



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y
MATERIALES

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN CULTIVOS DE
ESCHERICHIA COLI DE ALTA DENSIDAD**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA E INGENIERO CIVIL QUÍMICO

STEFANO JESÚS PASCUALETTI CASTRO

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROW
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO, CHILE

2019

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: **STEFANO JESÚS PASCUALETTI CASTRO**
FECHA: 2019
PROF. GUÍA: JUAN ASENJO DE LEUZE

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN CULTIVOS DE *ESCHERICHIA COLI* DE ALTA DENSIDAD

Este trabajo de título es motivado por la creciente demanda de ácido hialurónico, que proviene de sus usos con fines cosméticos y médicos. Por esto, se busca optimizar el crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* modificada con un gen *hasA* de *Streptococcus equismilis*, productor de ácido hialurónico para la producción de éste de manera recombinante.

La metodología desarrollada se basó en la realización de varias fermentaciones sin inducir la producción de ácido hialurónico, variando el control de pH y la alimentación entre cada una. Posteriormente, se realizan fermentaciones con alimentación e inducción de ácido hialurónico, variando el control de pH. Teniendo los datos de estas fermentaciones, se realizan comparaciones entre distintas condiciones, en búsqueda de un óptimo.

Finalmente se concluye que las condiciones óptimas de crecimiento son con control a $pH = 7,0$ y alimentación con fuente de carbono y nitrógeno en $t = 19 [h]$, mostrando diferencias de hasta 300 % en el peso seco. Los rendimientos o *yields* de producción de biomasa se mantienen parecidas en todas las fermentaciones, con excepción de la fermentación con inducción y con control de pH. Esto hace pensar que la producción se activa con mantención de pH, pero debido a problemas en el estudio paralelo en el ámbito molecular, no se pueden tener causas claras de esto.

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a mis padres José Dante y Corina, quienes me han apoyado en todo momento de mi vida, pese a todas las dificultades que se presentaron por delante.

A mis amigos más cercanos Alejandra, Martín y Pedro. Amigos que han estado en las buenas, en las malas y en las feas. Amigos con quienes tengo grandes recuerdos que atesoraré por siempre.

Y por último, pero no menos importante, a Valeria, que fue una gran ayuda y guía en este largo y accidentado camino que fue el trabajo de título.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.2. Motivación	3
1.3. Antecedentes bibliográficos y discusiones bibliográficas	3
1.4. Objetivos y limitaciones	7
1.4.1. Objetivo General	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
1.4.3. Limitaciones	7
1.5. Nomenclatura	8
1.6. Metodología específica	9
1.6.1. Preparación inóculo	9
1.6.2. Condiciones de cultivo	9
1.6.3. Determinación peso seco	10
1.6.4. Determinación tiempo de alimentación	10
1.6.5. Determinación velocidad máxima de crecimiento μ_{max}	11
1.6.6. Determinación yield biomasa	11
1.6.7. Producción y medición de contenido de ácido hialurónico	12
1.6.8. Determinación yield ácido hialurónico	12
2. Resultados y discusión	13
2.1. Curva de calibración peso seco	13
2.2. Curva de calibración para glucosa	15
2.3. Determinación velocidad máxima y consumo de azúcares	17
2.4. Fermentaciones sin inducción de vector de ácido hialurónico	19

2.4.1.	Fermentaciones sin control de pH	19
2.4.1.1.	Fermentación sin alimentación	19
2.4.1.2.	Fermentación con alimentación	20
2.4.2.	Fermentaciones con control de pH	22
2.4.2.1.	Fermentación sin alimentación	22
2.4.2.2.	Fermentación con alimentación	23
2.5.	Fermentaciones con inducción de vector de ácido hialurónico	25
2.5.1.	Fermentación sin control de pH	25
2.5.2.	Fermentación con control de pH	26
2.6.	Discusiones finales	28
3.	Conclusiones	30
	Bibliografía	31
4.	Anexos	34
4.1.	Esquema Vector utilizado	34
4.2.	Extracto de manual de operación fermentador	35
4.3.	Balance de masa para un fermentador batch	39
4.4.	Ejemplo de cálculo velocidades de crecimiento μ	40
4.5.	Datos de crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA	41
4.5.1.	Fermentación sin control de pH	41
4.5.2.	Fermentación con control de pH	42

Índice de Ilustraciones

1.1.	Unidad básica repetida de ácido hialurónico	1
1.2.	Ruta biosintética para la producción de HA en <i>Streptococci</i>	5
1.3.	Síntesis fedbatch de HA en bioreactor de 1 L.	6
2.1.	Curva de calibración de Peso Seco	14
2.2.	Curva de calibración de Glucosa	15
2.3.	Contenido de azúcares en ambas fermentaciones	17
2.4.	Peso seco de fermentaciones utilizadas para determinación de velocidades máximas	18
2.5.	Crecimiento sin control de pH ni alimentación	20
2.6.	Crecimiento sin control de pH, con alimentación	20
2.7.	Crecimiento con control de pH, sin alimentación	22
2.8.	Crecimiento con control de pH, con alimentación	23
2.9.	Crecimiento con inducción de producción de HA, sin control de pH. . .	25
2.10.	Crecimiento con inducción de producción de HA, con control de pH. . .	27
2.11.	Comparativa de crecimiento de peso seco en inducción de producción .	28
2.12.	Comparativa de crecimiento entre distintas condiciones de cultivo . . .	28
4.1.	Vector pET11a	34
4.2.	Equipo y armado del fermentador	35
4.3.	Protocolo de inoculación del fermentador	36
4.4.	Equipo de toma de muestras y su armado	37
4.5.	Protocolo de toma de muestras	38
4.6.	Crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA sin control de pH	41
4.7.	Crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA con control de pH	42

Índice de Tablas

2.1.	Datos para la elaboración de curva de calibración OD_{600} para peso seco	14
2.2.	Datos para la elaboración de curva de calibración OD_{570} para glucosa	16
2.3.	Datos de fermentación sin control de pH para determinación de μ_{max} y tiempo de alimentación	18
2.4.	Datos de fermentación con control de pH para determinación de μ_{max} y tiempo de alimentación	18
2.5.	Datos de fermentación sin control de pH ni alimentación	19
2.6.	Datos de fermentación sin control de pH, con alimentación	21
2.7.	Datos obtenidos del método de DNS para cálculo de $Y_{\frac{x}{Glu}}$ sin control de pH y con alimentación	21
2.8.	Datos de fermentación con control de pH, sin alimentación	22
2.9.	Datos de fermentación con control de pH, con alimentación	23
2.10.	Datos de DNS para cálculo de $Y_{\frac{x}{Glu}}$ con control de pH	24
2.11.	Datos de fermentación sin control de pH e inducción de producción de HA	26
2.12.	Datos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA	27
4.1.	Datos completos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA	41
4.2.	Datos de completos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA	42

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes generales

El ácido hialurónico (HA) es un glicoaminoglicano lineal y uniformemente repetitivo, compuesto por 2.000 a 25.000 disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico unidos alternadamente por enlaces glucosídicos β -1-3 y β -1-4 [1].

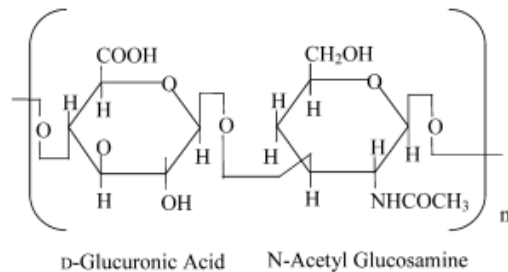


Figura 1.1: Unidad básica repetida de ácido hialurónico

El ácido hialurónico es abundante en tejido conjuntivo, epitelial, líquido sinovial y espacio intercelular de la epidermis [1] además de órganos como pulmones, riñones, cerebro y en menor medida el hígado [2]. Se conocen funciones biológicas del HA ligadas a la expansión de tejidos ante las restricciones puestas por la matriz fibrosa de colágeno, además de intervenciones, aún en estudio, relacionadas con el sistema inmune. Sumadas a las funciones anteriormente nombradas, altas concentraciones de HA son encontradas en regiones ligadas a proliferación y diferenciación celular [1]. Cabe destacar también, que cepas de *Streptococcus* de Grupo A y Grupo B utilizan

HA como parte de su capsula extracelular, uno de sus factores patógenos [1], [3].

Los usos más conocidos del ácido hialurónico son cosméticos y en el tratamiento de la osteoartritis. En el caso cosmético, inyecciones de HA a nivel subdérmico, permiten la generación de un gel capaz de absorber miles de veces su peso en agua, lo que permite rellenar espacios subcutáneos, escondiendo arrugas de manera efectiva [1]. En el caso de la osteoartritis, de rodilla más específicamente, se realizan inyecciones de HA con el objetivo de mejorar la elasticidad y aumentar la viscosidad del líquido sinovial además de estimular la síntesis natural de HA [4], permitiendo una mayor movilidad de la articulación, disminuyendo el dolor de la persona afectada [5]. Adicionalmente, se han propuesto usos para el ácido hialurónico en el tratamiento del cáncer, uniéndolo con un *carrier* o portador de medicamentos, aumentando la eficacia del tratamiento [6]

Inicialmente, la producción de ácido hialurónico se limitó al aprovechamiento de deshechos de la industria avícola y ganadera como lo son las crestas de gallos y articulaciones de bovinos [1], [2], [7]. La dificultad de extracción, bajos pesos moleculares de las cadenas moleculares, miedo a infecciones virales interespecies y aumento de la demanda de HA, han sido factores que impulsado la producción de ácido hialurónico recombinante a partir de diferentes microorganismos.

Se denomina cultivo de alta densidad a un tipo de cultivo que permite el crecimiento de un microorganismo más allá de $OD_{600} = 23$ [8]. Este tipo de cultivo está basado en la identificación de los factores que permitan aumentar la concentración de células, como la elección de un medio de cultivo adecuado, flujo de aireación además de flujo y tiempo de alimentación.

1.2. Motivación

Inicialmente, se descubrió la producción wild type de ácido hialurónico en cepas del Grupo A y B de *Streptococcus* [3]. Debido a la naturaleza patógena de estas cepas, se ha buscado producir HA de manera recombinante en microorganismos no patógenos de diversos tipos, tales como *Bacillus subtilis* [9], *Lactococcus lactis* [10], entre otros [11, 12, 13]. En vista de la demanda de ácido hialurónico irá en aumento, alcanzando un mercado estimado de 15.250 millones de dólares hacia el 2026 [14], sus potenciales usos y búsqueda de formas de producción en grandes cantidades, es que se busca producir esta molécula en cultivos de alta densidad de una bacteria tan común y estudiada como lo es la *Escherichia coli*, en un fermentador *fedbatch*.

