic cas en que sembla haver un problema de segregació plasmídica important és en el cultiu de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en medi complex LB. A final del creixement en aquest medi, al voltant del 40% de les cèl.lules han perdut el plàsmid per a l'expressió recombinant de Fuc-1-PA. Quan el mateix microorganisme es cultiva en medi MD els problemes de segregació es redueixen significativament amb una pèrdua de contingut plasmídic a final de creixement només del 10%. D'aquests resultats es pot extreure que la probabilitat de segregació plasmídica en

cultius semicontinus de XL1 Blue MRF' (pTrefuc) en medi MD suplementant ampilicil.lina al llarg de tot el procés, com els realitzats al Capítol VI, és baixa i que es podria provar d'eliminar aquest antibiòtic del medi sense esperar segregacions plasmídiques importants.

Per a les soques amb control de segregació pel sistema ORT no s'observen comportament diferents segons el medi de cultiu. Els millors resultats s'obtenen per a *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* amb total estabilitat plasmídica. Per a *DH1lacdapD(pORT1afuc)* en ambdós medis s'estimen segregacions plasmídiques al voltant del 15%.



**Figura VII.9** Resultats d'estabilitat plasmídica segregacional i estructural per seguiment del contingut de DNA plasmídica relatiu a biomassa. Descripció dels carrils: **M**: marcador de selecció, **C**: mostra control del plàsmid d'interès, **(1,2,3,4,5)**: mostra a final de creixement per consecutives resembres realitzades cada 24 hores de cultiu.

El seguiment de concentració plasmídica relatiu a biomassa al llarg del procés ve a corroborar aquests resultats (veure Figura VII.9). Aquesta és una tècnica semi-quantitativa que requereix d'una gran manipulació de les mostres i en la que els resultats dependran de la qualitat del procés per a l'extracció del DNA plasmídic, no obstant, dona informació addicional en relació a l'estabilitat estructural del plàsmid: possibles modificacions o delecions. Es mostren els resultats d'extracció de DNA de mostres corregides per biomassa per cada 24 hores de cultiu. La intensitat de la banda corresponent al plàsmid d'interès és proporcional al número de còpies del plàsmid per unitat de biomassa i la presència de bandes inesperades d'altres mides indica l'instabilitat estructural del plàsmid.. Només per als cultius de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en LB i MD s'observa una tendència clara a la reducció del número de còpies del plàsmid per unitat de biomassa al llarg del temps i, en tots els casos, es descarten problemes d'estabilitat estructural.

A la Taula VII.2 es presenta un resum dels resultats obtinguts en aquest estudi per a la caracterització de les noves soques recombinants en base al sistema ORT. El comportament d'ambdues soques ORT és molt similar en relació a creixement i estabilitat plasmídica però molt diferent en relació a l'expressió recombinant de Fuc-1-PA.

	XL1 ... (pTrcfuc)		DH1 ... (pORT1afuc)		DH1...(pORT1aLfuc)	
Temp. creixement / inducció:	37°C / 500 µM IPTG		37°C / 500 µM IPTG		30°C / 42°C	
	LB	MD	LB	MD	LB	MD
- µ (h <sup>-1</sup> ) màx.:	0,63	0,34	0,66	0,37	<b>0,57</b>	<b>0,35</b>
- Estabilitat plasmídica (% manteniment de plàsmid):	58	87	88	85	<b>98</b>	<b>99</b>
- Acumulació màx. Fuc-1-PA (% proteïna total):	16	31	10	11	<b>38</b>	<b>39</b>
- Activitat específica màx. Fuc-1-PA(UA·g <sup>-1</sup> PS):	320	628,6	(149,3)	(115,8)	<b>823,7</b>	<b>404,2</b>

**Taula VII.2.** Resum dels resultats de caracterització en matràs Erlenmeyer de les noves soques recombinants basades en el sistema d'expressió ORT i comparació amb la soca XL1 Blue MRF'(pTrcfuc). (En cursiva i entre parèntesi): per indicar valors en el límit de detecció de l'assaig enzimàtic.

La soca *DH1lacdapD(pORT1afuc)* no respon a la inducció en cap dels medis de treball. A la vista dels resultats obtinguts, aquest comportament no es pot explicar per problemes de segregació o deleccions del plàsmid ni tampoc per problemes associats al *cassette* per a l'expressió de Fuc-1-PA (es manté l'utilitzat en XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*) i en aquest cas s'observa una clara resposta a la inducció). En aquesta soca, tant el control de segregació plasmídica com el de regulació d'expressió recombinant depenen de la unió del repressor lac cromosòmic als operadors lac plasmídics. La baixa expressió basal, molt similar a la obtinguda per XL1 Blue MRF' (*pTrcfuc*) amb expressió de repressor lac adicional plasmídica per millorar la regulació de transcripció, ve a indicar que el número de còpies del plàsmid per unitat cel.lular és suficient per mantenir la supervivència de la soca alliberant el punt d'unió del repressor al cromosoma amb la competència per punts d'unió plasmídics però que, pràcticament, queden coberts tots els punts d'unió plasmídics observant-se l'expressió basal pròpia de la regulació poc eficient del promotor Trc. Tot i així, s'esperaria resposta a la inducció: l'IPTG competiria per la unió del repressor disminuint la seva afinitat pels operadors lac plasmídics i incrementant la transcripció.

El repressor lac és un tetràmer que es pot unir simultàniament a dos operadors lac d'una mateixa molècula de DNA, sent la repressió tant més forta com millor situats estiguin els dos operadors per augment de la concentració del repressor al voltant dels punts d'unió (Müller i col., 1996). Sembla que d'alguna manera, la presència de tres operadors lac en el plàmid *pORT1afuc* (dos del vector de clonatge *pORT1* i un per al control d'expressió de Fuc-1-PA) incrementa l'afinitat del repressor per l'operador plasmídic i l'IPTG ja no suposa competència per la seva unió. Per incrementar l'expressió recombinant en *DH1lacdapD(pORT1afuc)* es podria provar d'utilitzar un origen de replicació plasmídica més fort per incrementar el número de còpies del plàsmid per unitat cel.lular i/o disminuir l'expressió cromosòmica del repressor.

En la soca *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)*, en canvi, la utilització de sistemes de control diferents per l'estabilitat plasmídica i la sobreexpressió recombinant permet assolir concentracions específiques màximes de Fuc-1-PA que superen el 35% del total de proteïna

intracel·lular en ambdós medis de cultiu i evitar completament els problemes de segregació plasmídica simultàniament.

En base a tots aquests resultats, es tria la soca *DH1lacdapD* (pORT1aL*fuc*) per estudiar la viabilitat de producció de Fuc-1-PA en fermentador utilitzant el sistema d'expressió ORT. Tot i que el medi LB es presenta com la millor alternativa per maximitzar l'activitat específica de l'enzim (824 UA Fuc-1-PA/g PS al final del procés), es decideix treballar amb medi MD (404 UA Fuc-1-PA/g PS al final del procés). Es pren aquesta decisió pensant en utilitzar l'estratègia operacional semicontínua per limitació en glucosa posada a punt al capítol anterior d'aquest treball per aquests estudis en fermentador i en base al plantejament de dues hipòtesis:

- Si es possible assolir CADC amb aquesta estratègia, la productivitat volumètrica global del sistema podria ser molt superior tot i mantenir una activitat específica inferior.
- El fet de poder controlar la velocitat de creixement després de la inducció podria reduir l'efecte de l'increment de temperatura sobre l'expressió recombinant millorant l'activitat específica estimada en MD.

Per altra banda, aquesta decisió resulta atractiva pel fet que encara no s'ha provat aquest sistema d'expressió ORT en cultius en medi definit.

### **VII.2.3. Adaptació de l'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa al creixement de *DH1lacdapD*(pORT1aL*fuc*) en MD-FB i per a la producció de Fuc-1-PA.**

Amb l'objectiu d'assolir CADC treballant amb *DH1lacdapD*(pORT1aL*fuc*), es decideix provar la mateixa estratègia semicontínua exponencial sense control retroalimentat i en base a un perfil teòric d'addició optimitzada per al cultiu de XL1 Blue MRF' (pTrc*fuc*). Aquesta estratègia es basa en el control d'addició de glucosa com a única font de carboni de

forma que limiti el creixement i permeti mantenir la velocitat de creixement constant (*veure* Capítol VI)

*Implementació de l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa a l'equip de treball Applikon 5l.*

A la Figura VII.10. es presenten els resultats obtinguts per a la implementació d'aquesta estratègia semicontínua de treball a l'equip Applikon de 7 l (Ref.: Z61103CT07; FT Applikon Ltd.). Amb l'objectiu d'introduir el menor nombre de variables possible en aquesta implementació es treballa amb la soca recombinant utilitzada per a l'estudi de l'estratègia, XL1 Blue MRF' (pTrcfuc), i seguint el protocol optimitzat per a aquesta soca segons els resultats del Capítol VI.

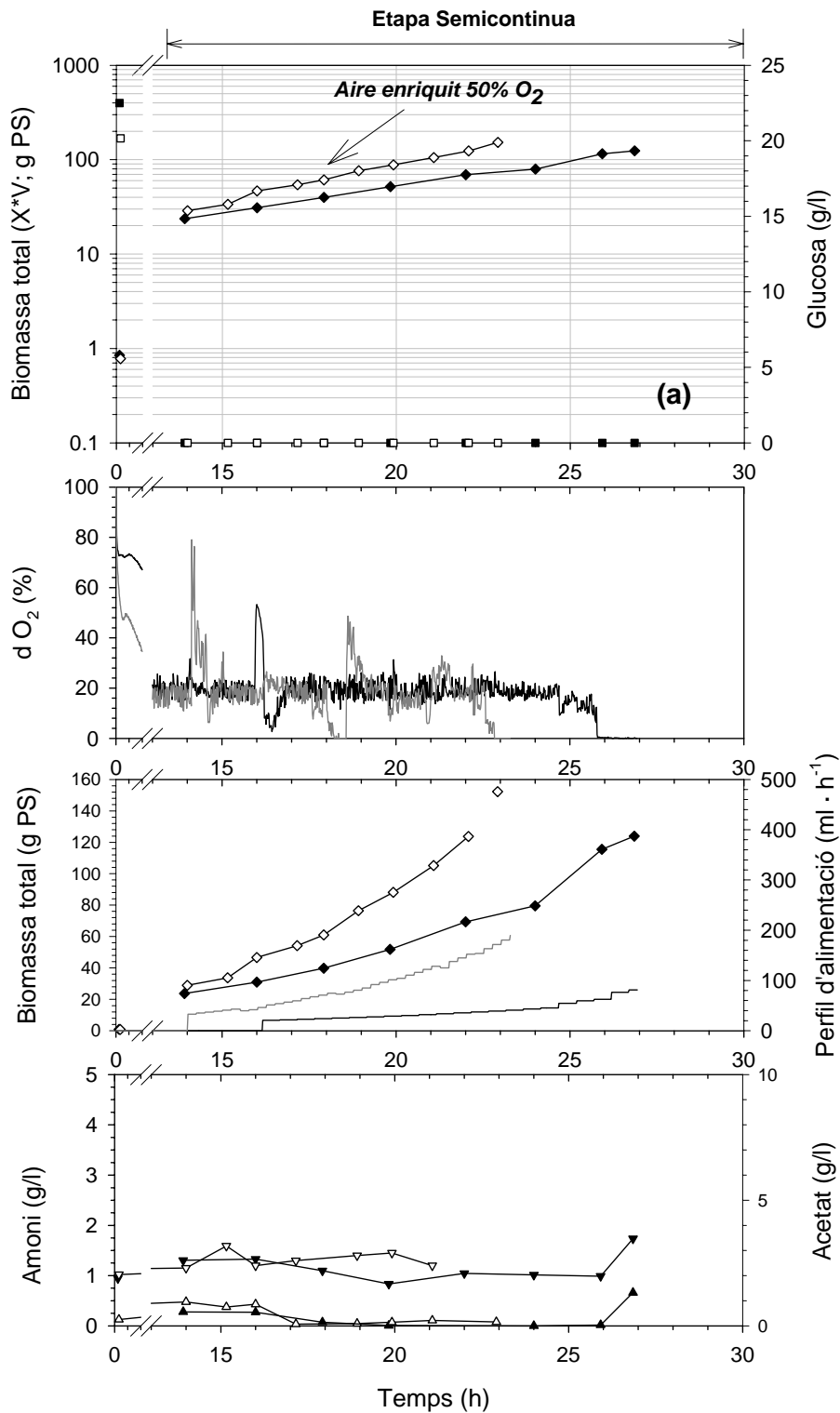
Es fixa la concentració de glucosa a  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  per a l'etapa discontinua i s'utilitza hidròxid amònic 25 % (p/v) per al control de pH durant el creixement. Per a tots els experiments en fermentador realitzats a Cobra Bio-manufacturing plc., la concentració d'oxigen dissolt a mantenir al medi de cultiu es redueix del 50% al 20%. Per al control d'alimentació en l'etapa semicontínua, s'adapta el programa de control d'addició, basat en el perfil teòric de creixement a velocitat constant segons les equacions de balanç per al sistema (*veure* Apèndix I), al nou equip de treball. En aquest cas, no es disposa d'una microbureta per controlar els volums d'addició i es substitueix per una bomba peristàltica basant el control en el càlcul d'esglaons de cabal d'addició i fixant el temps d'actualització en 15 minuts. El valor estimat de  $Y_{x:\text{glucosa}}$  per a XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) a  $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ , com a paràmetre de control, es manté en  $0,30 \pm 0,02 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1}$  glucosa tal com s'havia estimat per a les mateixes condicions de treball a l'equip Biostat B<sup>®</sup> (Braun Biotech Int.). Donat que l'objectiu de l'experiment és provar la possibilitat d'implementar l'estratègia optimitzada en un nou equip de treball, no s'indueix l'expressió recombinant.

Es treballa paral·lelament amb dos equips idèntics, fixant la velocitat de creixement en  $0,1 \text{ h}^{-1}$ , *Fermentació FB-9*, i  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , *Fermentació FB-10*, respectivament. Es pensa a provar

d'augmentar la velocitat de creixement a  $0,2 \text{ h}^{-1}$  per tal de reduir la duració de l'etapa semicontínua de creixement i adaptar el temps del procés a horaris laborals amb més facilitat. A la Taula VII.3 es mostren els valors estimats per als principals paràmetres de creixement d'aquestes fermentacions.

L'equipament emprat per aquesta segona implementació de l'estratègia semicontínua a Cobra Bio-Manufacturing plc. (U.K.) no és tant precís com l'utilitzat al Departament D'Enginyeria Química (UAB) per la seva optimització primera. A destacar:

- 1) en relació al sistema d'alimentació en la fase semicontínua, es passa de treballar amb una microbureta amb precisió d'ordre de  $\mu\text{l}$  i temps d'actualització d'un minut a emprar una bomba peristàltica de precisió de l'ordre de ml i temps d'actualització cada 15 minuts.
- 2) Les precisions dels mètodes analítics per al seguiment de l'evolució dels cultius i estimació dels paràmetres de control, bàsicament: per la determinació de glucosa, amoni i àcid acètic, són inferiors als emprats anteriorment (*veure* Apartat IV.5., Materials i Mètodes).



**Figura VII.10.** Implementació de l'estratègia semicontínua a l'equip Applikon de 7 l (Ref.: Z61103CT07; FT Applikon Ltd.). Creixement de XL1 Blue MRF<sup>+</sup> (pTrcfuc) a 0,1 h<sup>-1</sup> (símbols plens) i a 0,2 h<sup>-1</sup> (símbols buits) en medi MD-FB. (◆,◇) Biomassa total (g PS); (■,□) glucosa (g · l<sup>-1</sup>), (—, —) perfils d'alimentació i oxigen dissolt per 0,1 h<sup>-1</sup> i 0,2h<sup>-1</sup> respectivament., (▲, Δ) acètic (g · l<sup>-1</sup>), (▼,▽)amoni (g · l<sup>-1</sup>).



	Etapa de cultiu	Període de temps (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{ap_{x/glucosa}}$ (g PS/g gluc.)
<i>ExpFB-9</i> ( $0,1 h^{-1}$ )	<b>Discontínua:</b>	0 - 16	----	----
	<b>Semicontínua:</b>	16-26	0,128	0,340
<i>ExpFB-10</i> ( $0,2 h^{-1}$ )	<b>Discontínua:</b>	0 - 14	----	----
	<b>Semicontínua:</b>	14-23	0,185	0,397

**Taula VII.3.** Estimació de paràmetres de fermentació per a *FB-9* i *FB-10*. Implementació de l'estratègia semicontínua a l'equip Applikon de 7 l (Ref.: Z61103CT07; FT Applikon Ltd.) amb XL1 Blue MRF'(pTrc*fuc*).

Quan es fixa la velocitat de creixement a  $0,1 h^{-1}$ , globalment, els resultats venen a reproduir els prèviament obtinguts amb l'equip Braun Biostat B<sup>®</sup>. És possible mantenir la velocitat de creixement al voltant del valor prefixat durant tot el procés sense acumulacions de glucosa al medi de cultiu, mantenint la concentració d'amoni com a font de nitrogen constant al voltant de  $1,0 g \cdot l^{-1}$  i sense detectar acumulacions d'acètic al medi. Utilitzant únicament aire per al subministrament d'oxigen al cultiu, el creixement es comença a aturar a les 26 h de fermentació per limitació en la velocitat de transferència d'oxigen i amb una concentració cel·lular final de  $30 g PS \cdot l^{-1}$ . Només a partir d'aquest moment es comencen a acumular àcid acètic i amoni al vas de fermentació. La baixa precisió de l'equipament i mètodes analítics emprats no permet estimar prou ajustadament ni la concentració de glucosa en l'aliment per al control d'addició, ni el volum addicionat en cada esglaió d'addició, ni els paràmetres de rendiment dels diferents nutrients cap a biomassa. Com a conseqüència, tant la velocitat mantinguda al llarg del creixement semicontínu,  $0,13 h^{-1}$ , com el valor estimat experimentalment pel rendiment  $Y_{ap_{x:glucosa}}$ ,  $0,34 g PS \cdot g^{-1} glucosa$ , són lleugerament superiors que els prefixats per al control d'addició. Així, tenint en consideració aquestes limitacions en la precisió de l'equipament, es pot concloure que l'estratègia implementada funciona i permet assolir altes densitats cel·lulars.

Dels resultats obtinguts quan es fixa la velocitat de creixement a  $0,2 h^{-1}$  s'extreu que l'estratègia semicontínua funciona també al doblar la velocitat de creixement. Tampoc en

aquest cas es detecten acumulacions d'acètic ni es perd el control sobre les concentracions de glucosa residual ni amoni al medi al llarg de tot el procés. A les 18 hores de creixement, només quatre hores després d'iniciar l'etapa alimentada i amb una concentració cel.lular de  $16 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ , el creixement queda limitat per la velocitat de transferència d'oxigen. Per tal d'allargar suficientment la vida del cultiu i poder determinar l'eficàcia de l'estratègia semicontínua en aquest cas, s'enriqueix l'aire d'entrada al tanc de fermentació al 50% en oxigen. Cap a les 23 hores de cultiu la transferència d'oxigen torna a limitar el creixement amb una concentració final assolida de  $33 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Fixant la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i sense enriquir l'aeració en oxigen, amb l'equip Applikon de 7 l (Ref.: Z61103CT07; FT Applikon Ltd.) és possible assolir concentracions cel.lulars molt superiors que en el Braun Biostat B<sup>®</sup>:  $30 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$  front  $15 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ . Es pot extreure que l'equip Applikon 7l és molt més eficient en relació a la transferència d'oxigen del medi de cultiu al microorganisme. D'altra banda, al doblar la velocitat de creixement a  $0,2 \text{ h}^{-1}$  treballant amb el mateix equip de fermentació Applikon 7l, s'observa que aquest augment en la velocitat de creixement suposa un augment proporcional en la velocitat de transferència d'oxigen requerida per mantenir el creixement. En les mateixes condicions d'aeració, sense enriquir amb oxigen, la màxima concentració cel.lular assolida al doblar la velocitat de creixement es redueix gairebé a la meitat : de  $30 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $16 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Als laboratoris de Cobra Bio-manufacturing plc. no es disposa de xarxa de subministrament d'oxigen pur i treballar directament amb bombones d'oxigen suposa un conflicte per a les normes de seguretat de l'empresa. Per aquest motiu, s'intenta trobar unes condicions de treball que ens permetin avaluar l'eficàcia de l'estratègia de fermentació semicontínua per al cultiu de la nova soca recombinant *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* evitant la necessitat de treballar amb aire enriquit tot i que això suposi assolir densitats cel.lulars finals inferiors. En base a aquest criteri, es fixa la velocitat de creixement en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  tot i haver provat que l'estratègia és igualment vàlida al doblar la velocitat de creixement i que, en aquest cas, al reduir-se substancialment el temps de fermentació es milloraria la productivitat cel.lular del procés. No s'arriba a avaluar però l'efecte que l'increment en la velocitat de creixement podria tenir sobre la qualitat de la proteïna recombinant a l'induir-ne l'expressió.

Caracterització del creixement de *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en medi definit MD-FB per a l'etapa discontinua del procés semicontinu a adaptar.

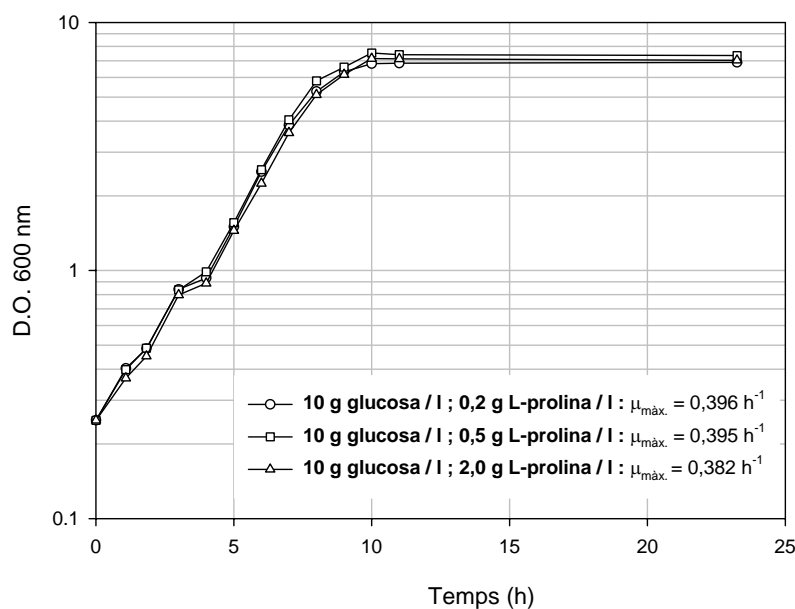
Es realitza una sèrie d'estudis preliminars per caracteritzar el creixement discontinu de la soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en el medi definit MD-FB. La necessitat de suplementar aquest medi amb L-prolina per salvar l'auxotrofia d'aquesta soca per aquest aminoàcid encareix substancialment el cost del medi.

El consum relatiu d'aminoàcids auxotròfics a biomassa pot variar amb el medi i les condicions de cultiu, la concentració de glucosa al medi de cultiu, el mode d'operació (discontinuu, semicontinu o continu), i la velocitat de creixement segons les necessitats biosintètiques del microorganisme en cada cas (Rothen i col., 1998). Per altra banda, un excés de determinats aminoàcids pot inhibir el creixement del cultiu reduint la concentració cel.lular màxima assolible i la màxima velocitat específica de creixement (Rothen i col., 1998). En el cas de la L-prolina, el Dr. Rothen i col.laboradors estimen aquest consum relatiu en  $24 \text{ mg L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$  (equivalent a  $0,012 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  si es considera  $Y_{x/\text{glucosa}} = 0,5$ ) en estudis en quimiostat en medi definit mineral a  $0,2 \text{ h}^{-1}$  i  $30 \text{ g/l}$  glucosa (Rothen i col., 1998). Anteriorment, en estudis en quimiostat a  $0,4 \text{ h}^{-1}$  i en medi definit mineral a concentració de glucosa al medi de  $2 \text{ g/l}$ , es troba publicat un valor superior de  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  (Yee i Balnch, 1993a). Altres estudis en quimiostat i medi definit mineral mantenint la concentració de glucosa constant a  $10 \text{ g/l}$ , estimen la seva concentració per no limitar el creixement entre  $0,4$  i  $1,0 \text{ g/l}$  depenent de la velocitat de creixement fixada per l'estudi (Seo i bailey, 1985; Mak i col., 1992; Favre-Bulle i col., 1993).

La millor manera d'estimar el consum relatiu de L-prolina a glucosa per *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* a les condicions de treball passaria per realitzar estudis en quimiostat per simular les condicions d'operació en l'etapa discontinua i semicontínua de l'estratègia de fermentació que es pretén adaptar: treballant en medi MD-FB fixant la concentració de glucosa i velocitat de creixement respectivament en  $25 \text{ g/l}$  i  $0,4 \text{ h}^{-1}$  i  $0 \text{ g/l}$  i

$0,1 \text{ h}^{-1}$ . No és factible però realitzar aquest tipus d'experiments en continu als laboratoris de Cobra Bio-Manufacturing plc. i es fa una aproximació a l'estudi de suplementació en matrassos Erlenmeyer mantenint la concentració en glucosa i variant la concentració en L-prolina per tractar d'avaluar l'efecte de la seva concentració relativa a glucosa sobre el creixement.

