



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Química

**Efecto de condiciones
ambientales en la biosíntesis de
la proteína recombinante
PE_PGRS26 de *Mycobacterium
tuberculosis* en cultivos
sumergidos de *Escherichia coli***

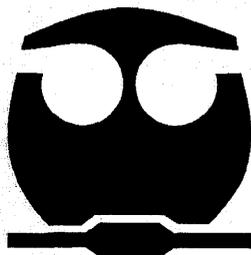
T E S I S

Para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Pedro Emmanuel Navarro García



México, D.F.

2010



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice General

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	5
2.2 PLÁSMIDO PET-22B	8
2.3 TALLO DE HISTIDINAS	10
2.4 METABOLISMO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> , SÍNTESIS DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SU EFECTO EN LA PRODUCTIVIDAD DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	11
2.5 LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN	11
2.6 OPERON LAC	13
2.7 IPTG (B-D-TIO-GALACTÓSIDO DE ISOPROPILO)	14
2.8 LAS PROTEÍNAS PE_PGRS	15
2.9 LA PROTEINA PE_PGRS26	17
2.10 BIOINGENIERIA Y BIOPROCESOS	19
2.10.1 CRECIMIENTO MICROBIANO	19
2.10.2 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA	23
2.10.3 MODELO CINÉTICO DE MONOD Y LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO	24
2.11 BIORREACTORES	26
2.12 TIPOS DE CULTIVO EN BIORREACTORES	26
2.12.1 EL CULTIVO EN LOTE (CL)	27
2.12.2 CULTIVO EN LOTE ALIMENTADO (CLA)	27
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 GENERAL	30
5.2 PARTICULARES	30
6. METODOLOGÍA	32
6.1 CONSERVACIÓN DE LA CEPA	32
6.1.1 GENERACIÓN DE BANCO MAESTRO (BM)	32
6.1.2 GENERACIÓN DE BANCO DE TRABAJO (BT)	32
6.2 EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO EN MATRACES AGITADOS	33
6.2.1 COMPARACIÓN DE BANCOS PRODUCTORES EN CUANTO A PRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO	33
6.2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN A CONCENTRACIÓN DE IPTG VARIABLE	34
6.2.3 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO. MEDIO MÍNIMO (MM) Y MEDIO TERRIFIC BROTH (TB)	34
6.2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD DE INDUCCIÓN. INDUCCIÓN INICIAL (I/TO) Y A LA HORA 3 (I/T3)	35
6.3 ESCALAMIENTO A CULTIVOS EN BIORREACTOR DE 1.0 L	36
6.3.1 CULTIVO EN LOTE (CL) Y EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN EN REACTOR 1.0 L	36
6.4 MÉTODOS DE IDENTIDAD Y CUANTIFICACIÓN	37
6.4.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR DENSITOMETRÍA	37
6.4.2 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	37
6.4.3 WESTERN BLOT	38

__6.4.4 DOT BLOT -----	39
__6.4.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL POR MÉTODO DE BRADFORD DE BIO- RAD -----	39
6.5 PURIFICACIÓN DE RPE_PGRS26 -----	40
__6.5.1 OBTENCIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN (CI)-----	40
__6.5.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON NIQUEL-----	40
6.5.3 ESTABILIZACIÓN FINAL DE RPE_PGRS26 -----	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	43
7.1 COMPARACIÓN DE BANCOS PRODUCTORES EN CUANTO A PRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO -----	43
7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN A CONCENTRACIÓN DE INDUCTOR B-D-TIO- GALACTÓSIDO DE ISOPROPILO (IPTG) VARIABLE -----	48
7.3 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO: MEDIO MÍNIMO (MM) Y TERRIFIC BROTH (TB)-----	50
7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA EDAD DE INDUCCIÓN. INDUCCIÓN INICIAL (I/T0) Y A LA HORA 3 (I/T3) A CONCENTRACIÓN 0.2 mM DE IPTG -----	54
7.5 ESCALAMIENTO A CULTIVOS EN BIORREACTOR DE 1.0 L -----	60
7.6 PURIFICACIÓN DE RPE_PGRS26 -----	64
8. CONCLUSIONES-----	74
9. ANEXO 1 (PREPARACIONES) -----	76
9.1 MEDIOS DE CULTIVO -----	76
9.2 PREPARACIÓN DE ANTIBIÓTICOS E IPTG -----	77
9.3 PREPARACIONES PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA -----	78
9.4 PREPARACIONES PARA WESTERN BLOT, DOT BLOT Y EXTRACCIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN ----	80
9.5 PREPARACIONES PARA CROMATOGRAFÍA Y ALMACENAMIENTO FINAL DE RPE_PGRS26-----	82
9.6 CURVA PATRÓN PARA MÉTODO DE BRADFORD-----	83
10. REFERENCIAS-----	84

Índice de tablas

Tabla 7.1	Velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo del Banco Maestro (BM) y Banco de Trabajo (BT)	45
Tabla 7.2	Velocidades específicas de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (td) y biomasa a las 8 horas de cultivo relacionados al medio de cultivo; Medio Mínimo (MM), Luria Bertani (LB) y Terrific Broth (TB)	52
Tabla 7.3	Velocidades específicas de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo al evaluar el efecto del inductor a concentración 0.2mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I)	56
Tabla 7.4	Velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo registrados para los cultivos llevados a cabo en matraz agitado y biorreactor controlado con tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2	62
Tabla 7.5	Peso obtenido de biomasa húmeda a las 10 horas de cultivo en lote en biorreactor de 1L y peso de cuerpos de inclusión (CI) húmedos derivados de la biomasa	64
Tabla 7.6	Cuantificación de proteína recombinante del concentrado final estabilizado, utilizando software Image J	72

Índice de figuras

Figura 2.1	Plásmido pRARE que proporciona una batería de tRNA no presente de manera natural en <i>E. coli</i> . Tomado de Novagen©-Merck (http://www.merck-chemicals.com.mx)	7
Figura 2.2a	Mapa del plásmido pET-22b de producción para la proteína rPE_PGRS26 adaptado de Novagen©-Merck (http://www.merck-chemicals.com.mx/life-science-research/pet-22b%2B-dna)	9
Figura 2.2b	Esquema simplificado de una región particular del plásmido pET-22b mostrando el gen clonado y otras regiones relevantes	10
Figura 2.3	Cuerpos de inclusión citoplásmicos en <i>E. coli</i> . Adaptada de un trabajo sin publicar de Trujillo-Roldán M.A.	13
Figura 2.4	Diagrama de la estructura molecular evidenciando similitudes entre el β -D-tio-galactósido de isopropilo (IPTG) y alolactosa	15
Figura 2.5	Secuencia peptídica de la proteína PE_PGRS26 nativa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Rv1441c) Secuencia obtenida de Entrez Protein de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)	18
Figura 2.6	Curva de crecimiento microbiano típica, mostrando las diversas fases en el desarrollo de un cultivo, donde “X” representa la concentración de biomasa y “t” el tiempo transcurrido. 1) Fase de latencia 2) Fase de crecimiento exponencial 3) Fase de desaceleración 4) Fase estacionaria 5) Fase de muerte celular	20
Figura 2.7	Balance de materia expresando que la biomasa inicial (X) tras la utilización de sustratos iniciales (S) rinde metabolitos o productos (P) y crecimiento de biomasa (nX)	23
Figura 7.1	Cinéticas de crecimiento de bancos productores en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados a 180 rpm e incubados a 37°C	43
Figura 7.2	SDS-PAGE de las cinéticas de producción	46

características del Banco Maestro (BM) y Banco de Trabajo (BT) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani agitados a 180 rpm e incubados a 37°C. Cada carril indica la producción en un tiempo determinado de cultivo (h). La inducción fue a las 3h. rPE_PGRS se señala con dos flechas negras.

- Figura 7.3** Cinéticas de crecimiento a concentraciones de inductor de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mM, llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados a 180 rpm e incubados a 37°C 49
- Figura 7.4** Comparación en producción tras 4 horas de inducción a concentraciones de inductor 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani agitados e incubados a 37°C. Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa 50
- Figura 7.5** Cinética de crecimiento llevada a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB) y Medio Mínimo (MM) inducidos a 3 horas de cultivo, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. Fue comparada con una cinética bajo las mismas condiciones utilizando medio Luria Bertani (LB) y Medio Mínimo (MM) 51
- Figura 7.6** Comparación en producción de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C a las 4 horas de inducción en medio LB y TB. Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa 53
- Figura 7.7** Cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. Se evaluó el efecto del inductor a concentración 0.2 mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I) 55
- Figura 7.8** Comparación en producción a las 4 horas de inducción para evaluando el efecto del inductor a concentración 0.2 mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I). Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa 57

Figura 7.9	Cinética de producción de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. tras inducción al inicio del cultivo (I/t0) vs un control sin inducir (S/I). La proteína se señala con dos flechas negras	59
Figura 7.10	Cinética de crecimiento de un cultivo en lote inducido al inicio con IPTG a una concentración 0.2 mM de IPTG, en medio Luria Bertani contenido en un biorreactor de 1.0 L. Se llevó un control sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH } 7.5 \pm 0.2$	61
Figura 7.11	Cinética de producción de un cultivo en lote inducido al inicio con IPTG a una concentración 0.2 mM de IPTG, en medio Luria Bertani contenido en un biorreactor de 1.0 L. Se llevó un control sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH } 7.5 \pm 0.2$. La proteína se señala con dos flechas negras	63
Figura 7.12	Electroforesis SDS-PAGE de cuerpos de inclusión (CI) purificados mostrando su grado de pureza y enriquecimiento de rPE_PGRS26	65
Figura 7.13	Cromatograma de purificación FPLC de rPE_PGRS26 a partir de CI obtenidos del biorreactor en lote. (A) representa la proteína no asociada a la resina, (B) la proteína eluída y (C) el gradiente creciente de imidazol	66
Figura 7.14	Dot blot de fracciones de purificación. Los cuadrantes 1-4 y 5-12 corresponden al Pico A y Pico B de la cromatografía (ver Figura 7.13) respectivamente	67
Figura 7.15	Análisis de pureza cualitativo de las 4 fracciones de cromatografía correspondientes al pico de purificación B (ver Figura 7.13)	68
Figura 7.16	Dot Blot del concentrado final estabilizado con Tris-HCl con glicerol al 20%	69
Figura 7.17	Electroforesis SDS-PAGE del concentrado final estabilizado tras el proceso de dializado, renaturalización, purificación y concentración en un sistema Amicon® Ultra (Millipore™) con tamaño de poro de 3000 kDa. Las impurezas presentes se muestran encerradas en óvalos	71

Resumen

Escherichia coli es una bacteria ampliamente utilizada desde ya varias décadas para la sobre-producción de proteínas heterólogas o recombinantes. Una de múltiples variedades disponibles a la fecha, diseñada específicamente para sobre producir proteínas recombinantes es *E. coli* Rosetta (DE3). La gran utilidad de esta cepa radica en que es derivada de cepas BL21 y está diseñada para mejorar la expresión de proteínas recombinantes que contienen codones que rara vez se utilizan en *E. coli*. DE3 hace referencia a que esta cepa porta una copia cromosómica de la T7 RNA polimerasa del fago λ DE3 bajo control del promotor lacUV5, mejorando así la expresión de proteínas recombinantes contenidas en vectores que portan el promotor T7. El presente proyecto utiliza la cepa antes mencionada para producir la proteína recombinante PE_PGRS26 (rPE_PGRS26) de *Mycobacterium tuberculosis*, posible candidata para elaboración de vacunas y *kits* diagnóstico.

El diseño experimental se llevó a cabo inicialmente en matraces agitados de 250 mL conteniendo 50 mL de medio Luria Bertani (LB). Se generó un Banco Maestro (BM) a modo de reserva a largo plazo y derivado de éste, un Banco de Trabajo (BT) para desarrollar el protocolo experimental, ambos para ser almacenados a -80°C. Posteriormente, se buscó evaluar el grado de similitud entre ambos bancos en cuanto a nivel de sobre-expresión dado que el proceso de congelamiento y descongelamiento podrían haber afectado su comportamiento. No se encontraron diferencias importantes en cuanto a la producción de la proteína ni en cuanto a

crecimiento para considerar que se afectó de manera importante al microorganismo en el proceso. Posteriormente, se evaluaron 4 concentraciones diferentes de inductor (IPTG) siendo 0.2, 0.5, 1 y 2 mM para encontrar la mejor para sobre expresar proteína a menor costo posible. Se encontró que aún a la concentración 0.2 mM, se aprecia la sobre-expresión y no aumenta de manera medible tras añadir concentraciones más elevadas. Considerando lo anterior, se evaluaron 3 medios de cultivo diferentes buscando aquel que lograra mejorar la sobre-expresión y permitiera mayor generación de biomasa. Un Medio Mínimo (MM) conteniendo sales, vitaminas y glucosa como fuente de carbono fue comparado con un medio complejo como el LB y uno enriquecido como el Terrific Broth (TB). La importancia del MM radica en que al permitir un crecimiento lento y controlado únicamente por adición de fuente de carbono, se pueden alcanzar concentraciones de biomasa mayores que en medios ricos, permitiendo modalidades de cultivo en lote (CL) y en lote alimentado con fuente de carbono (CLA) aumentando al mismo tiempo la sobre expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, en el MM no se presentó crecimiento mientras que en el medio TB se propició un desarrollo más abundante (2.31 ± 0.001 AU) comprometiendo la producción de rPE_PGRS26. De los tres medios evaluados, el LB propició una generación de biomasa moderada (1.350 ± 0.040 AU), con una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0.88 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ pero la sobre-expresión más importante. La mejor edad de cultivo para inducir, a la concentración de IPTG y en el mejor medio de cultivo, fue evaluada en dos etapas bien definidas, tanto al comienzo como al final de la fase exponencial de

crecimiento. Se encontró que la inducción temprana al inicio de la fase exponencial mejoraba los niveles de expresión de rPE_PGRS26.