1.3. Antecedentes bibliográficos y discusiones bibliográficas

Uno de los primeros estudios relacionados a la producción de ácido hialurónico en microorganismos fue el de Sugahara con *Streptococcus* del Grupo A en 1979 [3]. En este estudio, se tienen las primeras pistas del proceso de biosíntesis del ácido hialurónico, como su preferencia por fuentes de carbono en forma de monosacáridos por sobre los disacáridos en la elongación de la cadena y su relación con el metabolismo de azúcares como el glicólisis. Si bien, al año 1991 aún no se conocía con exactitud las rutas metabólicas, basados en evidencia de que el ácido glucurónico y N-acetilglucosamina son derivados de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato respectivamente [15] se propuso una ruta metabólica [1] (ver Figura 1.2). Posteriormente, Dougherty ya se había identificado un locus, denominado *has*, vinculado a la producción de HA de cápsula patogénica en *Streptococcus* del Grupo A y la identificación de 3 genes (*hasA*, *hasB* y *hasC*) en él [16]. Posteriormente se realizó la caracterización de *hasA* del locus *has* [17]. Las enzimas expresadas por *hasA*, *hasB* y *hasC* fueron identificadas como Hialuronan sintasa, UDP-glucosadehidrogenasa y UDP-glucosa pirofosforilasa respectivamente, dando cuenta que el operón (o locus) *has* es casi idéntico al *has* humano [17], aumentando su potencial para el uso médico.

La identificación del operón *has* en *Streptococcus*, qué enzimas son expresadas a

partir de él y la ruta metabólica en la que están involucradas dichas enzimas, ayuda de mejor manera a planear una estrategia para la producción de ácido hialurónico en distintos microorganismos. Las estrategias incluyen la elección de la fuente de carbono para el medio de cultivo o la elección del tipo de fermentador a utilizar, con objetivo de maximizar el ácido hialurónico producido.

Uno de los primeros acercamientos a la producción de HA en fermentadores fue mediante el uso de *Bacillus subtilis* transformado con el gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* [18]. La elección del microorganismo a transformar en este estudio se realizó considerando que tanto como *Streptococcus equisimilis* como *Bacillus subtilis* son bacterias grampositivas, lo que supondría un beneficio por sobre opciones Gramnegativas en la producción de una molécula extracelular como el ácido hialurónico. Adicionalmente, se descubrió que *Bacillus subtilis* tiene mayor robustez metabólica, ya que sobre expresar *hasA* no afectó mayormente al crecimiento celular [18], a diferencia de *Escherichia coli* que la sobreexpresión de *hasA* de *Streptococcus* merma su capacidad de crecimiento [19].

La capacidad de producción de moléculas recombinantes en alta densidad de *E. coli* ha sido probada en múltiples ocasiones con concentraciones celulares que van desde $26 \left[\frac{g}{L} \right]$ hasta $173 \left[\frac{g}{L} \right]$ [20]. La capacidad de producción de HA en fedbatch de *E. coli* en vista de un cultivo en alta densidad, fue puesta a prueba con la inserción del gen de Hialuronan sintasa proveniente de una bacteria gramnegativa (*Pasteurella multocida*) [13]. En este estudio, se logró alcanzar una concentración máxima de $2 \left[\frac{g}{L} \right]$ de HA y un crecimiento celular $OD_{600} = 30$, equivalente a $15 \left[\frac{g}{L} \right]$ peso seco (Ver Figura 1.3). Si bien, los niveles de crecimiento celular y de producción de HA son prometedores para *E. coli* considerando las limitaciones al sobreexpresar *hasA* mencionadas anteriormente, se debe considerar que tanto *E. coli* como *Pasteurella multocida* son bacterias gramnegativas, por lo que utilizar genes de bacterias grampositivas como *Streptococcus* podría mantener el efecto negativo en *fed-batch*.

Además de considerar factores como rutas metabólicas y microorganismo a utilizar, se deben considerar otro tipo de factores a la hora de producir cultivos de alta densidad. Uno de los más importantes es la formulación del medio y si se sigue administrando este medio en forma de *feed*. Korz [21] logró concentraciones de peso

seco de hasta $128 \left[\frac{g}{L} \right]$ usando glucosa como fuente de carbono y usando una versión 24 veces más concentrada en glucosa y libre de fuente de nitrógeno como alimentación de *fedbatch* (Figura 1.3). Lamentablemente, por falta de ciertos componentes del medio en el laboratorio, no será posible usar dicho medio. Sin embargo, se planea utilizar una alimentación con altas concentraciones de glucosa ($50\% \left[\frac{w}{v} \right]$) y fosfato de amonio ($10\% \left[\frac{w}{v} \right]$) [13]. En búsqueda de un nuevo medio de cultivo, se da cuenta de Terrific Broth (TB) y Luria Broth (LB) se utilizan como medios para alta densidad, dando a TB valores de peso seco más altos [22].

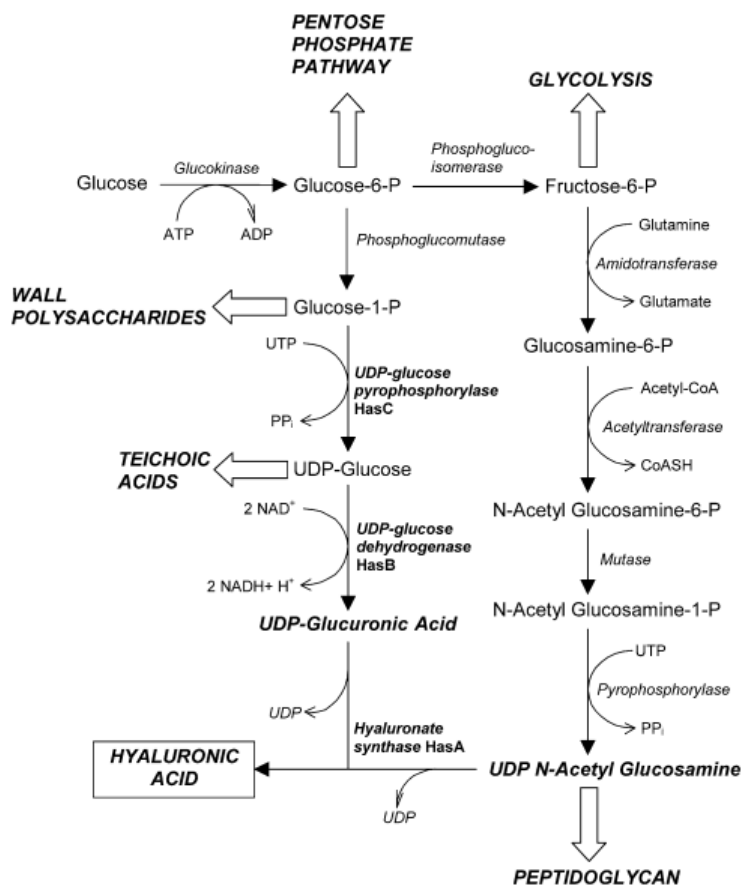


Figura 1.2: Ruta biosintética para la producción de HA en *Streptococci*

Considerando lo anterior, es que se busca realizar la producción de HA en *E. coli*, utilizando el gen de *hasA* procedente de *Streptococcus equisimilis* y *hasB* procedente de la cepa de *E. coli* K12, además de estar insertos en un vector inducible mediante Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Esto presenta cambios con respecto a los estudios anteriormente mencionados: Se utiliza un gen *hasA* proveniente de una grampositiva, para ser utilizada en una gramnegativa y la producción de HA está sujeta a inducción para evitar competición con el crecimiento celular. Sumado a esto, se planea realizar el cultivo fedbatch con una sola alimentación puntual, a diferencia del estudio de Mao, en el que se realizan 2 alimentaciones puntuales [13].

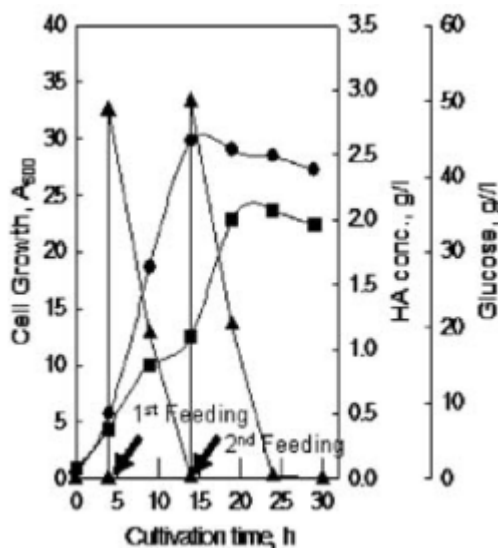


Figura 1.3: Síntesis fedbatch de HA en bioreactor de 1 L. Simbolos: Circulos crecimiento celular, cuadrados HA, triángulos glucosa [13]

1.4. Objetivos y limitaciones

1.4.1. Objetivo General

Estudiar las condiciones del crecimiento de *Escherichia coli* en alta densidad en un fermentador *fedbatch* para la producción de ácido hialurónico de manera recombinante.

1.4.2. Objetivos específicos

Se consideran los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar condiciones de cultivo (régimen de alimentación y control de pH) para maximizar el peso seco de *E. coli* en cultivo, más allá de $1 \left[\frac{g}{L} \right]$.
2. Alcanzar una concentración peso seco de $15 \left[\frac{g}{L} \right]$ de *E. coli* sin producción de ac. hialurónico.
3. Identificar cómo afecta la inducción a la producción de ac. hialurónico en el crecimiento del cultivo de *E. coli* mediante la determinación de parámetros de cinética de crecimiento y medición de peso seco.

1.4.3. Limitaciones

1. En estudios anteriores de producción de HA, no se superan los $15 \left[\frac{g}{L} \right]$ en peso seco de biomasa [9, 10, 11, 12, 13, 23], por lo que puede que no se supere esa barrera.
2. Competencia entre rutas metabólicas de formación de biomasa y producción de HA puede suponer problema si no se estima adecuadamente el momento para la síntesis [11].
3. La viscosidad del medio de cultivo a concentraciones de $4 - 5 \left[\frac{g}{L} \right]$ de ácido hialurónico lleva a mala agitación y baja transferencia de oxígeno, limitando la subsecuente producción del mismo.