En treballs en discontinu en matràs Erlenmeyer realitzats amb anterioritat a Cobra Bio-manufacturing plc. s'obtingué que, en medi mínim mineral a  $10 \text{ g glucosa/l}$ , amb una suplementació de  $0,5 \text{ g L-prolina/l}$  s'assoleix un creixement òptim de la soca mentre que  $0,1 \text{ g L-prolina/l}$  és una concentració subòptima (comunicació personal Dr. R. Cranenburgh, Cobra Bio-manufacturing plc.). S'inicia aquest apartat amb un petit estudi en matràs Erlenmeyer per comprovar aquest resultat i veure si es possible reduir encara més la concentració de L-prolina al medi tot abaratint el cost final del procés. A la Figura VII.11. es mostren els resultats obtinguts amb concentracions de  $0,2$ ,  $0,5$  i  $2,0 \text{ g L-prolina/l}$  en medi MD-FB a  $10 \text{ g glucosa/l}$ .



**Figura VII.11.** Estudi de suplementació del medi MD-FB en L-prolina per al creixement òptim de *DH1lacdapD(pORT1aL.fuc)*.

No s'aprecien diferències significatives de creixement: per a totes les concentracions de L-prolina assajades s'assoleix la mateixa densitat cel·lular final i la màxima velocitat específica de creixement és molt similar. S'extreu que:

- a) concentracions fins a 2 g L-prolina /l no resulten inhibidores per al creixement discontinu de la soca en MD-FB i
- b) és possible reduir encara la concentració de L-prolina relativa a glucosa necessària per assolir un creixement òptim fins a 0,2 g/l en les condicions de treball.

En base a aquest resultat, es tria un coeficient de consum relatiu de L-prolina a glucosa baix, 0,02 g L-prolina per g glucosa, per iniciar els estudis de creixement discontinu en fermentador i poder acabar de precisar aquest valor en condicions de cultiu òptimes que permetin prorrogar-lo fins que sigui la manca de L-prolina qui limiti el creixement.

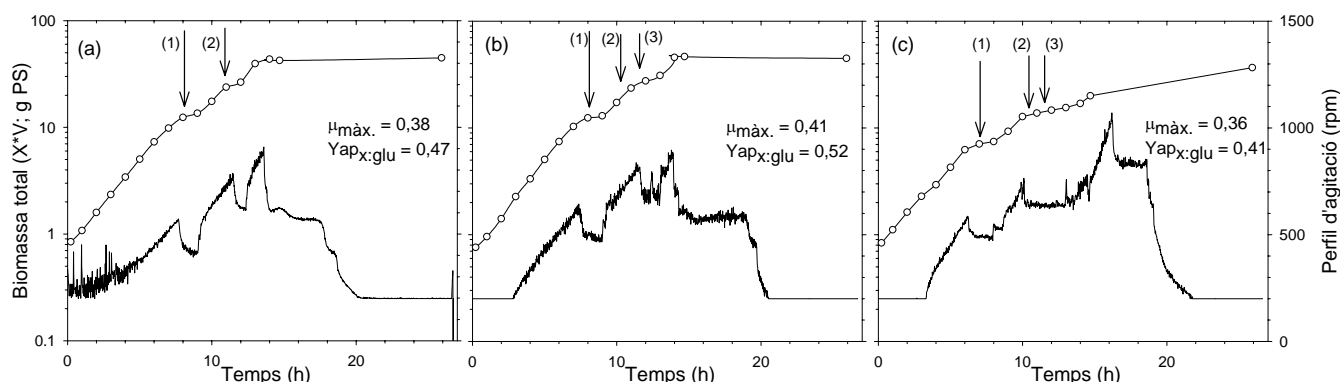
Donat que la glucosa pot actuar com inhibidor del promotor *lac* (regulació per catabolit) (*veure* Apèndix 4), interessa avaluar com pot afectar utilitzar glucosa com a font de carboni per al creixement d'aquesta soca en la qual rutes sintètiques essencials per al microorganisme es troben sota el control d'aquest promotor (*veure* VII.1.3.). És evident que aquesta soca és capaç de créixer en MD-FB, tal com es desprèn de l'estudi previ de suplementació de L-prolina en matràs Erlenmeyer, però podria ser que aquest creixement fos en condicions subòptimes.

Per determinar l'eficiència de la glucosa com a font de carboni per al creixement d'aquesta soca en medi MD-FB es realitza un experiment comparant, sota les mateixes condicions de cultiu discontinu, el creixement en:

- a) glucosa a  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ,
- b) glucosa a  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  amb suplementació d'IPTG a concentració final al medi de 1 mM,
- c) i glicerol a  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

La suplementació amb IPTG garanteix la total inducció dels gens sota el control del promotor *lac* i permetrà avaluar el possible efecte inhibitori de la glucosa per al creixement. El glicerol s'inclou a l'experiment com a font de carboni alternativa per al creixement d'*E. coli* en processos semicontinus (Korz i col., 1995; Neubauer i Winter 2001) que es podria arribar a considerar per a substituir la glucosa com a font de carboni treballant amb la mateixa estratègia semicontínua.

L'experiment es realitza a l'equip Applikon 7l en medi MD-FB a 25 g glucosa/l i mantenint les mateixes condicions de creixement discontinu descrites pel creixement de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc). Únicament s'inclouen dues modificacions: la temperatura de creixement es redueix de 37°C a 30°C per evitar la inducció tèrmica de l'expressió recombinant i, es suplementa L-prolina aplicant la raó trobada a l'experiment previ en matràs Erlenmeyer, 0,02 g L-prolina per gram de la font de carboni emprada en cada cas. Els resultats es presenten a la Figura VII.12.



**Figura VII.12.** Creixement discontinu de *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en medi definit MD-FB a 30°C. Perfils de: Biomassa total (○) i d'agitació (—) per a cada font de carboni emprada: (a) 25 g glucosa · l<sup>-1</sup>, (b) 25 g glucosa · l<sup>-1</sup> amb suplementació 1 mM d'IPTG i (c) 25 g glicerol · l<sup>-1</sup>. Fletxes: suplementacions puntuals del medi: (1) L-prolina i Tiamina per recuperar la concentració inicial al medi, 0,5 g L-prolina · l<sup>-1</sup> i 0,01 g Tiamina · l<sup>-1</sup> respectivament, i Lisina a 0,5 g · l<sup>-1</sup>, (2) en (a) a 0,5 g L-prolina · l<sup>-1</sup>, en (b) a 0,01 g Tiamina · l<sup>-1</sup> i en (c) a 0,5 g Lisina · l<sup>-1</sup>, (3) a 0,5 g L-prolina · l<sup>-1</sup>.

Tal com indica la primera parada sobtada d'agitació a la Figura VII.12., al voltant de les 8 hores de cultiu en glucosa (6h en glicerol), s'atura el creixement i es decideix suplementar el medi amb els principals components en que la soca es defineix com auxotròfica (L-prolina, Tiamina i Lisina) procedint experimentalment tal i com es descriu a la Figura VII.12. Inicialment s'addiciona una barreja dels tres components en cada reactor per assegurar una concentració mínima de 0,5 g · l<sup>-1</sup> al medi en cada aminoàcid i de 0,01 g · l<sup>-1</sup> en Tiamina. En tots tres casos es recupera el creixement del cultiu indicant que, efectivament, un d'aquests tres components és el limitant de creixement. El creixement torna a aturar-se posteriorment i, en aquest cas, s'addiciona només un dels tres components en cada reactor. Únicament en el suplementat amb L-prolina es recupera el creixement i per confirmar que és així, els altres dos també es suplementen amb L-prolina poc després observant-se el mateix efecte.

Dels resultats obtinguts s'extreu que la relació 0,02 g L-prolina per gram de la font de carboni és insuficient per mantenir el creixement. En tots els casos es fa necessari recuperar la concentració inicial de L-prolina al medi de cultiu dos cops per mantenir el creixement

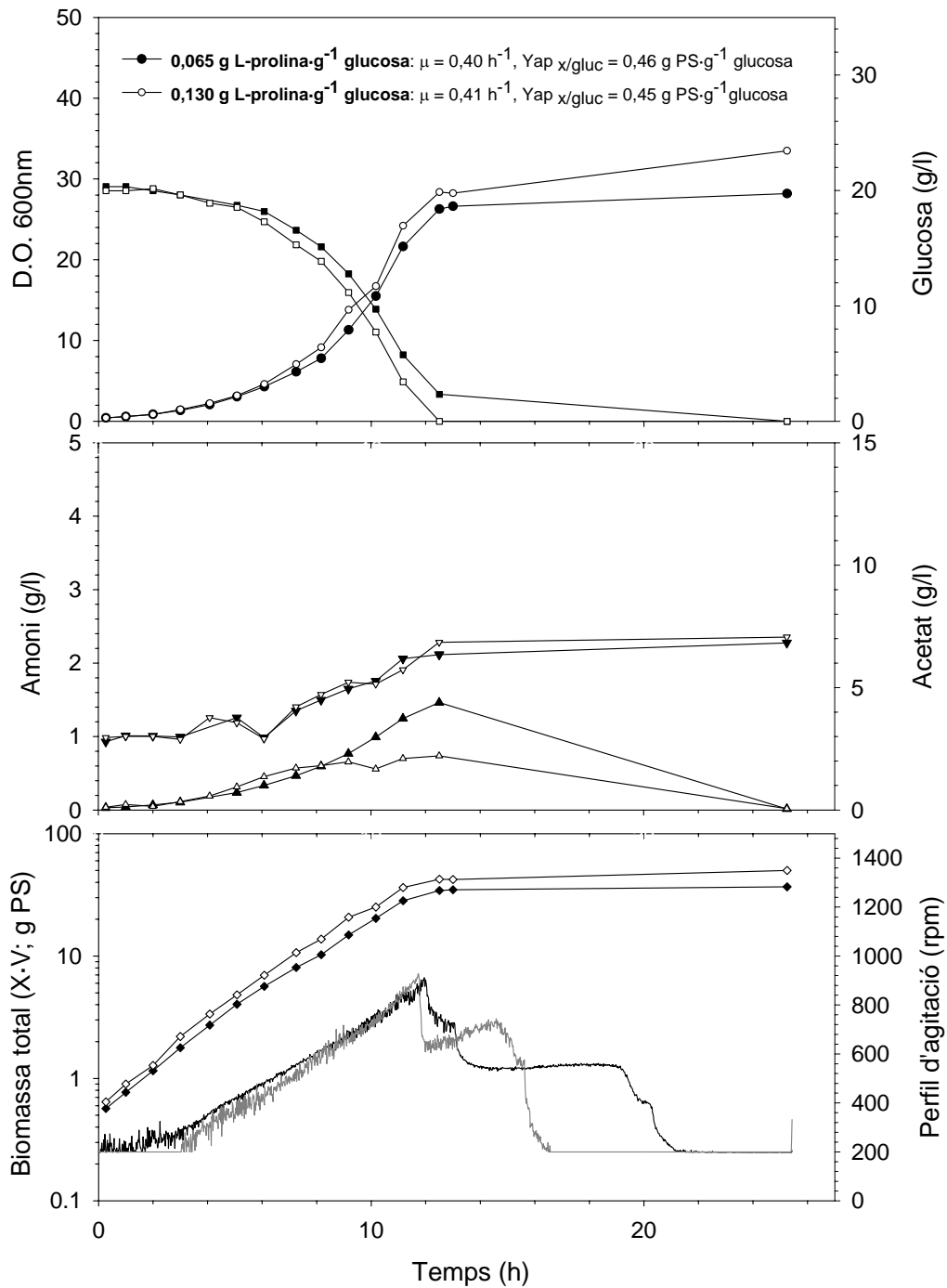
fins exhaurir la font de carboni inicial al medi de cultiu. Amb els resultats obtinguts s'estima un nou valor de consum de L-prolina relatiu a glucosa per a l'etapa discontinua de creixement:  $0,065 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . No és possible arribar a aquest resultat en l'estudi previ de suplementació en matràs Erlenmeyer, ja que el creixement queda limitat per altres raons (principalment, limitació d'oxigen, variació de pH, acumulació de tòxics de metabolisme) abans que es pugui apreciar aquesta limitació en L-prolina (veure Figura VII.11).

El glicerol es presenta com una bona alternativa a la glucosa com a font de carboni per al creixement de *DH11acdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*. Els valors de velocitat màxima específica de creixement són només lleugerament inferiors als obtinguts en glucosa,  $0,36 \text{ h}^{-1}$  front a  $0,40 \text{ h}^{-1}$ , i el rendiment relatiu a biomassa es redueix en un 20% treballant amb glicerol,  $0,41 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glicerol}$  front a  $0,50 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ .

No s'observen diferències significatives en els perfils de creixement obtinguts en els cultius en glucosa i en glucosa més suplementació d'IPTG (veure Figures VII.12. (a) i (b)) i es conclou que la glucosa no té cap efecte inhibitori apreciable sobre el creixement de *DH11acdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* a les condicions de treball. Amb aquest resultat, es decideix mantenir la glucosa com a font de carboni per a la implementació de l'estratègia semicontínua: l'aprofitament de glucosa cap a biomassa és superior que el de glicerol i aquesta és la font prèviament utilitzada en l'optimització de l'estratègia semicontínua. Únicament cal modificar la composició del medi MD-FB augmentant el contingut en L-prolina a l'etapa discontinua segons la relació  $0,065 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ .

Per confirmar el valor estimat de consum de L-prolina relatiu a glucosa, es realitza un segon experiment repetint el creixement discontinu a  $25 \text{ g l}^{-1}$  en glucosa suplementant L-prolina segons el consum relatiu a glucosa estimat  $0,065 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  i doblant aquesta relació,  $0,130 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . A la Figura VII.13 es presenten els resultats obtinguts.





**Figura VII.13.** Creixement discontinu de *DH11lacdapD(pORT1aLfuc)* en medi definit MD-FB a 30°C. Símbols plens: 0,065 g L-prolina · g<sup>-1</sup> glucosa; Símbols buits: 0,130 g L-prolina · g<sup>-1</sup> glucosa (●,○) D.O. 600nm, (■, □) concentració de glucosa, (▼,▽) concentració d'amoni, (▲,△) concentració d'acètic, (◆, ◇) biomassa total, (—, —) perfils d'agitació a 0,065 i 0,130 g L-prolina · g<sup>-1</sup> glucosa respectivament.

Els perfils de creixement són molt similars per a ambdues concentracions de L-prolina assajades. Sembla però que, en el cas de menor concentració en L-prolina, la velocitat de consum de glucosa al final de creixement és inferior i que la concentració d'acètic acumulada quan s'atura el creixement discontinu, cap a les 13h de cultiu, és considerablement superior sobrepasant els  $4\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  front els  $2\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  acumulats quan es dobla la concentració de L-prolina. Aquests resultats es poden explicar considerant que la concentració de L-prolina al medi treballant amb la relació de consum relatiu a glucosa inferior és insuficient per mantenir el creixement al final del cultiu i la glucosa al no poder metabolitzar-se cap a la formació de biomassa sense L-prolina tendeix a metabolitzar-se cap a la formació d'àcid acètic.

Doblar aquesta relació de consum relatiu no afecta el creixement però un cop exhaurida la glucosa, sembla que, en aquest cas, la situació és la contrària: l'excés de L-prolina acaba sent metabolitzat per la soca com a font de carboni. Es tractaria d'un comportament diàuxic del sistema adaptant-se a una segona font de carboni un cop exhaurida la principal. Als laboratoris de Cobra Bio-manufacturing plc. no es disposa d'equipament posat a punt per la detecció d'aminoàcids i no es pot comprovar aquesta hipòtesi però aquest comportament explicaria perquè hi ha una revifada en l'agitació poc després d'esgotar-se la glucosa, ara per mantenir el creixement en L-prolina fins el seu esgotament. Donat que en cap cas s'han observat efectes inhibitoris per excés de L-prolina al medi i per evitar que en algun moment la L-prolina pugui estar limitant el creixement del cultiu es tria aquesta segona relació de consum relatiu de L-prolina a glucosa per a l'etapa discontinua de l'estratègia semicontínua a adaptar.

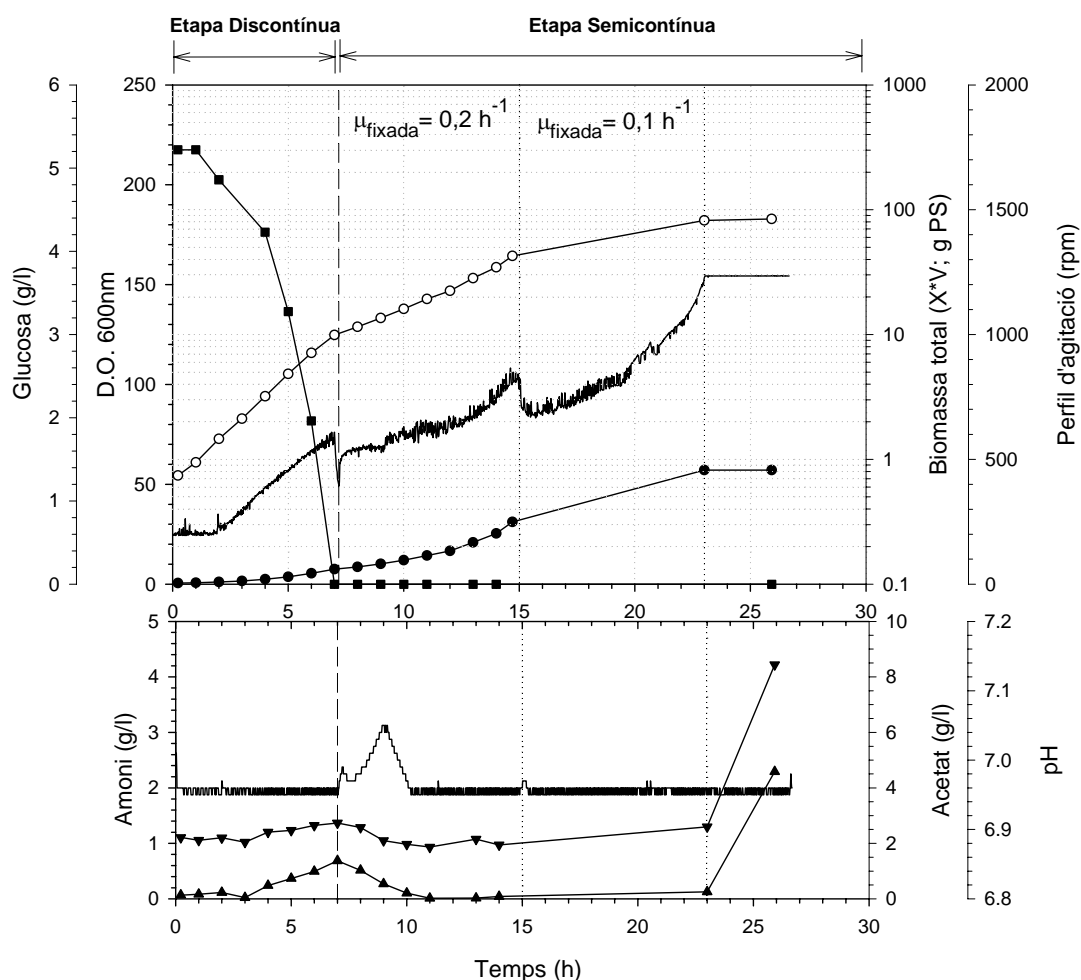
*Adaptació de l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa al creixement de DH1lacdapD(pORT1aLfuc) en MD-FB: etapa alimentada.*

Es realitza un experiment preliminar, *FB-11*, per avaluar les possibilitats de creixement de DH1lacdapD(pORT1aLfuc) segons l'estratègia semicontínua optimitzada per a XL1 Blue MRF' (pTrefuc). Es redueix la durada de l'etapa discontinua del procés fixant la concentració inicial al medi en  $5\text{g glucosa}\cdot\text{l}^{-1}$  i es manté la relació  $0,13\text{g L-prolina}\cdot\text{g}^{-1}\text{ glucosa}$  per a la formulació del medi MD-FB en aquesta etapa. Per al control d'addició

durant l'etapa alimentada, el rendiment de glucosa a biomassa,  $Y_{ap_{X:gluc}}$ , es fixa en base a la bibliografia en  $0,40 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  (Yee i Blanch, 1993b), seguint el mateix procés d'optimització que per a XL1 Blue MRF' (pTrc*func*). La temperatura es manté constant a  $30^{\circ}\text{C}$  durant tot el procés, es fixa la concentració d'oxigen dissolt al vas de fermentació al 20% i es treballa amb la mateixa composició de l'aliment que en l'estratègia semicontínua utilitzada per XL1 Blue MRF' (pTrc*func*) però addicionant L-prolina de forma proporcional a la glucosa per mantenir el creixement.

Ja s'ha comentat que tant la velocitat de creixement, com el mode d'operació i la concentració de glucosa al medi afecten les necessitats biosintètiques del microorganisme modificant els valors dels coeficients de consum relatiu de L-prolina a glucosa. Mantenint velocitats de creixement entre  $0,1$  i  $0,2 \text{ h}^{-1}$  s'han estimat coeficients relatius entre  $0,01$  i  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  (Yee i Balnch, 1993a; Rothen i col., 1998). Per determinar si el consum relatiu de L-prolina a glucosa disminueix en el sistema de treball en les condicions fixades per l'etapa semicontínua en relació a l'etapa discontinua, en l'etapa semicontínua es redueix el valor de  $Y_{L-prolina:glucosa}$  a  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  i es preparen solucions concentrades estèrils d'aquest aminoàcid per poder incrementar aquesta relació a l'aliment si fos necessari.

A la Figura VII.14. i Taula VII.4 es mostren els resultats obtinguts per a aquest *Experiment FB-11*. En una primera fase de l'etapa alimentada es decideix fixar la velocitat de creixement en  $0,2 \text{ h}^{-1}$  per evitar treballar per sota de la precisió de la bomba implementada a l'equip. Es treballa en aquestes condicions durant 8 hores i després es corregeix el valor de velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i es manté fins al final del creixement. No es prenen accions correctores sobre possibles desviacions del perfil teòric durant aquesta segona fase alimentada a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura VII.14.** Experiment *FB-11*. Creixement de *DH1lacdapD(pORT1aLruc)* segons l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa en MD-FB a 30°C. (●) D.O. 600nm, (○) biomassa total (■) concentració de glucosa, (▼) concentració d'amoni, (▲) concentració d'acètic, (—) perfil d'agitació i de pH.

Etapa de cultiu	Període de temps (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{ap_x/glucosa}$ (g PS/g gluc.)
<i>ExpFB-11</i>			
<b>Discontínua:</b>	0 - 7	0,403	0,521
<b>Semicontínua:</b>	7-15	0,186	0,575
	15-23	0,079	0,396

**Taula VII.4.** Paràmetres estimats per a l'Experiment *FB-11*.

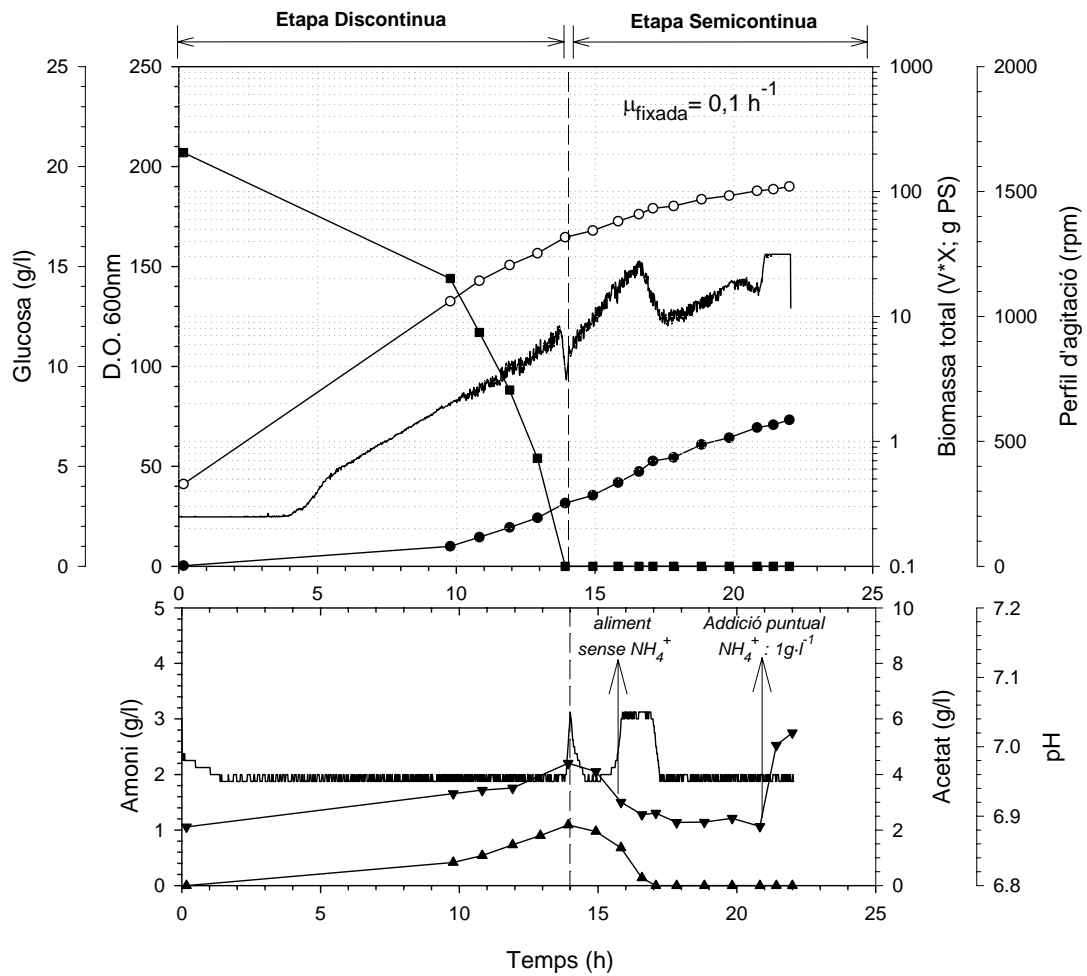
Dels resultats obtinguts s'extreu que l'estratègia semicontínua optimitzada per a XL1 Blue MRF' (pTrc*ful*) es pot adaptar sense dificultat al creixement de DH1*lacdapD*(pORT1a*Lful*). Tal com succeïa amb XL1 Blue MRF' (pTrc*ful*), tot i no conèixer els valors de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per aquesta soca de cultiu en aquest primer experiment, es possible mantenir el creixement exponencial al llarg de procés encara que no estrictament a les velocitats de creixement prefixades,  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . Un cop consumit l'acètic acumulat al final de l'etapa discontinua, no es detecten acumulacions de glucosa ni d'àcid acètic al medi de cultiu al llarg de l'etapa alimentada i la concentració d'amoni es manté dins els marges de concentració òptima (entre  $1,0$  i  $1,5 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ ) durant tot el procés, tot i que s'observa certa tendència a la seva acumulació durant l'etapa final de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . L'experiment s'atura finalment per problemes operacionals (obturació del difusor d'aire alimentat al sistema) amb una concentració final de biomassa de  $22 \text{ g PS/l}$ .