El escalamiento a un biorreactor de 1L, manteniendo las mejores condiciones encontradas en la caracterización en matraces agitados, fue manejado en la modalidad de CL. Se ejerció un control sobre la temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, el pH a 7.2 ± 0.2 y tensión de oxígeno disuelto (TOD) por arriba del 30% mediante control por agitación. El crecimiento en el reactor sigue una tendencia similar que el matraz, aunque el crecimiento en el reactor fue 30% mayor y casi 25% más rápido, pero no se registró un cambio importante en los niveles de expresión. Se llevó a cabo de igual manera un solo cultivo en un biorreactor de 10L a modo de ensayo preliminar para futuros cultivos a mayor escala, con la finalidad de obtener suficientes cuerpos de inclusión para posteriores purificaciones.

A partir de la biomasa generada en el biorreactor de 1L se obtuvieron cuerpos de inclusión conteniendo la proteína de interés y representando cerca del 25% de la biomasa húmeda total. Partiendo de proteína resolubilizada y desnaturalizada proveniente de los cuerpos de inclusión se efectuó un paso de cromatografía de afinidad con níquel en una resina de sefarosa (puesto que rPE_PGRS26 cuenta con un tallo de Histidinas), obteniéndose la proteína con un valor superior al 70% de pureza. La proteína purificada fue dializada y concentrada mediante centrifugaciones consecutivas en un Amicon® Ultra (Millipore™) con tamaño de poro de 3 KDa en buffer Tris-HCl con glicerol al 20% y pH de 8.0, logrando estabilizarla durante más de 4 semanas y permitiendo su uso para estudios inmunogénicos posteriores.

1. Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que puede llegar a afectar tanto pulmones, bazo o meninges y es causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes a un grupo llamado Complejo *Mycobacterium Tuberculosis*, que además de incluir a *Mycobacterium tuberculosis*., agrupa a otras especies. La especie más importante y representativa causante de tuberculosis es el *M. tuberculosis* siendo la manifestación pulmonar la más común y contagiosa (WHO, 2008). Aunque se relaciona importantemente con condiciones de pobreza extrema, se cree que cerca de un tercio de la población global se encuentra infectada (WHO, 2008).

Se estima que entre el año 2000 y 2020, aproximadamente 35 millones de personas morirán si no se mejoran tanto la inmunización como el diagnóstico (WHO, 2008). La primera vacuna contra tuberculosis se desarrolló en 1921, siendo ésta una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* y conocida como BCG o bacilo Calmette-Guerín (Calmette, 1927). Sin embargo, las estadísticas demuestran que en adultos tiene una eficacia que oscila desde el **80%** hasta la nulidad (Rodrigues y Smith, 1990). Considerando las estadísticas anteriores, se vuelve una tarea importante el encontrar alternativas nuevas de diagnóstico durante etapas activa o latente de la enfermedad, inmunización activa y drogas de última generación, que ayuden a combatir la epidemia de tuberculosis. Recientemente, se ha encontrado una familia de proteínas denominada PE y la subfamilia PE_PGRS principalmente encontradas en micobacterias patógenas no atenuadas como *M. bovis* (Garnier et

al., 2003) y *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998; Fleischmann *et al.*, 2002). La mencionada familia de proteínas han sido utilizadas como marcadores genéticos de polimorfismo en estudios epidemiológicos (Espitia *et al.*, 1999) y puede llegar a ser parte de un cóctel protéico que funcione como vacuna innovadora contra *M. tuberculosis* y *M. bovis* o un método diagnóstico eficaz para detectar tanto infecciones activas como latentes.

Este proyecto plantea el uso de *Escherichia coli* Rosetta DE3 como modelo en la producción de la proteína recombinante PE_PGRS26 (rPE_PGRS26) de *M. tuberculosis*, comenzando por la caracterización del sistema en matraces agitados, para posteriormente llevar a cabo un escalamiento a un biorreactor de 1L con pH, temperatura y oxígeno disuelto controlados. La gran utilidad de estas cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) radica en que son derivadas de cepas BL21 y están diseñadas para mejorar la expresión de proteínas recombinantes que contienen codones que rara vez se utilizan en *E. coli*, mejorando así la producción de proteínas heterólogas.

2. Antecedentes

2.1 Biosíntesis de proteínas heterólogas en *Escherichia coli*

En la actualidad, la expresión de proteínas recombinantes es una técnica ampliamente usada para obtener cantidades importantes de proteínas (Yee y Blanch, 1992; Aldor *et al.*, 2005; Babaeipour *et al.*, 2008). La primera proteína

heteróloga que apareció en el mercado fue la insulina humana en 1982, desarrollada bajo la firma Eli Lilly (FDA, 2010).

Escherichia coli es uno de los organismos de elección para producir proteínas recombinantes dado su rápido y abundante crecimiento en sustratos económicos, el amplio conocimiento de su genética y la gran diversidad de vectores, mutantes disponibles (Baneyx, 1999) y fáciles procesos de escalamiento (Baneyx y Mujacic, 2004). En la producción de proteínas recombinantes que no tengan modificaciones post-traduccionales y que se sinteticen intracelularmente, la especie de mayor uso es *E. coli* (Schmidt *et al.*, 1999; Bäcklund *et al.*, 2008), ya que es una bacteria bien conocida y fácil de trabajar.

Existen tres zonas en las cuales se puede localizar finalmente una proteína heteróloga recién sintetizada, dos dentro de la bacteria (citoplasma y periplasma) o bien puede ser excretada al medio externo (Choi *et al.*, 2006).

La excreción ocurre en muy bajos niveles y es dirigida por fenómenos tales como: debilitamiento de la pared y membrana celulares por métodos físicos o químicos, utilización de la porina OmpF o sistema de transporte de hemolisina, entre otros (Choi *et al.*, 2006). La localización periplásmica se ve favorecida con el uso de señales incluidas en el vector como pelB, OmpA, endoxilanasas, PhoA, entre otros (Choi *et al.*, 2006). Tanto dentro del periplasma como del citoplasma se puede promover la generación elevada de proteína en cuerpos de inclusión o bien producción moderada como proteína soluble (Choi *et al.*, 2006). Para generar cuerpos de inclusión se suele elevar la temperatura del cultivo, añadir moderada o elevada cantidad de inductor, incluir fuertes promotores en los vectores, emplear

cepas que tiendan a generar cuerpos de inclusión, entre otras alternativas (Choi *et al.*, 2006).

Este proyecto plantea el uso de *E. coli* Rosetta DE3 como modelo en la producción de la proteína recombinante PE-PGRS26. Esta cepa contiene el plásmido pRARE (**Figura 2.1**) con información para dichos codones de tRNA en *E. coli* (proL, leuW, argW, glyT, argU e ileX), replicón autónomo (P15Aori) y resistencia a cloranfenicol (*Cam*).

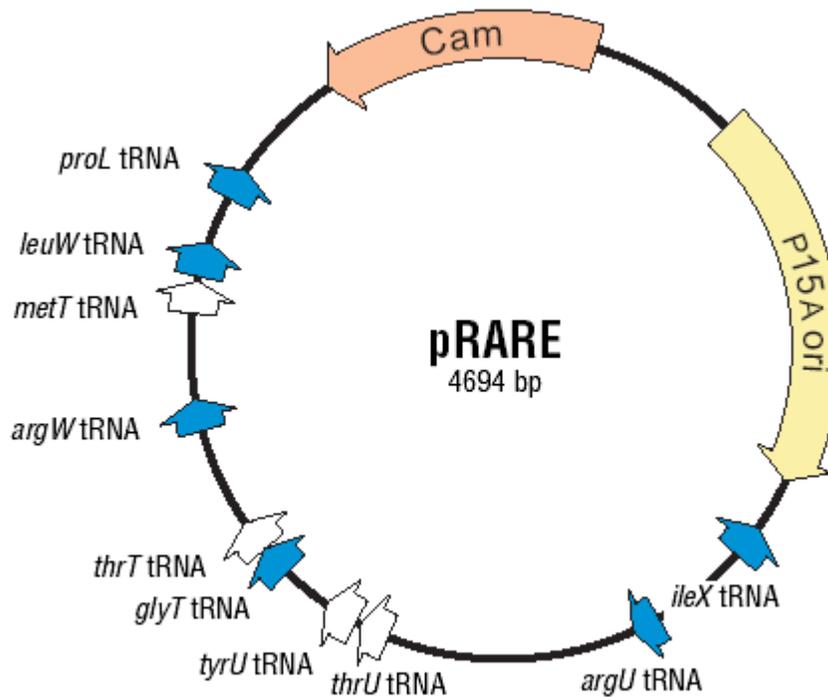


Figura 2.1 Plásmido pRARE que proporciona una batería de tRNA no presente de manera natural en *E. coli*. Tomado de Novagen©-Merck (<http://www.merck-chemicals.com.mx>)

DE3 hace referencia a que esta cepa porta una copia cromosómica de la T7 RNA polimerasa del fago λ DE3 bajo control del promotor lacUV5. Dicha enzima es más eficaz y veloz que la propia polimerasa de la bacteria cuando se asocia su propio promotor T7 (Tabor y Richardson, 1985) ubicado en un plásmido pET inducible por IPTG presente en *E. coli* Rosetta (DE3).

2.2 Plásmido pET-22b

El plásmido pET-22b (figura 2.2a) utilizado en este proyecto porta una señal amino terminal *pelB* (22 aminoácidos, ~4 a 5 kDa) para potencial relocalización periplásmica de la proteína de interés, además cuenta con una secuencia His•Tag[®] carboxilo terminal para facilitar el proceso de purificación (figura 2.2b). La secuencia se encuentra numerada bajo la convención pBR322, así que la región de expresión T7 se encuentra al revés en el mapa del vector (Novagen©-Merck). Una cantidad relativamente pequeña de T7 RNA polimerasa es suficiente para generar una abundante transcripción de genes bajo un promotor específico para T7 (Studier y Moffatt, 1986). Tal transcripción puede continuar durante mucho tiempo en un mismo plásmido sin que se termine y opaque la actividad de la RNA polimerasa bacteriana. Al tener un plásmido con el gen clonado de interés, se asegura que la proteína a producir sea casi inexistente si no hay inducción en casos donde la toxicidad es importante (Studier y Moffatt, 1986). Si el gen estuviera directamente clonado en el cromosoma bacteriano sin la presencia de un plasmido pET, la cantidad mínima basal de T7 RNA polimerasa sería capaz de mediar la producción de la proteína de interés y no se estaría controlando

correctamente la producción. Por otra parte, si hay toxicidad por parte del producto se tendrían consecuencias graves o se perderían plásmidos adicionales pues se volverían inestables (Studier y Moffatt, 1986). Este plásmido posee un marcador de resistencia a ampicilina, aunque se puede llegar a utilizar carbenicilina que es degradada más lentamente.