1.5. Nomenclatura

F	Flujo volumétrico en un fermentador en $\left[\frac{L}{h}\right]$
V	Volumen fermentador en $[L]$
x	Concentración peso seco de biomasa en $\left[\frac{g}{L}\right]$
x_0	Concentración peso seco inicial de biomasa en $\left[\frac{g}{L}\right]$
x_e	Concentración peso seco de biomasa a la entrada de un fermentador genérico en $\left[\frac{g}{L}\right]$
HA	Ácido Hialurónico
$[HA]$	Concentración de Ácido Hialurónico en $\left[\frac{g}{L}\right]$
$[Glu]$	Concentración de glucosa en $\% \left[\frac{w}{v}\right]$
$Y_{\frac{A}{B}}$	<i>Yield</i> o rendimiento de producción de A con respecto a B en $\left[\frac{masa\ de\ A}{masa\ de\ B}\right]$
μ	Velocidad de crecimiento en $\left[\frac{1}{h}\right]$
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento en $\left[\frac{1}{h}\right]$
α	Velocidad de muerte de microorganismos en $\left[\frac{1}{h}\right]$

1.6. Metodología específica

La cepa por utilizar es *E. coli* BL21 con el vector pET11a (Ver Anexo 4.1), que contiene el gen *hasA* de *Streptococcus equisimilis* y *hasB* procedente de la cepa de *E. coli* K12, además de genes de resistencia a ampicilina e inducción mediante IPTG. El biorreactor a utilizar es el Biotech[®] Biostat B 0496 con recipiente de 2 [L]. La alimentación puntual que se proporcionará a las fermentaciones será de concentración 500 $\left[\frac{g}{L}\right]$ de glucosa y fosfato de amonio 10 $\left[\frac{g}{L}\right]$ de fosfato de amonio con concentración final en medio de 50 $\left[\frac{g}{L}\right]$ y 1 $\left[\frac{g}{L}\right]$ respectivamente [13].

1.6.1. Preparación inóculo

Para la realización del preinóculo, se preparan 1 [L] de medio TB [24] con adición de ampicilina con concentración final de 100 $\left[\frac{\mu g}{mL}\right]$. Se separan 50 [mL] (los 950 [mL] restantes se utilizarán para la fermentación) y se inocula con la cepa antes nombrada con un factor de dilución de 1000. Se deja incubar por 16 [h] a 37°C y con agitación de 200 [RPM]. El biorreactor es inoculado siguiendo el protocolo mencionado en el correspondiente manual adjunto en el Anexo 4.2.

1.6.2. Condiciones de cultivo

La temperatura de cultivo en biorreactor se fija en 37°C, la cual será monitoreada mediante la termocupla del biorreactor y controlada por medio de la chaqueta enfriadora del mismo. El pH es monitoreado por el pH-metro del biorreactor y, en caso de necesitarlo, será ajustado a $pH = 7.0$ con soluciones HCl 0,1 [M] y $NaOH$ 0,1 [M] [25]. En caso de haber problemas con dicho sensor, la medición de pH se realizará con tiras reactivas y/o un pH-metro externo. La aireación se fijó en 2 [vvm] de aire y la agitación en 350 [RPM], las cuales son las condiciones máximas que soporta el biorreactor. La extracción de muestras para su análisis, sigue el protocolo mencionado en el manual (Anexo 4.2).

1.6.3. Determinación peso seco

La determinación de peso seco de cada muestra se realiza mediante medición de densidad óptica a $600 [nm]$, OD_{600} . La curva de calibración, que relaciona OD_{600} con peso seco se realiza tomando muestras de $2 [mL]$ por cuadruplicado, cada cierto tiempo, de una fermentación de prueba. A estas muestras, tras medir OD_{600} en un espectrofotómetro, son centrifugadas a $130.000 [RPM]$ por $10 [min]$, descartando el sobrenadante y conservando el *pellet*. Posteriormente, estas muestras se llevan a una estufa a $60^{\circ}C$ por $6 [hr]$ y posteriormente son masadas. La diferencia de masa entre el tubo vacío y con muestra, entrega el peso seco de biomasa de la muestra en $2.5 [mL]$. Teniendo varios de estos puntos peso seco / OD_{600} , se realiza una regresión lineal de los puntos en búsqueda de una ecuación.

1.6.4. Determinación tiempo de alimentación

El tiempo de alimentación será el momento en el que el cultivo se está quedando sin fuente de carbono o ya se quedó sin ésta. Para determinar este momento, se utiliza el método DNS para determinación de azúcares reductoras, tal y como se describe en *Laboratory manual for Biotechnology* [26]:

1. Se agregan $100 [\mu L]$ de la muestra problema y $100 [\mu L]$ del reagente DNS en un tubo eppendorf de $0.6 [mL]$
2. Se calientan el tubo a $100^{\circ}C$ en un termociclador por 5 minutos, para posteriormente ser enfriado hasta temperatura ambiente.
3. Medir absorbancia a $570 [nm]$

Las muestras son extraídas de fermentaciones (con y sin control de pH), las cuales son previamente centrifugadas a $130.000 [RPM]$ por 5 minutos, conservando el sobrenadante, para evitar que la biomasa de ésta, interfiera con la medición de densidad óptica en el método DNS.

1.6.5. Determinación velocidad máxima de crecimiento μ_{max}

Según la cinética de crecimiento de Monod, la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de un cultivo *batch* es determinada como la pendiente de la recta tangente en el punto de inflexión del gráfico, entre la fase exponencial y la fase logarítmica de crecimiento [27]. Realizando un balance de masa para una fermentación batch y asumiendo velocidad constante en un intervalo de tiempo t , se obtiene que:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (1.1)$$

A partir de la ecuación 1.1, es posible despejar la velocidad de crecimiento μ , tomando dos muestras consecutivas en fermentaciones (x y x_0) y la diferencia de tiempo entre ellas como t . Realizando este cálculo para cada par de muestras consecutivas y tomando el máximo, se obtiene el μ_{max} .

El balance de masa que lleva a la ecuación 1.1, se encuentra detallado en el Anexo 4.3 y una memoria de cálculo para la velocidad de crecimiento μ se encuentra en el Anexo 4.4

1.6.6. Determinación yield biomasa

Para la determinación de concentración de azúcares en las muestras para calcular el *Yield* glucosa/biomasa, se realiza por el mismo método ya mencionado en 1.6.4. Una vez determinadas las concentraciones de azúcares y peso seco en el momento de alimentación del cultivo y en el momento en que se inicie la fase estacionaria del cultivo, se determina el Yield biomasa/glucosa con la Ecuación 1.2:

$$Y_{\frac{x}{glucosa}} = \frac{x_{t_{valle}} - x_{t_{feed}}}{[Glu]_{t_{feed}} - [Glu]_{t_{valle}}} \quad (1.2)$$

1.6.7. Producción y medición de contenido de ácido hialurónico

La producción de ácido hialurónico será inducida en la fermentación mediante la adición de IPTG a concentración final $0.04 [mM]$ [28] y se medirá la concentración de éste, mediante el método del Cetil Trimetil Amonio Bromuro (CTAB) [29]. El método del CTAB se resume en los siguientes pasos:

1. Centrifugar las muestras a analizar a $130.000 [RPM]$ por $10 [min]$. El sobrenadante es conservado, se mezcla con 2.5 volúmenes de alcohol etílico puro y se almacena a $4^{\circ}C$ por $1 [h]$.
2. Las muestras se vuelven a centrifugar a $130.000 [RPM]$ por $10 [min]$. Se conserva el *pellet*, descartando el sobrenadante. El *pellet* es resuspendido con 5 volúmenes de agua desionizada.
3. Se mezcla $1 [mL]$ de muestra con $2 [mL]$ del reagente CTAB, consistente en $2.5 [g]$ de CTAB disueltos en $100 [mL]$ de una solución $0.2 [M]$ de *NaCl*. Se deja reaccionar la mezcla por $10 [min]$.
4. Se mide absorbancia a $400 [nm]$ y se utiliza dicha absorbancia para determinar el contenido de ácido hialurónico utilizando la ecuación 1.3 [29]

$$OD_{400} = 0.0083 \cdot [HA] - 0.0114 \quad (1.3)$$

1.6.8. Determinación yield ácido hialurónico

De manera similar a la determinación del Yield biomasa/glucosa visto en 1.6.6, se obtiene el Yield HA/glucosa con la Ecuación 1.4 :

$$Y_{\frac{HA}{glucosa}} = \frac{[HA]_{t_{valle}} - [HA]_{t_{feed}}}{[Glu]_{t_{feed}} - [Glu]_{t_{valle}}} \quad (1.4)$$

Capítulo 2

Resultados y discusión

2.1. Curva de calibración peso seco

Los datos obtenidos de la fermentación de prueba (sin control de pH ni alimentación) se pueden ver en la Tabla 2.1. Se retiraron *outliners* y se hizo una regresión lineal que se puede ver representada en la figura 2.1. La ecuación 2.1 se desprende de dicha regresión.

$$OD_{600} = 1.8267 \cdot x \quad (2.1)$$

El retiro de los *outliners* permitió la mejora de $R^2 \approx 0.65$ a $R^2 = 0.814$ haciendo que la regresión sea más representativa.

Las desviaciones estándar de algunas de las muestras superan el 10 [%] del promedio. Esto se puede deber a que las muestras tomadas eran tan pequeñas (1 [mL]), que podrían haber cabido en el error de la balanza.

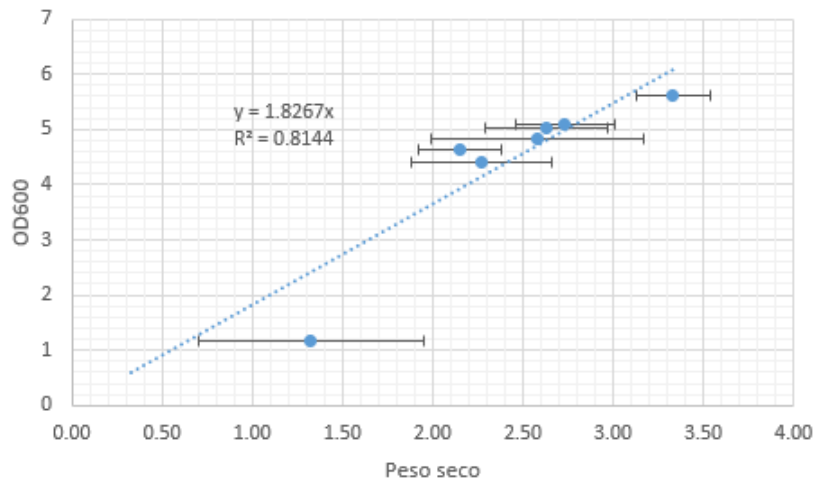


Figura 2.1: Curva de calibración de Peso Seco

Tabla 2.1: Datos para la elaboración de curva de calibración OD_{600} para peso seco