El valor de  $Y_{L\text{-prolina}/glucosa}$  fixat en  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  a l'etapa semicontínua permet mantenir el creixement sense limitar-lo durant tota l'etapa alimentada quan es manté la velocitat de creixement entre  $0,1$  i  $0,2 \text{ h}^{-1}$ . Aquest valor per a l'etapa alimentada suposa disminuir al voltant del 85% el consum de L-prolina per litre de solució alimentada si es compara amb mantenir el valor de  $0,13 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  estimat per l'etapa discontinua de creixement.

Tot i l'escassa precisió de l'equipament i mètodes analítics de treball, el valor estimat de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per a l'etapa semicontínua a velocitat de creixement  $0,2 \text{ h}^{-1}$  és considera desmesuradament alt i es fa estrany que superi el rendiment obtingut per a l'etapa discontinua en que es dobla la velocitat de creixement. Aquest valor es pot justificar si es considera com un rendiment aparent en que, no només s'està considerant la biomassa generada en aquest període pel consum de glucosa, sinó també pel consum d'altres fonts secundàries de carboni acumulades al medi, principalment: el remanent considerable de L-prolina amb que s'inicia l'etapa alimentada quan es fixa  $Y_{L\text{-prolina}: glucosa}$  en  $0,13 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per a l'etapa discontinua i també els  $1,2 \text{ g/l}$  d'àcid acètic acumulats al final de l'etapa discontinua en aquest experiment. El consum d'aquestes fonts alternatives de carboni al final de la fase discontinua explicaria també l'increment sobtat del valor de pH a

l'inici de l'etapa semicontínua a l'acumular-se amoni de la metabolització de la L-prolina al medi i desaparèixer l'excés d'àcid acètic del medi.

Per comprovar si la relació  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  és suficient per mantenir el creixement exponencial fixant la velocitat de creixement a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  es realitza un segon experiment per al cultiu de *DH1lacdapD(pORT1aLfuc)* segons l'estratègia semicontínua amb limitació per glucosa, *Experiment FB-12*. S'inicia l'etapa discontinua amb una concentració de glucosa al medi de  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  i es manté la relació  $0,13 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per a la formulació del medi MD-FB en aquesta etapa. Per al control d'addició durant l'etapa alimentada, es manté el valor de  $Y_{\text{ap}_{\text{x/glucosa}}}$  en  $0,40 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , fixat en base bibliogràfica (Yee i Blanch, 1993b) i ja que ha resultat prou adequat per mantenir els valors de velocitat de creixement experimentals al voltant dels prefixats a l'experiment previ *FB-11*. Per a la composició de l'aliment es manté la relació de consum de L-prolina relatiu a glucosa en  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . Els resultats obtinguts es mostren a la Figura VII.15 i Taula VII.5.



**Figura VII.15.** Experiment *FB-12*. Creixement de *DH11lacdapD(pORT1aLfuc)* segons l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa en MD-FB a 30°C. (●) D.O. 600nm, (○) biomassa total (■) concentració de glucosa, (▼) concentració d'amoni, (▲) concentració d'acètic, (—) perfil d'agitació i de pH.

Etapa de cultiu	Període de temps (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{ap_x/\text{glucosa}}$ (g PS/g gluc.)
<i>ExpFB-12</i>			
<b>Discontinua:</b>	0 - 14	---	0,541
<b>Semicontínua:</b>			
<b>Global</b>	14-22	0,114	0,465
	14-17	0,154	0,613
	17-22	<b>0,097</b>	<b>0,437</b>

**Taula VII.5.** Paràmetres estimats per a l'experiment *FB-12*

Amb els resultats obtinguts en aquest experiment *FB-12* es confirma l'eficiència de l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa per mantenir el creixement exponencial a  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . La fermentació s'atura degut a una falla operacional a les 8 hores de creixement semicontínu, amb una concentració de biomassa final de  $27 \text{ g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ . Es repeteix el mateix perfil de creixement que en *FB-11* i la fase de creixement alimentada es pot dividir en dues etapes.

Durant la primera etapa semicontínua, fins a les 17 hores de creixement, es consumeix l'àcetic acumulat al final de l'etapa discontinua i l'excés de L-prolina remanent d'aquesta mateixa etapa i, en conseqüència, la velocitat de creixement estimada és superior a la que s'intenta mantenir segons el control d'alimentació en base a la limitació de glucosa com única font de carboni al medi. Un altre cop, com a l'experiment previ *FB-11*, s'observa l'efecte de basificació del medi degut, probablement, a l'alliberació d'amoni al metabolitzar-se la L-prolina. I, un altre cop, el valor de  $Y_{ap \text{ x/glucosa}}$  estimat per a aquesta primera etapa cal interpretar-lo com un valor de rendiment aparent en que es contempla la formació de biomassa no només corresponent al consum de glucosa sinó també al d'aquestes altres fonts de carboni present al medi.

A la segona etapa de la fase semicontínua, a partir de les 17 hores de creixement, s'estabilitzen tots els paràmetres segons el perfil habitual per al funcionament de l'estratègia semicontínua estudiada: la concentració d'amoni es manté constant entre 1 i  $1,5 \text{ g NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ , no es detecten acumulacions d'àcetic i la glucosa residual al medi és nul·la. Els paràmetres estimats per a aquesta etapa confirmen el bon funcionament de l'estratègia: la velocitat de creixement es manté constant al valor prefixat  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i el rendiment de glucosa a biomassa aparent s'estima en  $0,44 \text{ g biomassa} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ .

A la fermentació prèvia, *FB-11*, s'observa una lleugera tendència a l'acumulació d'amoni al llarg de l'etapa semicontínua possiblement perquè la metabolització de la L-prolina suposava una font addicional d'amoni al medi (veure Figura VII.14). Per evitar la seva acumulació en aquest experiment *FB-12*, poc després de l'inici de l'etapa alimentada es decideix eliminar l'amoni de la composició de l'aliment. Dels resultats obtinguts s'extreu



que el control de pH per addició d'hidròxid amònic 25% (p/V) és suficient per mantenir els nivells d'amoni al medi al llarg del procés i que la suplementació d'amoni en l'aliment és innecessari per al cultiu d'aquesta soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en les condicions de treball. Per fermentacions posteriors es decideix eliminar l'amoni de la composició de l'aliment, això permetrà augmentar la concentració de la glucosa alimentada i millorar la productivitat del procés

Amb aquest *Experiment FB-12* es considera provada l'eficiència de l'estratègia semicontínua per assolir CADC de *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*. Caldria optimitzar les condicions d'operació per evitar l'acumulació de fonts de carboni alternatives a la glucosa a l'inici de l'etapa alimentada i poder corregir la manca de control inicial de la velocitat de creixement en aquesta etapa. Es decideix però prioritzar l'estudi de producció de Fuc-1-PA amb aquesta soca donat que aquesta manca de control sobre el creixement és puntual i no afecta l'objectiu final del procés d'assolir CADC.

*Estudi de producció de Fuc-1-PA en DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>) en MD-FB mitjançant l'estratègia semicontínua per limitació de glucosa.*

De la mateixa manera que amb el sistema d'expressió XL1 Blue NRF'(pT<sub>refuc</sub>), l'objectiu primer d'aquest apartat és determinar les característiques de la producció de Fuc-1-PA en el sistema de producció en estudi: utilitzant la soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* com a hoste i emprant l'estratègia semicontínua exponencial per limitació en glucosa en medi MD-FB a 0,1 h<sup>-1</sup>. Principalment, es pretén avaluar:

- a) com afecten al creixement de la soca hoste la sobreexpressió recombinant de Fuc-1-PA i altres canvis en les condicions de creixement associats al fet d'induir el cultiu, bàsicament, l'increment de temperatura,
- b) la velocitat i qualitat d'acumulació de Fuc-1-PA al sistema.

Aquesta informació permetrà, primer, determinar si aquest sistema d'expressió recombinant basat en el sistema ORT és adequat per l'expressió de Fuc-1-PA utilitzant aquesta estratègia de cultiu i, en cas afirmatiu, fixar el criteri d'inducció adequat per optimitzar tant

la concentració cel.lular final de l'enzim actiu al medi de cultiu com la productivitat volumètrica del sistema.

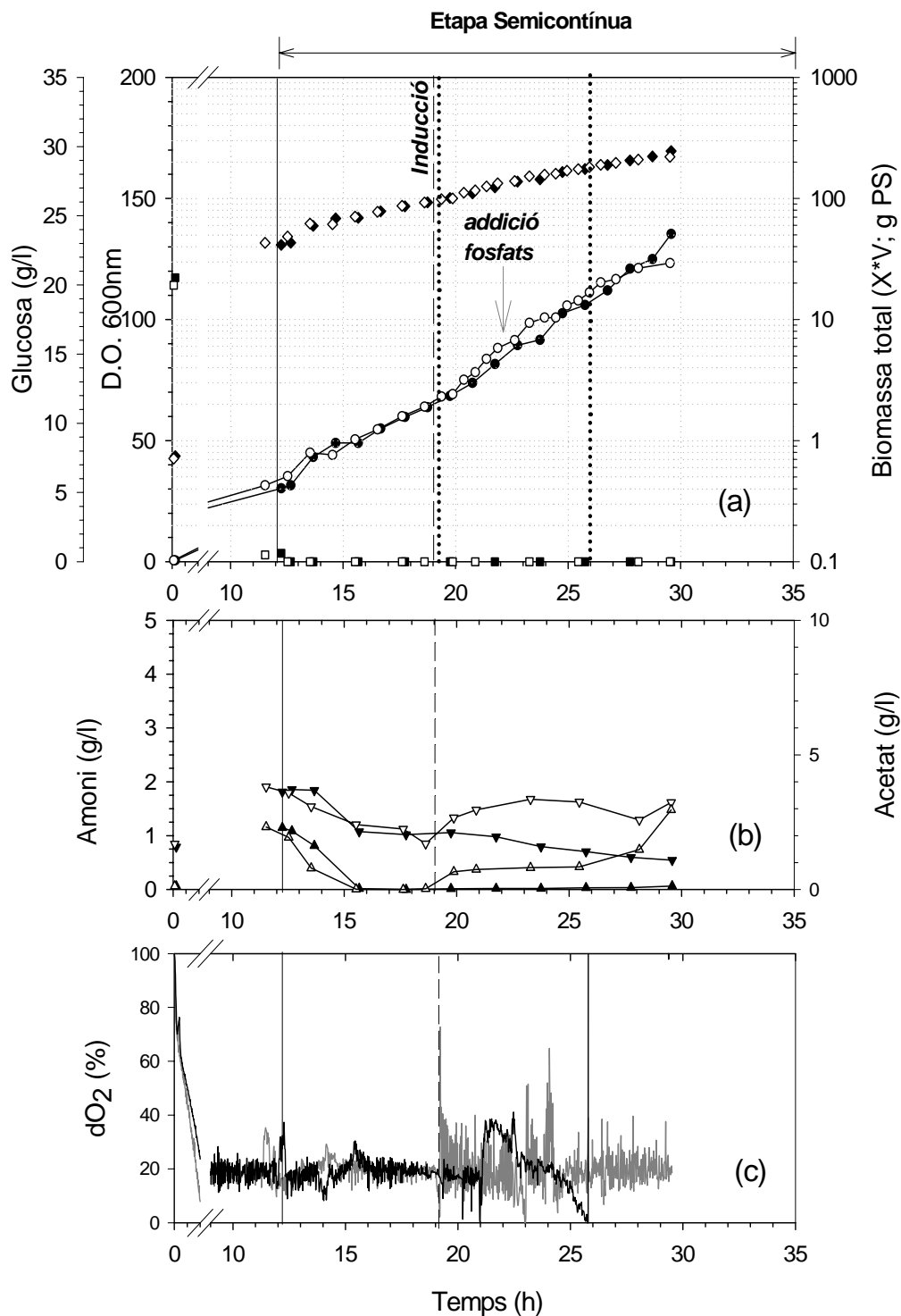
S'inicien els estudis de producció de Fuc-1-PA en *DH11acdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* fixant els paràmetres d'operació descrits per a l'*Experiment FB-12*. Per l'etapa discontinua, es treballa amb una concentració inicial de glucosa al medi de  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  i es manté la relació  $0,13 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per a la formulació del medi MD-FB. Per a l'etapa semicontínua, es fixa la velocitat de creixement per al control d'addició en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i es corregeix el valor de  $Y_{\text{ap}}_{\text{x:glucosa}}$  a  $0,44 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , segons s'extreu dels resultats de *FB-12*. També en base als resultats de *FB-12*, s'elimina l'amoní de la composició de la solució alimentada, i es manté la relació de consum de L-prolina relatiu a glucosa en  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ .

Es realitzen dues fermentacions en paral.lel i en condicions idèntiques segons es descriu al punt anterior, *Fermentacions FB-13* i *FB-14*. *FB-13* s'utilitza com a control de creixement no induït i *FB-14* s'indueix, per increment de temperatura de 30 a 42°C, al voltant de les 7 hores de creixement i amb una concentració cel.lular al voltant de 25g PS/l. Seguint el mateix criteri que per XL1 Blue MRF'(pTrc<sub>fuc</sub>) per caracteritzar la producció de Fuc-1-PA en aquest nou sistema caldria induir primer a l'inici de la fase exponencial. No s'indueix a l'inici de la fase semicontínua en aquest primer experiment de caracterització ja que, segons el perfil de creixement en les fermentacions prèvies, no és possible controlar la velocitat de creixement amb el control d'addició per acumulació d'altres fonts de carboni al medi de cultiu durant les primeres hores de la fase alimentada. S'espera a assegurar haver recuperat el control sobre la velocitat de creixement per procedir a la inducció.

Per analitzar l'expressió recombinant, per una banda es mesura l'activitat aldolàsica Fuc-1-PA al llarg del procés i, paral.lelament, es segueix l'acumulació de Fuc-1-PA al citoplasma cel.lular per anàlisi espectrofotomètric SDS-PAGE de mostres ajustades a la mateixa concentració cel.lular.

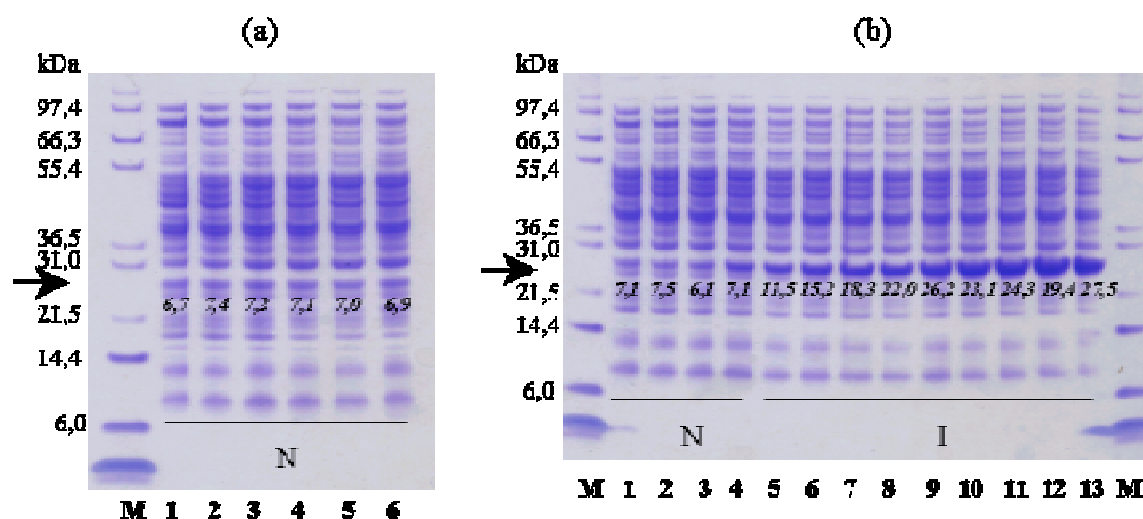
La Figura VII.16. resumeix els resultats obtinguts per ambdues fermentacions, *FB-13* i *FB-14*, en relació a creixement i concentració de nutrients i de productes de metabolisme al llarg del procés. Es mostren els resultats sobre la mateixa gràfica amb l'objectiu de poder avaluar l'efecte de la sobreexpressió sobre el creixement cel.lular. S'inclouen els perfils d'oxigen dissolt al medi de cultiu durant el procés per poder avaluar l'efecte de l'augment de temperatura sobre la solubilitat de l'oxigen. Per completar aquesta figura, a la Taula VII.6. es mostren les principals dades de procés per aquestes fermentacions i les estimacions per a l'evolució dels paràmetres de control de creixement corresponents.

A la Figura VII.17. es mostren els resultats obtinguts per al seguiment d'acumulació de Fuc-1-PA com a fracció del total de proteïna intracel.lular segons l'anàlisi per SDS-PAGE. D'un primer anàlisi d'aquests gels electroforètics s'extreu que, en el cas de no inducció, el control sobre l'expressió constitutiva es manté al llarg de tot el procés amb fraccions de proteïna total intracel.lular corresponents a Fuc-1-PA constants al voltant del 7 %. Aquests resultats són coincidents amb els obtinguts per la caracterització d'aquesta soca recombinant en Erlenmeyer. En canvi, quan s'augmenta la temperatura del sistema a 42°C, *FB-14*, hi ha una resposta ràpida a la inducció i la concentració específica de Fuc-1-PA assolida a final del procés supera el 25% del total de proteïna intracel.lular. Més endavant s'avaluaran de nou aquests resultats comparant-los amb els seguiment d'activitat Fuc-1-PA al llarg del procés i en relació a creixement.



**Figura VII.16.** Creixement semicontínu de *E. coli* DH11acdapD(pORT1aLfuc). Símbols plens: Fermentació FB-13 (no induïda). Símbols buits: Fermentació FB-14 (induïda). (●, ○) Densitat Òptica a 600 nm, (◆, ◇) biomassa total (g PS), (■, □) glucosa (g · l<sup>-1</sup>), (▲, △), acètic (g · l<sup>-1</sup>) i (▼, ▽) amoni (g · l<sup>-1</sup>). (•••••) Línies indicant l'enriquiment de l'aeració al 50% en oxigen: a les 19 hores per a FB-14 (induïda) i a les 26 hores per a FB-13 (no induïda). (—, —) perfils d'oxigen dissolt per FB-13 i FB-14 respectivament.

**TAULA VII.6. apaisada**



**Figura VII.17.** (a) *FB-13* (no induïda). (b) *FB-14* (induída) Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres al llarg de la fermentació corregides per biomassa. N: no induït, I: induït. M: marcador de pesos moleculars. (a) 1- 14.67 h, 2- 16.67 h, 3- 19.75 h, 4- 22.75 h, 5- 25.75 h, 6- 28.45 h, (b) 1- 16.53h, 2- 18.62h, 3-19.37h, 4- 19.87h, 5- 20.37h, 6- 20.87h, 7- 21.37h, 8- 21.87h, 9-22.37h 10-23.95h 11- 25.90h 12-26.45h 13-28.12h. *En cursiva:* quantificació densitomètrica de fracció de Fuc-1-PA relativa a proteïna total intracel.lular.

El creixement no induït, *FB-13*, confirma el bon funcionament de l'estratègia semicontínua per al creixement de *DH11acdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*. Es repeteix el perfil de creixement descrit per a *FB-12* amb una primera fase alimentada en que no és possible el control de la velocitat de creixement. Un cop consumit l'àcid acètic residual al medi, al voltant de les 4 hores de creixement alimentat, s'arriba a controlar el creixement exponencial del cultiu amb una velocitat de  $0,09 \text{ h}^{-1}$ , al voltant de la velocitat de creixement prefixada per al control d'addició. L'eliminació de l'amoni en l'alimentació es tradueix en una disminució molt lenta de la seva concentració al medi però que no arriba a limitar el creixement. Al voltant de les 26 hores de creixement, amb una concentració cel.lular de  $40 \text{ g PS/l}$  es fa necessari enriquir l'aeració al 50% d'oxigen per mantenir la concentració d'oxigen al medi prefixada per al creixement. A partir d'aquest moment es satura la lectura del sensor d'oxigen dissolt i no és possible el seguiment d'aquest paràmetre. Poc després, al voltant de

les 29,5 hores de creixement es decideix aturar voluntàriament la fermentació amb una concentració final de 51 g PS/l.

Per *FB-14*, abans de la inducció, es repeteix el mateix comportament descrit per *FB-13* amb dues fases diferenciades en l'etapa alimentada. En aquest cas, al voltant de les 3 hores de creixement alimentat, es recupera el control sobre la velocitat de creixement i encara s'esperen 4 hores més a procedir a la inducció per comprovar el funcionament de l'estratègia. Just després de la inducció de *FB-14*, degut a la reducció en la solubilitat d'oxigen al medi de cultiu per l'augment de temperatura a 42°C, no és possible mantenir la concentració prefixada d'oxigen al medi. Per tal d'allargar l'etapa induïda i poder avaluar l'efecte de la inducció sobre el creixement, es decideix enriquir l'aeració al 50% en oxigen (*veure* Figura VII.16.a.i c). Durant les 6 primeres hores de creixement induït, no es pot apreciar l'efecte de la sobreexpressió sobre el creixement, es manté un valor de  $Y_{ap\ x/\text{glucosa}}$  de l'ordre de l'estimat per mantenir el creixement a  $0,1\ \text{h}^{-1}$  prèvia inducció i és possible controlar al voltant d'aquest valor la velocitat de creixement. El creixement es va frenant progressivament a partir d'aquest moment, es comença a acumular àcid acètic al medi de cultiu i cap a les 9 hores de creixement induït la velocitat de creixement és tan baixa que es pot considerar aturat el cultiu. En canvi, per les mateixes hores de fermentació i en les mateixes condicions d'oxigenació, el cultiu control no induït, *FB-13*, encara manté el creixement a la velocitat de creixement prefixada segons el control d'alimentació (*veure* Figura VII.15.a). S'extreu que, mantenint les condicions òptimes d'oxigenació, al voltant de les 9 hores de creixement induït l'estrès metabòlic associat a la sobreexpressió recombinant frena el creixement cel.lular amb una concentració cel.lular final màxima de  $46\ \text{g PS} \cdot \text{l}^{-1}$ .

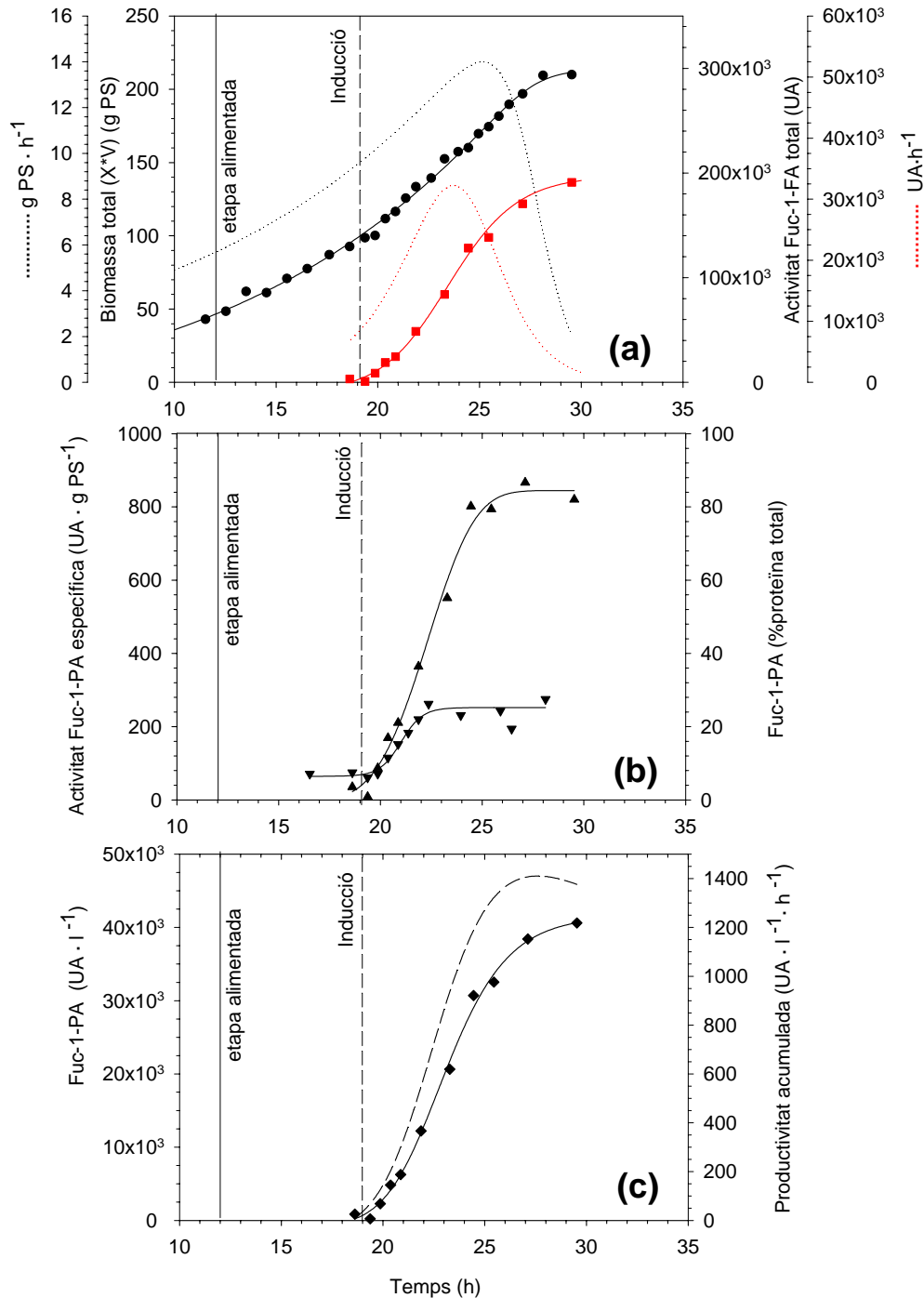
La Figura VII.18. mostra l'anàlisi dels resultats de producció de Fuc-1-PA per la fermentació induïda *FB-14* en relació al creixement. A la Figures VII.18.a. es mostra els perfils de biomassa total (g PS) i unitats d'activitat Fuc-1-PA totals (UA Fuc-1-PA) al vas de fermentació al llarg del procés i les corresponents estimacions de velocitat de producció de biomassa (g PS / h) i Fuc-1-PA activa (UA / h). A la Figura VII.18.b. es mostren els resultats en relació a la producció específica de Fuc-1-PA: activitat específica (UA  $\cdot$  g<sup>-1</sup> PS)

i fracció de proteïna intracel.lular corresponent a Fuc-1-PA (% proteïna total) (veure també Figura VII.17). Finalment, la Figura VII.18.c. corresponen a la variació en la concentració de Fuc-1-PA activa al brou de cultiu ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1}$ ) al llarg del procés i al càlcul de productivitat volumètrica acumulada des de l'inici de la fermentació ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), considerant també el temps invertit en l'etapa discontinua.