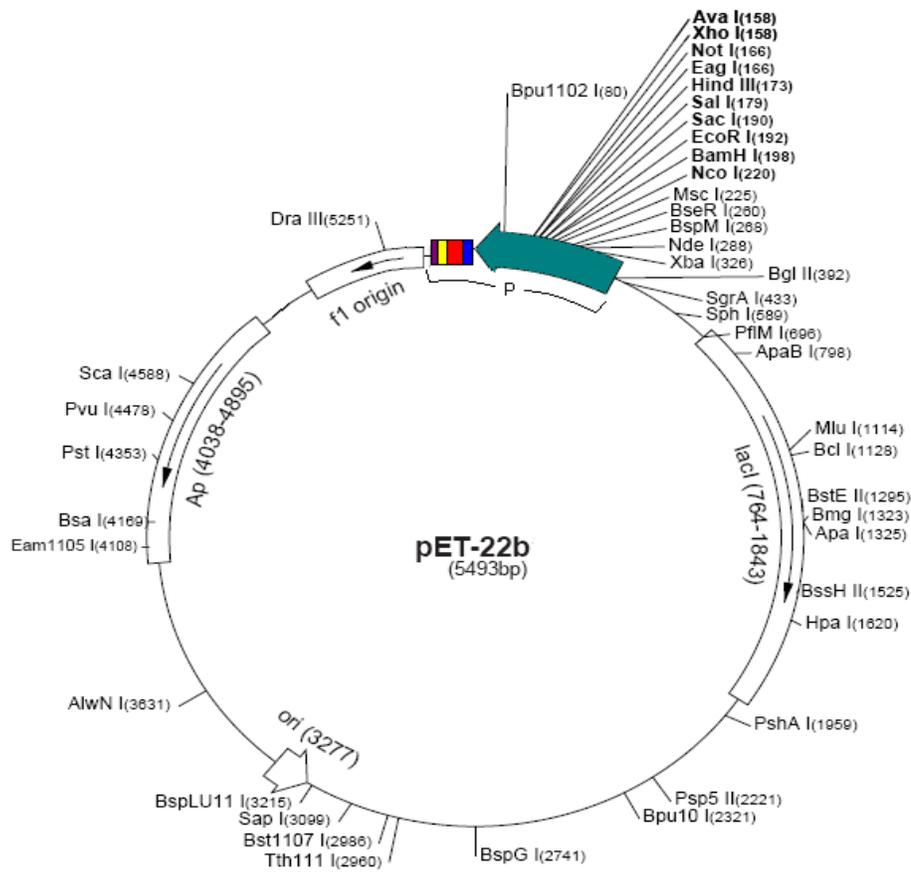


Figura 2.2a Mapa del plásmido pET-22b de producción para la proteína rPE_PGRS26 adaptado de Novagen©-Merck (www.merck-chemicals.com.mx/life-science-research/pet-22b%2B-dna)

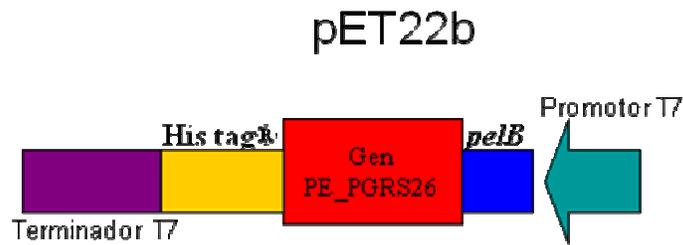


Figura 2.2b Esquema simplificado de la región P del plásmido pET-22b (**Figura 2.2a**) mostrando el gen clonado y otras regiones relevantes

2.3 Tallo de Histidinas

La secuencia de poli histidina His-tag® (6,8 ó 10 residuos consecutivos) contenida en una infinidad de plásmidos diferentes para producción de proteínas de interés, se une a cationes divalentes como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} inmovilizados previamente en resinas quelantes permitiendo rendimientos de purificaciones de hasta el 95% (Hengen, 1995). Los extractos de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* son hechos pasar por una resina de agarosa conteniendo níquel o cualquier otro catión de los mencionados anteriormente. Una vez que la secuencia de poli histidina presente en la proteína a purificar se ha unido a la matriz, ésta puede eluirse mediante el paso de soluciones de cloruro de amonio, glicina, histidina, imidazol, EDTA o diversos iones que compitan en afinidad (Hengen, 1995).

Este procedimiento versátil permite purificación de proteínas bajo condiciones no desnaturizantes o en presencia de urea o guanidina (Hengen, 1995).

2.4 Metabolismo de *Escherichia coli*, síntesis de ácidos orgánicos y su efecto en la productividad de proteínas recombinantes

Los medios de cultivo utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen típicamente altas concentraciones de glucosa (Brown *et al.*, 1985). El crecimiento de *E. coli* bajo condiciones propicias dadas por abundancia de fuente de carbono y oxígeno, provoca la síntesis exagerada de metabolitos derivados de ácidos orgánicos, de los cuales el acetato es el más abundante (Allen y Luli, 1987). Dichas condiciones son prevalentes y de suma importancia en los cultivos aerobios en lote con medios de cultivo ricos donde no se suministra la fuente de carbono de manera limitante (Landwall y Holme, 1977). La presencia de acetato en el medio de cultivo provoca inhibición del crecimiento e incluso disminución en la producción de síntesis de proteínas recombinantes (Brown *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1984) haciendo necesaria la implementación de nuevas estrategias de cultivo, como el cultivo en lote alimentado (CLA) para evitar la sobreproducción de acetato. En el caso particular de la producción de glicina oxidasa de *Bacillus subtilis* producida en *E. coli* Rosetta (DE3) mediante un CLA, se logró aumentar la densidad celular y producción respecto a medios convencionales como Terrific Broth (TB) y Luria Bertani (LB) al emplear un Medio Mínimo (MM). Dicho medio es más pobre pero minimiza el sobreflujo metabólico promoviendo un crecimiento más lento, generando más biomasa al final de un cultivo largo, disminuyendo la acumulación de acetato y otros ácidos orgánicos, reduciendo costos para producción a gran escala (Martínez-Martínez *et al.*, 2007).

2.5 Los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión (CI) son agregados de proteína no estructurada de 0.5 a 1.3 μm de diámetro, fácilmente visibles bajo el microscopio convencional y separables mediante centrifugación a alta velocidad, logrando así procesos de purificación relativamente más sencillos y baratos (Kane y Hartley, 1988; Singh y Panda, 2005).

La sobre-producción de una variedad amplia de proteínas recombinantes en *E. coli* suele manifestarse con la generación de cuerpos de inclusión (Kane y Hartley, 1988) o como presencia de proteína soluble pero en bajas cantidades (Choi *et al.*, 2006). *E. coli* se utiliza ampliamente en la producción de proteínas que no requieren modificaciones postraduccionales como glicosilaciones (Singh y Panda, 2005).

Al encontrarse desnaturalizada y en agregados grandes, la proteína heteróloga sufre menor degradación por parte de las proteasas (Kane y Hartley, 1988), aunque para recuperar la actividad de las proteínas heterólogas producidas sea necesario solubilizarlas, renaturalizarlas y purificarlas, muchas veces perdiendo la actividad biológica en el proceso (Singh y Panda, 2005).

A pesar de lo anterior, resulta muy difícil predecir cuales proteínas heterólogas tenderán a acumularse en cuerpos de inclusión. En un estudio en el que se produjeron diversas proteínas heterólogas en *E. coli*, no se encontró relación alguna entre la formación de CI y el origen, el promotor ni la hidrofobicidad de la proteína (Kane y Hartley, 1988).

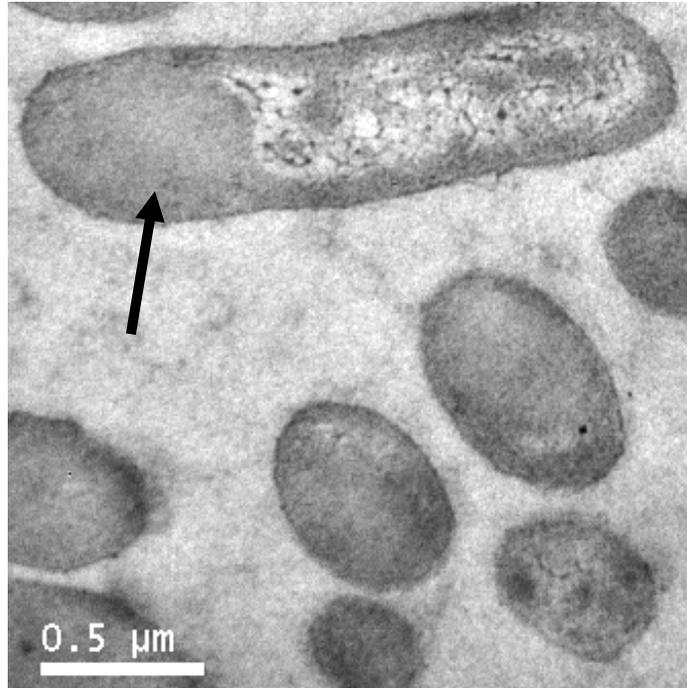


Figura 2.3 Cuerpos de inclusión citoplásmicos en *E. coli*. Tomada de un trabajo sin publicar de **Trujillo-Roldán M.A.**

2.6 Operon Lac

El operón lac se encuentra bajo un tipo de regulación negativa, donde los genes pueden transcribirse siempre, salvo cuando la proteína represora Lac I se encuentra unida a la región operadora, por la cual presenta una elevada afinidad (Gardner *et al.*, 2009). En este caso, el promotor del gen *lac I* es constitutivo, por lo que la proteína Lac I se expresa permanentemente y permanece unida en forma de tetrámero a la zona operadora, impidiendo la transcripción de los genes estructurales (Gardner *et al.*, 2009). El operón lac presenta una expresión basal, al igual que la mayoría de los operones. Esto quiere decir que, en ausencia de inductor, el operón puede expresar los genes estructurales en muy baja

concentración y así mantener unas bajas concentraciones de β -galactosidasa y de permeasa. La permeasa permitirá que pueda entrar inicialmente la lactosa en la bacteria y la β -galactosidasa permitirá transglicosilar la lactosa y transformarla en alolactosa (Gardner *et al.*, 2009).

Este sistema fácilmente controlable ha sido ampliamente utilizado desde hace varias décadas para producir proteínas, tanto heterólogas como nativas, en *Escherichia coli* y en otros organismos (Baneyx y Mujacic, 2004).

2.7 IPTG (β -D-tio-galactósido de isopropilo)

Suele utilizarse como inductor artificial del operón *lac*, sustituyendo a la alolactosa, ya que es capaz de unirse al represor LacI, pero no es un sustrato para la β -galactosidasa y no puede ser metabolizado por la bacteria por lo que se dice que es un inductor gratuito, ideal para generación de proteínas recombinantes (Gardner *et al.*, 2008). Muchos autores reportan que dicho inductor es capaz de promover buena producción de proteínas recombinantes a concentraciones variables desde 0.1 mM a 2 mM por lo que es aconsejable caracterizar el propio sistema de trabajo (Yee y Blanch, 1992). El IPTG es ampliamente utilizado en laboratorios de investigación a escalas pequeñas pero por tener un costo que oscila entre 429 a 309 USD por 100 g (Biocompare, 2010) su uso industrial o a mayores escalas es limitado.

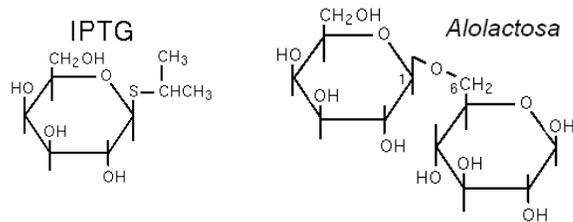


Figura 2.4 Diagrama de la estructura molecular evidenciando similitudes entre el β-D-tio-galactósido de isopropilo (IPTG) y alolactosa.

2.8 Las proteínas PE_PGRS

La familia de genes PE_PGRS de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* comprende cerca de 63 genes que se encuentran dispersos por todo el genoma bacteriano (Dheenadhayalan *et al.*, 2006). Dichos genes no se encuentran en otras micobacterias como *M. avium* o *M. smegmatis*. Hay evidencia respecto a que las proteínas PE_PGRS se encuentran presentes en la superficie micobacteriana (Banu *et al.*, 2002, Delogu *et al.*, 2004) mediando de alguna manera la interacción con las células eucariontes del hospedero (Delogu y Brennan, 2001).

Los dominios PE de dichas proteínas presentes en *M. tuberculosis* H37Rv se encuentran codificados en genes conteniendo secuencias homólogas. Estos dominios PE tienen presentes, en la mayoría de los casos, como característica primordial prolina (P) y ácido glutámico (E) (PE) cerca del amino terminal en la posición 8 y 9. La familia multigénica PE consta de 99 miembros aproximadamente (Cole *et al.*, 1998).

En el caso de las proteínas PE_PGRS, el dominio PE se encuentra unido a otro denominado PGRS, descubierto en *M. tuberculosis* H37Rv de aislados clínicos

(Cole *et al.*, 1998). Este dominio ha sido descrito como una región polimórfica conteniendo casi 40% glicina (G) y 25% alanina (A). Las secuencias repetitivas ricas en GA siguen un patrón GGAGGX (donde X puede ser cualquier aminoácido). La familia PE_PGRS, única para micobacterias constituye cerca del 5% del genoma total de *M. tuberculosis* (Flores y Espitia, 2003). Los genes PGRS codifican para proteínas que van desde los 170 aminoácidos hasta 550 en promedio (Brennan y Delogu, 2002).