OD_{600} muestra	Peso tubo [g]	Peso total [g]	Diferencia [g]	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$	Peso seco promedio $\left[\frac{g}{L}\right]$	Desviación estándar
1.16	1.1333	1.13596	0.00266	1.33	1.33	0.28
	1.1339	1.136	0.0021	1.05		
	1.1092	1.1124	0.0032	1.6		
4.41	1.1343	1.1391	0.0048	2.4	2.27	0.23
	1.1402	1.145	0.0048	2.4		
	1.1102	1.1142	0.004	2		
4.63	1.1099	1.1139	0.004	2	2.15	0.59
	1.0949	1.1005	0.0056	2.8		
	1.1008	1.1041	0.0033	1.65		
4.82	1.1148	1.1205	0.0057	2.85	2.58	0.28
	1.1094	1.1146	0.0052	2.6		
	1.1337	1.1383	0.0046	2.3		
5.08	1.1086	1.1146	0.006	3	2.73	0.34
	1.1101	1.1148	0.0047	2.35		
	1.0918	1.0975	0.0057	2.85		
5.03	1.1204	1.126	0.0056	2.8	2.63	0.21
	1.1038	1.1086	0.0048	2.4		
	1.1091	1.1145	0.0054	2.7		
4.52	1.1087	1.1144	0.0057	2.85	3.03	0.16
	1.1123	1.1185	0.0062	3.1		
	1.1079	1.1142	0.0063	3.15		
5.63	1.1083	1.1147	0.0064	3.2	3.33	0.42
	1.124	1.13	0.006	3		
	1.1076	1.1152	0.0076	3.8		

2.2. Curva de calibración para glucosa

Los datos utilizados para elaborar la curva de calibración para glucosa por medio de DNS se pueden encontrar en la Tabla 2.2. A esos datos se les realizó una regresión lineal que se muestra la figura 2.2. La ecuación 2.1 se extrae de la regresión mencionada.

$$OD_{600} = 0.0019 \cdot [Glu] + 0.4253 \quad (2.1)$$

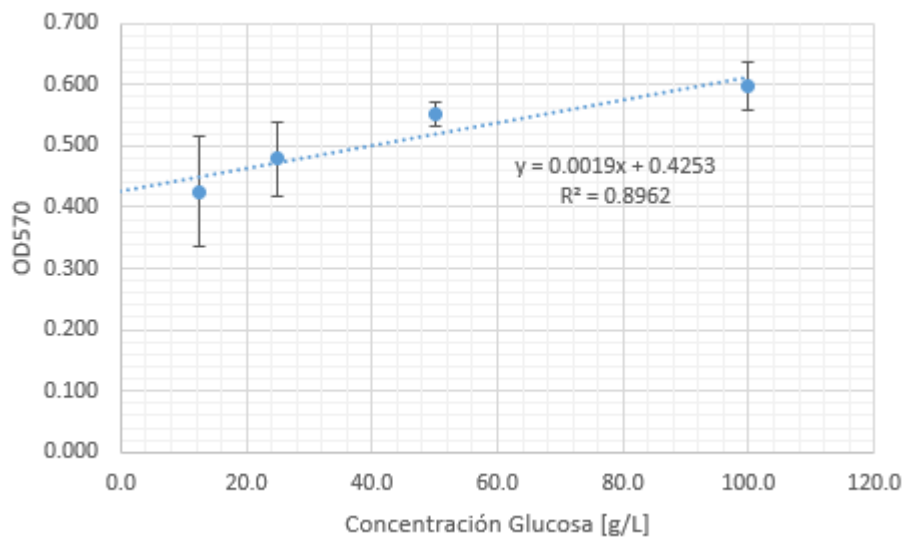


Figura 2.2: Curva de calibración de Glucosa

Tabla 2.2: Datos para la elaboración de curva de calibración OD_{570} para glucosa

Concentración glucosa $\left[\frac{g}{L}\right]$	OD_{570}	Promedio	Desv. Est
100	0.595	0.599	0.039
	0.605		
	0.550		
	0.645		
50	0.540	0.551	0.020
	0.580		
	0.550		
	0.535		
25	0.500	0.479	0.059
	0.515		
	0.390		
	0.510		
12.5	0.365	0.425	0.090
	0.355		
	0.430		
	0.550		

2.3. Determinación velocidad máxima y consumo de azúcares

Se realizaron dos fermentaciones (con y sin control de pH) con el propósito de determinar μ_{max} y el tiempo de alimentación adecuado para ambas condiciones. Los datos obtenidos en la fermentación sin control de pH se pueden ver en la Tabla 2.3 y la con control de pH, en la Tabla 2.4. La figura 2.3 muestra la evolución en la presencia de azúcares en el medio de cultivo.

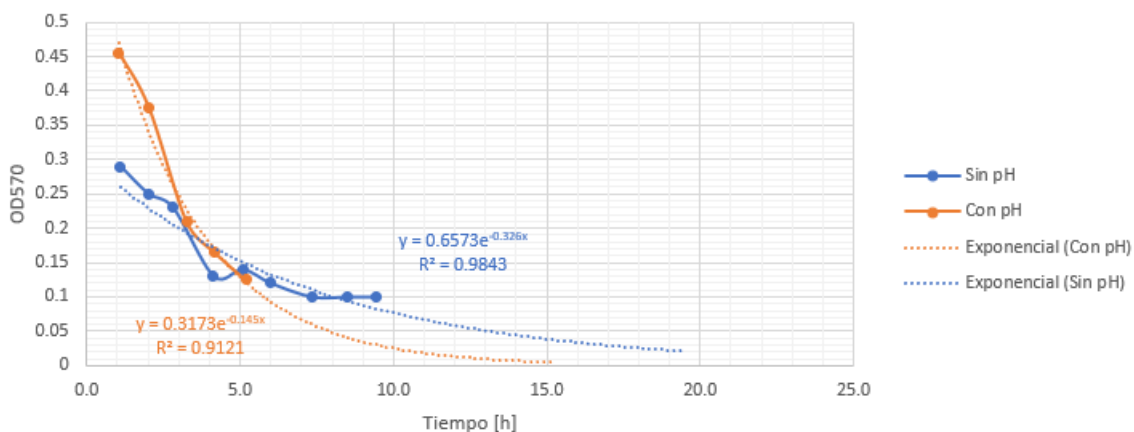


Figura 2.3: Contenido de azúcares en ambas fermentaciones

La fermentación con control de pH duró 4 horas menos que la fermentación sin control de pH, debido a que presentaba señales de muerte celular, es decir, subida brusca en la OD_{600} y una posterior bajada de ésta en menores tiempos, por lo que se detuvo. Las razones de esta muerte no están claras, pero se presume que la alta oscilación del pH debido a la forma de medición y control de éste produjo dicha muerte.

Las velocidades máximas de crecimiento μ_{max} obtenidas fueron de $0.976 \left[\frac{1}{h} \right]$ para la fermentación sin control de pH y de $0.897 \left[\frac{1}{h} \right]$, cuyos ejemplos de cálculo pueden encontrarse en el Anexo 4.4. Estos valores contradicen la intuición de que manteniendo el pH cercano a 7.0 en vez de pH más ácido, la velocidad de crecimiento aumenta [25]. Mencionado anteriormente, esta discrepancia se puede deber a la dificultad para mantener el pH deseado y la posible sobreoscilación de su valor.

Tabla 2.3: Datos de fermentación sin control de pH para determinación de μ_{max} y tiempo de alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$	OD_{570} DNS
1.1	0.269	0.15	0.29
2.0	0.658	0.36	0.25
2.8	1.826	1.00	0.23
4.1	3.432	1.88	0.13
5.1	4.96	2.72	0.14
6.0	5.51	3.02	0.12
7.4	6.3	3.45	0.1
8.5	7.22	3.95	0.1
9.4	7.09	3.88	0.1

Tabla 2.4: Datos de fermentación con control de pH para determinación de μ_{max} y tiempo de alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$	OD_{570} DNS
1.0	0.493	0.27	0.455
2.0	1.052	0.58	0.375
3.3	3.180	1.74	0.210
4.2	4.767	2.61	0.165
5.2	6.010	3.28	0.125

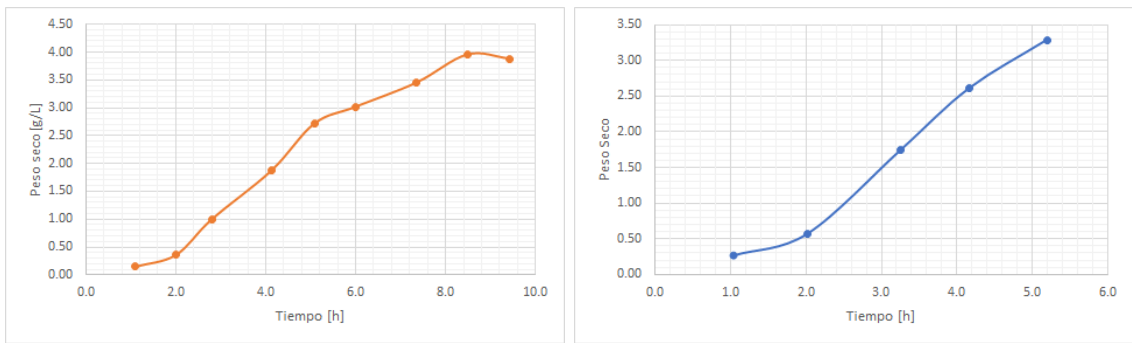


Figura 2.4: Peso seco de fermentaciones utilizadas para determinación de velocidades máximas. Izquierda, sin control de pH. Derecha, con control de pH

2.4. Fermentaciones sin inducción de vector de ácido hialurónico

2.4.1. Fermentaciones sin control de pH

2.4.1.1. Fermentación sin alimentación

Esta fermentación se desarrolló durante 25.75 [h], siendo detenida cuando se da cuenta del decaimiento en densidad óptica de $OD_{600} = 5.08$ a $OD_{600} = 5.03$, por consiguiente, en el contenido de biomasa.

Tabla 2.5: Datos de fermentación sin control de pH ni alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$
0.00	0.07	0.038
1.17	0.33	0.181
2.10	0.47	0.257
3.33	1.16	0.635
18.75	4.41	2.414
20.08	4.63	2.535
21.00	4.7	2.573
22.60	4.82	2.639
24.07	5.08	2.781
25.75	5.03	2.754

Esta fermentación ya supera uno de los objetivos específicos propuestos: Superar la barrera de $1 \left[\frac{g}{L}\right]$ peso seco, pero aún sin saber si son las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo recombinante.