La biomassa total (g PS), la quantitat total de Fuc-1-PA activa produïda i la concentració específica de Fuc-1-PA activa segueixen perfils de tipus sigmoïdal en el temps (Figures VII.18.a i b.). Les estimacions per a l'evolució de les velocitats de producció cel.lular ( $\text{g PS} \cdot \text{h}^{-1}$ ), de Fuc-1-PA activa total ( $\text{UA} \cdot \text{h}^{-1}$ ) i de Fuc-1-PA activa específica ( $\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS} \cdot \text{h}^{-1}$ ) s'obtenen a partir de la derivació analítica de les equació sigmoïdals ajustades als corresponents perfils de producció total i concentració específica.

Per poder seguir la discussió d'aquests resultats, a la Taula VII.7. es resumeixen els principals resultats obtinguts en relació a la producció de Fuc-1-PA per *FB-14* en termes de productivitats globals i concentracions de Fuc-1-PA assolides al final dels processos. També s'inclouen les velocitats de producció de Fuc-1-PA màximes, totals ( $\text{UA} \cdot \text{h}^{-1}$ ) i específiques ( $\text{UA} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS} \cdot \text{h}^{-1}$ ), com a valors de referència per poder comparar la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa amb altres processos.





**Figura VII.18.** Acumulació de Fuc-1-PA durant l'etapa induïda de la fermentació *FB-14*. *E. coli* *DH1 lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* induït a 7 hores de l'inici de la fase semicontínua de creixement. **(a)** (●) i (■) Biomassa total (g PS) i activitat Fuc-1-PA total (UA) al vas de fermentació respectivament; (.....) i (.....) estimació dels perfils de velocitats de producció de biomassa i Fuc-1-PA activa. **(b)** (▲) Concentració específica de Fuc-1-PA (UA g<sup>-1</sup> PS) i (▼) % Fuc-1-PA de proteïna total intracel·lular. **(c)** (◆) Concentració volumètrica de Fuc-1-PA (UA l<sup>-1</sup>) i (----) estimació al perfil de productivitat volumètrica acumulada

	velocitats producció màx.		Concentracions finals			Productivitats globals	
	Específica	Total	Específica	Volumètrica		Específica	Volumètrica
	(UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup> )	(UA·h <sup>-1</sup> )	(UA·g <sup>-1</sup> PS)	% proteïna total	(UA·l <sup>-1</sup> )	(UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup> )	(UA·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>FB-14</b>	177,1	32250	844,7	27,5	40610	28,6	1376,6

**Taula VII.7.** Dades de producció de Fuc-1-PA a l'experiment *FB-14*.

A partir del moment d'inducció, la quantitat total de Fuc-1-PA activa produïda al vas de fermentació (UA Fuc-1-PA totals) augmenta proporcionalment a l'augment de biomassa total (g PS totals) aturant-se amb l'aturada del creixement del cultiu (*veure* Figures VII.18.a.). En base a aquesta observació, sembla que la producció de Fuc-1-PA activa al sistema de treball és associada al creixement. Aquest comportament per l'expressió recombinant coincideix amb l'obtingut al capítol anterior amb la soca recombinant XL1 Blue MRF'(pT $\text{rcfuc}$ ), emprant la mateixa estratègia de cultiu però sistemes de regulació de l'expressió recombinant diferents.

Quan, a partir de les 6 hores de creixement induït l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant afecta el creixement, ja no és possible controlar la velocitat de creixement mitjançant el control d'addició (*veure* Taula VII. 6 i Figura VII.18.a.) i d'acord amb el punt anterior, aquesta frenada del creixement es tradueix en una decaiguda progressiva també en la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa (*veure* Figures VII.18.a.). No es considera aturat el creixement fins a les 30 hores de cultiu però al voltant de les 25 hores, 6 hores després de la inducció, sembla que ja s'ha assolit la màxima concentració possible de Fuc-1-PA per unitat cel.lular amb un valor màxim de 845 UA · g<sup>-1</sup> PS (tendència a la saturació de la corba de concentració específica de Fuc-1-PA activa (UA · g<sup>-1</sup> PS) amb el temps; *veure* Figura VII.18.b i Taula VII.7). Els resultats obtinguts en termes de fracció de proteïna total intracel.lular (*veure* Figures VII.18.b i Figura VII.17) corroboren aquest resultat amb una estimació del temps requerit encara inferior: només entre 3 i 4 hores de creixement induït. No obstant, la densitometria de gels d'agarosa és una tècnica només

semi-quantitativa i es considera més fiable l'estimació de temps en base a la mesura d'activitat específica.

A la Figura VII.18.c. es presenta una aproximació al perfil de productivitats volumètriques acumulades que s'obté aturant aquest procés *FB-14* a diferents moments del creixement induït i considerant el temps total de procés, també l'etapa discontinua de creixement. Aquesta estimació s'obté a partir de l'equació sigmoïdal ajustada al perfil experimental de concentració volumètrica de Fuc-1-PA activa en el temps ( $\text{UA} \cdot \text{l}^{-1}$ ) que es mostra a la mateixa Figura VII.18.c. La productivitat volumètrica del procés seria màxima parant la fermentació al voltant de les 27,5 hores de cultiu, després de 8,5 hores de creixement induït, amb un valor de  $1410 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A les 27,5 hores però encara no s'ha assolit la màxima concentració volumètrica de Fuc-1-PA:  $38890 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  front  $40640 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  al final del procés.

En base a tot aquest anàlisi de resultats és possible extreure una conclusió en relació a l'optimització del criteri d'inducció per maximitzar la producció de Fuc-1-PA en aquest procés sempre que sigui possible mantenir les condicions òptimes d'oxigenació després de la inducció (això implica la necessitat d'enriquir l'aeració amb oxigen). Cal induir havent assolit prèviament la màxima concentració cel.lular per a la qual es pugui garantir mantenir el creixement, un cop induïda l'expressió, al voltant de 6 hores sense limitacions d'oxigen. D'aquesta manera seria possible assolir la màxima concentració cel.lular específica (al voltant de  $845 \text{ UA} \cdot \text{g}^{-1}$  PS segons *FB-14*) abans que l'efecte de l'expressió recombinant sobre el metabolisme cel.lular freni el creixement però assegurant, simultàniament, la inducció de la quantitat màxima de biomassa per maximitzar la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa ( $\text{UA} \cdot \text{h}^{-1}$ ) durant el període induït.

Aplicant aquest criteri d'inducció i treballant amb oxigen pur seria possible assolir una producció de Fuc-1-PA molt superior a les  $40640 \text{ UA} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $2,7 \text{ g}$  Fuc-1-PA activa per litre de cultiu) assolides en *FB-14*. Ja s'ha comentat però que a Cobra Bio-manufacturing plc. no es disposa de xarxa de subministrament d'oxigen, ni als laboratoris d'escalat de procés ni als reactors a planta de producció, i que treballar directament amb bombones d'oxigen o

aire enriquit suposa un conflicte per a les normes de seguretat de l'empresa. Per tal de poder provar l'escalat a producció d'aquesta estratègia de cultiu amb el sistema d'expressió ORT es realitza un segon experiment amb l'equip Applikon 7l amb l'objectiu d'optimitzar la producció de Fuc-1-PA en aquest sistema treballant només amb aire de xarxa.

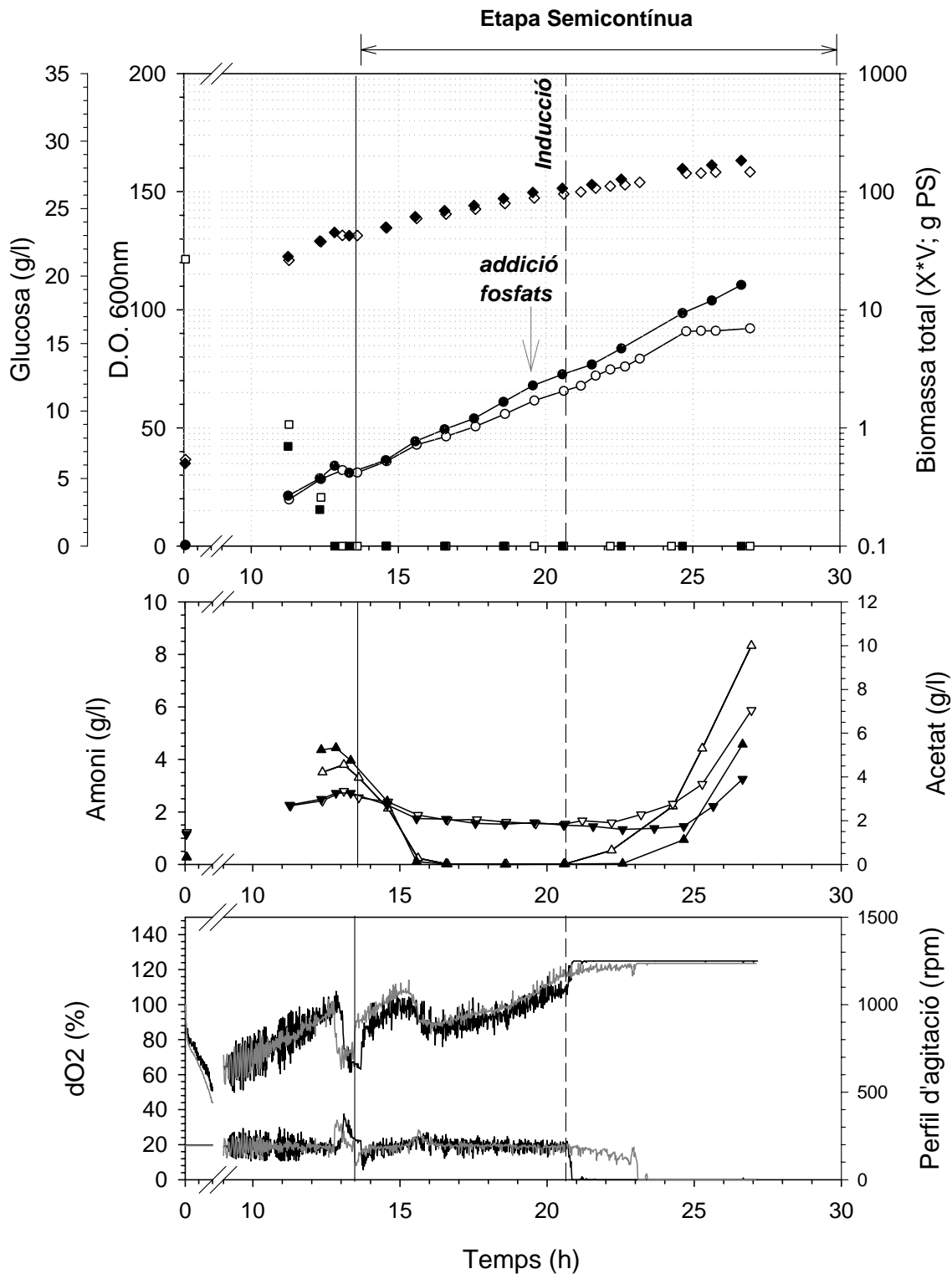
Es realitzen dues fermentacions en paral·lel en equips idèntics Applikon 7l, *Fermentacions FB-15* i *FB-16*, fixant, bàsicament, els mateixos paràmetres d'operació descrits per als experiments anteriors. Per l'etapa discontinua, es treballa amb una concentració inicial de glucosa al medi de  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  però, en la composició del medi MD-FB, es redueix el factor de consum relatiu de L-prolina a glucosa a  $0,08 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$  per avaluar l'efecte de disminuir la concentració en L-prolina residual al final de l'etapa discontinua en relació al comportament del cultiu a l'inici de l'etapa alimentada en que no és possible controlar la velocitat de creixement. Per a l'etapa semicontinua, es fixa la velocitat de creixement per al control d'addició en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i es corregeix el valor de  $Y_{\text{ap}}_{\text{x/glucosa}}$  per al control d'addició a  $0,41 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , considerant els valors experimentals d'aquest paràmetre a les fermentacions prèvies no induïdes en que ha estat possible mantenir  $\mu = 0.1 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ . Es manté la composició de la solució alimentada dels experiments anteriors: no es contempla l'amoni en la seva formulació i es manté la relació de consum de L-prolina relatiu a glucosa en  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . Per l'aeració del medi de cultiu s'utilitza únicament aire de xarxa i es fixa el nivell d'oxigen a mantenir al medi de cultiu al 20% com en les fermentacions anteriors.

La fermentació *FB-15* s'utilitza com a control de creixement no induït i *FB-16* s'indueix per increment de temperatura de 30 a 42°C. Segons els resultats de *FB-14*, quan s'indueix l'expressió recombinant incrementant la temperatura i amb concentracions cel·lulars altes, la reducció en la solubilitat de l'oxigen al medi de cultiu i l'elevada demanda d'oxigen per mantenir el creixement porten a una ràpida limitació d'oxigen al medi de cultiu per mantenir el creixement. L'objectiu d'aquest experiment és caracteritzar la producció de Fuc-1-PA al sistema de treball mantenint el creixement induït en aquestes condicions de limitació d'oxigen. En base als perfils d'acumulació específica de Fuc-1-PA en el temps per *FB-14* (veure Figura VII.18.b.), es planteja la hipòtesi que, tot i en condicions de cultiu

subòptimes, només que es mantingui el creixement induït entre 3 i 4 hores es poden arribar a assolir concentracions específiques de Fuc-1-PA considerables (al voltant del 50% de la màxima per al sistema, 845 UA/g PS).

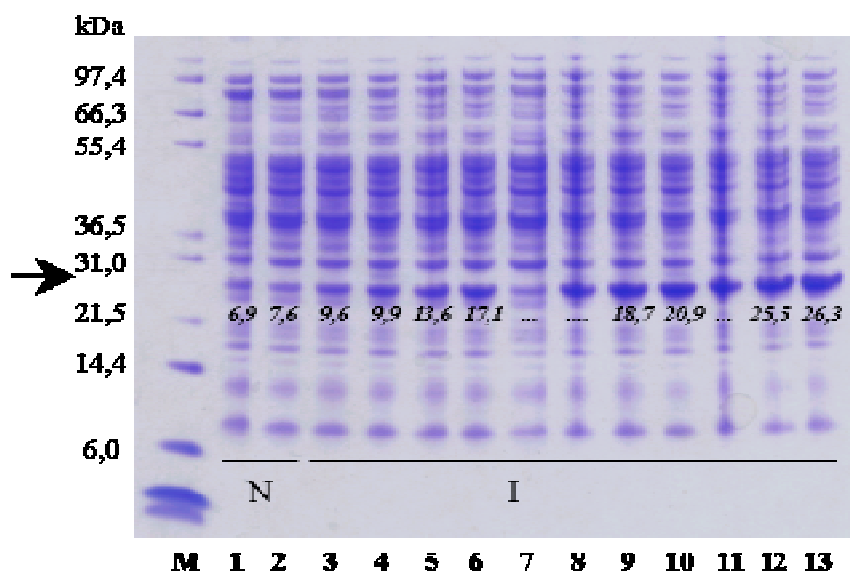
La màxima concentració assolible al sistema de treball utilitzant només aire i sense induïr l'expressió recombinant s'assoleix al voltant de les 26 hores de creixement amb un valor de 42g PS/l segons els resultats obtinguts en *FB-13* (veure Figura VII. 16). Per tal de maximitzar la concentració cel.lular assolida en el moment de la inducció, per aquesta fermentació *FB-16* es fixa la inducció al moment en que s'hagi assolit una concentració cel.lular al voltant de 25,5 g PS/l (veure Figura VII.19; D.O.  $_{600nm} \approx 65.00$ ), 5 hores abans d'assolir aquest concentració cel.lular final si es manté la velocitat de creixement en  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . Tot i que el criteri per la inducció és diferent en cada cas, el moment de la inducció per aquest experiment *FB-16* ve a coincidir amb el realitzat prèviament *FB-14* induint superada la primera fase sense control de velocitat de creixement a l'etapa alimentada. Això ens ha de permetre comprovar la validesa de la hipòtesi plantejada per fixar el criteri d'inducció en aquest cas i determinar l'efecte de la limitació d'oxigen sobre l'expressió de Fuc-1-PA al sistema.

A la Figura VII.19. es resumeixen els resultats obtinguts per ambdues fermentacions, *FB-15* i *FB-16*, en relació a creixement i concentració de nutrients i de productes de metabolisme al llarg del procés. S'inclouen els perfils d'oxigen dissolt i agitació al medi de cultiu durant el procés. Per completar aquesta figura, a la Taula VII.8. es mostren les principals dades de procés per aquestes fermentacions i les estimacions per a l'evolució dels paràmetres de control de creixement corresponents.



**Figura VII.19.** Creixement semicontínu d'*E. coli* DH1lacdapD(pORT1aLfuc). Símbols plens: Fermentació FB-15 (no induïda). Símbols buits: Fermentació FB-16 (induída). (●, ○) Densitat Òptica a 600 nm, (◆, ◇) biomassa total (g PS), (■, □) glucosa (g · l<sup>-1</sup>), (▲, △), acètic (g · l<sup>-1</sup>) i (▼, ▽) amoni (g · l<sup>-1</sup>). (—, —) perfils d'oxigen dissolt i agitació per FB-13 i FB-14 respectivament.

**Pàgina amb Taula VII.8.**



**Figura VII.20.** *FB-16* (induïda) Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres al llarg de la fermentació corregides per biomassa. **N:** no induït, **I:** induït. **M:** marcador de pesos moleculars. **1-** 16.6 h, **2-** 19.6h, **3-** 21.2 h, **4-** 21.7 h, **5-** 22.2 h, **6-** 22.7 h, **7-** 23.2 h, **8-** 23.7 h, **9-** 24.3 h **10-** 24.8 h **11-** 25.3 h **12-** 25.8h **13-** 27 h. *En cursiva:* quantificació densitomètrica de fracció de Fuc-1-PA relativa a proteïna total intracel.lular.

A la Figura VII.20. es mostren els resultats obtinguts per al seguiment d'acumulació de Fuc-1-PA com a fracció del total de proteïna intracel.lular per *FB-16*. Abans d'induir l'expressió constitutiva es manté al voltant del 7% del total de proteïna intracel.lular d'acord amb els experiments previs. Un cop s'incrementa la temperatura del sistema, tot i no treballar amb condicions òptimes d'oxigenació, el sistema respon ràpidament a la inducció i la concentració específica de Fuc-1-PA assolida a final del procés supera el 25% del total de proteïna intracel.lular.

La reducció de concentració de L-prolina al medi MD-FB de l'etapa discontinu no sembla millorar el problema de descontrol en la velocitat de creixement a l'inici de l'etapa alimentada. Més al contrari, sembla que s'incrementa l'acumulació d'àcid acètic al final de l'etapa discontinua amb concentracions superiors als 4 g/l tant per *FB-15* com per *FB-16*.



En canvi, en *FB-13* i *FB-14*, mantenint el coeficient de consum relatiu en 0,13 g L-prolina · g<sup>-1</sup> glucosa, aquesta concentració d'àcid acètic residual es reduïa a la meitat.

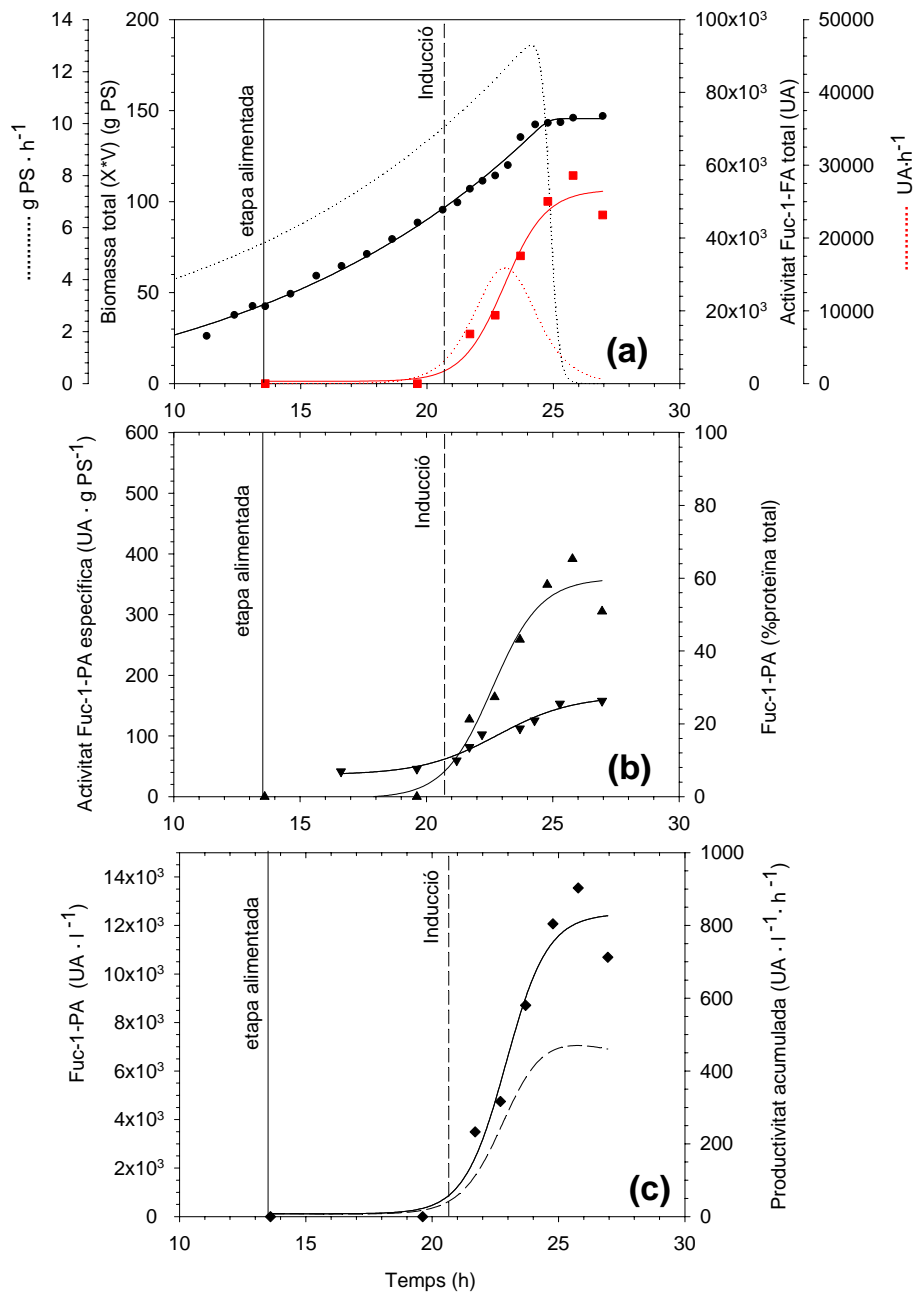
Per *FB-15*, creixement no induït, es confirma el perfil de creixement obtingut amb *FB-13* amb dues fases de creixement per l'etapa alimentada. Fins al voltant de les 3,5 hores de creixement alimentat, quan ja s'ha consumit l'àcid acètic residual de l'etapa discontinua, no és possible el control de la velocitat de creixement pel consum de fonts de carboni alternatives a la glucosa. A partir d'aquest moment, l'estratègia funciona òptimament al llarg de tot el procés: els nivells de glucosa residual i d'àcid acètic al cultiu són inapreciables i es manté la concentració d'amoni entre 1,5 i 2,0 g/l. A les 23 hores de cultiu ja no és possible mantenir la concentració prefixada d'oxigen dissolt al medi i, degut a la limitació d'oxigen, es comencen a acumular àcid acètic i amoni al medi de cultiu. Tot i així, és possible mantenir el creixement controlat fins a les 27 hores de cultiu assolint una concentració cel.lular final de 42 g PS/l.