Se ha propuesto que estas proteínas están involucradas en procesos de replicación intracelular en los macrófagos (Ramakrishnan *et al.*, 2000) o bien pueden funcionar como adhesinas (Delogu y Brennan, 2001; Brennan y Delogu, 2002) e interferir con el procesamiento de antígeno (Brennan y Delogu, 2002). Existen a su vez algunos reportes de la posibilidad de que estas proteínas estén ancladas a la superficie bacteriana (Banu *et al.*, 2002), que actúen como una fuente de variabilidad antigénica y posiblemente representen un mecanismo de evasión al sistema inmunológico del enfermo (Cole, 1998). Incluso podrían ser proteínas captadoras de calcio impidiendo la maduración del fagosoma en el macrófago derivando en una internalización y persistencia (Dheenadhayalan *et al.*, 2006). Se ha reportado que la expresión proteínas PE_PGRS en *M. smegmatis*, una cepa que normalmente no contiene genes PE_PGRS, incrementa la persistencia de la micobacteria recombinante en macrófagos y en tejidos de ratón (Dheenadhayalan *et al.*, 2006). A su vez, se ha reportado alguna evidencia de que ciertos genes de PE_PGRS son expresados específicamente en granulomas infectados con *M. marinum* (Ramakrishnan *et al.*, 2000).

La expresión diferencial de proteínas PE_PGRS entre cepas de *M. tuberculosis* aisladas de casos clínicos así como diferencias en crecimiento bajo las mismas condiciones de cultivo *in vitro* (Flores y Espitia, 2003) e *in vivo* (Delogu *et al.*, 2006) sugieren que la capacidad adaptativa del microorganismo permite evadir al sistema inmunológico del enfermo, reinfectar una población anteriormente expuesta y puede ser un problema cuando se busca la generación de vacunas (Dheenadhayalan *et al.*, 2006).

2.9 La proteína PE_PGRS26

La proteína PE_PGRS26 (Rv1441c) es un miembro típico y representativo de más de 60 proteínas de la familia PE_PGRS. PE_PGRS26 parece estar implicada de manera directa junto con otras proteínas de la familia en la evasión del microorganismo de la respuesta inmune en el estadio de latencia y como posible marcador de la infección latente por la bacteria (Dheenadhayalan *et al.*, 2006). Estudios en una población de 200 aislados clínicos diferentes de personas infectadas con *M. tuberculosis* en estado de latencia revelan que el gen Rv1414c que codifica para PE_PGRS26 es capaz de ser modificado en su secuencia en un 50% de los casos analizados. Dicho porcentaje muestra a su vez cerca de 40 tipos diferentes de modificaciones sugiriendo una vez más el papel de esta proteína en particular en la evasión al sistema inmune (Talarico *et al.*, 2008) y quizás por esa misma razón demuestre ser altamente inmunogénica. En la **Figura 2.5** se muestra la estructura primaria de la proteína PE_PGRS26 de *M tuberculosis* H37Rv conteniendo un residuo P cerca del extremo amino terminal en posición 8 y abundancia de residuos GA.

```
MSNVMVVPGMLSAAAADVASIGAALSAANGAAAPTTAGVLAAGADEVS
AAIASLFSGYARDYGALSAQMARFHQQFVQALTASVGSYAAAEANAS
PLQALEQQVLAAINAPTQTLLGRPLIGNGADGLPGQNGGAGLLWGN
GGNGGAGDAAHPNGGNGGDAGMFGNGGAGGAGYSPAAGTGAAGG
AGGAGGAGGWLSGNGGAGGNGGTGASGADGGGGLPPVPASPGGN
GGGDAGGAAGMFGTGGAGGTGGDGGAGGAGDSPNSGANGARGG
DGGNGAAGGAGGRLFNGGAGGNGGTAGQGGDGGTALGAGGIGGDG
GTGGAGGTGGTAGIGGSSAAGGAGGDGGAGGTGGGSSMIGGKGGT
GGNGGVGGTGGASALTIGNGSSAAGGAGGAGGTGGTGYIESLDGKG
QAGNGGNGGNGAAGGAGGGGTGAGGNGGAGGNGGDGGPSQGGG
NPGFGGDGGTGGPGGVGVPDGIGGANGAQQGKHG
```

Figura 2.5 Secuencia peptídica de la proteína PE_PGRS26 nativa de *M. tuberculosis* H37Rv (Rv1441c) Secuencia obtenida de Entrez Protein de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)

Recientemente se ha trabajado con vacunas de ADN de genes de PE_PGRS26, 16 y 33 para tratar de inmunizar ratones de laboratorio y mostrar resistencia contra un modelo de contaminación por tuberculosis en aerosol sin éxito (Singh *et al.*, 2008).

2.10 Bioingeniería y bioprocesos

2.10.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano o generación de biomasa es el aumento del número de microorganismos en el tiempo, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo, sino al de la población en general (Schlegel, 1997). El ciclo celular es el proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del ADN, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento y su división por bipartición para dar lugar a dos células hijas (Schlegel, 1997). Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y alargándose y otras que están iniciando la división celular (Freeman, 1986).

El crecimiento de un cultivo bacteriano se aprecia más claramente cuando se grafica el logaritmo del número de células viables respecto al tiempo. Una curva de crecimiento típica (**Figura 2.6**) tiene un aspecto sigmoideo y permite diferenciar las diferentes fases de crecimiento que se presentan en un cultivo (Schlegel, 1997). Las siguientes fases descritas se pueden distinguir en la **Figura 2.6**.

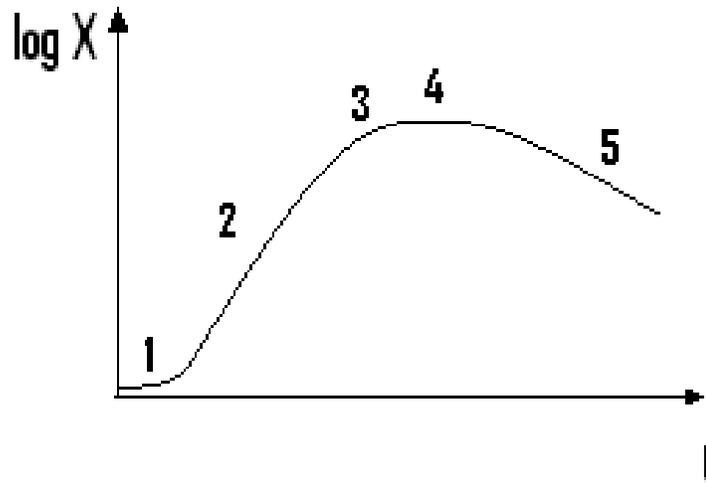


Figura 2.6 Curva de crecimiento microbiano típica, mostrando las diversas fases en el desarrollo de un cultivo, donde “X” representa la concentración de biomasa y “t” el tiempo transcurrido. 1) Fase de latencia 2) Fase de crecimiento exponencial 3) Fase de desaceleración 4) Fase estacionaria 5) Fase de muerte celular

1. *Fase de latencia*: Abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de la facilidad del microorganismo de desarrollarse en cierto medio de cultivo. Si el inóculo procede de un cultivo previo viejo (fase estacionaria de crecimiento) la célula tiene que adaptarse primero a las nuevas condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas. Si las fuentes de energía y de carbono del nuevo medio de cultivo se diferencian de las del cultivo previo, la adaptación a las nuevas

condiciones va ligada frecuentemente a una nueva síntesis de enzimas que no eran necesarias en el cultivo previo (Schlegel, 1997).

2. *Fase de crecimiento exponencial*: La fase de crecimiento exponencial se caracteriza por una reproducción en el tiempo más breve posible (dependiendo de cada microorganismo) y constante. El tiempo de generación durante el crecimiento exponencial es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio y/o condiciones ambientales. La velocidad específica de crecimiento (μ) se define en esta misma fase debido a la relativa constancia en crecimiento durante esta fase. La fase exponencial de crecimiento permite a su vez, el estudio de la influencia de factores ambientales (pH, potencial redox, temperatura, aireación, etc.) así como la utilización de diversos sustratos. Las condiciones ambientales que repercuten sobre el crecimiento son temperatura, oxígeno disuelto, pH y disponibilidad de nutrientes principalmente (Schlegel, 1997).

3. *Fase de desaceleración*: Es la fase de transición que existe cuando la duplicación constante y uniforme característica de la fase exponencial deja de serlo, provocando heterogeneidad en la duplicación y metabolismo en la población microbiana. La velocidad específica de crecimiento es dependiente de la concentración de sustrato, al comenzar a disminuir la concentración de sustrato, el crecimiento decrecerá hasta cesar completamente tras el total consumo del sustrato limitante o experimentar

fenómenos diversos, como represión metabólica. La transición de la fase exponencial a la estacionaria tiene lugar por tanto paulatinamente. Cierta porción de la población comienza a entrar en fase estacionaria mientras otras continúan reproduciéndose (Schlegel, 1997).

4. *Fase estacionaria*: La fase estacionaria ocurre cuando las células mueren y se duplican a una tasa similar. Además de la disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de O₂ baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer disminuir la tasa de crecimiento llevar a fase estacionaria. En la fase estacionaria pueden utilizarse aún materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. Sólo las células muy sensibles mueren rápidamente. En muchos procesos microbianos de producción enfocados a la formación de un metabolito secundario (no esencial para el desarrollo del microorganismo), la fase estacionaria es la verdadera fase productiva. Por ello, en biotecnología se diferencia una trofofase (fase de nutrición o crecimiento) y una idiofase (fase de producción). A pesar de que las células no crezcan durante la idiofase, la presencia de sustratos repercute en la generación de productos de interés (Schlegel, 1997).

5. *Fase de muerte celular*: La fase de muerte y las causas de la muerte de las células bacterianas en soluciones nutritivas normales suelen ser complejas y a veces dependen de la naturaleza de cada microorganismo. Se sabe que

en el caso de *Escherichia* y *Lactobacillus*, cuando se acumulan demasiados ácidos orgánicos productos del metabolismo, se eleva la toxicidad y se promueve fase estacionaria y posteriormente muerte. El número de células viables puede descender exponencialmente. En algunos casos las células pueden lisarse por acción de las propias enzimas y mecanismos celulares. (Schlegel, 1997).

Parte de los nutrientes o sustratos asimilados por los microorganismos son aprovechados en la generación de energía química y biosíntesis de diversos metabolitos. Se puede entonces expresar el aumento de biomasa en cierto tiempo con un simple balance de materia mostrado en la **figura 2.7**:

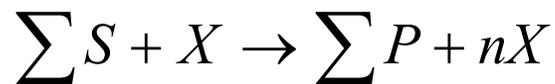


Figura 2.7 Balance de materia expresando que la biomasa inicial (X) tras la utilización de sustratos iniciales (S) rinde metabolitos o productos (P) y crecimiento de biomasa (nX) (Shuler y Kargi, 2008)

2.10.2 Métodos de cuantificación de biomasa

Existen dos grupos grandes de métodos de evaluar el aumento de biomasa:

Métodos directos (suelen ser más rápidos y fáciles) y métodos indirectos. Los métodos directos son útiles cuando se tiene una suspensión homogénea de

células, el medio es líquido poco viscoso y no hay otros sólidos en el medio (Shuler y Kargi, 2008):

- Peso seco
- Peso húmedo
- Volumen celular empacado

Métodos indirectos cuando no es posible efectuar los directos o bien se llevan a cabo por cuestiones de practicidad (Shuler y Kargi, 2008):

- Absorción de luz por células en suspensión o densidad óptica a 600 nm (D.O.)
- Cuantificación de componentes relacionados a la biomasa: DNA, RNA, ATP y proteínas o metabolitos, etc.

2.10.3 Modelo cinético de Monod y la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento de un microorganismo (μ) es el cambio en el número de células o biomasa (X) en el tiempo (t) y es función de la concentración de un sustrato limitante cuando los demás se encuentran en exceso por arriba de las necesidades del microorganismo y éste se encuentra creciendo exponencialmente.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \longrightarrow \quad \int_{X_0}^{X_i} \frac{dX}{X} = \mu \int_{t_0}^t dt$$

Tras la integración de la expresión que define el cambio en el número de células respecto al tiempo, μ se puede calcular a partir de las densidades bacterianas o biomasa X_0 y X_i en los tiempos t_0 y t y tiene unidades de $[h^{-1}]$

$$\mu = \frac{\log X_i - \log X_0}{\log e(t - t_0)} = \frac{\ln X_i - \ln X_0}{(t - t_0)}$$

Ecuación 1. Ecuación que define un valor para la velocidad específica de crecimiento (μ) como la pendiente de una recta, función de la biomasa (X) y el tiempo (t) durante la fase exponencial de crecimiento (Schlegel, 1997)

Se grafica la linearización del crecimiento durante la etapa exponencial mediante logaritmo natural de la biomasa generada o densidad óptica y posteriormente se obtiene la pendiente de dicha curva, siendo ese valor el más aproximado a μ (Shuler y Kargi, 2008). El tiempo de duplicación (td) se deriva de μ y se refiere al tiempo en horas en el que una célula madre da lugar a dos células hijas (Schlegel, 1997).