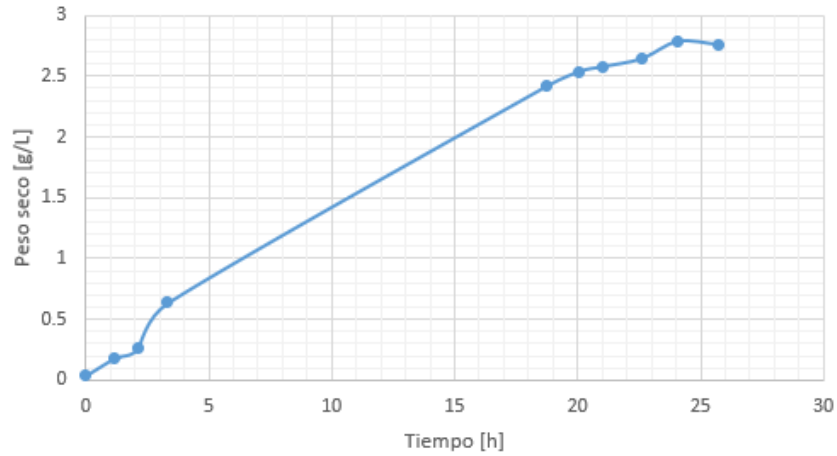


Figura 2.5: Crecimiento sin control de pH ni alimentación

2.4.1.2. Fermentación con alimentación

Esta fermentación se desarrolló por casi el triple de tiempo que la descrita en sección 2.4.1.1 debido mayormente, a la alimentación administrada y al lento crecimiento provocado por el no control del pH.

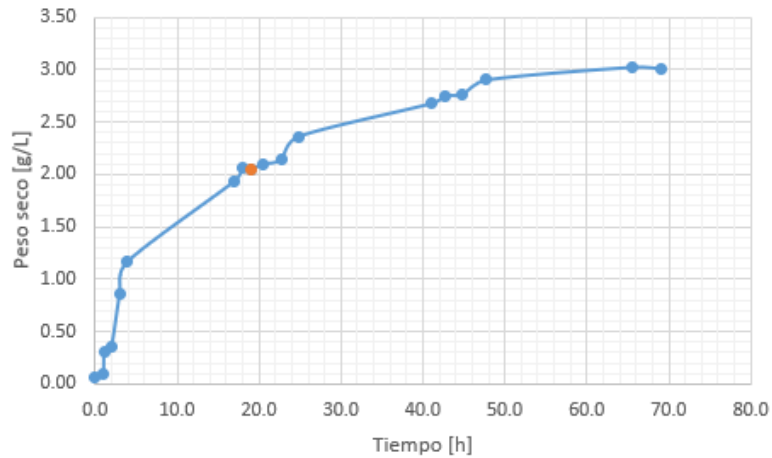


Figura 2.6: Crecimiento sin control de pH, con alimentación. Punto anaranjado: Punto de alimentación

Se separaron 3 muestras (Tabla 2.7), posteriores a la alimentación, con el fin de calcular el *yield* Y_{Glu}^x . Usando los datos $t = 19 [h]$ y $t = 65.5 [h]$, se obtiene $Y_{Glu}^x = 0.0108 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$.

2.4. FERMENTACIONES SIN INDUCCIÓN DE VECTOR DE ÁCIDO HIALURÓNICO21

Tabla 2.6: Datos de fermentación sin control de pH, con alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\frac{g}{L}$
0.0	0.100	0.05
0.9	0.160	0.09
1.1	0.566	0.31
1.9	0.637	0.35
3.0	1.562	0.86
3.9	2.124	1.16
17.0	3.540	1.94
18.0	3.760	2.06
19.0	3.750	2.05
20.5	3.830	2.10
22.7	3.910	2.14
24.8	4.310	2.36
41.0	4.890	2.68
42.8	5.020	2.75
44.8	5.050	2.76
47.8	5.300	2.90
65.5	5.520	3.02
69.1	5.490	3.01

Tabla 2.7: Datos obtenidos del método de DNS para cálculo de Y_{Glu}^x sin control de pH y con alimentación

Tiempo [h]	OD_{570}	Glucosa $\frac{g}{L}$	Peso seco $\frac{g}{L}$
19	0.60	91.95	2.05
24.8	0.53	55.11	2.36
65.5	0.43	2.47	3.02

2.4.2. Fermentaciones con control de pH

2.4.2.1. Fermentación sin alimentación

Esta fermentación se desarrolló durante 24 horas siendo detenida, al igual que las demás fermentaciones, cuando se da cuenta del decaimiento en densidad óptica, por consiguiente, en el contenido de biomasa de la misma.

Tabla 2.8: Datos de fermentación con control de pH, sin alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\frac{g}{L}$
0.00	0.080	0.044
1.33	0.140	0.077
1.99	0.367	0.201
3.20	1.510	0.827
4.10	2.560	1.401
4.67	3.110	1.703
17.60	9.180	5.025
18.68	9.930	5.436
21.63	10.750	5.885
23.97	10.450	5.721

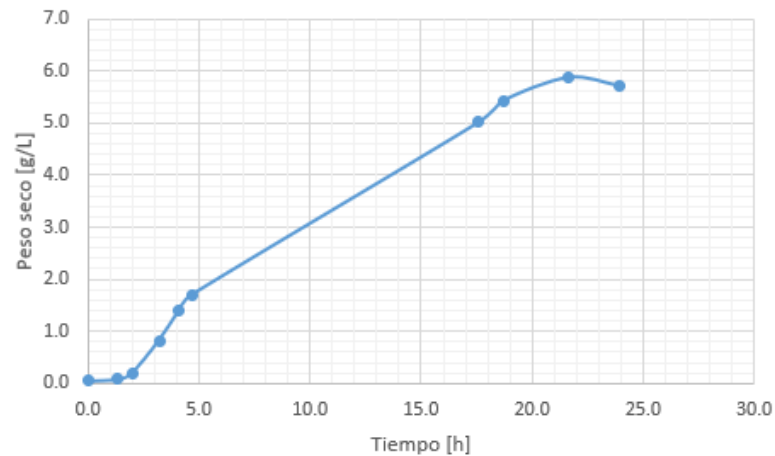


Figura 2.7: Crecimiento con control de pH, sin alimentación

Como se puede apreciar, esta fermentación produce más que la homóloga sin control de pH descrita en la sección 2.4.1.1, lo que sustenta la influencia que tiene el control del pH de la fermentación sobre el crecimiento de la misma [25].

2.4.2.2. Fermentación con alimentación

Tabla 2.9: Datos de fermentación con control de pH, con alimentación

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$
0.00	0.077	0.042
1.23	0.136	0.075
2.03	0.377	0.207
3.17	1.470	0.805
4.08	2.459	1.346
4.67	3.004	1.644
19.38	12.100	6.624
20.93	12.500	6.843
22.12	13.367	7.171
23.58	13.440	7.358
24.95	12.440	6.810

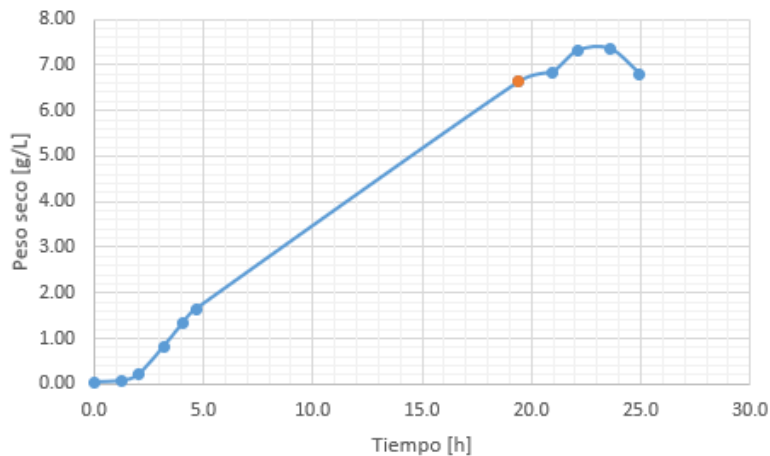


Figura 2.8: Crecimiento con control de pH, con alimentación. Punto anaranjado: Punto de alimentación

Al igual que en la sección 2.4.1.2, se extrajeron 3 muestras post-alimentación con el fin de calcular $Y_{\frac{x}{Glu}}$. Usando los datos $t = 19.4 [h]$ y $23.6 [h]$, considerando $[Glu] = 0$ en este último, se obtiene $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0127 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$. Este *yield* es levemente superior al encontrado en la sección 2.4.1.2, lo que se condice con modelos que muestran crecimientos menores a pH más ácido que 7.0 en *E. coli* [25]. Adicionalmente, se puede notar el menor tiempo de cultivo de esta fermentación en comparación con la desarrollada en la sección 2.4.1.2. Esto es debido a que diferencia en peso seco al momento de la alimentación, corresponde también a diferencias en la velocidad del consumo de la glucosa por mantenimiento, haciendo que a mayor peso seco menor tiempo de cultivo posterior al feed.

Tabla 2.10: Datos de DNS para cálculo de $Y_{\frac{x}{Glu}}$ con control de pH

Tiempo [h]	OD_{570}	Glucosa $\left[\frac{g}{L} \right]$	Peso seco $\left[\frac{g}{L} \right]$
19.4	0.59	90.89	6.624
22.1	0.43	3.53	7.171
23.6	0.42	-0.158	7.358

2.5. Fermentaciones con inducción de vector de ácido hialurónico

En ambas fermentaciones, la producción de ácido hialurónico fue inducida mediante la adición de IPTG junto con la alimentación al $t = 19 [h]$. La concentración final de IPTG en la fermentación es de $0.4 [mM]$.

2.5.1. Fermentación sin control de pH

En esta fermentación, se agregó la alimentación en $t = 19 [h]$. Los datos de crecimiento de la fermentación previo a este momento, fueron comparables a las fermentaciones sin control de pH descritas en la sección 2.4.1 y son detallados en el Anexo 4.5.1.

En esta fermentación se obtuvieron *yields* $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0219 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$

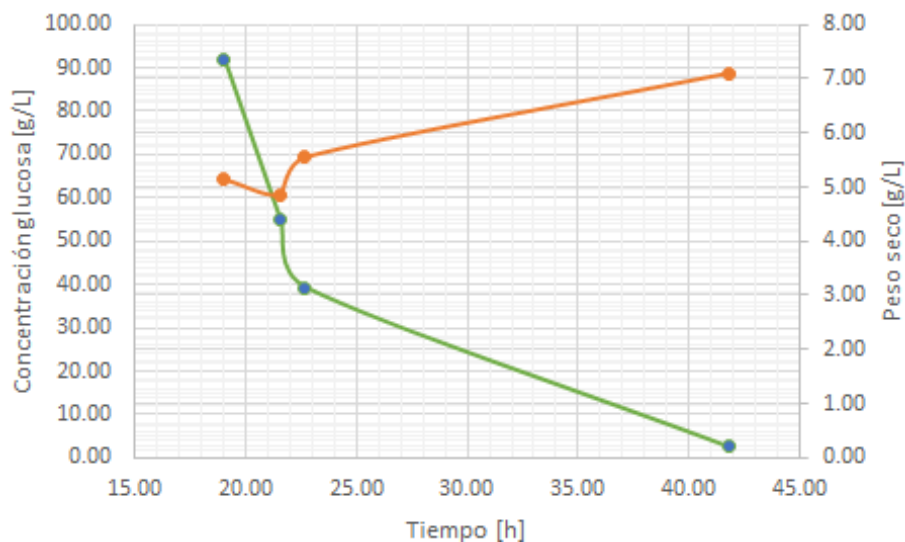


Figura 2.9: Crecimiento con inducción de producción de HA, sin control de pH. Naranja: Peso seco, Verde: Glucosa.