En *FB-16* s'indueix el cultiu cap a les 20,8 hores de creixement amb una concentració cel.lular de 25 g PS/l. A partir d'aquest moment es treballa en condicions de limitació d'oxigen i es comencen a acumular concentracions importants d'àcid acètic i amoni al cultiu. Tot i així, encara és possible mantenir el creixement induït 4 hores controlant la velocitat de creixement. A partir de les 25 hores de creixement, l'increment en la concentració cel.lular és mínim degut a la combinació dels efectes d'expressió recombinant i limitació d'oxigen sobre el creixement i 2 hores després s'atura el creixement havent-se assolit concentracions inhibidores tant d'àcid acètic com d'amoni al medi de cultiu. La concentració cel.lular assolida al final del creixement és en aquest cas de 35 g PS/l.

Per *FB-16* es procedeix al mateix anàlisi dels resultats producció de Fuc-1-PA en relació a creixement que per les fermentacions precedents (Figura VII.21). A la Figura VII.21.a. es mostra els perfils de biomassa total (g PS) i unitats d'activitat Fuc-1-PA totals (UA Fuc-1-PA) al vas de fermentació al llarg del procés i les corresponents estimacions de velocitat de producció de biomassa (g PS / h) i Fuc-1-PA activa (UA / h). A la Figura VII.21.b. es mostren els resultats en relació a la producció específica de Fuc-1-PA: activitat específica

(UA · g<sup>-1</sup> PS) i fracció de proteïna intracel.lular corresponent a Fuc-1-PA (% proteïna total) (*veure* també Figura VII.20). Finalment, la Figura VII.21.c. corresponen a la variació en la concentració de Fuc-1-PA activa al brou de cultiu (UA · l<sup>-1</sup>) al llarg del procés i al càlcul de productivitat volumètrica acumulada des de l'inici de la fermentació (UA · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>), considerant també el temps invertit en l'etapa discontinua.

Per poder seguir la discussió d'aquests resultats, a la Taula VII.9. es resumeixen els principals resultats obtinguts en relació a la producció de Fuc-1-PA per *FB-16* en termes de productivitats globals i concentracions de Fuc-1-PA assolides al final dels processos. S'inclouen les velocitats de producció de Fuc-1-PA màximes, totals (UA · h<sup>-1</sup>) i específiques (UA · g<sup>-1</sup> PS · h<sup>-1</sup>). com a valors de referència per poder comparar la velocitat de producció de Fuc-1-PA activa amb altres processos. Per poder comparar els resultats obtinguts induït al mateix moment del procés però amb la possibilitat o no de prorrogar el creixement induït treballant només amb aire o amb aire enriquit amb oxigen, a la mateixa taula s'inclouen les mateixes dades ja presentades per la fermentació *FB-14*.



**Figura VII.21.** Acumulació de Fuc-1-PA durant l'etapa induïda de la fermentació *FB-16*. *E. coli* DH1 *lacdapD*(pORT1aL*fuc*). (a) (●) i (■) Biomassa total (g PS) i activitat Fuc-1-PA total (UA) al vas de fermentació respectivament; (.....) i (.....) estimació dels perfils de velocitats de producció de biomassa i Fuc-1-PA activa. (b) (▲) Concentració específica de Fuc-1-PA (UA g<sup>-1</sup> PS) i (▼) % Fuc-1-PA de proteïna total intracel·lular. (c) (◆) Concentració volumètrica de Fuc-1-PA (UA l<sup>-1</sup>) i (- - -) estimació al perfil de productivitat volumètrica acumulada

	velocitats producció màx.		Concentracions finals			Productivitats globals	
	Específica (UA·g <sup>-1</sup> PS· h <sup>-1</sup> )	Total (UA·h <sup>-1</sup> )	Específica (UA·g <sup>-1</sup> PS)	% proteïna total	Volumètrica (UA·l <sup>-1</sup> )	Específica (UA·g <sup>-1</sup> PS·h <sup>-1</sup> )	Volumètrica (UA·l <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<i>FB-14</i>	177,1	32250	844,7	27,5	40610	28,6	1376,6
<i>FB-16</i>	<b>94,4</b>	<b>15892</b>	<b>355,9</b>	<b>26,3</b>	<b>12399</b>	<b>13,2</b>	<b>460,1</b>

**Taula VII.9.** Dades de producció de Fuc-1-PA a l'experiment *FB-14*.

Els resultats obtinguts en *FB-16* venen a confirmar que la producció de Fuc-1-PA en aquest sistema va associada a creixement. Tot i la limitació d'oxigen dissolt al medi de cultiu després de la inducció, és possible mantenir el creixement exponencial a la velocitat prefixada per un període de 4 hores. Durant aquest temps es produeix Fuc-1-PA però l'expressió s'atura tant punt ho fa el creixement del cultiu (*veure* Figura VII.21.a i Taula VII.8).

Segons els resultats obtinguts en *FB-14*, són necessàries unes 6 hores de creixement induït en condicions òptimes d'oxigenació per assolir la màxima concentració específica de Fuc-1-PA activa al sistema. D'acord amb aquest resultat, la producció de Fuc-1-PA a *FB-16* és considerablement inferior, únicament al voltant del 42% d'aquesta acumulació intracel.lular màxima, 355,9 UA/g PS front a 845 UA/g PS (*veure* Figura VII.21.b i Taula VII.9), perquè el cultiu queda limitat per la disponibilitat d'oxigen abans que l'aturi l'efecte de l'expressió recombinant sobre el creixement. En termes de concentració volumètrica de Fuc-1-PA activa i productivitat volumètrica acumulada al final del procés, ambdós paràmetres es redueixen a una tercera part en *FB-16* respecte a *FB-14*.

L'optimització del criteri d'inducció per maximitzar la producció s'ha de fixar sempre atenent a la disponibilitat de mitjans per dur a terme el procés. Per la producció de Fuc-1-PA en el procés en estudi i quan no es disposa de l'equipament necessari per l'enriquiment de l'aeració d'entrada al tanc de fermentació, el criteri d'inducció fixat en *FB-16* permet assolir una concentració cel.lular a final de creixement, 35 g PS/l, propera a la màxima assolible en condicions de no inducció, 42 g PS/l, i mantenir el 42% de la concentració específica màxima. Caldria però determinar si adelantant el moment de la inducció seria

possible mantenir el creixement induït fins assolir la mateixa concentració cel.lular final, 35 g PS/l. En cas afirmatiu, adelantant la inducció entre 2 i 3 hores respecte de FB-16 s'aconseguiria maximitzar la producció en aquestes condicions de treball.

#### VII.2.4. Escalat a producció del procés semicontínu per a la producció de Fuc-1-PA mitjançant *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*.

Fins aquest punt del treball, s'ha posat a punt una estratègia semicontínua que permet obtenir CADC de dues soques d'*E. coli* per la producció de Fuc-1-PA en base a diferents sistemes d'expressió: XL1 Blue MRF'(pTrefuc) i *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*. L'objectiu d'aquest últim apartat és determinar la viabilitat d'escalar aquesta estratègia operativa a nivell de producció utilitzant la soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*.

Aquest experiment *FB-17* es realitza a la planta de producció de Cobra Bio-manufacturing plc. utilitzant l'equip de 75 l de capacitat màxima 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.). Es fixen exactament les mateixes condicions de treball que per l'experiment anterior a escala laboratori *FB-16*. Per l'etapa discontinua, es treballa amb una concentració inicial de glucosa al medi de  $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  i es manté la reducció en el factor de consum relatiu de L-prolina a glucosa a la composició del medi MD-FB fixant-lo a  $0,08 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . Per al control d'addició a l'etapa semicontínua, es fixa la velocitat de creixement en  $0,1 \text{ h}^{-1}$  i es corregeix el valor de  $Y_{\text{ap}_{\text{x/glucosa}}}$  a  $0,41 \pm 0,03 \text{ g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ , considerant els valors experimentals d'aquest paràmetre a les fermentacions prèvies no induïdes en que ha estat possible mantenir  $\mu = 0,1 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ . Es manté la composició de la solució alimentada dels experiments anteriors: no es contempla l'amoní en la seva formulació i es manté la relació de consum de L-prolina relatiu a glucosa en  $0,02 \text{ g L-prolina} \cdot \text{g}^{-1} \text{ glucosa}$ . Per l'aeració del medi de cultiu s'utilitza únicament aire de xarxa i es fixa el nivell d'oxigen dissolt a mantenir al medi de cultiu al 20%.

Dels resultats previs obtinguts, *FB-14* i *FB-16*, s'extreu que per maximitzar la producció de Fuc-1-PA amb aquesta estratègia operacional i emprant la soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*, es fa necessari induir havent assolit la màxima concentració cel.lular possible però garantint 6 hores de creixement induït per maximitzar simultàniament la concentració específica de Fuc-1-PA. Quan es treballa sense enriquiment en oxigen de l'aeració, després de la inducció és difícil mantenir el creixement degut a la limitació d'oxigen dissolt al medi per efecte de l'augment de temperatura. Segons els

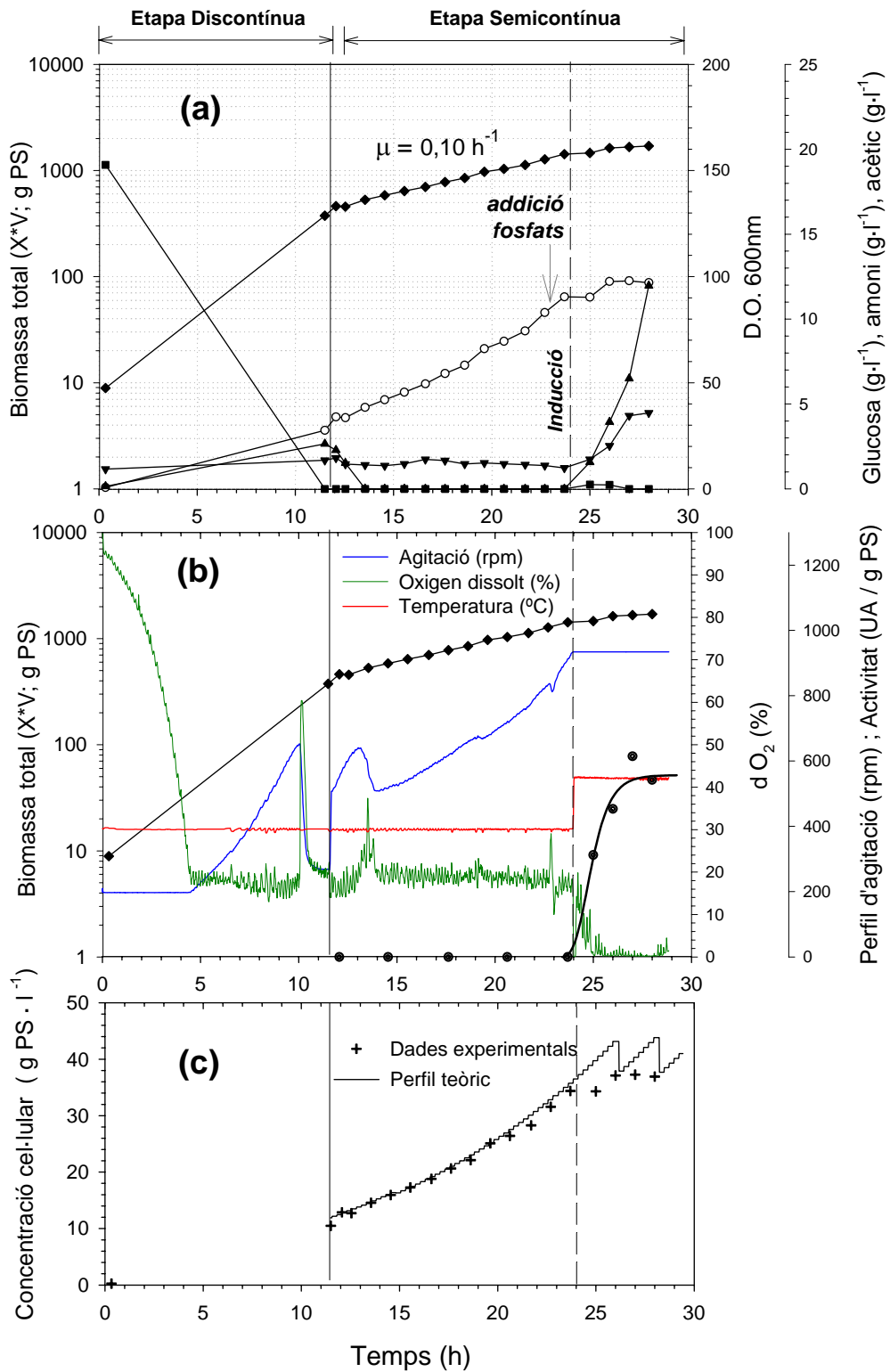
resultats de FB-16, no és possible mantenir el creixement induït a concentracions cel.lulars superiors a 35 g PS / l en aquestes condicions de creixement induït amb limitació d'oxigen al medi.

No obstant, en aquest primer experiment a escala productiva, *FB-17*, es prioritza comprovar el funcionament de l'estratègia semicontínua de treball per assolir CADC adaptada al nou equip de treball (50/75 l Fermenter; LSL Biolafitte Inc.) front a l'optimització de l'expressió recombinant i es decideix mantenir el màxim temps possible el creixement en condicions de no inducció. Amb aquest criteri es fixa el moment d'inducció a una concentració cel.lular de 35 g PS/l, al voltant de 3 hores abans que s'aturi el creixement no induït per limitació d'oxigen treballant únicament amb aeració (*veure* Figura VII.19.; FB-15). A partir del moment d'inducció, es sobrepressiona el tanc de fermentació per augmentar la solubilitat d'oxigen al medi tot i l'augment de temperatura i poder mantenir el creixement induït per sobre d'aquesta concentració cel.lular per avaluar la resposta a la inducció.

A la Figura VII.22. es resumeixen els resultats obtinguts per aquesta fermentació *FB-17*. A la Figura VII.22.a. es presenten les dades en relació a creixement i concentració de nutrients i de productes de metabolisme al llarg del procés. A la Figura VII.22.b. es completa aquesta informació amb els perfils d'oxigen dissolt, agitació i temperatura al medi de cultiu durant el procés. S'inclou el perfil de producció de Fuc-1-PA en termes de concentració específica.

Per poder avaluar el funcionament de l'estratègia d'alimentació per al control de creixement amb l'escalat a producció, a la Figura VII.22.c. es mostra el grau de coincidència entre el perfil de creixement teòric prefixat per al control de l'alimentació i les dades experimentals de concentració cel.lular determinades fora de línia al llarg del procés.

La Taula VII.10. recull els paràmetres de control per aquesta fermentació.



**Figura VII.22.** Experiment FB-17. Escalat de l'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa a producció. Creixement de DH1*lacdapD*(pORT1a*Lfuc*) a l'equip 50/75 l Fermenter (LSL Biolafitte Inc.). (◆) Biomassa total, (○) D.O.  $_{600nm}$ , (▼) amoni (g/l), (▲) àcid acètic (g/l), (■) glucosa(g/l), (●) Producció de Fuc-1-PA (UA / g PS).



**Taula VII. 10.**

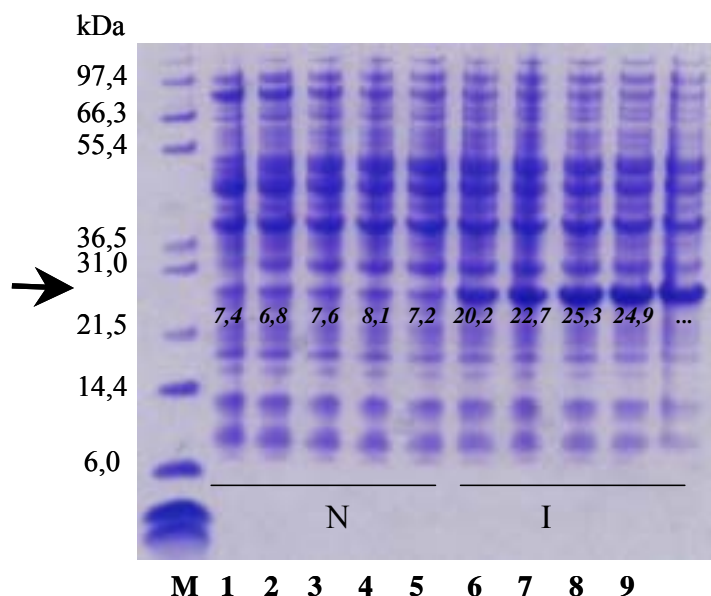
Com es mostra a la Figura VII.22.a., durant les 12 primeres hores de creixement semicontinu no induït, l'estratègia de creixement exponencial per limitació de glucosa funciona perfectament reproduint exactament els resultats obtinguts a escala de laboratori. Es manté la velocitat de creixement global per aquest període a  $0,1 \text{ h}^{-1}$  (veure també Taula VII.10) i la concentració de glucosa residual al medi per sota del límit de detecció de l'assaig ( $< 0,2 \text{ g/l}$ ) durant tot el procés. Tampoc es detecten problemes d'acumulació d'àcid acètic al llarg de tot aquest període i la concentració d'amoni es manté entre 1 i  $1,5 \text{ g/l}$  garantint la seva disponibilitat com a font de nitrogen però sense assolir concentracions superiors a  $3 \text{ g/l}$  que poguessin resultar inhibidores per al creixement. No és possible evitar la primera fase de creixement alimentat a velocitat de creixement descontrolada (de 11,5 a 14 hores aproximadament) observada prèviament a les fermentacions a escala de laboratori i que es justifica pel consum de fonts de carboni alternatives a la glucosa a l'inici de l'etapa alimentada (bàsicament, L-prolina residual de l'etapa discontinua i l'acumulació d'àcid acètic fins a  $3 \text{ g/l}$  al final d'aquesta mateixa etapa). No obstant, aquesta fase ocupa només 2,5 hores i no altera la velocitat de creixement global mantinguda durant el període semicontinu no induït (veure Taula VII.10.). A la Figura VII.22.b. es pot comprovar com els perfils d'oxigen dissolt al medi i agitació també són coincidents amb els obtinguts prèviament a escala laboratori per tot aquest període.

La Figura VII.22.c. mostra el grau de coincidència entre el creixement real del cultiu i el perfil teòric de creixement en que es basa el control d'addició i corrobora el bon funcionament de l'estratègia: durant tota aquesta etapa de creixement no induït no és necessari corregir el perfil de creixement prefixat.

A les 24 hores de fermentació, amb una concentració cel.lular de  $34,5 \text{ g PS/l}$  (veure Figura 22.a;  $\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 90.0$ ) es procedeix a la inducció de l'expressió recombinant per increment de temperatura de  $30$  a  $42^\circ\text{C}$ . Per al canvi de temperatura en aquest equip s'utilitza la circulació de vapor d'aigua de línia per la camisa del reactor. Això permet l'augment de temperatura de procés de forma homogènia en pocs minuts tal com es mostra a la Figura VII.22.b. En canvi, als equips a escala laboratori, aquest canvi es realitza per escalfament de l'aigua de refrigeració de la camisa del vas de fermentació i la transferència de calor és

molt més lenta sent necessaris entre 20 i 30 minuts per assolir la mateixa temperatura. Un cop assolida la temperatura d'inducció, la concentració d'oxigen dissolt al medi es redueix dràsticament però es recupera sobrepressionant el tanc gradualment fins a una pressió màxima de 2 bar corresponent a la màxima sobrepressió permesa per les normes de seguretat de l'empresa (pressió màxim de treball especificat per al sistema: 3 bar). Tot i així, el nivell d'oxigen dissolt es va reduint gradualment i només és possible retardar 1 hora les condicions de creixement amb limitació d'oxigen (*veure* Figura VII.22.b.). A les 3 hores de creixement induït es pot considerar completament aturat el creixement (*veure* també Taula VII.10) havent-se assolit una concentració cel.lular màxima de 37,2 g PS/l.

En relació a la producció de Fuc-1-PA, a la Figura VII.23. es mostren els resultats obtinguts per al seguiment d'acumulació de Fuc-1-PA com a fracció del total de proteïna intracel.lular. Abans d'induir, l'expressió constitutiva de Fuc-1-PA es manté al voltant del 7% del total de proteïna intracel.lular d'acord amb els experiments previs a escala de laboratori. El sistema respon ràpidament a la inducció per augment de temperatura i 3 hores després de la inducció ja s'ha assolit una concentració específica de Fuc-1-PA màxima al voltant de 25% del total de proteïna intracel.lular.



**Figura VII.23.** Experiment *FB-17*. Electroforesi desnaturalitzant SDS-PAGE de mostres al llarg de la fermentació corregides per biomassa. **N**: no induït, **I**: induït. **M**: marcador de pesos moleculars. **1**-13,5 h, **2**- 15.5 h, **3**-18.6 h, **4**- 20.6 h, **5**- 23.7 h, **6**- 25.0 h, **7**- 26.0 h, **8**- 27.0 h, **9**-28.0 h. *En cursiva*: quantificació densitomètrica de fracció de Fuc-1-PA relativa a proteïna total intracel.lular.

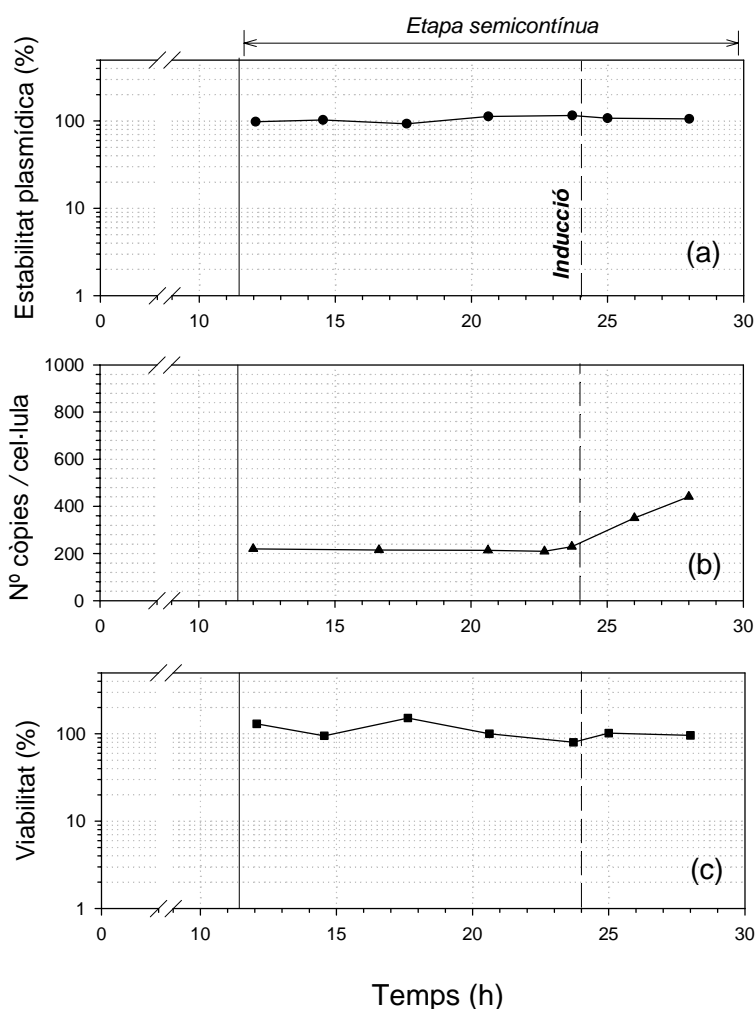
A la Figura VII.22.b. es mostra el perfil de concentració específica de Fuc-1-PA activa al llarg del procés i a la Taula VII.11. els resultats de producció de Fuc-1-PA al final del procés en termes de concentracions i productivitats específiques i volumètriques. A la mateixa taula s'inclouen els resultats assolits amb el mateix procés de producció a escala laboratori, *experiments FB-14* i *FB-16*. El perfil de concentració d'activitat específica (Figura VII.22.b.) corrobora els resultats obtinguts per anàlisi de fracció de proteïna total a la Figura VII.23: a les 3 hores de creixement induït, d'acord amb una cinètica de producció associada a creixement, s'atura l'expressió recombinant al mateix temps que el creixement cel.lular. La concentració d'activitat Fuc-1-PA específica màxima assolida és de 390 UA/g PS corresponent al 45% de la màxima assolida en condicions òptimes de creixement post-inducció, 845 UA/g PS per *FB-14*.

**Taula VII.11. Apaisada!!!!**

Només és possible mantenir el creixement induït al voltant de 3 hores. Tot i així, els resultats de concentració de Fuc-1-PA activa i productivitat volumètrica acumulada al final del procés són similars als obtingudes per FB-16 en que es possible prorrogar el creixement induït encara un parell d'hores més. La diferència entre les concentracions cel.lulars en el moment de la inducció (35 g PS/l per FB-17 front 25 g PS/l per FB-16) i l'eficiència en el canvi de temperatura per a la inducció en FB-17 (menys de 5 minuts en FB-17 (50/75 l Fermenter; LSL Biolafitte Inc.) front uns 25 minuts en FB-16 (Applikon de 7 l; FT Applikon Ltd.)) venen a justificar aquest resultat.

Dels resultats obtinguts s'extreu que l'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa posada a punt en aquest treball és fàcilment implementable a escala de producció per l'obtenció de Fuc-1-PA amb bons rendiments de producció. En aquest primer experiment, FB-17, sense treballar en condicions òptimes d'inducció, ja s'obtenen, en una sola operació, al voltant de 50g de Fuc-1-PA (corresponents a les 651808 UA totals a final del procés).

S'aprofita aquest experiment FB-17 amb *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* per avaluar l'estabilitat plasmídica i viabilitat cel.lular de les soques recombinants basades en el sistema ORT a escala de producció. A la Figura VII.24. es presenten els resultats obtinguts. L'estabilitat plasmídica s'avalua mitjançant el seguiment de la fracció de cèl.lules que mantenen la seva capacitat de divisió en cultiu en LB amb/sense IPTG al llarg del procés (Figura VII.24.a.; veure Materials i Mètodes IV.5.4.1.) i també per extracció de DNA plasmídica i estimació del número de còpies del plàsmid per unitat cel.lular (Figura VII.24.b.; veure Materials i Mètodes IV.5.4.3.).