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 2. Definición del tiempo de duplicación td y su relación con la velocidad específica de crecimiento μ

2.11 Biorreactores

Un biorreactor es un contenedor o sistema de cualquier tamaño, que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un contenedor en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos (Doble y Gummadi, 2007). Este proceso puede ser aerobio o anaerobio. Un biorreactor puede ser también un dispositivo o sistema empleado para crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular (Doble y Gummadi, 2007).

Entre las características que debe reunir un biorreactor se encuentran: Calidad de mezclado, altas velocidades de transferencia de masa, factibilidad técnica y económica en construcción de unidades de gran volumen, bajos costos de operación y mantenimiento y operación aséptica o estéril (Vázquez, 2007).

Las funciones características que realiza el biorreactor involucran el mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación, mantener constante y homogénea la temperatura, minimizar los gradientes de concentración de nutrientes y suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo (Doble y Gummadi, 2007). El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado (Doble y Gummadi, 2007).

2.12 Tipos de cultivo en biorreactores

2.12.1 El cultivo en Lote (CL)

Se refiere a un cultivo celular en un reactor con una carga inicial de medio que no será alterada por la adición o remoción de nutrientes u otros elementos.

El reactor se carga con el medio de cultivo y se inocula, a medida que se lleva a cabo el cultivo, cambian las condiciones al consumirse los sustratos, formándose biomasa y metabolitos. Cuando se ha alcanzado la producción requerida o se ha investigado el fenómeno de interés, se vacía el reactor, se limpia y el proceso se repite de ser necesario. Es la forma de cultivo más simple que se hace tanto a escala laboratorio como a nivel industrial (Doble y Gummadi, 2007). En este tipo de cultivo se sigue el patrón de crecimiento explicado en la **Figura 2.6** mostrada anteriormente.

2.12.2 Cultivo en lote alimentado (CLA)

Es un proceso de cultivo al que se suministra un flujo de sustrato y/o nutrientes (fuente de carbono usualmente) de manera continua o variable, constante o no, de manera limitante fijando un crecimiento deseado modulando la velocidad específica de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos de interés (Cinar *et al.*, 2003). Se parte de un cultivo en lote típico para posteriormente iniciar una alimentación controlada con flujo de fuente de carbono, sustrato o mezcla de sustratos, a cierta concentración cuando la fuente inicial de carbono se haya agotado o se alcance una cantidad de biomasa o velocidad específica de crecimiento deseada. En los CLA no existe una corriente de salida de medio de cultivo, como consecuencia, habrá un aumento de volumen del medio en el reactor (Vázquez y Orozco, 2007). El CLA elimina problemas de

represión de síntesis de producto por glucosa y problemas de limitación del crecimiento celular por exceso de sustrato.

El crecimiento exponencial se puede llegar a mantener por un tiempo mayor al de un cultivo en lote normal, pero al presentarse condiciones de estrés como utilización total de la cantidad de nutrientes o acumulación de metabolitos tóxicos, se llegará a la muerte del cultivo (Vázquez y Orozco, 2007).

3. Justificación

Este proyecto pretende caracterizar y establecer un proceso donde se obtengan altas cantidades de proteína recombinante (rPE_PGRS26) para ser empleada en proyectos y ensayos inmunológicos como parte de la investigación sobre *Mycobacterium tuberculosis* tratando de generar vacunas y/o sistemas de diagnóstico innovadores necesarios.

4. Hipótesis

Medios que propicien un lento crecimiento de *E. coli* como el MM, así como una inducción al final de la etapa exponencial de crecimiento, promoverán una mejor producción de la proteína rPE_PGRS26. La producción será mayor en reactores de 1.0 L controlados y a su vez mayor en CLA.

5. Objetivos

5.1 General

Evaluar diversas condiciones en cultivos sumergidos de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) Novagen®, con plásmido de producción pET22b, encontrando las determinantes para la mayor producción de la proteína recombinante PE_PGRS26 de *Mycobacterium tuberculosis*.

5.2 Particulares

- Generar un Banco Maestro (BM) con la finalidad de preservar largos periodos de tiempo la clona productora de rPE_PGRS26, almacenado a -80°C.
- Generar un Banco de Trabajo (BT), derivado del BM y almacenarlo a -80°C. Dicho banco será la semilla para originar los cultivos, tanto a nivel matraz como a nivel biorreactor.
- Comparar la productividad del BM y BT buscando detectar afectación por congelamiento y descongelamiento sobre producción de rPE_PGRS26 o bien, sobre el crecimiento.
- Evaluar el posible efecto inhibitor sobre el crecimiento y sobre la producción de rPE_PGRS26, de inducir hacia el final de la etapa

exponencial de crecimiento a cuatro concentraciones diferentes siendo éstas 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de IPTG.

- Evaluar el efecto sobre el crecimiento y producción de rPE_PGRS26 de: Un medio de cultivo que consiste en sales, vitaminas y una sola fuente de carbono como el Medio Mínimo (MM), un medio rico y complejo como el Luria Bertani (LB) y un medio muy rico y complejo como el medio Terrific Broth (TB).
- Evaluar del efecto de la edad de inducción durante el cultivo induciendo al inicio de la fase exponencial de cultivo (I/t_0) y al final de la misma (I/t_3).
- Llevar a cabo el proceso de escalamiento a un biorreactor de 1.0L con pH, temperatura y tensión de oxígeno disuelto (TOD) controlados, con cultivos en lote (CL) en el caso de los medios LB o TB y lote alimentado (CLA) en el caso del MM.
- Obtener los Cuerpos de Inclusión (CI) citoplásmicos a partir de la biomasa generada en el biorreactor de 1L.
- Purificar la proteína rPE_PGRS26, a partir de CI solubilizados en buffer desnaturante de urea, mediante cromatografía de afinidad con níquel.

- Estabilizar rPE_PGRS26 purificada y concentrada para posteriores estudios inmunogénicos.

6. Metodología

6.1 Conservación de la cepa

6.1.1 Generación de Banco Maestro (BM)

A partir de colonias de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo el plásmido pET22b con el inserto del gen Rv1441c codificante para la proteína PE_PGRS26, donadas por el Dr. Antonio Vallecillo del grupo de la Dra. Clara Espitia, se tomó una colonia y se inoculó por asada un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB con los antibióticos carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL). Se incubó dicho tubo 16 horas hasta presentar un valor de absorbancia (AU) de 1.0 aproximadamente. Se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de medio LB pH=7.5 y los dos antibióticos mencionados a la misma concentración. Se incubó de 3 a 4 horas hasta alcanzar un valor de 1.0 AU aproximadamente en una incubadora con agitación orbital PsycroTherm™ (New Brunswick Scientific) a 180 rpm y 37°C. Se transfirieron a tubos de 50 mL: 30 mL de cultivo + 20 mL de glicerol estéril y fueron agitados suavemente para mezclar ambas fases. Se repartió la mezcla en crioviales de 1.0 mL siendo almacenados inmediatamente a -80°C.

6.1.2 Generación de Banco de trabajo (BT)

Se tomaron 0.5 mL de un criovial del BM y se inoculó un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB a pH=7.5, carbenicilna (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034

mg/mL). Se incubó a 37°C de 4 a 5 h a 180 rpm. Se transfirieron a un tubo de 50mL: 30mL de cultivo + 20 mL de glicerol estéril y agitando suavemente para mezclar ambas fases. Se repartió la mezcla en 40 crioviales de 1.0 mL y se almacenaron inmediatamente a -80°C.

6.2 Evaluación de condiciones de cultivo en matraces agitados

6.2.1 Comparación de bancos productores en cuanto a producción y crecimiento

Se descongeló un criovial del BM y otro del BT y se tomaron 100 μ L de cada uno por separado. Se inocularon cuatro tubos de ensayo (dos por cada banco a modo de duplicado) conteniendo 5 mL de medio LB pH=7.5, carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL). Se incubaron los tubos de 12 a 14 horas a 37°C a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital PsycroTherm™ (New Brunswick Scientific). Se inocularon cuatro matraces Erlenmeyer de 250 mL (dos por cada banco a modo de duplicado), conteniendo 45 mL de medio LB pH=7.5 con los antibióticos a la misma concentración. Se indujo con IPTG (Sigma) a una concentración de 0.5 mM a las horas 3 de cultivo y se siguió el desarrollo del cultivo incubado a 37°C a 180 rpm determinando valores de AU, cada hora durante 8 horas y un último valor a las 25 horas de cultivo. Se evaluó cualitativamente la cinética de producción mediante electroforesis-SDS PAGE con muestras de las horas 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 25. Se determinó gráficamente la velocidad específica de crecimiento (μ) al igual que el tiempo de duplicación (td) de la misma manera como se presentó en las **Ecuaciones 1 y 2**.

6.2.2 Evaluación del efecto sobre la producción a concentración de IPTG variable

Se inocularon 8 tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio LB pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL), cada uno con 100 μ L tomados de un criovial de BT y se incubaron 13 horas a 37°C a 180 rpm. Con dichos cultivos, se inocularon 8 matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 45 mL de medio LB pH=7.5 con carbenicilina y cloranfenicol a las mismas concentraciones.

Se indujeron con IPTG (Sigma) todos los 8 matraces con las 4 concentraciones de inductor 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM a las horas 3 de cultivo (fin de la fase exponencial de crecimiento) y se siguió el desarrollo del cultivo incubado a 37°C a 180 rpm determinando valores de AU cada hora durante 8 horas y un último dato a las 25 horas de cultivo. Se efectuó una electroforesis SDS-PAGE para posteriormente realizar un Western Blot, como prueba de identidad, de una muestra tomada a las 7 horas de cultivo para comparar producción a 4 horas post-inducción en todos los casos.

6.2.3 Evaluación de medios de cultivo. Medio Mínimo (MM) y medio Terrific Broth (TB)

Se inocularon 2 tubos de ensayo conteniendo 5 mL de MM pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) y 2 tubos de ensayo conteniendo 5 mL de TB pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) con 100 μ L tomados de un criovial de BT por tubo inoculado.

A partir de los cultivos con MM se inocularon 2 matraces de 250 mL conteniendo 45 mL de MM pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) y a partir de los cultivos con TB se inocularon 2 matraces de 250 mL conteniendo 45 mL de TB pH=7.5 con carbenicilina y cloranfenicol, con las mismas concentraciones antes mencionadas. Se indujeron los cultivos en matraz con 0.2 mM de IPTG (Sigma) a las tres horas de cultivo. Se dio seguimiento al desarrollo del cultivo incubado a 37°C en una incubadora con agitación orbital PsycroTherm™ (New Brunswick Scientific) a 180 rpm determinando valores de AU. cada hora durante 8 horas a partir del inicio del cultivo y una última muestra a las 28 horas de cultivo para el medio TB. Se determinó gráficamente la velocidad específica de crecimiento (μ) al igual que el tiempo de duplicación (td) como se muestra en las **Ecuaciones 1 y 2**. Se evaluó cualitativamente la cinética de producción mediante electroforesis-SDS PAGE con muestras de las horas 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 28 para el mismo medio. Se tomó una muestra a las 7 horas de cultivo y se llevó a cabo una prueba de identidad mediante Western Blot para comparar sobre expresión de rPE_PGRS26 entre los diferentes medios de cultivo.

6.2.4 Evaluación del efecto de la edad de inducción. Inducción inicial (I/to) y a la hora 3 (I/t3)

Se tomaron 100 μ L de un criovial de BT por cada tubo de ensayo a inocular. Se inocularon 6 tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio LB pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) e incubaron por 13 horas a 37°C a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital PsycroTherm™

(New Brunswick Scientific). Con dichos cultivos se inocularon 6 matraces conteniendo 45 mL de medio LB pH=7.5 con carbenicilina y cloranfenicol. Se indujeron 4 matraces con 0.2 mM de IPTG (Sigma), dos al inicio del cultivo y dos a las 3 horas. Los dos matraces restantes fueron cultivos control en ausencia de inductor. Se dio seguimiento al desarrollo del cultivo incubado a 37°C a 180 rpm determinando valores de AU cada hora durante 8 horas a partir del inicio del cultivo y una última toma de muestra a las 25 horas. Se determinó gráficamente la velocidad específica de crecimiento (μ) al igual que el tiempo de duplicación (td). Se efectuó un Western Blot, como prueba de identidad y cualitativa de sobre expresión, de una muestra tomada a las 7 horas de cultivo para comparar producción a 4 horas post-inducción.

6.3 Escalamiento a cultivos en biorreactor de 1.0 L

6.3.1 Cultivo en lote (CL) y evaluación de producción en reactor 1.0 L

Se inocularon 2 matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio LB a pH=7.5 con carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) con 200 μ L tomados de un criovial del Banco de Trabajo (BT) cada uno y se incubaron de 13 a 14h a 37°C a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital PsycroTherm™ (New Brunswick Scientific). Por inspección visual, el matraz que presentó un mejor crecimiento sirvió de inóculo para un biorreactor de 1.0 L (Applikon™ de volumen total 2.0 L, equipado con dos turbinas Rushton con relación de diámetro $D_i/D_t = 0.5$) conteniendo 950 mL de medio LB con pH=7.5, carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL).