Tabla 2.11: Datos de fermentación sin control de pH e inducción de producción de HA

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$	OD_{570} DNS	Concentración glucosa $\left[\frac{g}{L}\right]$
18.98	9.39	5.14	0.6	91.95
21.50	8.88	4.86	0.53	55.11
22.66	10.15	5.56	0.5	39.32
41.78	12.97	7.10	0.43	2.47

Los valores OD_{400} del método CTAB para la determinación de la concentración de HA son tan pequeños, que son atribuibles a errores experimentales por lo que no se considera que hubo una producción de éste.

2.5.2. Fermentación con control de pH

En esta fermentación, se agregó la alimentación en $t = 20$ [h]. Los datos de crecimiento de la fermentación previo a este momento, fueron comparables a las fermentaciones con control de pH descritas en la sección 2.4.2 y son detallados en el Anexo 4.5.2.

En esta fermentación se obtuvieron *yields* $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0055 \left[\frac{g_{biomasa}}{g_{Glu}}\right]$. El *yield* de biomasa es un orden de magnitud menor a los calculados en las secciones 2.4.1.2, 2.4.2.2 y 2.5.1, lo cual sugiere que la glucosa se está utilizando en otra ruta metabólica que no sea la de crecimiento, como por ejemplo, en la ruta de producción de HA.

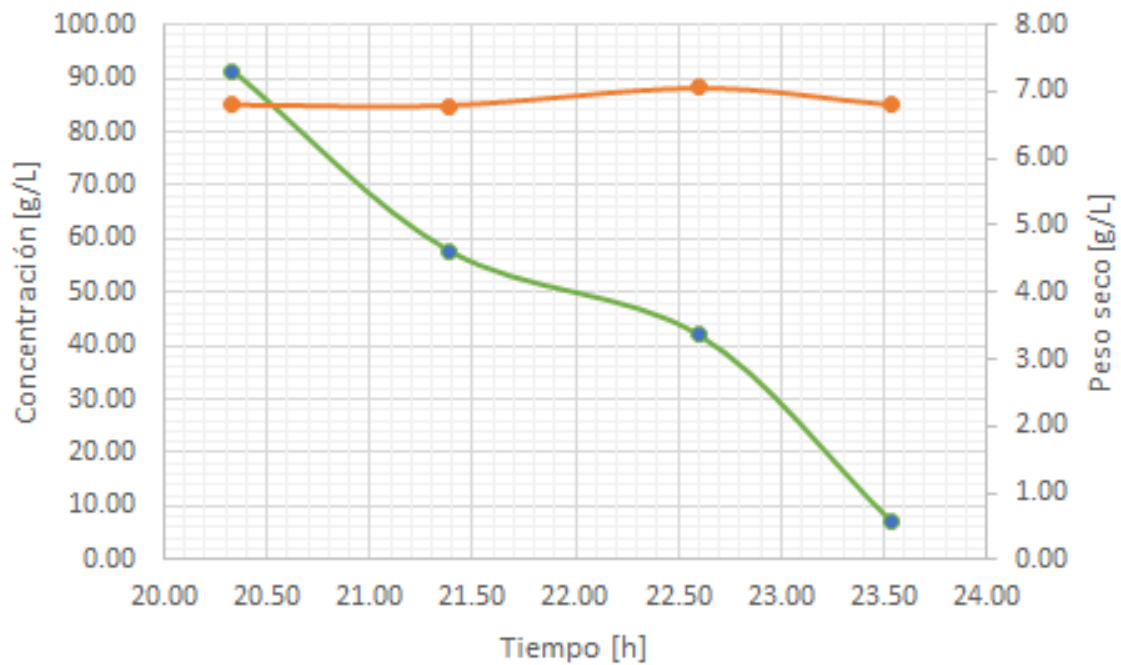


Figura 2.10: Crecimiento con inducción de producción de HA, sin control de pH. Naranja: Peso seco, Verde: Glucosa.

Tabla 2.12: Datos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA

Tiempo [h]	OD_{600}	Peso seco $\left[\frac{g}{L}\right]$	OD_{570}	Concentración glucosa $\left[\frac{g}{L}\right]$
20.33	12.41	6.79	0.599	91.42
20.55	12.39	6.78	0.535	57.74
21.77	12.91	7.07	0.505	41.95
22.70	12.41	6.79	0.439	7.21

Al igual que en la sección anterior, los valores OD_{400} del método CTAB para la determinación de la concentración de HA son tan pequeños, que son atribuibles a errores de medición del espectrofotómetro.

2.6. Discusiones finales

Viendo la figura 2.12 se hace evidente el efecto del control de pH sobre la fermentación, mostrando diferencias de hasta $6 \left[\frac{g}{L} \right]$ en peso seco entre fermentaciones. Esta diferencia se hace menor cuando se induce la producción de HA (Figura 2.11), lo que hace pensar que el control de pH permite la producción de HA, afectando el crecimiento. Sin embargo, los valores de OD_{400} del método CTAB son tan pequeños, que lleva a pensar de que no hay producción de ácido hialurónico, dando a entender que lo que detectó el método sea probablemente, *debris* o escombros de los procesos celulares de la fermentación o simples errores experimentales.

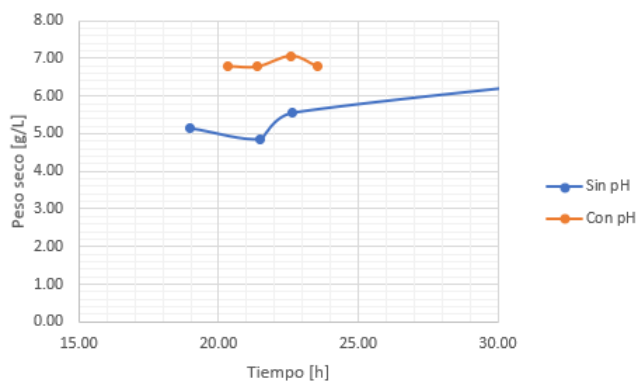


Figura 2.11: Comparativa de crecimiento de peso seco en inducción de producción de HA

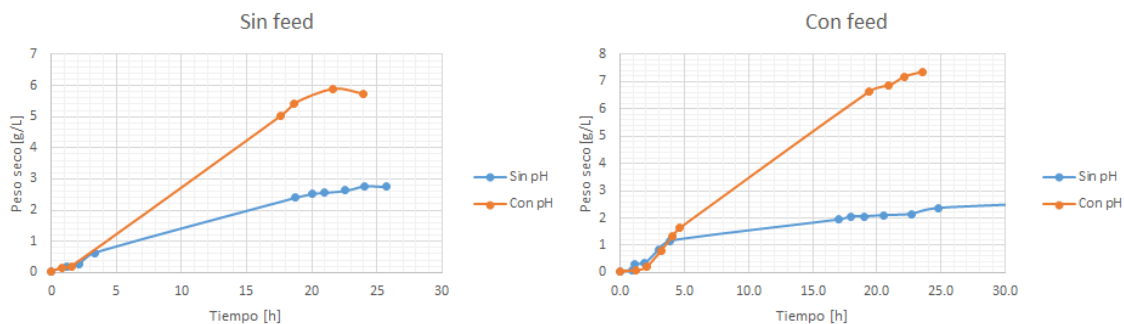


Figura 2.12: Comparativa de crecimiento entre distintas condiciones de cultivo

De las limitaciones que se consideraron que podría tener el proyecto, el límite de $15 \left[\frac{g}{L} \right]$ de peso seco fue la más evidente, siendo $7.5 \left[\frac{g}{L} \right]$ la concentración más alta. Este bajo crecimiento con respecto a ese límite se puede deber a muchos factores, como por ejemplo, falta de fuente de carbono o mayor aireación. De estas razones dadas, es más probable la falta de fuente de carbono debido a que la alimentación fue puntual y única, y no continua; la falta de aireación es descartada debido a que no se consideró mayormente en este estudio.

Como proyecciones a futuro, se puede estudiar los efectos de una alimentación continua de fuente de carbono a distintas concentraciones y distintos tiempos, a *posteriori* de hacer un estudio para comprobar la integridad del vector insertado en *E. coli* para la producción de ácido hialurónico.

Capítulo 3

Conclusiones

Se lograron identificar las condiciones de cultivo optimas para el crecimiento de *Escherichia coli* recombinante para la producción de ácido hialurónico. Dichas condiciones son control de pH con valor igual a 7.0 y alimentación con fuente de carbono y de nitrógeno a $t = 19 [h]$. Estas condiciones lograron alcanzar un peso seco de $7.36 \left[\frac{g}{L} \right]$ en aproximadamente 24 horas, superando a las otras fermentaciones por al menos $1 \left[\frac{g}{L} \right]$ a mismo tiempo de fermentación, superando el objetivo inicial de $1 \left[\frac{g}{L} \right]$ de peso seco. Sin embargo, no se pudo superar la barrera de $15 \left[\frac{g}{L} \right]$ de peso seco que otros estudios similares de producción de HA tampoco pudieron superar.

Se logra determinar cómo afecta la inducción de producción de HA al crecimiento de *E. coli* mediante la determinación de rendimientos o *yields* de producción de biomasa $Y_{\frac{x}{Glu}}$. Los *yields* sin inducción a la producción de HA son $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0108 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$ sin control de pH y $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0127 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$ con control, mientras que con inducción a la producción de HA son $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0219 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$ sin control de pH y $Y_{\frac{x}{Glu}} = 0.0055 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ Glu}} \right]$ con control. Esto sugiere de que la inducción a la producción de HA sí afecta al crecimiento pero, por problemas en el estudio molecular que se desarrolla en paralelo, no se pudo comprobar.

Finalmente, se concluye que los resultados de producción de ácido hialurónico son tan pequeños, que es seguro concluir que no hubo producción significativa alguna de ácido hialurónico.