**Figura VII.24.** Experiment *FB-17*. Seguiment d'estabilitat plasmídica i viabilitat cel.lular en cultiu semicontinu de *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en medi definit MD-FB.

La viabilitat cel.lular al llarg del procés s'estima quantificant la fracció de cèl.lules formadores de colònies en medi LB front al total de cèl.lules al cultiu (Figura VII.24.c.). No s'observa pèrdua de viabilitat cel.lular al llarg del procés, fins i tot un cop induït el cultiu es manté la capacitat de divisió cel.lular per a tota la població fins al final del procés.

Com es mostra a la Figura VII.24.a., el número de cèl.lules que perden el plàsmid i amb ell la capacitat de créixer en medi no suplementat amb IPTG es mínim mantenint-se una estabilitat plasmídica al llarg de tot el procés al voltant del 100%. Els resultats de quantificació de número de còpies per unitat cel.lular, Figura VII.24.b., venen a corroborar aquest resultat. Abans de la inducció es manté el número de còpies amb la divisió cel.lular, estimant-se un total de 200 còpies del plàsmid per unitat cel.lular, i amb la inducció tèrmica s'accelera l'activitat metabòlica incrementant-se aquest contingut fins a 400 còpies per unitat cel.lular. Aquest comportament després de la inducció ha estat àmpliament reportat en sistemes d'expressió recombinant per inducció tèrmica (Kaprálek i col., 1998; Hoffman i Rias, 2001).

Amb els resultats obtinguts en relació a l'estabilitat plasmídica es pot afirmar que el sistema d'expressió recombinant ORT és realment eficient per al control de segregació plasmídica en cultius semicontinus a nivell de producció i, per tant, una alternativa atractiva als sistemes basats en la suplementació d'antibiòtics com a marcadors de selecció.



### VII.3. CONCLUSIONS

Fins a la realització d'aquest treball, el sistema ORT, patentat per Cobra Bio-manufacturing plc., s'havia emprat a Cobra Bio-manufacturing plc. únicament per a la producció de DNA plasmídic per a la seva aplicació en teràpia gènica utilitzant estratègies de cultiu semicontínues en medis complexos molt rics i assolint concentracions cel.lulars màximes al voltant de 25 g PS/l. Dels resultats d'aquest capítol s'extreu que aquest sistema ORT és una bona alternativa als sistemes convencionals basats en la suplementació d'antibiòtics per evitar la segregació plasmídica en processos semicontinus de llarga durada a escala productiva en medis definits. D'altra banda, s'han obtingut molt bons resultats per l'expressió recombinant de Fuc-1-PA com a primer model de proteïna recombinant produïda utilitzant aquest sistema ORT, provant el seu gran potencial també per l'expressió de proteïnes recombinants. De forma addicional, l'adaptació de l'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa en medi MD-FB ha permès doblar les concentracions cel.lulars assolides a final de procés respecte a les estratègies de cultiu emprades fins al moment a Cobra Bio-manufacturing plc.

S'han construït dues noves soques per l'expressió de Fuc-1-PA basades en el sistema ORT, *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* i *DH1lacdapD(pORT1a<sub>fuc</sub>)*, i s'ha realitzat un primer estudi comparatiu a nivell de matràs Erlenmeyer per determinar la seva capacitat de creixement, producció de Fuc-1-PA i estabilitat plasmídica. D'aquest estudi s'extreu que:

- la soca *DH1lacdapD(pORT1a<sub>fuc</sub>)*, induïble en base al promotor *lac*, no és una bona alternativa per l'expressió de Fuc-1-PA: els nivells d'expressió constitutiva són baixos amb una acumulació de Fuc-1-PA al voltant del 10% de la proteïna total intracel.lular i una activitat aldolàsica corresponent inapreciable. Independentment de la naturalesa del medi, complexa o definida, no s'observa resposta a la inducció de l'expressió recombinant.
- En canvi, la soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*, induïble per temperatura, es presenta com una molt bona alternativa per l'expressió de Fuc-1-PA. Es tracta d'un sistema ben regulat amb nivells d'expressió constitutiva mínims, al voltant del 5% de la proteïna total intracel.lular, i bona resposta a la inducció amb produccions de Fuc-1-PA que suposen al voltant del 32 i el 38% de la proteïna total intracel.lular a final de

creixement, en medi MD i LB respectivament. Aquesta acumulació es tradueix en nivells d'activitat específica màxima a final de creixement molt superiors en medi LB que en medi MD, 824 +/- 49 UA/g PS en LB front 404 +/- 24 UA/g PS en MD. Aquest resultat ve a indicar l'efecte negatiu de les altes velocitats de creixement sobre el plegament correcte de les proteïnes cap a la seva forma soluble activa quan es treballa en medis de naturalesa definida.

- No es detecten problemes d'instabilitat plasmídica per cap de les noves soques recombinants obtingudes basades en el sistema ORT. Aquest resultat s'ha corroborat posteriorment a escala de producció per la soca *DH1lacDapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*.

Emprant el sistema ORT, quan s'utilitza la regulació basada en el promotor *lac* tant per al control de segregació plasmídica com per el control d'expressió recombinant, els resultats no són prometedors amb una expressió recombinant insignificant que es redueix a l'expressió basal al sistema tot i l'addició d'IPTG. En canvi, el sistema rendeix molt bons resultats per l'expressió recombinant quan s'utilitzen sistemes de control diferents per cada un d'aquest aspectes com s'extreu dels resultats amb *DH1lacDapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*. En aquesta soca l'expressió de Fuc-1-PA es troba sota el control d'un sistema induïble per temperatura i el sistema ORT per al control de segregació plasmídica es basa en el promotor *lac*. En aquest cas, és possible assolir un bon control de la segregació plasmídica i expressió recombinant simultàniament.

La soca *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* és innecessàriament auxotròfica per L-prolina. Per al seu creixement en el medi definit MD-FB, s'ha redefinit la composició del medi introduint aquest aminoàcid segons l'estimació del seu coeficient de consum relatiu a glucosa,  $Y_{L-prolina/glucosa}$ , en les condicions de cultiu tant en l'etapa discontinua com alimentada.  $Y_{L-prolina/glucosa}$  és dependent de la velocitat de creixement.

L'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa desenvolupada per assolir CADC per la producció de Fuc-1-PA emprant la soca XL1 Blue MRF' (*Trc<sub>fuc</sub>*) ha estat fàcilment adaptable al cultiu de *DH1lacDapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* tot i les limitacions de precisió en el nou equipament emprat. També per aquesta soca l'estratègia ha permès

obtenir CADC a velocitat de creixement controlada i amb resultats reproduïbles. La màxima concentració cel.lular assolida en condicions de no inducció i treballant amb aire enriquit al 50% en oxigen ha estat de 50 g PS/l. Es tracta doncs d'una estratègia robusta i d'aplicació general que permet ser adaptada fàcilment al cultiu de noves soques d'*E. coli* recombinants mitjançant un número reduït d'experiments: primer, per determinar el valor de  $Y_{ap_{x/glucosa}}$  per les condicions de treball i velocitat específica a la que es vol mantenir el creixement; segon, un cop caracteritzat el creixement no induït, per determinar les característiques de l'expressió recombinant al sistema, velocitat/qualitat de producció i efecte sobre el perfil de creixement no induït. Aquesta informació permet determinar el criteri òptim d'inducció per maximitzar la producció.

Aplicant aquesta estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa a la producció de Fuc-1-PA amb *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*, s'ha assolit una concentració específica màxima de Fuc-1-PA intracel.lular activa de 845 +/- 51 UA / g PS en condicions òptimes de creixement post-inducció (tot enriquant l'aire amb oxigen pur al 50%). Aquest valor dobla l'activitat específica assolida per al creixement de la mateixa soca i en el mateix medi MD-FB a nivell de matràs Erlenmeyer, 404 +/- 24 UA / g PS, quan no és possible controlar la velocitat de creixement post-inducció i mostra la importància de la velocitat de creixement del cultiu induït en la qualitat de sobreexpressió. Aquesta activitat específica màxima assolida amb *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)*, suposa al voltant del 80% de l'acumulació específica màxima de Fuc-1-PA obtinguda utilitzant la soca recombinant XL1 Blue MRF' (pTrc<sub>fuc</sub>) amb regulació d'expressió en base a un promotor tipus lac. Aquests resultats venen a indicar que el sistema ORT té un gran potencial per a la producció de proteïnes recombinants i que cal aprofundir en l'optimització del sistema per la seva aplicació en el camp de l'expressió recombinant bàsicament provant promotors alternatius als de tipus lac i als d'inducció tèrmica, per al control d'expressió recombinant.

L'estratègia és fàcilment aplicable a nivell de producció. A escala de producció de 50 l no es presenten problemes d'heterogenitzat al medi de cultiu i els resultats obtinguts en relació a concentració cel.lular i producció de Fuc-1-PA venen a reproduir els prèviament obtinguts a escala de laboratori fixant les mateixes condicions d'operació. Amb aquesta

primera prova d'aplicació de l'estratègia desenvolupada a escala productiva, s'ha obtingut la producció de Fuc-1-PA més gran reportada de que es tingui constància, 50,1 g de Fuc-1-PA activa, i encara es podria millorar molt la producció disposant d'oxigen per l'aeració del medi de creixement.

## VIII. CONCLUSIONS GENERALS I FUTURS TREBALLS

### *Diversos aspectes d'influència en l'expressió de Fuc-1-PA: el sistema d'expressió, el medi i l'estratègia de cultiu i les condicions de creixement.*

S'ha treballat amb dues soques recombinants basades en sistemes d'expressió diferents per a la producció de Fuc-1-PA, XL1 Blue MRF'(pTrcfuc) i DH1lacdapD(pORT1aLfuc). En ambdós casos, la síntesi de Fuc-1-PA va associada a creixement: mentre hi ha creixement cel.lular hi ha producció recombinant, per tant, treballar en condicions que permetin allargar la vida del cultiu induït permetrà assolir la màxima concentració específica per al sistema de treball.

Per XL1 Blue MRF'(pTrcfuc), induïble per IPTG, la composició definida del medi és un avantatge per l'expressió recombinant obtenint-se 3 cops millors resultats en medi definit que en medi complex LB, 700 +/- 42 UA/g PS front a 200 +/- 12 UA / g PS, en cultius discontinus a escala de matràs Erlenmeyer. Quan s'utilitza un medi definit per al creixement en sistemes semicontinus controlant la velocitat de creixement a  $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$  és possible allargar el creixement del cultiu induït fins assolir la concentració específica activa màxima per al sistema, 1086 +/- 66 UA / g PS.

En canvi, per DH1lacdapD(pORT1aLfuc), induïble per temperatura, els nivells d'expressió recombinants màxims assolits en l'estudi a escala de matràs Erlenmeyer són molt similars per ambdós medis amb valors d'acumulació específica màxima al voltant del 35% del total de proteïna intracel.lular però, en aquest sistema, la composició complexa suposa un clar avantatge per al plegament de Fuc-1-PA cap a la seva forma activa soluble amb concentracions específiques de Fuc-1-PA activa màximes per al creixement en LB de 824 +/- 50 UA / g PS front a 404 +/- 24 UA/ g PS per al mateix creixement en medi definit. En els estudis en matràs Erlenmeyer, la inducció tèrmica comporta un increment considerable de la velocitat de creixement i, l'aportació directe d'aminoàcids que poden ser ensamblats ràpidament en la síntesi de proteïnes evitant la saturació de les vies sintètiques de l'hoste pot explicar aquest comportament. Tot i així, es decideix treballar amb una composició definida del medi per als estudis de producció en fermentador. Sembla que el control sobre

la velocitat de creixement per limitació de substrat, tot i la inducció tèrmica, permet controlar l'activitat metabòlica de l'hoste i comporta una millora molt considerable de la concentració específica de Fuc-1-PA activa assolida en medi definit: mantenint  $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$  la concentració específica de Fuc-1-PA activa es dobla respecte a l'obtinguda en els estudis de caracterització en Erlenmeyer a  $\mu_{\text{màx.}} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ , passant de  $404 \pm 24 \text{ UA/g PS}$  a  $845 \pm 51 \text{ UA/g PS}$ , màxima concentració específica activa assolida per aquesta soca recombinant en les condicions de treball i superior a l'obtinguda inicialment en medi LB.

En vista dels resultats obtinguts encara es podria tractar de millorar alguns aspectes per augmentar la concentració específica assolida amb *DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)* en base al mateix procés de producció. Aquests aspectes són:

a) *inducció a temperatures inferiors a 42°C*. Tot i que tradicionalment s'ha emprat un salt de temperatura de 30 a 42°C per induir els promotors  $\lambda P_L$  i  $P_R$  en combinació amb el repressor  $cI_{857}$ , l'optimització d'aquests sistemes en relació a la temperatura d'inducció ha mostrat increments en els rendiments de producció a 40°C (Strandberg i Enfors, 1991b) i fins a 38°C (Harder i col., 1994). Per tant, es podria provar d'activar la inducció mitjançant una rampa de temperatura dins el rang de temperatures òptimes de creixement d'*E. coli*: entre 30 i 37°C, evitant activar la resposta de xoc tèrmic i al mateix temps reduint els problemes associats a la reducció de solubilitat de l'oxigen en el medi amb la temperatura. Possiblement, d'aquesta forma seria factible mantenir el creixement induït més temps millorant les concentracions específiques de Fuc-1-PA activa i, si més no, les concentracions cel·lulars màximes assolides abans de que el creixement es limiti per la disponibilitat d'oxigen al medi després de la inducció.

b) *suplementació del medi definit amb complements complexos a partir de la inducció de l'expressió recombinant*. Dels estudis de medi de cultiu en matràs Erlenmeyer s'extreu que la composició complexa del medi afavoreix la formació de Fuc-1-PA cap a la seva forma soluble activa. Tot i que, controlant la velocitat de creixement i les condicions de cultiu en l'estratègia semicontínua, s'ha doblat la producció de Fuc-1-PA activa per unitat cel·lular en medi definit, és possible que l'addició d'una suplementació complexa després de la inducció millorés encara més els rendiments del procés.

*L'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa al medi de cultiu com a eina en l'optimització de sistemes de producció de proteïnes recombinants en E. coli.*

L'estratègia semicontínua exponencial per limitació de glucosa posada a punt en aquest treball ha permès, primer, assolir CADC per la soca recombinant XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i optimitzar la producció recombinant en aquest sistema. Posteriorment, s'ha adaptat amb èxit la mateixa estratègia de creixement per assolir CADC de DH1lacdapD(pORT1aLfuc).

Es tracta d'una estratègia de cultiu semicontinu senzilla, que no requereix de control retroalimentat per al manteniment del creixement a una velocitat de creixement constant prefixada i fàcil d'implementar en qualsevol equip de treball de que es disposi perquè necessita d'un equipament mínim i molt econòmic i només d'un programa senzill per al control d'alimentació al sistema. Els resultats mostren que tot i la seva simplicitat, l'estratègia és altament robusta: un cop optimitzat el paràmetre  $Y_{ap\ x/glucosa}$  per a la soca i condicions de cultiu específiques, és possible reproduir els resultats obtinguts per una mateixa soca en diferents equips i escalats de procés.

El fet que l'estratègia permeti assolir resultats reproduïbles sense dificultat fa possible establir una estratègia general per determinar el criteri d'inducció més adequat per maximitzar la producció recombinant segons sigui la soca de treball, el sistema d'expressió que empra i les limitacions d'equipament. Aquest procediment general consisteix, primer, en caracteritzar el creixement no induït segons aquesta estratègia i les condicions de treball fixades. Aleshores es pot iniciar l'estudi d'inducció amb un experiment en que es fixi el moment d'inducció a l'inici de l'etapa alimentada. La reproduïbilitat respecte dels resultats de creixement no induït, permet extreure d'aquest primer experiment d'inducció la informació necessària per conèixer les característiques de l'expressió recombinant al sistema i fixar un criteri d'inducció. Aquesta informació és: a) efecte de l'expressió recombinant sobre el creixement cel.lular en condicions de no inducció i b) característiques per a la producció de la proteïna sobreexpressada al sistema: velocitat i qualitat de

producció. Amb aquesta informació és fàcil triar el moment d'inducció intentant assolir la concentració específica màxima i simultàniament, la màxima concentració cel.lular.

L'aplicació d'aquesta successió de passos per la producció de Fuc-1-PA treballant amb dues soques recombinats d'*E.coli* basades en sistemes d'expressió diferents ha permès optimitzar el procés de producció en cada cas. No obstant, aquesta extrapolació de les condicions d'inducció òptimes és més fiable en sistemes d'expressió en que la inducció de l'expressió recombinant no altera de forma dràstica les condicions de creixement i es pot preveure el perfil de creixement post-inducció, com és en el cas de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc). En canvi, treballant amb DH1lacdapD(pORTaL<sub>fuc</sub>), la reducció en la solubilitat de l'oxigen post-inducció dificulta aquesta previsió.

Amb aquests resultats, es podria dir que, el que realment s'ha posat a punt en aquest treball, més que una estratègia per al cultiu d'*E. coli* recombinant per assolir CADC, és una estratègia senzilla per l'optimització de processos de producció de proteïnes recombinants en *E.coli*: ràpid, econòmicament factible i que permet comparar diferents sistemes d'expressió recombinant en *E.coli* entre sí per triar el sistema més adequat per escalar a producció. El sistema permet optimitzar el procés de producció de proteïnes recombinants amb una inversió de temps reduïda: simplement ja es disposa d'un sistema semicontinu implementat al fermentador de treball i només cal adaptar-lo a la soca de treball en cada cas. Els resultats obtinguts mostren que, fàcilment, es poden assolir produccions en l'escala de gram en un reactor de dimensions reduïdes (exemple, Applikon 7 l; Ref.: Z61103CT07; FT Applikon Ltd.) i es pensa que la generalització d'aquesta estratègia ha de permetre obtenir, en molts casos, prou proteïna recombinant per començar estudis de caracterització funcional o d'estructura de proteïnes d'interès.

Amb aquesta idea, l'aplicació de forma sistemàtica d'aquesta estratègia de treball per la producció de proteïnes recombinants en *E. coli* al grup de treball del Departament d'Enginyeria Química de la UAB ha permès accelerar l'obtenció de quantitats suficients d'altres aldolases del grup d'estudi, aldolases d'estereoquímica complementària depenents



de DHAP (veure Introducció, I.1.3.), per començar els estudis d'aplicació d'aquest grup d'enzims com a biocatalitzadors.

No obstant, encara es podrien estudiar d'altres aspectes per millorar aquesta estratègia de producció sistemàtica de proteïnes recombinants en *E. coli*. En aquest treball, s'ha fixat la velocitat de creixement en l'etapa semicontínua a  $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$  per reduir les variables d'operació que poguessin influir els resultats. Però un cop optimitzada l'estratègia operacional valdria la pena avaluar l'efecte de la velocitat de creixement prefixada per al creixement sobre la producció recombinant i el creixement cel.lular. Velocitats de creixement massa altes poden afectar la qualitat en l'expressió recombinant i els rendiments cel.lulars per l'acumulació d'àcid acètic o altres productes tòxics de metabolisme o, simplement, per reducció de la concentració cel.lular màxima assolida per unes determinades condicions d'aeració per al procés. En aquest primer treball, s'ha provat que l'estratègia funciona a velocitats de creixement superiors (a  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$  amb XL1 Blue MRF' (pTrcfuc); veure Capítol VII.2.3.) però no s'ha avaluat l'efecte d'aquest augment de la velocitat de creixement sobre la producció de Fuc-1-PA en la seva forma soluble activa. La comparació del creixement de XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) a  $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$  i  $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$  fa evident que a l'augmentar la velocitat de creixement mantenint les mateixes característiques d'aeració s'obtenen menors rendiments cel.lulars ja que la velocitat de transferència d'oxigen del medi de cultiu cap al microorganisme limita abans el creixement. Incloure la velocitat de creixement en l'etapa semicontínua com a variable en l'estudi, permetria triar la velocitat de creixement màxima que permetés, simultàniament, el bon funcionament de l'estratègia semicontínua assolint concentracions cel.lulars màximes i la producció de quantitats raonables de la proteïna activa. D'aquesta forma es podria millorar considerablement la productivitat volumètrica acumulada del procés.

#### Els sistema ORT per l'expressió de proteïnes recombinants

Dels resultats del capítol VII d'aquest treball s'extreu que el sistema ORT té un gran potencial per l'expressió de proteïnes recombinants sempre que el control d'expressió no sigui en base a promotors tipus lac.

En concret, s'ha treballat amb un sistema d'inducció per temperatura. Aquest sistema, que resulta òptim per la producció de DNA plasmídic (com es mostra a la Figura VII.24, amb la inducció del sistema per temperatura es duplica la càrrega plasmídica per unitat cel.lular), té un gran nombre de retractors per la seva aplicació en sobreexpressió de proteïnes recombinants. Bàsicament això és degut a la forta alteració del metabolisme cel.lular que segueix a aquest tipus d'inducció (perquè es desencadenen respostes pròpies de *xoc tèrmic*) i a que moltes proteïnes expressades es desactivin per efecte de les altes temperatures de treball. Aquest era el sistema d'expressió disponible a Cobra Bio-manufacturing plc. com alternativa a la regulació en base a promotors tipus *lac* per a la construcció de noves soques recombinants basades en el sistema ORT i per aquest motiu es va introduir a l'estudi.

Tot i els problemes associats a la inducció per temperatura, la utilització de sistemes de control diferents per l'estabilitat plasmídica i l'activació d'expressió recombinant ha permès assolir bons resultats per l'expressió de Fuc-1-PA activa. L'optimització del sistema ORT per a la seva aplicació en processos de producció recombinant de proteïnes passaria per:

- a) treballar amb sistemes de regulació d'expressió induïbles per sistemes alternatius a la inducció tèrmica i en base al promotor *lac*. Seria interessant estudiar sistemes tipus Rha i Ara (veure introducció capítol VII) amb activació d'expressió per catabolit. Aquests sistemes faciliten la inducció sense alterar les condicions de creixement de forma dràstica i possiblement, permetin mantenir el creixement induït per més temps i maximitzar la concentració cel.lular final i la concentració específica de Fuc-1-PA a la biomassa generada.
- b) La suplementació de L-prolina necessària per al creixement de *DH1lacdapD(pORTaL<sub>fuc</sub>)* en medis definits dificulta l'adaptació de l'estratègia i encareix substancialment el cost del procés global. Es fa necessari treballar en el desenvolupament d'una nova generació de soques ORT prototrófiques per a L-prolina i que evitin noves auxotrofies innecessàries.

Comparació de la producció de Fuc-1-PA amb l'estratègia de cultiu discontinu per limitació de glucosa segons la soca recombinat de treball.

A la Taula VIII.1. es recorden els resultats obtinguts en aquest treball per a la producció de Fuc-1-PA segons la soca recombinant emprada.

El fet que el sistema d'agitació sigui molt més eficaç per l'equip Applikon que per al BiostatB permet assolir concentracions cel.lulars finals similars per ambdós equips treballant amb condicions d'aeració del cultiu diferents (només amb aire enriquit al 50% en el primer cas i amb oxigen pur en el segon) i facilita la comparació dels resultats obtinguts al marge de l'equip de treball. Amb XL1 Blue MRF' (pTrc*fuc*) s'assoleix la concentració específica màxima de Fuc-1-PA, 1086 +/- 62 UA/g PS front 845 +/- 51 UA/ g PS per DH1*lacdapD*(pORTa*Lfuc*) en *FB-14*, i també la màxima concentració volumètrica de Fuc-1-PA al final del procés, 47450 UA / l front 40610 UA / l. Però, en canvi, la producció és més ràpida en el sistema en base a vectors ORT en que s'indueix l'expressió per augment de temperatura i això permet que la productivitat volumètrica acumulada del procés sigui superior per DH1*lacdapD*(pORTa*Lfuc*), 1377 front a 1216 UA · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>.

Per sobre d'aquestes petites diferències, es pot dir que per ambdues soques els resultats obtinguts per l'optimització de la producció de Fuc-1-PA al sistema són molt similars: amb una concentració de producte recombinant actiu final entre 48.000 i 40000 UA/l i una productivitat volumètrica acumulada entre 1400 i 1200 UA · l<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> en qualsevol dels casos.

L'objectiu inicial d'utilitzar el sistema ORT per l'expressió de Fuc-1-PA no era tant millorar els rendiments en l'expressió recombinant com millorar altres aspectes del sistema: la problemàtica associada a l'ús d'antibiòtics com a marcadors de selecció i també a l'ús d'IPTG per a l'expressió recombinant a escala productiva. Amb els resultats obtinguts s'ha provat àmpliament l'eficiència del sistema ORT per assegurar l'estabilitat plasmídica al llarg de processos semicontinus i en escala de producció. En base a aquest sistema, la soca DH1*lacdapD*(pORTa*Lfuc*) permet regular l'expressió evitant la suplementació d'IPTG i

assolint produccions molt similars a les obtingudes per XL1 Blue MRF' (pTrc*fuc*). Per tant, es pot concloure que l'ús del sistema ORT és una molt bona alternativa per l'escalat a producció d'aquesta estratègia semicontínua per a la producció de Fuc-1-PA.

## APÈNDIX 1.

### Regulació de l'operó *lac* (per a la utilització de lactosa en *E.coli*)

L'operó *lac* en les cèl.lules naturals d'*E. coli* consta de tres gens (*lacZ*, *lacY* i *lacA*) que codifiquen per els enzims necessaris per al metabolisme del sucre lactosa. Aquest operó està sotmès a doble regulació: regulació positiva per catabolit en presència de glucosa i repressió negativa en absència de lactosa, de forma que només quan les concentracions de glucosa són baixes i hi ha lactosa al medi la cèl.lula es capaç de metabolitzar aquest sucre.