El cultivo fue inducido al comienzo con IPTG (Sigma) 0.2 mM activándose los controles de proceso para tensión de oxígeno disuelto TOD \geq 30% (Sharma *et al.*, 2007), temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2 mediante un controlador ADI 1030 (Applikon™). Las variables anteriores se registraron en línea por medio de la aplicación BioXpert® Lite (Applikon™) instalada en una PC conectada al controlador.

Se tomaron muestras a cada hora durante 10 horas para determinar valores AU y generar la cinética de crecimiento y se determinó gráficamente la velocidad específica de crecimiento (μ) al igual que el tiempo de duplicación (td). Se efectuó la cinética de producción mediante electroforesis SDS-PAGE a partir de las 3 horas de cultivo y hasta el final del mismo.

6.4 Métodos de identidad y cuantificación

6.4.1 Determinación de biomasa por densitometría

Se tomaron muestras de los cultivos en matraz agitado o biorreactor y mediante un espectrofotómetro DU® 730 (Beckman Coulter®) se tomaron lecturas de absorbancia (AU) a 600 nm en celdas de plástico de 1 mL y 1 cm. Cuando se obtuvieron lecturas mayores a 0.7, se diluyeron las muestras 1:5, 1:10 ó 1:20 según fuera necesario para obtener lecturas de AU. mayores a 0.1.

6.4.2 Electroforesis SDS-PAGE

Se llevó a cabo una electroforesis en un gel de acrilamida al 10% siguiendo la técnica estándar (Towbin, *et al.*, 1996) empleándose soluciones previamente preparadas (Anexo 1) en un equipo Hoefer. Las muestras provenientes de los

cultivos fueron uniformizadas a 1 AU, de tal manera que se tomaban volúmenes proporcionales de cada tiempo de cultivo. Las muestras se centrifugaron a 33000 x g en una centrifuga Eppendorf 5415C. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 100 µL de buffer PBS para resuspender el botón celular. El resuspendido fue lisado hirviéndolo durante 20 minutos en baño maria. Se tomaron 10 µL del lisado y se añadieron entre 25 y 30 µL de buffer de carga reductor 2X (Anexo 1).

6.4.3 Western Blot

Siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, se transfirieron mediante un equipo Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad™) a una membrana de PVDF Immobilon™ (Millipore™) las proteínas contenidas en un gel de acrilamida después de una electroforesis SDS-PAGE. Se lavó la membrana con buffer PBS-Tween 20 al 0.05% 2 veces por 5 minutos. Se aplicó buffer de bloqueo para western blotting por 30 minutos mojando muy bien ambos lados de la membrana. Se enjuagó la membrana por ambos lados con buffer PBS – Tween 20 al 0.05% 2 veces por 5 minutos. Se incubó 1.5 horas la membrana con buffer de anticuerpo anti-histidina para Western Blotting (Anexo 1) y terminado el tiempo se lavó nuevamente la membrana con buffer PBS – Tween 20 al 0.05%. Se dejó secar por varios minutos para posteriormente revelarse con una solución reveladora de 3,3'-diaminobenzidina DAB (Anexo 1).

6.4.4 Dot Blot

A modo de ensayo cualitativo para determinar la presencia de rPE_PGRS26, se activó una membrana de PVDF con metanol puro durante 10 segundos. Se dividió en cuadrantes de 1 cm² aproximadamente y en cada uno se colocaron 10 µL de muestra. Se dejó secar la membrana durante 1 hora aproximadamente a 37°C. Se lavó la membrana con buffer PBS-Tween 20 al 0.05% dos veces por 5 minutos. La membrana se colocó en un SNAP i.d.TM (MilliporeTM) y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Se incubó 15 minutos la membrana con buffer de anticuerpo anti-histidina para Western Blotting (Anexo 1) y terminado el tiempo se lavó nuevamente la membrana con buffer PBS – Tween 20 al 0.05% de 3 a 5 veces. Se dejó secar por unos minutos para posteriormente aplicar solución reveladora de 3,3'-diaminobenzindina DAB (Anexo 1).

6.4.5 Determinación de proteína total por método de Bradford de Bio-Rad

Se hizo una dilución 1:4 del reactivo de color del *kit* Bio-rad Protein Assay (Bio-Rad®) en agua desionizada. Se prepararon 3 estándares de albúmina sérica bovina de concentraciones 0.90, 0.45 y 0.22 mg/mL disuelta en agua desionizada para generar la curva patrón (Anexo 1), correspondiente al método estándar descrito por el fabricante. Se tomaron 20 µL de los estándares y se añadió 1 mL de reactivo de color diluido y se mezcló suavemente haciéndose lo mismo con las muestras problema. Se dejaron incubar mínimo 5 minutos pero no más de 1 hora y

mediante espectrofotometría se obtuvieron valores de absorbancia tanto de estándares como de muestras a 595 nm.

6.5 Purificación de rPE_PGRS26

6.5.1 Obtención de cuerpos de inclusión (CI)

El cultivo obtenido en el biorreactor de 1.0 L fue centrifugado a 2000 x g en una centrifuga Beckman J2-21 durante 20 min. La biomasa fue resuspendida en aproximadamente 20 veces su volumen en buffer PBS y centrifugada nuevamente a 2000 x g por 20 min, repitiéndose el proceso 3 veces en total. La biomasa fue resuspendida una última vez en buffer PBS y se le agregaron aproximadamente 5 mg de lisozima por cada 10 g de biomasa húmeda y se incubó a 37°C por 1 hora. Se centrifugó la biomasa a 2000 x g por 20 min y se resuspendió en aproximadamente 20 veces su volumen de buffer PBS. La suspensión fue sonicada en un Soniprep 150 (Sanyo™) a una amplitud de 10 micrones en 3 pasos de 1 min con descansos de 3 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugada a 2000 x g durante 20 min y se resuspendió el botón en aproximadamente 20 veces su volumen en buffer PBS-Triton X100 al 2%. Se centrifugó a 2000 x g por 20 min repitiéndose la resuspensión y centrifugación de 1 a 2 veces. Se resuspendió el botón de CI en buffer PBS, se centrifugó a 2000 x g por 20 min, se eliminó el sobrenadante y finalmente se almacenó congelado a -20 °C.

6.5.2 Cromatografía de afinidad con níquel

Se tomaron aproximadamente 0.3 g de CI descongelados y fueron solubilizados en buffer cromatográfico A (Anexo 1) durante 48 a 72 horas a 4°C.

Se lavó la columna de cromatografía (con capacidad de 8 mL) conteniendo resina de sefarosa niquelada (Amersham Pharmacia Biotech AB) con 5 volúmenes de buffer cromatográfico A (Anexo 1), hasta eliminar el etanol presente en la resina.

Se centrifugó la suspensión de CI a 33000 x g (Eppendorf 5415C) por 5 min para obtener únicamente la fracción de proteína solubilizada y se introdujeron a la columna 5 mL de sobrenadante. Se agitó suavemente la columna a 4°C de 3 a 4 horas y se dejó empacar por gravedad 3 horas más. Se llevó a cabo la cromatografía FPLC a flujo = 0.45 mL/min y 0.1 AUFS durante 105 minutos (100% buffer A – 20 min, de 0 a 100% buffer B – 50 min, 100% buffer B – 15 min, 100 a 0% buffer B – 10 min, 100% buffer A – 10 min) en un equipo Econo® (Bio-Rad). Se llevó a cabo una identificación de rPE_PGRS26 presente en las fracciones de purificación obtenidas mediante Dot Blot, al igual que una electroforesis SDS-PAGE para evaluar grado de pureza.

6.5.3 Estabilización final de rPE_PGRS26

Se hizo una única solución de proteína purificada a partir de las fracciones eluidas en buffer de cromatografía B (Anexo 1) de purificación que contenían la proteína de interés de forma más pura y se vertió en un Amicon® Ultra (Millipore™) con tamaño de poro de 3000 kDa. Se llevaron a cabo 30 centrifugaciones para remover paulatinamente el buffer de elusión de la muestra, añadiendo 200 µL de

buffer estabilizador Tris-HCl con glicerol al 20% y centrifugando a 5100 x g (Beckman TJ-6) por 3 minutos cada vez.

Al finalizar el proceso de lavado se centrifugó a 5100 x g (Beckman TJ-6) la muestra hasta obtener un volumen máximo de 1 mL y se almacenó a 4°C.

Se llevó a cabo una prueba de identidad y estabilidad de la proteína mediante un Dot Blot de una muestra con cerca de 4 semanas de almacenamiento y una prueba de pureza con electroforesis SDS-PAGE de la misma muestra.

7. Resultados y discusión

7.1 Comparación de bancos productores en cuanto a producción y crecimiento

Con la finalidad de percibir posibles diferencias en cuanto a crecimiento se llevaron a cabo cultivos en matraces agitados Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo utilizando inóculos derivados tanto del Banco Maestro (BM) como del Banco de Trabajo (BT) por separado. En la **Figura 7.1** se muestra la cinética de crecimiento para los cultivos de ambos bancos inducidos a las 3 horas (indicado por una flecha) hacia el final de la etapa exponencial de crecimiento.

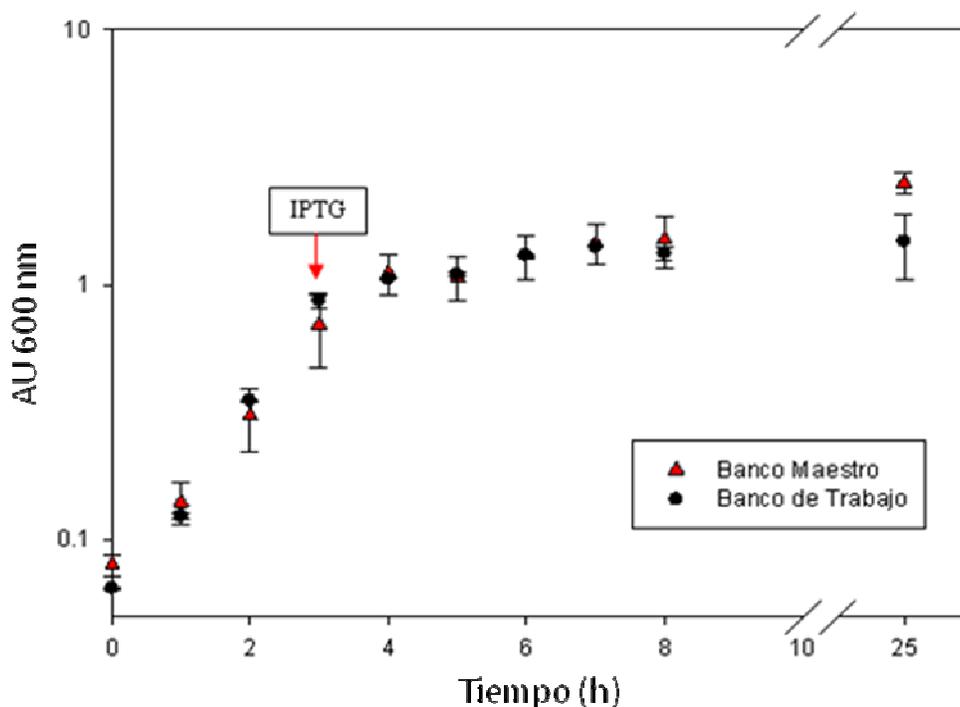


Figura 7.1 Cinéticas de crecimiento de bancos productores en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados a 180 rpm e incubados a 37°C

La cinética de crecimiento muestra una tendencia muy similar entre ambos bancos productores y aunque el BM presenta un retraso inicial en el crecimiento, se diferencian de manera más importante hasta las 25 horas de cultivo. La variación ligada a los cultivos de BM fue muy grande pero se aprecia la tendencia a mantener un cierto retraso respecto al BT. El hecho de que el BM logre desarrollarse un poco más a las 25 horas de cultivo puede relacionarse con el hecho de que creció más lentamente desde el comienzo del cultivo y por lo tanto hubo una menor tasa de acumulación de acetato, disminución de pH y generación de metabolitos inhibidores del crecimiento, permitiendo un mayor crecimiento posterior (Allen y Luli, 1987; Brown *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1984). La diferencia en el crecimiento de los bancos puede deberse a los pasos de descongelamiento y recongelamiento de los bancos. Puede ser que la población del BT se encuentre habituada al descongelamiento debido a que se originó de un cultivo generado con el BM comenzando a crecer más rápido desde el inicio del cultivo.

La tendencia observada en la **Figura 7.1** se afirma numéricamente con los parámetros cinéticos de ambos bancos mostrados en la **Tabla 7.1**. Todos los valores de μ fueron calculados a partir del inicio del cultivo hasta las 3 horas.