Bibliografía

- [1] B. Fong, C. Lars, R. Mclaughlin, and L. K. Nielsen, “Microbial hyaluronic acid production,” *Appl Microbiol Biotechnol*, no. 66, pp. 341–351, 2005.
- [2] J. Fraser, T. C. Laurent, and U. B. Laurent, “Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover,” *Journal of Internal Medicine*, no. 242, pp. 27–33, 1997.
- [3] K. Sugahara, N. Schwartz, and A. Dorfman, “Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, no. 14, pp. 6252–6261, 1979.
- [4] R. Mendichi and L. Šoltés, “Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial fluid,” *Inflammation Research*, vol. 51, no. 3, pp. 115–116, 2002.
- [5] T. Gower, “Hyaluronic Acid Injections for Osteoarthritis.” <https://www.arthritis.org/living-with-arthritis/treatments/medication/drug-types/other/hyaluronic-acid-injections.php>.
- [6] J. H. Kim, M. J. Moon, D. Y. Kim, S. H. Heo, and Y. Y. Jeong, “Hyaluronic acid-based nanomaterials for cancer therapy,” *Polymers*, vol. 10, no. 10, pp. 1–15, 2018.
- [7] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, and J. Chen, “Microbial production of hyaluronic acid : current state , challenges , and perspectives,” *Microbial Cell Factories*, vol. 10, no. 99, pp. 1–9, 2011.
- [8] Biologics International Corp, “High Cell Density Fermentation Technology.” <https://www.biologicscorp.com/blog/high-cell-density-fermentation-a-efficient-fed-batch-fermentation-technology/>.

- [9] C. Shene, B. A. Andrews, and J. A. Asenjo, “Fedbatch fermentations of *Bacillus subtilis* ToC46 (pPFF1) for the synthesis of a recombinant study and modelling,” *Enzyme and Microbial Technology*, no. 24, pp. 247–254, 1999.
- [10] L.-j. Chien and C.-k. Lee, “Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*,” *Appl Microbiol Biotechnol*, no. 77, pp. 339–346, 2007.
- [11] S. Jagannath and K. B. Ramachandran, “Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 48, pp. 148–158, 2010.
- [12] Z. Mao and R. R. Chen, “Recombinant Synthesis of Hyaluronan by *Agrobacterium* sp .,” *Biotechnol. Prog.*, no. 23, pp. 1038–1042, 2007.
- [13] Z. Mao, H.-d. Shin, and R. Chen, “A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis,” *Biotechnological Products and Process Engineering*, pp. 63–69, 2009.
- [14] S. Smith and ReportBuyer, “The global hyaluronic acid market size is expected to reach USD 15.25 billion by 2026 registering a CAGR of 7.8 %.” <https://www.prnewswire.com/news-releases/the-global-hyaluronic-acid-market-size-is-expected-to-reach-usd-15-25-billion-by-2026-registering-a-cagr-of-7-8-300869780.html>, 2019.
- [15] C. Matsubara, M. Kajiwara, H. Akasaka, and S. Haze, “Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Biosynthesis of Hyaluronic Acid,” *Chem. Pharm. Bull*, vol. 39, no. 9, pp. 2446–2448, 1991.
- [16] B. Dougherty and I. van de Rijn, “Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A streptococci,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 175, no. 5, pp. 1291–1299, 1992.
- [17] B. Dougherty and I. van de Rijn, “Molecular Characterization of hasA from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group A Streptococci,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, pp. 1291–1299, 1993.
- [18] B. Widner, S. V. Dollen, M. Tang, T. Heu, A. Sloma, D. Sternberg, P. L. Dean-gelis, P. H. Weigel, and S. Brown, “Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 7, pp. 3747–3752, 2005.

- [19] P. DeAngelis, J. Papaconstantinou, and P. Weigel, “Molecular Cloning, Identification, and Sequence of the Hyaluronan Synthase Gene from Group A Streptococcus pyogenes,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 26, pp. 19181–19184, 1993.
- [20] S. Y. Lee, “High cell-density culture of Escherichia coli,” *Trends in Biotechnology*, vol. 14, no. 3, pp. 98–105, 1996.
- [21] D. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E. Sanders, and W. Deckwer, “Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli,” *Journal of biotechnology*, vol. 39, pp. 59–65, 1995.
- [22] K. E. Kram and S. E. Finkel, “Rich medium composition affects Escherichia coli survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 13, pp. 4442–4450, 2015.
- [23] J. H. Choi, K. C. Keum, and S. Y. Lee, “Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli,” *Chemical Engineering Science*, vol. 61, pp. 876–885, feb 2006.
- [24] Cold Spring Harbor Protocols, “Terrific Broth Medium.” <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8620>, sep 2015.
- [25] P. Reinikainen, J. Olkku, P. Markkanen, and A. Holmberg, “Determination of pH and Temperature Profiles for the Growth of Escherichia Coli,” *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 18, no. 17, pp. 219–224, 1985.
- [26] A. Verma, S. Das, and A. Singh, “DNS Method for Reducing Sugar,” in *Laboratory Manual for Biotechnology*, ch. 5, pp. 278–279, S. Chand & Co., 2014.
- [27] J. Monod, “The Growth of Bacterial Cultures,” *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 3, no. XI, pp. 371–394, 1949.
- [28] B. Dougherty and I. van de Rijn, “Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 10, pp. 7118–7124, 1993.
- [29] Y. H. Chen and Q. Wang, “Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth,” *Carbohydrate Polymers*, 2009.

Capítulo 4

Anexos

4.1. Esquema Vector utilizado

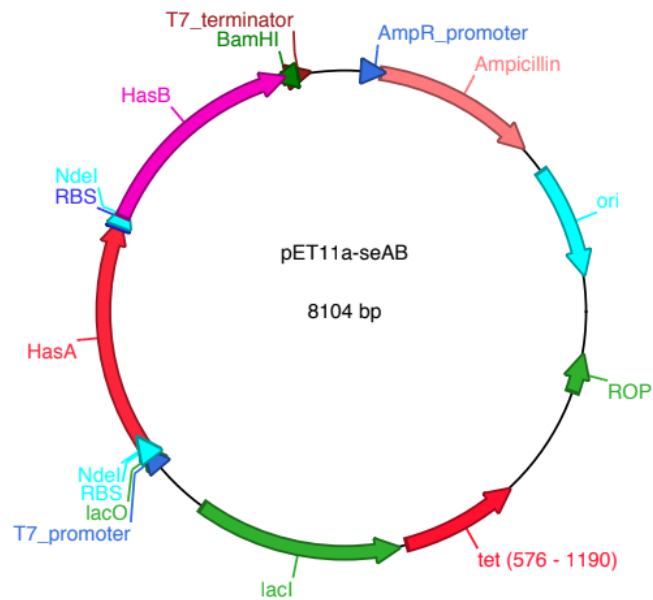


Figura 4.1: Vector pET11a

4.2. Extracto de manual de operación fermentador

4.3 Equipping and Assembling the Culture Vessels

4.3.1 Overview

- The internal equipment of a vessel and the kind and number of components, which should be installed in the top-plate, need be planned carefully. Some of the accessory parts can only be mounted, removed or changed, while the top-plate is disassembled. Some parts are to be pushed through the top plate from below and screwed tight with a corresponding nut from above. Other parts will be tightened by corresponding nuts from below.

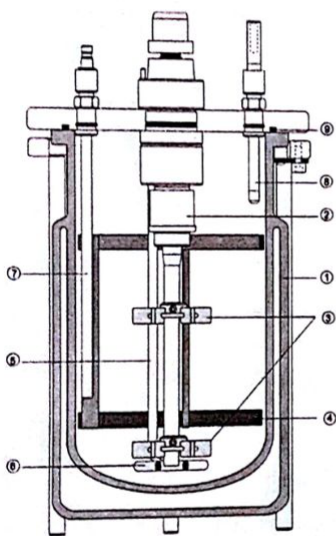


Fig. 4 - 5: Culture vessel type B 2; internal setup:

- (1) jacketed glass vessel
- (2) stirrer shaft
- (3) 6-bladed disc impeller
- (4) baffle insert
- (5) sparger pipe
- (6) sparger ring for air inlet
- (7) harvest pipe
- (8) antifoam probe
- (9) O-ring seal of top-plate

- Parts for assembly while the top-plate is removed, are in general:
 - adapters for antifoam and level probe
 - adapters for the harvest pipe,
 - the adapter for the inoculation port
 - any universal fitting (hose connector)
 - the mounting pocket for the optional reference thermometer (if necessary)
 - tubing connectors for the side-entry ports of culture vessels B2 and B5
- For culture vessels with drive shaft and stirrers such parts are, for instance:
 - baffle insert or extra baffles
 - the stirrers for the drive shaft
 - a spinfilter for media removal
 - a silicone membrane insert for bubble free gas supply
- For airlift culture vessels without drive shaft such parts are, for instance:
 - guiding tube for loop system
 - electrodes, probes, pipes of special dimension considering the height of the airlift vessels
- Blind closures must be fitted to any top-plate port, which is not required for equipment. For the blind closures of $\varnothing = 6$ mm, this is only possible, while the top-plate is removed.
- After assembly of the top plate to the glass vessel only these component parts can be added, removed or changed, which are located from outside:
 - exhaust cooler (or flexible adapter for exhaust cooler)
 - antifoam and level probe
 - the harvest pipe
 - other component parts for assembly into clamping adapters
 - 2-way inlet of Bypass sampler
 - 4-way inlet adapter

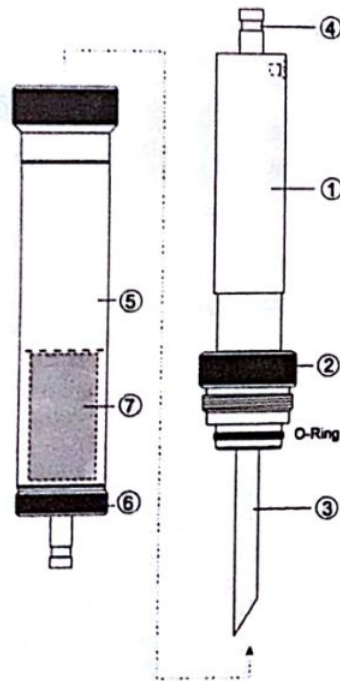
Figura 4.2: Equipo y armado del fermentador

Equipment and maintenance of the culture vessels

4.3.8 1-Channel Inoculation Kit

Similar to the inoculation kit B/MD the 1-channel inoculation kit allows for sterile access to the culture vessel, when the seed culture or corrective solutions should be supplied. A special advantage is the use of larger tubings for an increased flow of medium and the supply of larger volumes. The kit requires a top-plate port of Ø 19 mm equipped with a septum port kit B10.