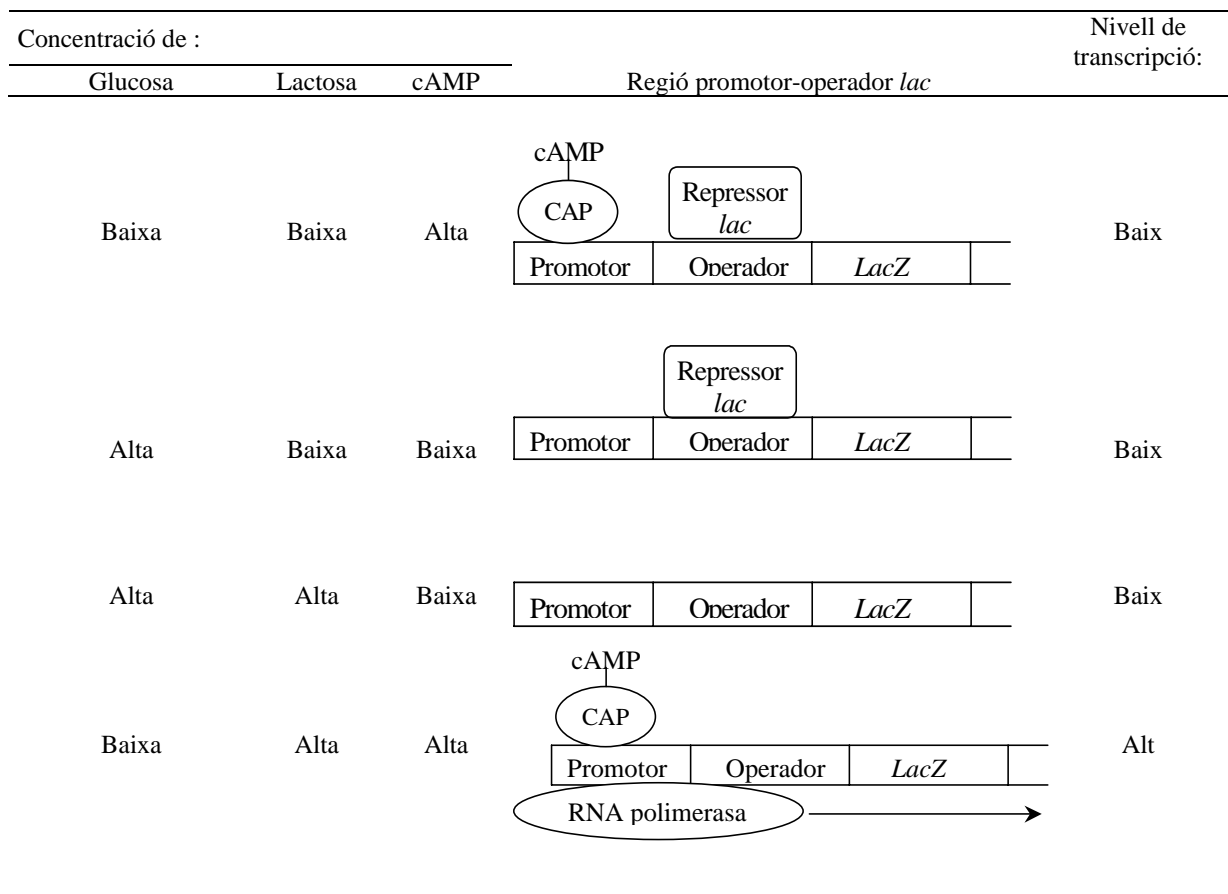
La transcripció del promotor *lac* està primer regulada pel repressor *lac*, producte de transcripció del gen *lacI*. En absència de inductor (lactosa o IPTG) el repressor *lac* inhibeix la transcripció perquè s'uneix a la regió operador del operó *lac*. Quan el repressor està unit a l'operador, la seva presència evita la unió correcta de la RNA-polimerasa a la regió del promotor i no és possible la transcripció dels gens a l'operó. Però com existeix un equilibri entre la forma ocupada i lliure de l'operador, aquest no està ocupat contínuament i això permet una baixa expressió basal dels gens de l'operó.

Quan la cèl.lula es troba en un medi amb lactosa o altres galactòsids s'activa l'expressió dels gens per a la seva metabolització. Un cop dins la cèl.lula, una petita quantitat de lactosa es convertida per la concentració basal de  $\beta$ -galactosidasa a un compost intermedi, allolactosa, que s'uneix a la molècula de repressor *lac*. Aquesta unió provoca un canvi conformacional al repressor *lac* reduint la seva afinitat per al seu lloc d'unio a l'operador *lac*. Sense repressor a l'operador, és possible la transcripció dels gens de l'operó *lac*.

Per altra banda, l'operó està sotmès també a repressió per catabolit: per la unió de la proteïna CAP a la regió del promotor. Quan CAP s'uneix al promotor augmenta l'afinitat de la RNA polimerasa pel promotor i potencia la transcripció. L'afinitat de CAP al promotor es potencia així mateix per la unió d'aquesta a l'enzim adenosina cíclic

monofosfat (cAMP). La concentració de cAMP és alta quan la concentració de glucosa al medi és baixa.

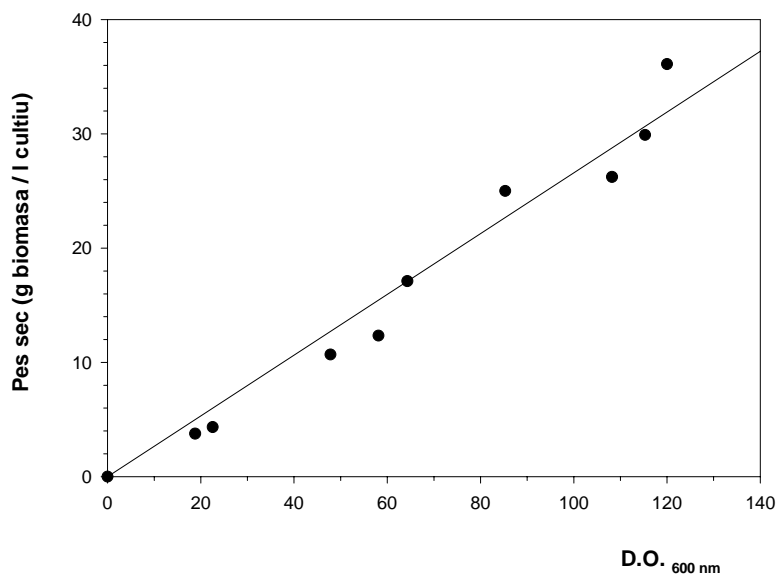
Aquestes interaccions i conseqüències en la transcripció dels gens regulats per l'operó *lac* es mostren a la Figura Ap-1.1. La repressió per catabolit permet a *E. coli* metabolitzar de forma preferent glucosa front lactosa i una gran varietat d'altres sucres. Tot i en presència de l'inductor, concentracions altes de glucosa porten a nivells baixos de transcripcions del promotor *lac*.



**Figura Ap-1.1.** Efecte de les concentracions de glucosa i lactosa (o el seu anàleg IPTG) al medi de cultiu en els nivells de transcripció del promotor *lac* en *E. coli*. Adaptació de Donovan i col., 1996.

**APÈNDIX 2.****Correlació entre pes sec i lectura de densitat òptica a 600 nm (veure Materials i mètodes, IV.5.1.3.).**

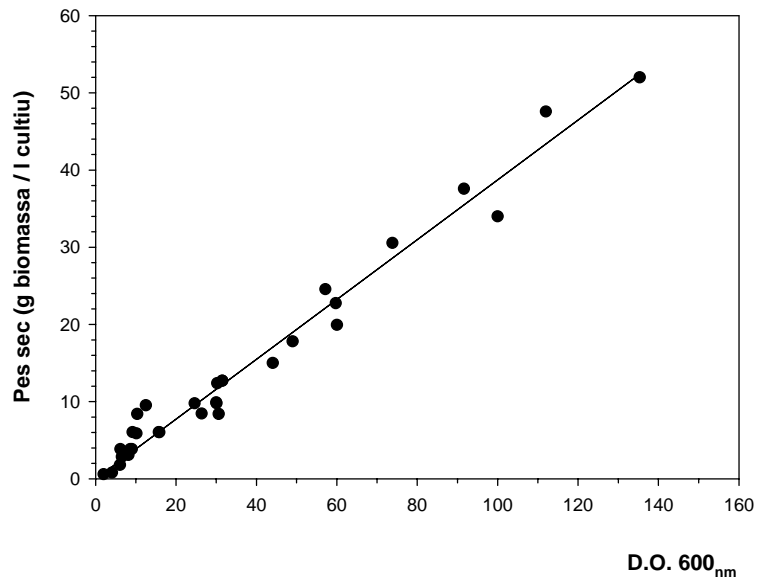
Es presenten les rectes de correlació entre les lectures de densitat òptica a 600 nm corregides pel factor de dilució aplicat per la mesura espectrofotomètrica i la determinació experimental del pes sec (g biomassa seca per litre de brou de fermentació) de les mateixes mostres de creixement per a les soques de treball, *E.coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) i *E.coli* DH1lacdapD(pORT1aLfc), en CADC en medi definit MD-FB.

*E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en medi MD-FB

$$\text{Pes sec (g biomassa seca} \cdot \text{l}^{-1} \text{ de cultiu)} = 0,266 \cdot \text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$$

Coefficient de correlació = 0,965

*E. coli* DH1lacdapD(pORT1aL<sub>fuc</sub>)



$$\text{Pes sec (g biomassa seca} \cdot \text{l}^{-1} \text{ de cultiu)} = 0,377 \cdot \text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$$
 Coeficient de correlació = 0,974



**APÈNDIX 3.****Model d'alimentació exponencial per a un procés semicontínu a velocitat de creixement constant**

El model matemàtic més simple que descriu el creixement microbià en estratègies semicontínues es basa en les següents suposicions:

- es considera un bioreactor perfectament agitat en el que el creixement ve limitat únicament per la concentració del substrat limitant mentre que la resta de nutrients necessaris es troben, o s'alimenten, en una relació d'excés.
- Només s'alimenta un corrent que conté aquest substrat limitant i tota la resta de components necessaris i no hi ha extracció de cultiu al llarg del procés.
- L'alimentació del substrat es comença després d'un període de creixement discontinu en que el microorganisme creix activament.
- Si el substrat limitant del creixement és al mateix temps font d'energia, part d'aquest s'utilitzarà en el manteniment de la biomassa existent.

Les equacions del model són:

$$\frac{d}{dt}(VX) = V\mu X \quad (1)$$

$$\mu = f(S_0) \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt}(VS) = FS_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{d(VX)}{dt} - mVX \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = F + f_{\text{àcid}} + f_{\text{base}} + f_{\text{antiespumant}} - f_{\text{vap}} \quad (4)$$

on:

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

t : temps de cultiu (h)

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

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

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

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

$Y_{x/s}$ : coeficient de rendiment de substrat a biomassa ( $\text{g PS} \cdot \text{g}^{-1} \text{ substrat}$ )

$m$ : coeficient de consum de substrat limitant per al manteniment de la biomassa existent ( $\text{g substrat} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ )

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

L'equació (1) descriu el balanç de matèria per la biomassa, on  $\mu$  es suposa funció de la concentració del substrat limitant a l'aliment d'acord amb l'equació (2). L'equació (3) és l'equació de balanç pel substrat limitant de creixement; on l'acumulació de substrat al vas de fermentació s'igualava a la diferència entre els trams l'alimentació, i consum: generació de biomassa i manteniment de la biomassa existent. El balanç global de matèria (4) mostra que l'increment de volum del cultiu al vas de fermentació depèn de la velocitat d'addició de: el corrent alimentat, les solucions de base i/o àcid per al control de pH, l'agent antiespumant utilitzat i l'evaporació d'aigua del sistema pel corrent de sortida de gasos.

Les condicions d'alimentació per mantenir un creixement exponencial a velocitat de creixement constant es deriven a partir de les equacions del model de creixement anterior considerant les següents simplificacions:

- la variació del volum al vas de fermentació corresponent als volums per la correcció del pH del sistema ( $f_{\text{àcid}}$ ,  $f_{\text{base}}$ ) i per la pèrdua d'aigua al corrent de sortida de gasos ( $f_{\text{vap}}$ ) són negligibles front la variació de volum corresponent al corrent alimentat. Tampoc es té en consideració la variació de volum corresponent al mostreig per al seguiment del procés. L'Equació (4) es pot simplificar:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (5)$$

- En l'equació (3) es considera el consum del substrat limitant del creixement per al manteniment cel·lular inclòs en un terme de rendiment aparent de substrat a biomassa,  $Y_{ap_{x/s}}$ , i es simplifica l'expressió a:

$$\frac{d}{dt}(VS) = FS_0 - \frac{1}{Y_{ap_{x/s}}} \cdot \frac{d(VX)}{dt} \quad (6)$$

- Si és possible controlar la velocitat de creixement constant a un valor prefixat, l'equació (1) pel balanç de biomassa del sistema es pot integrar fixant els valors de concentració cel·lular inicial,  $X_0$ , i volum inicial del sistema,  $V_0$ , a temps inicial del període alimentat,  $t_0 = 0$ . S'obté l'equació (7) que descriu el creixement microbià en processos semicontinus a  $\mu$  constant:

$$XV = X_0V_0 \exp(\mu t) \quad (7)$$

Utilitzant aquestes equacions (5), (6) i (7) que definirien un model simplificat de creixement, i assumint encara que:

- s'alimenta la quantitat de substrat limitant necessària en cada moment per mantenir el creixement prefixat però no en excés, de forma que la concentració residual al vas de fermentació és pot considerar nul·la. Aplicant aquesta condició a l'Equació (6), es considera una situació d'estat pseudo-estacionari per la concentració de substrat limitant al vas de fermentació i es pot escriure:

$$\frac{d}{dt}(VS) = 0 = FS_0 - \frac{1}{Y_{ap_{x/s}}} \cdot \frac{d(VX)}{dt} \quad (8)$$

- El rendiment aparent de glucosa a biomassa,  $Y_{ap_{x/s}}$ , es pot aproximar a un valor constant en el temps per tot el període de creixement semicontinu a les condicions fixades per a dur a terme el procés.

Substituint l'equació (1) pel balanç de biomassa a l'Equació (8) i un altre cop, l'equació (7) per definir la biomassa a temps  $t$  en funció de la biomassa a temps inicial del període alimentat, s'arriba a la següent expressió per al cabal d'alimentació:

$$F = \frac{\mu XV}{S_0 Y_{ap_{x/s}}} = \frac{\mu X_0 V_0 \exp(\mu t)}{S_0 Y_{ap_{x/s}}} \quad (9)$$

Substituint l'expressió a l'Equació (7) per la variació de volum i integrant:

$$V = V_0 + \frac{X_0 V_0}{S_0 Y_{ap_{x/s}}} \exp(\mu t) - \frac{X_0 V_0}{S_0 Y_{ap_{x/s}}} \quad (10)$$

Reorganitzant els termes de l'Equació (10) per definir una constant única,  $A$ , que agrupi els paràmetres que queden fixats a valor teòricament constant al definir les condicions de treball per al procés (Lee i Blanch, 1993b):

$$V = \frac{V_0}{\mu} (\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0) \quad \text{on:} \quad A = \frac{\mu}{Y_{ap_{x/s}} S_0} \quad (11)$$

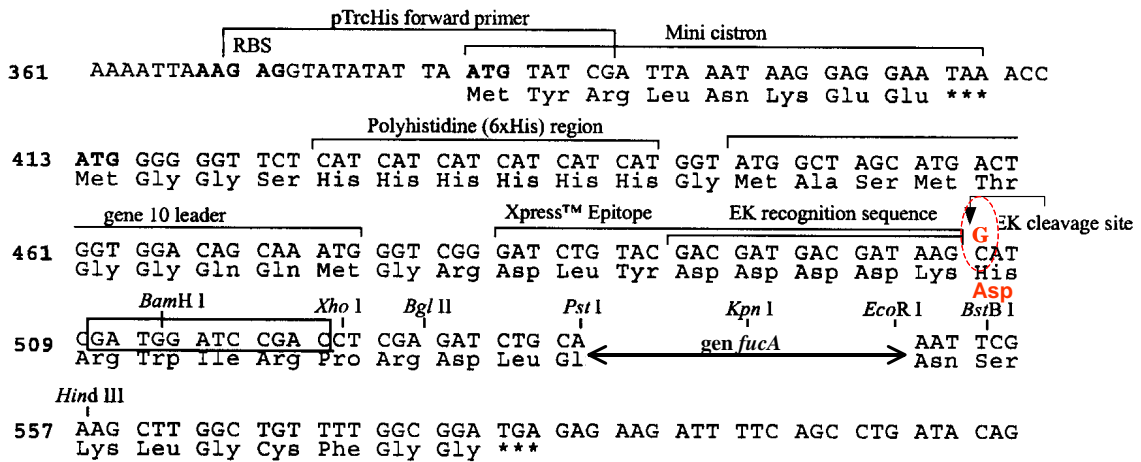
Les Equacions (9) i (11) són expressions que defineixen el perfil del cabal a alimentar i l'increment de volum al vas de fermentació necessaris per tal de mantenir el creixement exponencial sota les condicions prèviament fixades.

Finalment, substituint l'equació (11) a l'Equació (7) s'obté una expressió per l'increment de la concentració cel·lular en el temps:

$$X = \frac{\mu X_0 \exp(\mu t)}{(\mu + AX_0 \exp(\mu t) - AX_0)} \quad \text{on:} \quad A = \frac{\mu}{Y_{ap_{x/s}} S_0} \quad (12)$$

APÈNDIX 4.

Mapa del vector pTrcfuc .



En vermell s'indica la mutació puntual trobada en la seqüència del vector pTrcfuc, per l'expressió de Fuc-1-PA, respecte a la seqüència descrita per al vector comercial de clonatge pTrchis (Invitrogen).

**BIBLIOGRAFIA****A**

Akesson, M., Hagander, P. I Axelsson, J.P. (2001) Avoiding Acetate Accumulation in *Escherichia coli* cultures Using Feedback Control of Glucose Feeding. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 223-230.

Alajarín, R., Garcia-Junceda, E. and Wong, C.-H. (1995) A Short Enzymatic Synthesis of L-Glucose from Dihydroxyacetone Phosphate and L-Gliceraldehyde. *J. Org. Chem.* **60**, 4294-4295.

Ariens, E.J. (1989) Stereoselectivity in the action of drugs. *Pharmacol. Toxicol.* (Copenhagen) **64**, 319-320.

Ariens, E.J. (1992) Chirality in pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Recent. Dev. Ther. Drug Monit. Clin. Toxicol.* 257-264.

Aristidou, A.A., San, K.-Y. i Bennett, G.N. (1994) Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 944-951.

Aristidou, A.A., San, K.-Y. i Bennete, G.N. (1999) Improvement of Biomass Yield and Recombinant Gene Expression in *Escherichia coli* by Using Fructose as the primary Carbon Source. *Biotechnol. Progr.* **15**: 140-145.

Arnett, E.M., Fisher, F.J., Nichols, M.A. i Ribeiro, A.A.(1990) Structured-energy relations for the aldol reaction in nonpolar media. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 801-808.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1990) Current Protocols in Molecular Biology. Jhon Wiley and Sons, New York.

**B**

Bahl, H., Echols, H., Straus, D.B., Court, D., Cowl, R. i Georgopoulos, C.P. (1987) Induction of the heat shock response of E.coli through stabilization of  $\sigma^{32}$  by the phage lambda cIII protein. *Gene Dev.* **1**: 57-64.

Bailey, J.E. i Ollis, D.F. (1977). Biochemical Engineering Fundamentals, p.576. McGraw-Hill Book Co., New York

Bailey, J.E. i Ollis, D.F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Ed. McGraw-Hill Book Co., New York

- Bailey, J.E.(1993) Host-vector interactions in E.coli. *Advan. Eng. Biotechnol.* **48**: 29-52
- Baillie, T.A., Schultz, K.M. (1997) Stereochemistry in the drug development process: role of chirality as a determinant of drug action, metabolism and toxicity. *Chem. Anal.* (N.Y.) **142**: 21-43.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **10**, 411-421.
- Bauer, K.A., Ben-Bassat, A., Dawson, M., de la Puente, V.T. i Neway, J.O. (1990) Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentation cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microb.* **56**: 1296-1302.
- Bentley, W.E., Mirjalili, N., Anderson, D.C., Davis, R.H. I Kompala, D.S. (1990) Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng* **35**: 668-681.
- Birnboim, H.C. i Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **6**: 1513-1523.
- Blom N. and Sygusch J. (1997) Product binding and role of the C-terminal region in Class I D-fructose-1,6-Biphosphate aldolase. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 36-39.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. (1999) *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Boström, M. i Larsson, G. (2002) Introduction of the carbohydrate-activated promoter P<sub>malK</sub> for the recombinant protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 231-238.

## C

- Carrea, G., Ottolina, G. (2000) Stereoselective síntesis of drugs and drug precursors by hydrolases and oxidoreductases. *Biocatal. Biotransform.* **18**: 119-132.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. (1996) *Current Protocols in Protein Science*. 2<sup>ona</sup> Edició. John Wiley & sons, Inc (USA).
- Corchero, J.L. I Villaverde, A. (1998) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 625-632.
- Cranenburgh, R.M., Hanak, J.A.J., Williams, S.G. i Sherratt, D.J. (2001) *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acid Res.* **29**, 1-6.

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

Chalmers J.J., Kim E., Telford J.N., Wong E.Y., Tacon W.C., Schuler M.L. and Wilson D.B.(1990) Effects of Temperature on *Escherichia Coli*  $\beta$ -Lactamase or Human Epidermal Growth Factor. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 104-111

Choi, J.-I. i Lee, S.Y. (1999) High level Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalcrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb* **65**, 4363-4372.

Chou, C.-H., Bennett, G.N., i San, K.-Y. (1994) Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high level recombinant protein production in dense *E. coli* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 952-960.

Chou, C.-H., Bennett, G.N. i San, K.-Y. (1996) Genetic manipulation of stationary-phase genes to enhance recombinant protein production in *E.coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **50**: 636-642.

## D

Davidson, J. (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.

Dedhia, N., Richins, R., Mesina, A. I Chen, W. (1997) Improvement in recombinant protein production in ppGpp-deficient *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **53**: 379-386.

Dedhia, N.N., Hottinger, T. i Bailey J.E. (1994) Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves cell growth. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 132-139

Degryse, E. (1991) Stability of a host-vector system based on complementation of an essential gene in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **18**: 29-40.

DeLisa, M.P., Li, J., Rao, G., Weigand, W.A. i Bentley, W.E. (1999) Monitoring GFP-Operon Fusion Protein Expression During High Cell Density Cultivation of *Escherichia coli* Using an On-line Optical Sensor. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 54-64.

Diaz-Ricci, J.C., Regan, L. I Bailey J.E. (1991) Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 1-3.

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

Donovan, R.S., Robinson, C.W. i Glick B.R. (1996) Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter.



*J. Ind. Microbiol.* **16**: 145-154.

Doran, J.L.; Leskiw, B.K.; Petrich, A.K.; Westlake, D.W.S. and Jensen, S.E. (1990). Production of *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase in *Escherichia coli* using a two ciston expression system. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 197-206

Dreyer, M.K. and Schulz, G.E. (1993) The Spatial Structure of the Class II L-Fucose-1-phosphate Aldolase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **231**: 549-553.

Dreyer, M.K. and Schulz, G.E. (1996) Catalytic Mechanism of the Metal-dependent Fucose Aldolase from *Escherichia coli* as Derived from Structure. *J. Mol. Biol.* **259**: 458-466.

Durany, O. (2000) Desenvolupament de metodologia per a la producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona.

## E

Effenberger, F. and Straub, A. (1987) A novel convenient preparation of Dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions. *Tetrahedron Lett.* **28**: 1641-1644.

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

Estler, M.U. (1995) Recursive on-line estimation of the specific growth rate from off-gas analysis for the adaptive control of fed-batch processes. *Bioprocess Eng.* **12**: 205-207.

Eyrisch, O., Keller, M. and Fessner, W.-D. (1994) Higher-carbon Sugars by Enzymatic Chain Extension. Oxidative Generation of Aldol Precursors *in situ*. *Tetrahedron Lett.* **35**: 9013-9016

## F

Farewell, A i Neidhardt, F.C. (1998) Effects of temperature of *in vivo* protein synthesis capacity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4704-4710.

Farmer, W.R. i Liao, J.C. (1997) Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* **63**: 3205-3210.

Farza, M., Nandri, M. i Hammouri, H. (2000) Nonlinear observation of specific growth rate in aerobic fermentation processes. *Bioprocess. Eng.* **23**: 359-366.

Favre-Bulle, O., Weenink, E., Vos, T., Preusting, H., Witholt, B. (1993) Continuous bioconversion of n-octane to octanoic acid by recombinant *Escherichia coli* (alk+) growing in a two-liquid phase chemostat. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 263-272.

Fechter, M.H., Stutz, A.E. i Tauss, A. (1999) Chemical and chemo-enzymatic approaches to unnatural ketoses and glycosidase inhibitors with basic nitrogen in the sugar ring. *Curr. Org. Chem.* **3**: 269-285.

Ferrao-Gonzales, A.D., Suarez, M.C., Rocha, C.B. i Foguel, D. (2002) Pressure provides new insights into protein folding and aggregation. In: Antonio Villaverde (ed.), Protein Production in Bacterial Cell Factories. Research Signpost, India, 73-82.

Ferrer, P. (2002) Fermentation Processes for optimal heterologous protein production in bacterial systems. In: Antonio Villaverde (ed.), Protein Production in Bacterial Cell Factories. Research Signpost, India, 1-16.