Tabla 7.1 Velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo del Banco Maestro (BM) y Banco de Trabajo (BT)

Banco / Parámetro	BM	BT
μ (h^{-1})	0.72 ± 0.11	0.88 ± 0.01
td (h)	1.02 ± 0.14	0.82 ± 0.01
td (min)	61.12 ± 8.53	49.08 ± 0.68
Biomasa a 8h (AU)	1.505 ± 0.235	1.350 ± 0.040

La velocidad específica de crecimiento del BM es en promedio 18% menor respecto al BT y se refleja en un retraso en el tiempo de duplicación de 12 minutos en promedio.

Una cinética de producción a partir de la inducción (**Figura 7.2**) busca hacer notar diferencias en la sobre-expresión de rPE_PGRS26 debidas a descongelamiento, recongelamiento y otros factores ligados a la generación misma de los bancos.

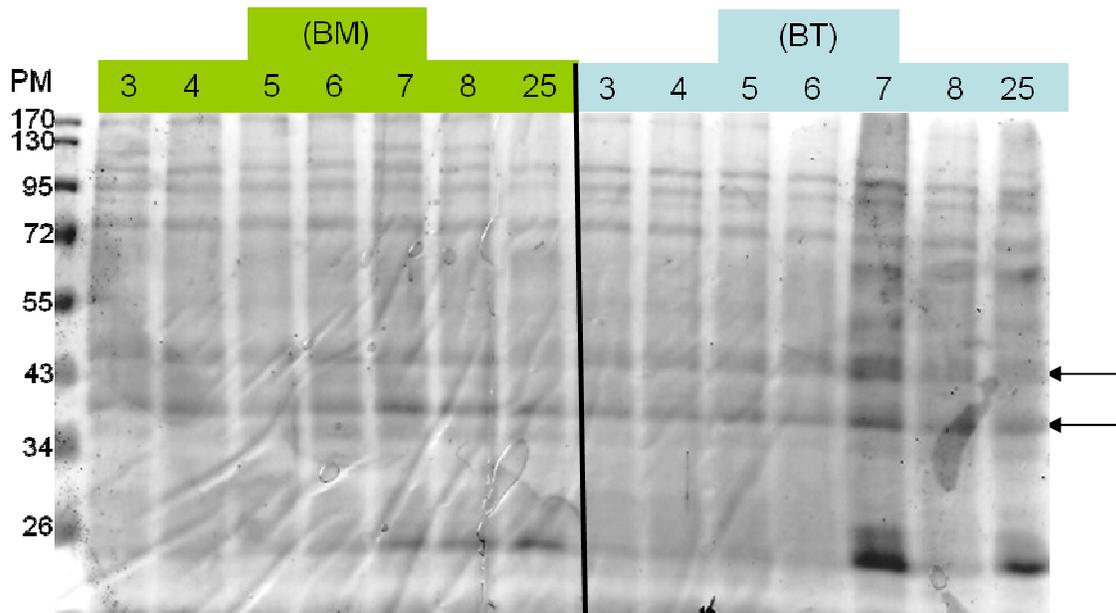


Figura 7.2 SDS-PAGE de las cinéticas de producción características del Banco Maestro (BM) y Banco de Trabajo (BT) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani agitados a 180 rpm e incubados a 37°C. Cada carril indica la producción en un tiempo determinado de cultivo (h). La inducción fue a las 3h. rPE_PGRS se señala con dos flechas negras.

Las muestras cargadas la electroforesis de las cinéticas de producción fueron uniformizadas a 1 AU. La diferencia entre ambos no es tan evidente sino hasta las 7, 8 y 25 horas de cultivo, donde se nota que el proceso para generar el BT parece mejorar la sobre expresión de rPE_PGRS26.

En ambos bancos se detecta la presencia de dos bandas que mostraron reconocimiento al llevar a cabo una prueba de identidad mediante Western Blot, la existencia de ambas bandas se explica con la naturaleza del vector. Al utilizar el plásmido pET-22b que cuenta con el péptido señal *pelB* de relocalización

periplásmica (Novagen©-Merck), la proteína recombinante se divide en dos subespecies reconocidas por el anticuerpo antihistidina utilizado en el Western Blot. Diversos autores muestran evidencias contrarias respecto a la relocalización de las proteínas marcadas con señal pelB, en algunos casos es efectiva y en otros no. Las propiedades específicas de cada proteína recombinante pueden llegar a tener el efecto más importante para su exitosa relocalización (Chung *et al.*, 1998). Probablemente la subespecie de mayor peso porta el péptido señal pelB aumentando su peso ligeramente desde 3 hasta 5 kDa y otra no, manteniendo su peso estimado de ~41 kDa (ncbi.nlm.nih.gov/protein/). Chung y colaboradores encontraron que la diferencia en peso entre hG-CSF con y sin señal pelB es muy ligera y no afecta su actividad biológica, por lo cual en este proyecto se considera que las dos bandas observadas de rPE_PGRS26 pueden ser prácticamente la misma. Al generarse la proteína recombinante con la señal pelB, una translocasa asociada a la membrana citoplásmica escinde dicha señal para dar paso a la relocalización exitosa de rPE_PGRS26 al espacio periplásmico (Sørensen y Mortensen, 2004). El crecimiento demasiado rápido a 37°C puede evitar que se relocalice exitosamente toda la proteína recombinante recién sintetizada, favoreciéndose la generación de cuerpos de inclusión citoplásmicos.

La productividad del Banco de Trabajo (BT) decae a las 25 horas de cultivo, fenómeno probablemente relacionado con la inhibición de su crecimiento, estrés celular y muerte hacia las horas avanzadas de cultivo, mientras que el Banco Maestro (BM) muestra un comportamiento más uniforme conservando el nivel de expresión bajo a lo largo de todo el cultivo.

Finalmente, los cultivos utilizando al BT muestran un ligero aumento en productividad y crecimiento más rápido, permitiendo obtener mayor cantidad de

proteína recombinante y por otro lado, facilitando los cultivos en cuanto al tiempo de crecimiento.

7.2 Evaluación del efecto sobre la producción a concentración de inductor β -D-tio-galactósido de isopropilo (IPTG) variable

Para encontrar efectos en la sobre expresión de rPE_PGRS26 dependientes de la concentración de IPTG se llevaron a cabo 4 cultivos inducidos a las 3 horas. Las concentraciones de inductor evaluadas fueron 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM y se registró la cinética de crecimiento (**Figura 7.3**) durante las primeras 8 horas y tomando una muestra final a las 25 horas.

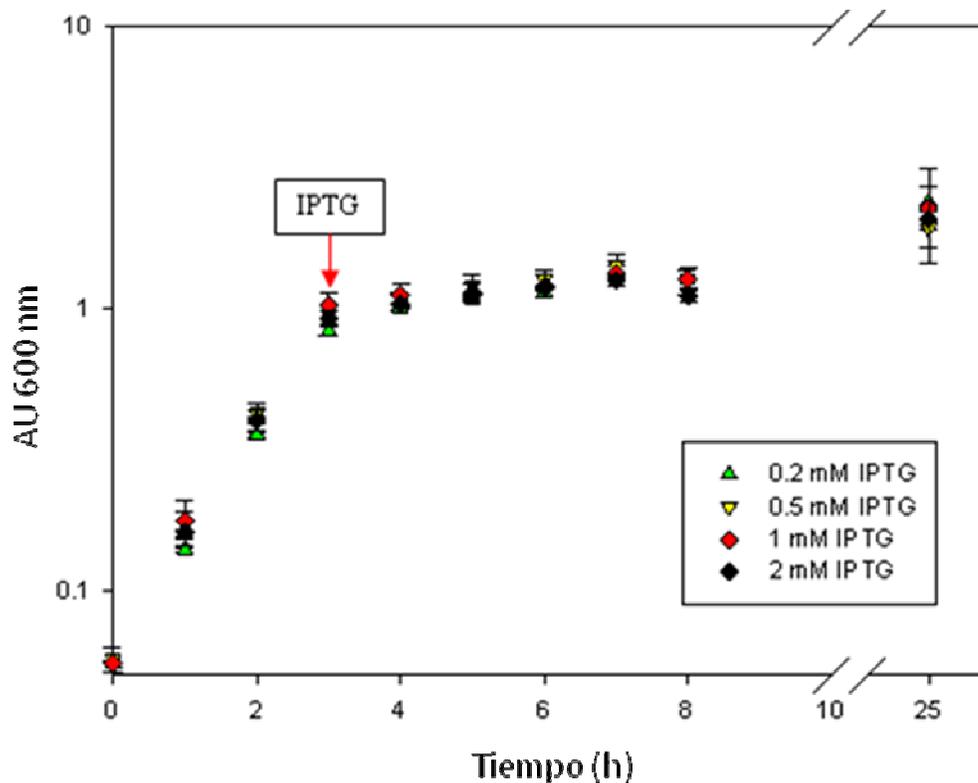


Figura 7.3 Cinéticas de crecimiento a concentraciones de inductor de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mM, llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50

mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados a 180 rpm e incubados a 37°C

Al agregar al cultivo concentraciones crecientes de inductor, no se ve un efecto inhibitorio proporcional a la concentración sobre el crecimiento. Si bien la adición ocurrió hacia el final de la fase exponencial de crecimiento, todos los cultivos detuvieron su crecimiento tras la adición del inductor de manera similar. La activación de sistemas de expresión y redireccionamiento de maquinaria celular ligados a la inducción, responsables del efecto negativo sobre el crecimiento, es básicamente la misma al adicionar inductor a las concentraciones evaluadas.

El microorganismo tiene prácticamente la misma reacción en cuanto a su crecimiento al adicionar las diferentes concentraciones de IPTG, pero es necesario evaluar diferencias en sobre expresión a las 4 horas post-inducción (tiempo que registró mayores niveles de expresión) en los 4 casos. Se llevó a cabo una electroforesis para posteriormente hacer un Western Blot de muestras tomadas a dicho tiempo (**Figura 7.4**) a modo de prueba cualitativa de producción y de identidad. El anticuerpo logró reconocer tanto la banda de 41 kDa como la banda de ~45 kDa. Dado que la banda de 41 kDa es más abundante y está en el peso pronosticado para PE_PGRS26, se le da especial importancia.



Figura 7.4 Comparación en producción tras 4 horas de inducción a concentraciones de inductor 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani agitados e incubados a 37°C. Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa

Si bien en el caso del crecimiento no se apreciaron diferencias importantes, a nivel de expresión si se ve un ligero aumento proporcional a la concentración de inductor. Teniendo eso en mente se debió hacer un balance costo-beneficio. Al manifestar una sobre-expresión con la concentración más baja y compararla con la obtenida a concentraciones más altas se decidió que aquella a utilizarse para los ensayos posteriores sería la menor. Lo anterior en vista de que si existió sobreexpresión utilizando 0.2 mM de IPTG (Sigma) y que al aumentar la concentración se estaría agregando material adicional al cultivo llegando quizás a dificultar el proceso de purificación.

7.3 Evaluación de medios de cultivo: Medio Mínimo (MM) y Terrific Broth (TB)

Se buscó el medio de cultivo que promoviera el mejor balance entre generación de biomasa y sobreexpresión de rPE_PGRS26. Se tenía la expectativa de que el Medio Mínimo (MM) lograra el crecimiento más elevado en tiempos superiores a las 10 horas ya que reduciría los niveles de ácido láctico generado y reducción acelerada de pH (Martínez-Martínez *et al.*, 2007). Sorprendentemente, a pesar de estar trabajando con *E. coli* Rosetta (DE3), los precrecimientos en tubos de ensayo con MM para posteriormente inocular los matraces Erlenmeyer no lograron desarrollarse ni a las 48 horas. De tal manera que solo se pudieron inocular los

matraces con medio TB. La cinética de crecimiento para dicho medio se comparó con la cinética para medio LB bajo las mismas condiciones obtenida de experimentos anteriores, mostrándose en la **Figura 7.5**.