Part, accessories	Cat.-no.	Specifications	Notes
1-channel inoculation kit	884061/0	for septum port B10	incl. sterile sleeve
1-channel inoculation adapter	B300940100104	hollow needle Ø 6 x 0,5 mm of stainless steel 1.4435	
O-ring	39120830	15,6 x 1,78, (EPDM)	
silicone tubing	39971155	Ø 4 x 7, silicone rubber	delivery set of 2 m



Preparing of the 1-channel inoculation kit

1. Check and clean a previously used 1-channel inoculation kit. No residues of medium should glue inside the needle (3) and internal pipe. Check the O-ring and clean or replace, if necessary.
 2. The sterile sleeve is filled with glass silk (7) which can get moistened and dirty by time. This can hinder proper deaeration during sterilization. Therefore you should check the filling regularly. Unscrew the screw cap (6) and check and replace the glass silk, if required.
 3. Attach the silicone tubing for medium transfer to the hose connector (4). Cut as long as required and connect to the corrective solution bottle or the container for the seed culture.
 4. Screw on the sterile sleeve. It will keep the needle (3) of the inoculation kit sterile, until it is connected to the septum port for supply of the seed culture or of the corrective solution.
 5. Prepare the corrective solution bottle or the container for the seed culture and sterilize together with the 1-channel inoculation kit and the tubing.
- ☐ For connection of the 1-channel inoculation kit to the septum port see the connection information below.

Fig. 4 - 12: 1-channel inoculation kit

Figura 4.3: Protocolo de inoculación del fermentador

4.5.5 Manual Sampling Kit

The manual sampler, cat.-no 884 462/3, can be used for discontinuous removal of samples at a larger volume. It consists of the following parts, see fig. of the setup:

- Sampling tube (pos. 2),
- Clamping device for assembly to one of the stands of the culture vessel
- Syringe for sample removal with sterile filter assembly (pos. 4)
- Silicone tubing 2 x 4 mm for connection of the syringe and 4 x 7 mm for connection to the harvesting pipe in the culture vessel and the sample outlet,
- Hose clamp

The sampling tube has a screw cap with three hose connectors. One is used for connection to the sampling tube of the culture vessel (pos. 1), one for outlet of the sample to external receptacle (pos. 5) and one for the syringe (pos. 3). The sterile filter assembly of the syringe prevents insterile air to enter and contaminate the device.

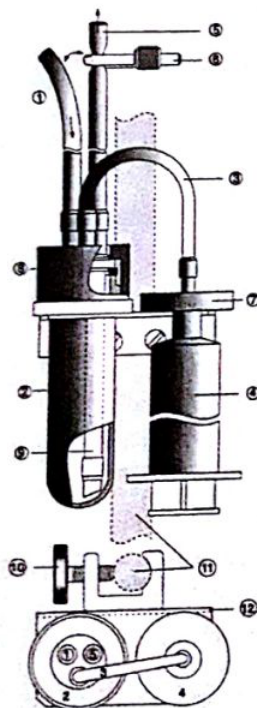


Fig. 4 - 36: Manual Sampler

Assembling the manual sampling kit

1. Unscrew the cap of the sampling tube. Attach a short piece of silicone tubing $\text{Ø } 4 \times 7$ to the rising pipe, it should be reach down to the bottom of the tube. Screw cap onto the tube again.
2. Attach a piece of silicone tubing $\text{Ø } 4 \times 7$ to the outside hose connector of the rising pipe. This tubing is used to transfer a sample into an external receptacle (via outlet tubing, 5).
3. Attach another piece of silicone tubing $\text{Ø } 4 \times 7$ to hose connector (1) and connect to the sampling pipe of the culture vessel. This tubing is used for transfer of the sample from the harvest pipe into the sampling tube
4. Mount sterile filter to the syringe and connect to the third hose connector of the sampling tube via a short piece of silicone tubing $\text{Ø } 2 \times 4$, see pos. (3).
5. Attach the clamping device to one of the stand rods of the culture vessel so that the manual sampler can easily be handled. Insert the sampling tube and the syringe into the clamping device.
6. Clamp-off the silicone tubing between the rising pipe of the culture vessel and the sampling tube prior to autoclaving.
7. Autoclave the complete assembly together with the culture vessel.

Figura 4.4: Equipo de toma de muestras y su armado

Removal of Samples with the Manual Sampler

1. Prior to taking a sample push down the plunger of the syringe. The outlet tubing (5) should be open at this time.
2. Remove the hose clamp from the tubing connected to the culture vessel (1) and clamp-off the outlet tubing (5) now.
3. Draw the plunger of the syringe (4). The sample is sucked through the sampling pipe and the tubing (1) into the sampling tube. Transfer the required sample volume. Then push the plunger back a little until the tubing connection to the culture vessel is empty. This avoids that residues of the sample are kept in the tubing until the next sample is taken.
4. Loosen the hose clamp from the outlet tubing and clamp-off again the transfer tubing from the culture vessel (1).
5. Lead the outlet tubing (5) into a receptacle (flask, beaker, etc.). To transfer the sample slowly push the plunger of the syringe. The sample is driven through the rising pipe of the sample tube and the outlet tubing into the receptacle.

Notes:

- It is recommended to completely empty the sample tube as shown in step 5. Sample residues in the tube may contaminate the next sample and change its characteristics.
- Between two samples dip the open end of the hose into a disinfectant in order to avoid contamination of the culture broth.

Figura 4.5: Protocolo de toma de muestras

4.3. Balance de masa para un fermentador batch

Un balance de masa para un fermentador genérico se tiene lo siguiente:

$$F \cdot x_e - F \cdot x + \mu \cdot x \cdot V - \alpha \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt} \quad (4.1)$$

Al ser tener un fermentador *batch*, no se tiene entrada ni salida de células además de ser un volumen constante, es decir, $V = \text{constante}$ y $F = 0$. Adicionalmente, se toma el supuesto de que la muerte celular es despreciable, lo que se traduce en $\alpha = 0$. Aplicando lo anteriormente descrito, se obtiene:

$$\mu \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt} = x \frac{dV}{dt} + V \frac{dx}{dt} \quad (4.2)$$

Tomando en cuenta que V es constante, por lo que $\frac{dV}{dt} = 0$:

$$\mu \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt} = V \frac{dx}{dt} \quad (4.3)$$

Teniendo μ constante, la ecuación anterior es integrable, considerando concentración inicial de biomasa en $t = 0$ es x_0 . Integrando se obtiene:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (4.4)$$

4.4. Ejemplo de cálculo velocidades de crecimiento μ

Para el cálculo de las velocidades de crecimiento μ , se despejó esta variable en la ecuación 4.4, obteniendo:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{x}{x_0} \quad (4.1)$$

A modo de ejemplo, se calcula la velocidad de crecimiento entre las muestras a tiempo $t = 1.1 [h]$ y $t = 2.0 [h]$ de la Tabla 2.3. De estos datos se toma $x_0 = 0.15 \left[\frac{g}{L} \right]$ y $x = 0.36 \left[\frac{g}{L} \right]$ con $t = 2.0 - 1.1 [h] = 0.9 [h]$. Reemplazando:

$$\mu = \frac{1}{0.9 [h]} \ln \frac{0.36 \left[\frac{g}{L} \right]}{0.15 \left[\frac{g}{L} \right]} = 0.976 [h] \quad (4.2)$$

4.5. Datos de crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA

4.5.1. Fermentación sin control de pH

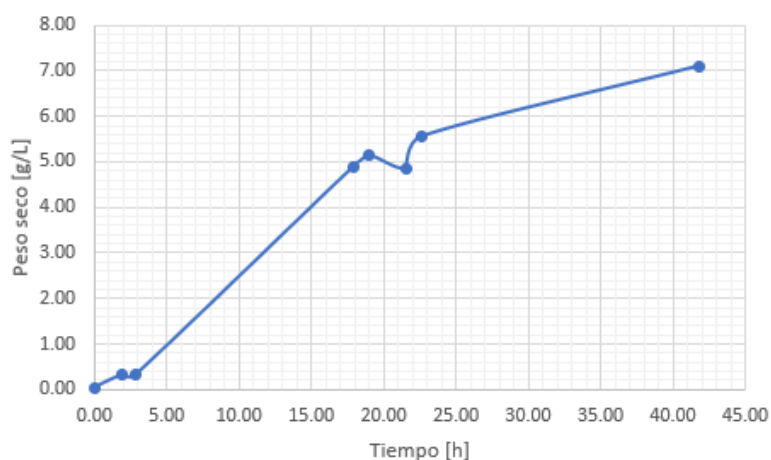


Figura 4.6: Crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA sin control de pH

Tabla 4.1: Datos completos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA

Tiempo	OD600	Peso seco [g/L]
0.00	0.0725	0.04
1.87	0.57	0.31
2.83	0.57	0.31
17.90	8.92	4.88
18.98	9.39	5.14
21.50	8.88	4.86
22.66	10.15	5.56
41.78	12.97	7.10

4.5.2. Fermentación con control de pH

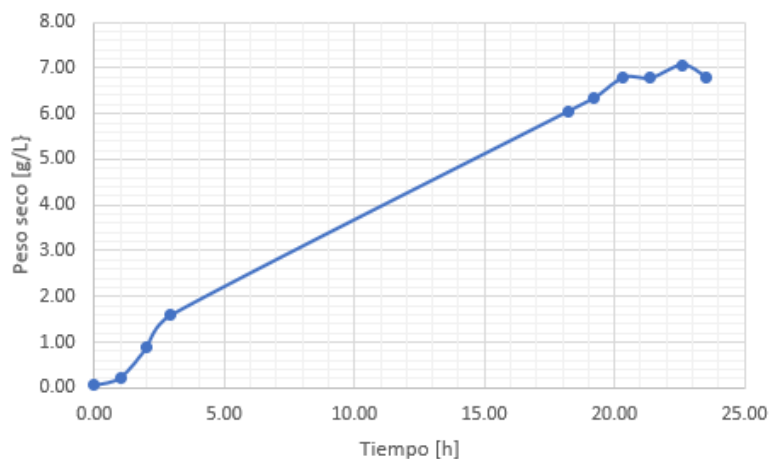


Figura 4.7: Crecimiento de fermentación con inducción de producción de HA con control de pH

Tabla 4.2: Datos de completos de fermentación con control de pH e inducción de producción de HA

Tiempo	OD600	Peso seco [g/L]
0.00	0.096	0.05
1.00	0.419	0.23
2.00	1.604	0.88
2.92	2.9	1.59
18.23	11.07	6.06
19.23	11.6	6.35
20.33	12.41	6.79
21.38	12.39	6.78
22.60	12.91	7.07
23.53	12.41	6.79