Fessner, W.D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G.G., Badía, J. and Aguilar, J. (1991) Diastereoselective Enzymatic Aldol Additions: L-Rhamnulose and L-Fuculose 1-Phosphate Aldolases from *E. coli*. *Angew. Chem. Int. Edit.* **30**: 555-558

Fessner, W.-D., Badía, J., Eyrisch, O., Schneider, A. and Sinerius, G. (1992) Enzymatic Synthesis of rare Ketose 1-phosphates. *Tetrahedron Lett.* **33**: 5231-5234

Fessner, W., Schneider, A., Eyrisch, O., Sinerius, G. and Badía, J. (1993) 6-Deoxy-L-lyxo- and 6-Deoxy-L-arabino-hexulose 1-phosphates. Enzymic Syntheses by Antagonistic Metabolic Pathways. *Tetrahedron-Asymmetr.* **4**: 1183-1192.

Fessner, W.-D. i Walter, C. (1997) Enzymic C-C bond formation in asymmetric synthesis. *Top. Curr. Chem.* **184**: 97-194.

Fessner, W.-D. (2000) In stereosel. Biocatal. Patel, R.N., Ed. Marcel Dekker Inc.: New York, N.Y. 239-265.

Flickinger, M. i Rouse, M.P. (1993) Sustaining protein synthesis in the absence of rapid cell division: an investigation of plasmid-encoded protein expression in *E.coli* during very slow growth. *Biotechnol. Progr.* **9**: 555-572.

Fuchs, C. Köster, D., Wiebusch, S. Mahr, K., Eisbrenner, G. I Märkl, H. (2002) Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **93**: 243-251.

## G

Gabriel, D. (1996) Disseny i automatització d'un sistema de monitorització de nitrat, nitrit i amoni mitjançant tècniques d'anàlisi en flux: aplicació a una planta pilot depuradora d'aigües residuals urbanes amb criteris de Nitrificació/Desnitrificació. Tesi de llicenciatura, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

Galen, J.E., Nair, J., Yuang, J., Wasserman, S.S., Tanner, M.K., Sztejn, M.B. I Levine, M.M. (1999) Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine

strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**: 6424-6433.

Garcia-Junceda, E., Shen, G., Sugai, T., Wong, C. (1995) A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent Aldolases: Rhamanulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorgan. Med. Chem.* **3**: 945-953.

George, H.A., Powell, A.L., Dahlgren, M.E., Herber, W.K., Maigetter, R.Z., Burgess, B.W., Stirdivant, S.M., i Greasham, R.L. (1992) Physiological effects of TGF $\alpha$ -PE40 expression in recombinant *E. coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 437-445.

Georgiou, G. i Valax, P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli* *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 190-197.

Ghalambor, M.A, and Heath, E.C. (1962) The Metabolism of L-Fucose. *J. Biol. Chem.* **237**: 2427-2433.

Gibert, S., Bakalara, N. and Santarelli, X. (2000) Three-step chromatographic purification procedure for the production of a His-tag recombinant kinesin overexpressed in *E. Coli*. *J. Chromatogr.* **737**: 143-150.

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

Gill, R.T., DeLisa, M.P., Valdes, J.J. i Bentley, W.E. (2001) Genomic analysis of high-cell-density recombinant *E.coli* fermentation and “cell conditioning” for improved recombinant protein yield. *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 85-95.

Glick B.R. (1995) Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. *Biotechnol. Adv.* **13**, 247-261.

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

Gschaedler, A., Boudrant, J. 1994. Amino acids utilization during batch and continuous cultures of *Escherichia coli* on a semi-synthetic medium. *J. Biotechnol.* **37**, 235-251.

Guisán, J.M., Fernandez-Lafuente R., Rodríguez, V., Bastida, A., Blanco, R.M. i Albaro, G. (1993) Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. Stability and Stabilization of Enzymes. Van der Tweel, W.J.J., Harder A. & Buitelaar R.M. eds. Elsevier Sc. Publ. Amsterdam (Holanda), 47, 55-62.

## H

Han, K., Lim, H.C. i Hong Juan (1991) Acetic Acid Formation in *Escherichia coli*

Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 663-671.

Han, L.; Doverskog, M.; Enfors, S. and Häggström, L. (2002) Effect of glycine on the cell yield and growth rate of *Escherichia coli*: evidence for cell-density-dependent glycine degradation as determined by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J. Biotechnol.* **92**: 237-249.

Hannig, G. and Makrides, S. (1998) strategies For optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends. Biotechnol.* **19**: 54-60.

Harcum, S.W. (2002) Structured model to predict intracellular amino acid shortages during recombinant protein overexpression in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **93**, 189-202.

Harcum, S.W. I Bentley, W.E. (1999) Heat shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli*. Implication for heterologous protein yield. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **80**: 23-37.

Harder, M.P.F., Sanders, E.A., Wingender, E. i Deckwer, W.-D. (1994) Production of human parathyroid hormone by recombinant *E. coli* TG1 on synthetic medium. *J. Biotechnol.* **32**: 157-164.

Hellmuth, K., Korz, D.J., Sanders, E.A. i Deckwer, W.-D. (1994) Effecte of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *E.coli*. *J. Biotechnol.* **32**: 289-298.

Henderson, I., Garcia-Junceda, E., Liu, K.K.-C., Chen, Y.-L. Shen, G.-J. and Wong C.-H. (1994) Cloning, overexpression and Isolation of the Type II FDP Aldolase from *E.coli* for Specificity Study and Synthetic Application. *Bioorgan. Med. Chem.* **2**: 837-843.

Henderson, D.P. i Toone, E.J. (1999) In Compr. Nat. Prod. Chem. Pinto, B.M., R, A.V. Eds. Elsevier Science B.V. Duke University, vol. 3, 367-440.

Herrmann, G.F., Wang, P., Shen, G-J., Garcia-Junceda, E., Khan, S.H., Matta, K.L. and Wong, C-H. (1994) Large Scale Production of Recombinant  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase from *E. coli* for the Study of Acceptor Specificity and Use of the Recombinant Whole Cells in Synthesis. *J. Org. Chem.* **59**: 6356-6362.

Hodgson, J. (1993) Expression systems: A user's guide Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Bio/technology* **11**: 887-893.

Hoffmann, F., Aris, A., Carbonell, X., Rohde, M., Corchero, J.L., Rinas, U. I Villaverde, A. (1999) Heat inactivation of plasmid-encoded CI<sub>857</sub> repressor induces gene expression from Ind-lambda prophage in recombinant *E.coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 327-334.

Hoffman, F. i Rinas, U. (2001) Plasmid amplification in *Escherichia coli* after temperature upshift is impaired by induction of recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1819-1825.

Hohenblum, H., Naschberger, S., Weik, R., Katinger, H. i Mattanovich, D. (2001) Production of recombinant human trypsinogen in *Escherichia coli* and *Pichia Pastoris*. In: O-W. Merten et al. (eds.), Recombinant protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 339-345.

Horiuchi, J.-I. i Hiraga, K. (1999) Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B<sub>2</sub> production. *Journal of bioscience and Bioengineering*, **87**: 365-371.

Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfer, U., Kujau, M., Wenderoth, R., Müller, K., Matzku, S., Plückthun, A i Riesenberg, D. (1996) high volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 524-532.

## I

Ito, K., Akiyama, Y., Yura, T. i Shiba, K. (1986) Diverse effects of the MalE-lacZ hybrid protein on *E.coli* cell physiology. *J. Bacteriol.* **167**: 201-204.

## J

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

Jürgen, B., Lin, H.Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M. i Schweder, T. (2000) Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *E.coli* glucose-limited fed-batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **70**: 217-224.

## K

Kaprálék, F. Tichý, P.J. Fábry, M., Sedláček, J. (1998) Effects of temperature and novobiocin on the expression of calf prochymosin gene and on plasmid copy number in recombinant *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* **43**: 63-67.

Kawabe, T.; Ohshima, T.; Uozumi, N.; Iijima, S. and Kobayashi, T. (1993) Inducible production of recombinant xylose isomerase by *Escherichia coli* in Fed-batch culture *J. Chem. Eng. Japan*, **25**: 702-708.

Kenneth, W.Y.; Miranda, G.S. and Wah, K.T. (1995) Formulation and optimization of two culture media for the production of tumor necrosis factor- $\beta$  in *Escherichia coli*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **62**: 289-294

- Kilikian, B.V.; Suárez, I.D.; Liria, C.W. and Gombert, A.K. (2000). Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochem.* **35**: 1019-1025.
- Ko, Y.F., Bentley, W.E. i Weigan, W.A. (1995) The effect of cellular energetics on foreign protein production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**: 145-159.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2000) Complex carbohydrate synthesis tools for glycobiotologists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies. *Glycobiology* **10**: 1157-1169.
- Konstantinov, K. Kishimoto, M. Seki, T. i Yoshida, T. (1990) A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 750-758.
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A. i Deckwer, W.D. (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **39**: 59-65.
- Kosinski, M.J. i Bailey, J.E. (1991) Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal  $\beta$ -galactosidase in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **18**: 55-68.
- Kosinski, M.J., Rinas, U. i Bailey, J.E. (1992a) Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *E.coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 782-784.
- Kosinski, M. J., Rinas, U. i Bailey, J.E. (1992b) Proteolytic response to the expression of an abnormal  $\beta$ -galactosidase in *E.coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 335-341.
- Kramer, W., Elmecker, G., Weik, R., Mattanovich, D i Bayer, K.. (1996) Kinetic Studies for the Optimization of Recombinant Protein Formation. In: Asenjo, J.A. i Andrews, B.A. (ed.), *Recombinant DNA Biotechnology III: The Integration of Biological and Engineering Sciences*. Annals of the New York Academy of Science, New York, New York, 782, 1-16.
- Kumar, P.K.R., Maschke, H.-E., Friehs, K. I Schügerl, K. (1991) Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends Biotechnol.* **9**: 279-284.
- Kweon, D.-H., Han, N.S., Park, K.-M. i Seo, J.-H. (2001) Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **36**: 537-542.
- Kwon, S., Kim, S. i Kim, E. (1996) Effects of glycerol on  $\beta$ -lactamase production during high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* **12**: 205-208.

**L**

Laffend, L. i Shuler, M.L. (1994) Structured model of genetic control via the *lac* promoter in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 399-410.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lee, C.; Sun, W-J.; Burgess, B.W.; Junker, B.H.; Reddy, J.; Buckland, B.C.; Greasham, R.L. (1997) Process optimization for large-scale production of TGF- $\alpha$ -PE40 in recombinant *Escherichia coli*: effect of medium composition and induction timing on protein expression. *J. Ind. Microbiol.* **18**: 260-266.

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

Lee, S.Y.; Yim, K.S.; Chang, H.N. and Chang, Y.K. (1994) Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **32**: 203-211.

Li, X.; Robbins, J.W. and Taylor, K.B. 1990. The production of recombinant b-galactosidase in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. *J. Ind. Microbiol.* **5**: 85-94.

Li, Y., Chen, J., Mao, Y-Y., Lun, S-Y. i Koo, Y-M. (1998) Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **33**: 709-714.

Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 497-501.

Lin H.Y., Hanschke, R., Nicklisch, S., Nietsche, T., Jarchow, R., Schwahn, C., Riemschneider, S., Meyer, S., Gupta, A., Hecker, M. i Neubauer, P.(2001) Cellular responses to strong overexpression of recombinant genes in *Escherichia coli*. In: O-W. Merten et al. (eds.), *Recombinant protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 55-73.

Lin, H.Y., Mathiszik, B., Xu, B., Enfors, S.-O. i Neubauer, P. (2001) Determination of the Maximum Specific Uptake Capacities for Glucose and Oxygen in Glucose-Limited Fed-Batch Cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **73**: 347-357.

Lui, G.W. i Strohl, W.R. (1990) Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1004-1011.

**M**

Macaloney, G., Draper, I., Preston, J., Anderson, K.B., Rollins, M.J., Thompson, B.G., Hall, J.W. i McNeil, B. (1996) At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Food and Bioprocess Processing* **74**: 212-220.

Maçdonald, H.L. i Neway, J.O. (1990) Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 640-645.

Machajewski, T.D. i Wong, C.H. (2000) The catalytic asymmetric aldol reaction. *Angew Chem Int Ed.* **39**: 1353-1374.

Mak, K.W.Y., Yap, M.G.S., Huang, H.L., Teo, W.K. (1992) Growth and induction effects on the expression of rhTNF-beta. *Biochem. Eng.* **2001**:189-191.

Mak, K.W.Y., Yap, M.G.S. i Teo, W.K. (1995) Formulation and optimization of two Culture Media for the production of Tumour Necrosis Factor- $\beta$  in *Escherichia coli* *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **62**:289-294.

Makrides, S. (1996) Strategies for achieving High-level Expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.

Mandel, M. i Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.

Margolin, A.L. (1993) Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 266-280.

Märkl, H., Zenneck, C., Dubach, A. i Ogonna, J.C. (1993) Cultivation of *E. coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 48-52.

McNeil, B. and Harvey, L.M. (1990) Fermentation, a practical approach. 1<sup>era</sup> Edició. Oxford University Press, Oxford (England).

Mendoza-Vega, O., Buri, E. i Speck, D. (1995) Enhancement of recombinant cholera Toxin B subunit production in *Escherichia coli* by applying a Fed-batch control strategy. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1037-1042.

Meyer, H., Leist, C. i Fiechter A. (1984) Acetate formation i continuous culture of *Escherichia coli* K12D1 on defined and complex media. *J. Biotechnol.* **1**: 355-358.

Mizutani S.; Mori H.; Shimuzu Sh.; Sakaguchi K.; Kobayashi T. (1986) Effect of amino acid supplement on cell yield and gene products in *Escherichia coli*. harboring plasmid *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 204-209.



Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T i Shimizu, S. (1979) High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J. Chem. Eng. Jpn.* **12**: 313-319.

Morona, R., Yeadon, J., Considine, A., Morona, J.K. i Manning, P.A. (1991) Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* *thyA*<sup>+</sup> gene: application to colera vaccine development. *Gene* **107**: 139-144.

Müller, J., Oehler, S. i Müller-Hill, B. (1996) Repression of lac Promoter as a Function of Distance, Phase and Quality of an Auxiliary lac Operator. *J. Mol. Biol.* **257**: 21-29.

Murphy, D.B. (1998) Guidance for Industry. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. Food and Drug Administration, Rockville, Md, USA.

## N

Nakano, N., Rischke, M., Sato, S. i Märkl, H. (1997) Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in dialysis reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 597-601.

Neubauer, P. and Winter, J.(2001) Expression and Fermentation strategies for recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: O-W. Merten et al. (eds.), Recombinant protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 195-258.

## O

Ozaki, A., Toone, E.J., von der Osten, C.H. Sinskey, A.J.S. and Whitesides, G.M. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **12**: 4970-4971.

## P

Pan, J.G., Rhee, J.S., LeBeault, J.M. (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* **9**: 89-94.

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

## R

Ramilo, C.A. and Evans, J.N. (1997) Overexpression, purification, and characterization of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase from

*Escherichia coli*. *Protein Expres. Purif.* **9**: 253-61.

Ramirez, D.M. and Bentley, W.E. (1999). Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures. *J. Biotechnol.* **71**: 39-58.

Ramirez, D.-M. i Bentley, W.-E. (1992) Fed-batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress response. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 596-608.

Rasor, J. P. (1995) Enzymes in asymmetric synthesis: formation of C-C bonds by aldolases. *Chimica Oggi* **13**: 9-13.

Reiling H. E., Laurila H. i Fiechter A., (1985) Mass culture of *Escherichia coli*: medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *J. Biotechnol.* **2**:191-206.

Rhee, J.; Bode, J.; Diaz-Ricci, J.C.; Poock, D.; Weigel, B.; Kietzmer, G. and Schügerl, K. (1997) Influence of the medium composition and plasmid combination on the growth of recombinant *Escherichia coli* JM109 and the production of the fusion protein ECORI::SPA. *J. Biotechnol.* **55**: 69-83.

Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, Schumann, K., Veith, G., Zuber, G. i Knorre, W.A. (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 77-82.

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W.A., Pohl, H.-D., Korz, D., Sanders, E.A., Roß, A. i Deckwer, W.-D. (1991a) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of Biotechnology* **20**: 17-28.

Riesenberg, D. (1991b) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**: 380-384.

Riesenberg, D. and Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 422-430.

Rinas, U. (1996) Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *E. coli*. *Biotechnol.Prog.* **12**:196-200.

Ritter, S.K. (2001) Green Chemistry. *Chem. Eng. News* **16**: 27-34.

Rothen, S.A., Sauer, M., Sonnleitner, B. i Witholt, B. (1998) Growth Characteristics of *Escherichia coli* HB101[pGec47] on Defined Medium. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 92-100.

Rozzell, J.D. (1999) Biocatalysis at commercial scale. Myths and realities. *Chim. Oggi.* **17**: 42-47.

Ryan, E.T., Crean, T.I., Kochi, S.K., John, M., Luciano, A.A., Killeen, K.P., Klose, K.E. I Calderwood, S.B. (2000) Development of a  $\Delta glnA$  balanced lethal plasmid system for the expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **68**: 221-226.

## S

Sakamoto S., Iijima, M., Matsuzawa H. i Ohta, T. (1994) Production of thermophilic protease by glucose-controlled fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **78**: 304-309.

San, K.-Y., Bennett, G.N., Aristidou, A.A. i Chou, C.-H.(1994) Strategies in high-level expression of recombinant protein in *E.coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **721**:257-267.

Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M.-D., Silverman, G.J., Lotz, M., Carson, D.A. I Raz, E. (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**: 352-354.

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

Schweder, T., Schmidt, I., Herrmann, H., Neubauer, P., Hecker, M. i Hofmann, K. (1992) An expression vector system providing plasmid stability and conditional suicide of plasmid-containing cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 91-93.

Seo, J.H., Bailey, J.E. (1985) Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1668-1674.

Shapiro, A.L., Viñuda, E. i Maizel, J.V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresi in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**: 815-820.

Shimizu, M., Iijima S. i Kobayashi T.(1992) Production of insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* by cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J. Ferment Bioeng* **74**: 163-168.

Shimizu, N. Fukuzono, S., Fujimori, K., Nishimura, N. i Odawara, Y. (1988) Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitori sibstance concnetration monitoring. *J. Ferment. Technol.* **66**: 187-191.

Snow, A. I Hipkiss, A.R. Stability of urogastone and some fusion derivatives and the induction of stress proteins in *E.coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **15**: 965-966.

Solaiman, D.K.Y. and Somkuti, G.A. 1991. Expression of stretomycete cholesterol oxidase

in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **8**, 253-258.

Solomons, T.W.G. (1982) Química Orgánica. Ed.: LIMUSA, Mexico D.F.

Stinson, S.C. (1992) Chiral Drugs. *Chem. Eng. News.* **28**: 46-79.

Stinson, S.C. (1998) Counting in chiral drugs. *Chem. Eng. News.* **21**:83-104.

Stinson, S.C. (2001) Chiral catalysis rinding high. *Chem. Eng. News.* **29**: 23-26.

Strandberg, L. i Enfors, S.O. (1991a) Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1669-1674.

Strandberg, L. i Enfors, S. O. (1991b) Batch and fed-batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **13**: 609-614.

Suárez, D.C. i Kilikian, B.V. (2000) Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process biochem.* **35**: 1051-1055.

Suau, T. (2001) Estudi de la purificació de Fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant d'*E. coli*. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona.

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

Suzuki, T., Yamane, T. i Shimizu, S. (1990) Phenomenological Background and Some Preliminary Trials of Automated Substrate Supply in pH-Stat Model Fed-Batch Culture Using a Setpoint of High Limit. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 292-297.

## T

Takayama, S., McGarvey, G.J. and Wong, C.H. (1997) Microbial aldolases nad Transketolases: New Biocatalytic Approaches to Simple and Complex Sugars. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 285-310.

Teich, A., Lin, H.Y., Andersson, L., Meyer, S. i Neubauer, P. (1998) Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *E.coli* after IPTG induction. *J Biotechnol.* **64**: 197-210.

Teich, A., Meyer, S., Lin, H.Y., Andersson, L., Enfors, S.-O. i Neubauer, P. (1999) Growth Rate Related Concentration Changes of the Starvation Response Regulators  $\sigma^s$  and ppGpp in Glucose-Limited Fed-Batch and Continuous Cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **15**: 123-129.

Thisted, T., Nielsen, A.K., Gerdes, K. (1994) Mechanism of post-segregational killing: translation of *Hok*, *SrnB* and *Pnd* mRNAs of plasmids R1, F and R483 is activated by 3'-end processing. *The EMBO Journal* **13**: 1950-1959.

Toone, E.J., Simon, E.S., Bednarski, M.D. and Whitesides, G.M. (1989) Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates. *Tetrahedron* **45**: 5365-5422.

Tsuji, K., Lijima, M., Matsuzawa, H. i Sakamoto, S. (1997) Over-production of *Thermus* protease in dense culture of *Escherichia coli* using two carbon sources. *Biotechnol. Tech.* **11**: 395-398.

Turner, C., Gregory, M.E. i Thornhill, N.F (1994) Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC. *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 819-829.

## V

Vallejo, L.F. i Rinas, U. (2002) Strategies for refolding inclusion body proteins. In: Antonio Villaverde (ed.), *Protein Production in Bacterial Cell Factories*. Research Signpost, India, 59-71.

van der Werf, M.J., van der Tweel, W.J.J., Kamphuis, J. Hartmans, S. i de Bont, J.A.M. (1994) The potential of lyases for the industrial production of optically active compounds. *Trends. Biotechnol.* **12**: 95-103.

Vind, J., Sorensen, M.A., Rasmussen, M.D., i Pedersen, S. (1993) Synthesis of proteins in *E.coli* is limited by the concentration of free ribosomes: Expression from reported genes does not always reflect functional mRNA levels. *J.Mol. Biol.* **231**: 678-688.

Volk, N., Franco-Lara, E., Galvanauskas, V and Lübbert, A. (2001) Model supported optimization of fed-batch fermentations for recombinant protein production. In: O.W. Merten et al. (eds.), *Recombinant protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 371-381.

von der Osten, C.H., Sinskey, A.J. Barbas, C.F., Pederson, R.L., Wang, Y.-F. and Wong, C.-H. (1989) Use of Recombinant Bacterial Fructose-1,6-diphosphate Aldolase in Aldol Reactions: Preparative Synthesis of 1-Deoxynojirimycin, 1-Deoxymannojirimycin, 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, and Fagomine. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 3924-3927.

## W

Walsh, G. (2003) Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **55**: 3-10.

Wang, J. i Hewick, R. (1999) Proteomics in drug discovery. *Drug Discov. Today* **4**: 129-133.

Wang, C.K., Duan, K.J. Yeh, K.W. i Chen, W.C. (2001) Production of a fusion protein of sweet potato sporamin from recombinant *E.coli* XL1 Blue by fed-batch fermentations. *Biotechnol. Lett.* **23**: 475-479.

Weickert, M.J., Doherty, D.H., Best, E.A. and Olins, O. (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **7**: 494-499.

Weikert, C., Sauer, U i Bailey, J.F. (1997) Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. *Microbiol.* **143**: 1567-1574.

Whitney, G.K.; Glick, B.R. and Robbins, C.W. (1989). Induction of T4 DNA ligase in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 991-998.

Wild, J., Walter, W.A., Gross, C.A. i Altman, E. (1993) Accumulation of secretory protein precursors in *E.coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* **175**: 3992-3997.

Wilms B.; Hauch A.; Reuss M.; Syldatk Ccch.; Mattes R.; Siemann M.; Altenbuchner J. (2001) High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli*.rha BAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* **73**: 95-103.

Williams, S.G., Cranenburgh, R.M., Weiss, A.M.E., Wrighton, C.J., Sherratt, D.J. I Hanak, J.A.J. (1998) Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2120-2124.

Winter, J.; Neubauer, P.; Glockshuber, R. and Rudolph, R. (2000) Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *J. Biotechnol.* **84**: 175

Wong, C.H. (1992) Engineering enzymes for chemoenzymatic synthesis. Part I: practical routes to aza-sugars and complex carbohydrates. *Trends Biotechnol.* **10**: 337-341.

Wong, C.-H. i Whitesides, G.M. (1994) Enzymes in Synthetic Organic Chemistry. First Edition ed. Elsevier Science Ltd. Kidlington, Oxford, U.K., vol 12.

Wong, C., Garcia-Junceda, E., Chen, L., Blanco, O., Gijzen, H.J.M. and Steensma, D.H. (1995) Recombinant 2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase in organic synthesis: use of sequential two-substrate and three-substrate aldol reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 3333-3339.

Wymer, N. and Toone E.J. (2000) Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr. Opin Chem. Biol.* **4**: 110-119.

**X**

Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G. i Enfors, S.-O. (1999) Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 564-571.

**Y**

Yamanè, T. i Shimizu, S. (1984) Fed-batch Techniques in Microbial Processes. *Adv. Biochem. Eng.* **30**: 147-194.

Yee, L. And Blanch, H.W. (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology* **10**: 1550-1555.

Yee L. and Blanch H.W. (1993a) Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.* **41**,221-230.

Yee, L. I Blanch, H.W. (1993b) Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 781-790.

Yoon, S.K., Kang, W.K. i Park, T.H. (1994) Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 995-999.

Yoon, S.K.; Kang W.K. i Park, T.H. (1996) Regulation of Trp Promoter of production of Bovine Somatotropin in Recombinant *Escherichia coli* Fed-Batch Fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 153-157.

**Z**

Zagalak, B., Frey, P., Karabatsos, G.L. i Abeles, R. (1966) The stereochemistry of the conversion of D and L 1,2-propanediols to Propionaldehyde. *J. Biol. Chem.* **241**: 3028-3035.

Zhang, X.-W., Sun, T., Liu, X., Gu, D.-X. i Huang, X.-N. (1998) Human growth hormone production by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **33**: 683-686.

Zhang, X.-W., Sun, T., Liu, X., Gu, D.-X. i Tang, Z.-Q. (1999) Production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by high cell density fermentation of secretory recombination *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **34**: 55-58.