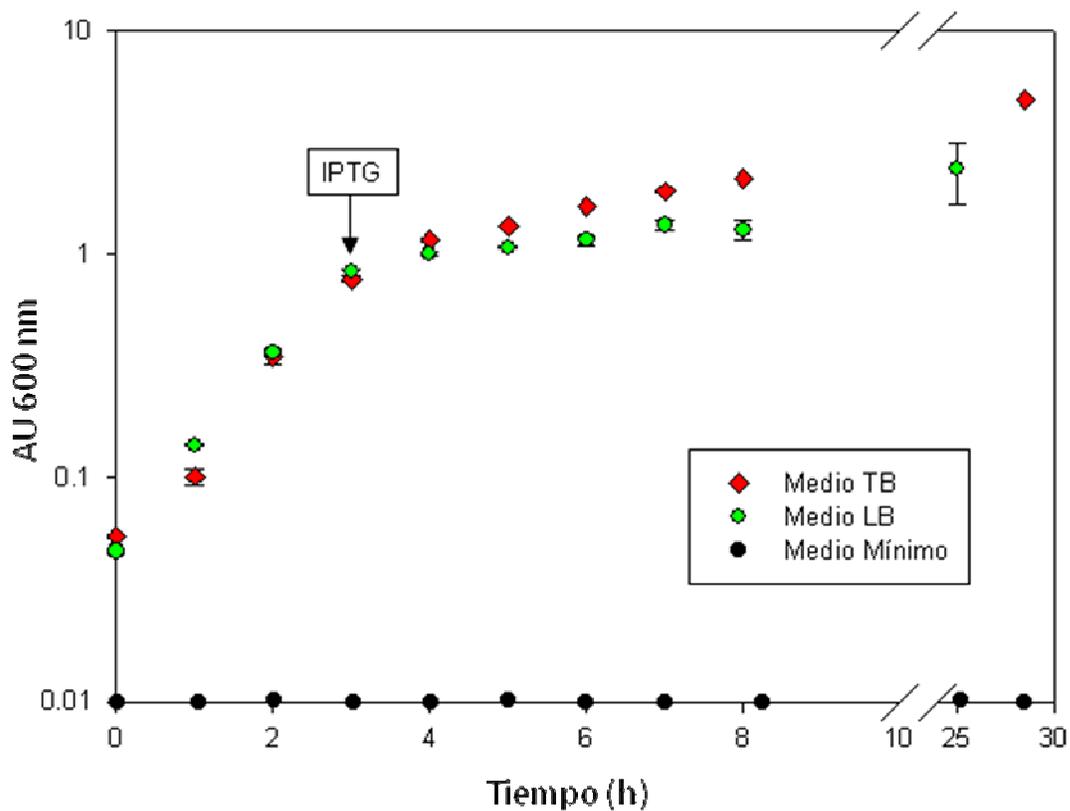


Figura 7.5 Cinética de crecimiento llevada a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB) y Medio Mínimo (MM) inducidos a 3 horas de cultivo, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. Fue comparada con una cinética bajo las mismas condiciones utilizando medio Luria Bertani (LB) y Medio Mínimo (MM)

De los tres medios de cultivos evaluados, únicamente los medios complejos LB y TB promovieron crecimiento importante. Si bien *E. coli* Rosetta DE3 posee las cualidades para crecer en el MM produciendo altas cantidades de proteína

recombinante (Martínez-Martínez *et al.*, 2007), ese no fue el caso en este proyecto, lo que lleva a pensar en que hay alguna deficiencia genética en la cepa utilizada o incluso que el autor del artículo (Martínez-Martínez *et al.*, 2007) se reservó cierta información dado que se trata de producción con aparentes fines industriales. Se observa un abatimiento del crecimiento relacionado al medio empleado tras inducir.

La **Tabla 7.2** muestra que la velocidad específica de crecimiento (μ) para el medio TB no presenta diferencias significativas respecto al medio LB, mientras que el MM no registró crecimiento alguno.

Tabla 7.2 Velocidades específicas de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (td) y biomasa a las 8 horas de cultivo relacionados al medio de cultivo; Medio Mínimo (MM), Luria Bertani (LB) y Terrific Broth (TB)

Medio / Parámetro	MM	LB	TB
μ (h^{-1})	ND*	0.88 ± 0.01	0.91 ± 0.01
td (h)	ND*	0.82 ± 0.04	0.79 ± 0.04
td (min)	ND*	49.08 ± 2.28	47.25 ± 2.00
Biomasa a 8h (AU)	ND*	1.350 ± 0.040	2.31 ± 0.001

* ND: No determinado por no presentar crecimiento

El medio TB al presentar el doble en cantidad de los mismos componentes del medio LB y propiciar un crecimiento ligeramente más acelerado (**Tabla 7.2**),

disminuye en cierta medida el efecto adverso sobre el crecimiento al inducir logrando generar mayor biomasa (**Figura 7.5**). El fenómeno de inhibición en el crecimiento hacia el final del cultivo debido al sobreflujo metabólico de *E. coli* en ese medio rico (Allen y Luli, 1987; Brown *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1984) se ve minimizado ligeramente por la excesiva disponibilidad de nutrientes permitiendo que continúe creciendo.

Es necesario evaluar los niveles de sobre expresión de la proteína recombinante dependiendo del medio de cultivo empleado, por lo cual se llevó a cabo un Western Blot como una prueba cualitativa de producción y de identidad para el medio LB y TB mostrado en la **Figura 7.6**.

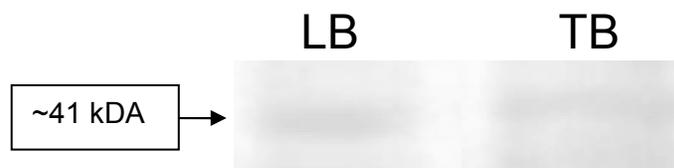


Figura 7.6 Comparación en producción de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C a las 4 horas de inducción en medio LB y TB. Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa

El medio TB sería el mejor medio de los tres evaluados para generar biomasa y posiblemente más cuerpos de inclusión pues se tienen más células de donde extraerlos. Sin embargo en la **Figura 7.6** se observa que de alguna manera el sobreflujo metabólico y el crecimiento acelerado parecen afectar negativamente en la síntesis de rPE_PGRS26. Si la producción de proteínas recombinantes puede

llegar a disminuir al registrarse condiciones demasiado óptimas para el crecimiento (Brown *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1984), entonces el medio TB por ser el más rico y el que promueve mayor crecimiento puede llegar a comprometer seriamente la sobre expresión de rPE_PGRS26.

Finalmente, al parecer el medio LB es la mejor opción en cuanto a producción de proteína. Por la naturaleza del medio LB, solo se podrán llevar a cabo cultivos en lote (CL) para el biorreactor de 1.0 L dado que al ser un medio complejo existen diversas fuentes de carbono potenciales para el microorganismo. Si el fundamento de un cultivo en lote alimentado (CLA) involucra que solo exista una fuente de carbono disponible totalmente monitoreada a través del tiempo y esa misma fuente sea administrada al criterio del experimentador fijando una velocidad específica de crecimiento deseada (**Ecuaciones 4 y 5**) minimizando la síntesis de metabolitos tóxicos, entonces un medio complejo no es opción.

7.4 Evaluación del efecto de la edad de inducción. Inducción inicial (I/t0) y a la hora 3 (I/t3) a concentración 0.2 mM de IPTG

Para apreciar el efecto sobre el crecimiento exponencial tras adicionar el inductor (IPTG) a concentración de 0.2 mM, se llevaron a cabo tres cultivos adicionales. Se creció un cultivo control sin inducir (S/I), uno inducido desde su comienzo (I/t0), durante los primeros minutos de la fase exponencial de crecimiento y otro inducido a las 3 horas. Sus cinéticas de crecimiento se muestran en la **Figura 7.7**.

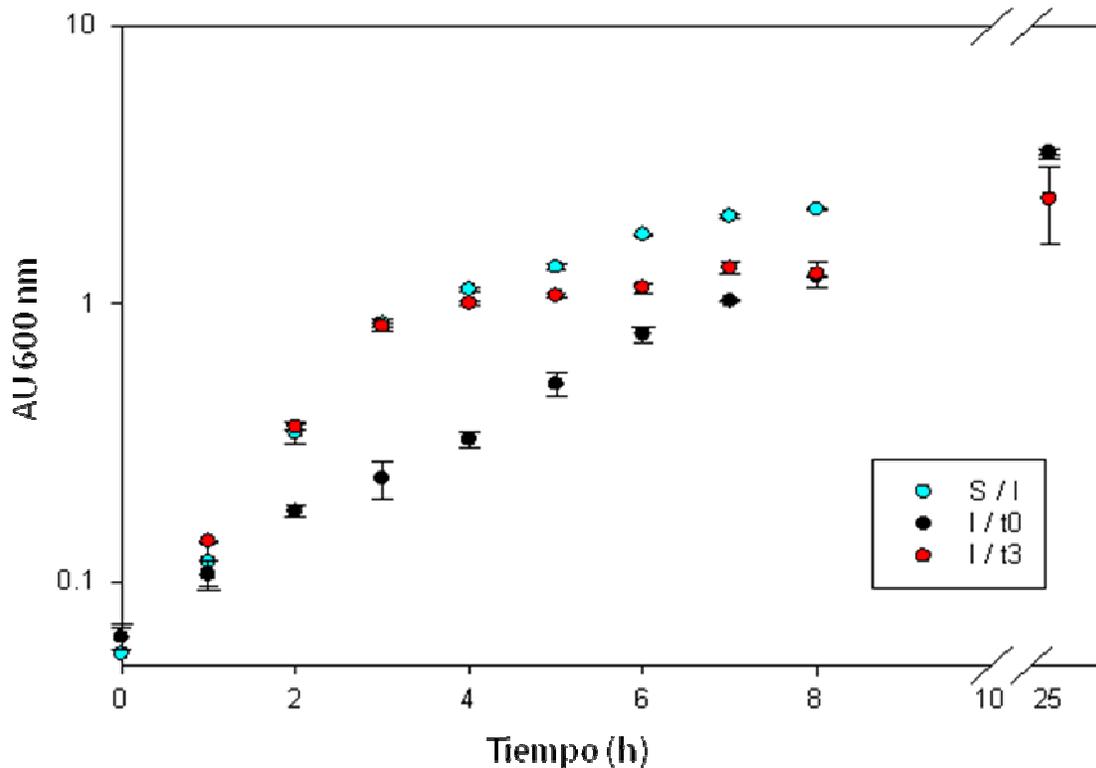


Figura 7.7 Cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. Se evaluó el efecto del inductor a concentración 0.2 mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I)

Como era esperado, la inducción tanto al inicio como a las 3 horas de cultivo afectó negativamente el crecimiento bacteriano al comparar su comportamiento con el control. Una inducción temprana provoca una activación de maquinaria celular enfocada a la sobre producción de rPE_PGRS26 y por lo tanto, gasto de energía que de otra manera sería invertida en la generación de biomasa (Freeman, 1986). Al comparar el crecimiento del cultivo I/t3 con el S/I, se hace evidente el cambio repentino en la pendiente descrita por la generación de

biomasa por la activación del sistema de sobre expresión de rPE_PGRS26. S/I describe un comportamiento de crecimiento más gradual con una fase exponencial bien definida, una fase de desaceleración a partir de las 4 horas y dos puntos correspondientes a fase estacionaria a las 7 y 8 horas. A las 25 horas de cultivo, tanto S/I como I/t3 crecieron menos que I/t0. De nuevo se aprecia el fenómeno relacionado al lento crecimiento inicial y mayor generación de biomasa hacia el final del cultivo (Allen y Luli, 1987; Brown *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1984). Para mostrar de manera más explícita las diferencias en cuanto a crecimiento tras añadir el inductor, se calcularon tanto las velocidades específicas de crecimiento (μ) como los tiempos de duplicación (td) para los 3 cultivos. Dichos parámetros se despliegan en la **Tabla 7.3**.

Tabla 7.3 Velocidades específicas de crecimiento (μ), tiempos de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo al evaluar el efecto del inductor a concentración 0.2 mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I)

Condición/ parámetro	Sin inducción (S/I)	Inducción inicial (I/t0)	Inducción a 3 horas (I/t3)
μ (h^{-1})	0.94 \pm 0.09	0.45 \pm 0.01	0.88 \pm 0.01
td (h)	0.74 \pm 0.07	1.50 \pm 0.01	0.79 \pm 0.04

<i>td</i> (min)	45.60 ± 5.22	89.97 ± 0.44	47.26 ± 0.53
Biomasa a 8h (AU)	2.200 ± 0.020	1.26 ± 0.001	1.28 ± 0.010

Respecto al control S/I, el cultivo I/t0 registró un valor de μ aproximadamente 48% menor, de tal manera queda comprobado el efecto retardante del IPTG sobre el crecimiento del microorganismo. El cultivo I/t3 mantuvo un valor muy similar a S/I hasta las 3 horas, fenómeno que es lógico dado que hasta que fue inducido en el punto máximo que se tomó como referencia para calcular μ , básicamente tenían las mismas condiciones.

Se tomó una muestra tras 4 horas post-inducción de I/t0 e I/t3 y a las 4 horas de cultivo de S/I para llevar a cabo Western Blot mostrado en la **Figura 7.8**.

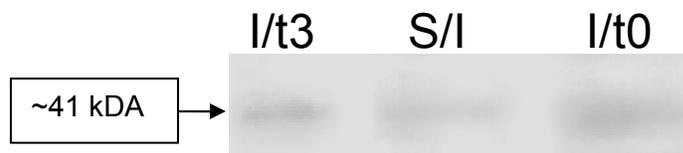


Figura 7.8 Comparación en producción a las 4 horas de inducción para evaluando el efecto del inductor a concentración 0.2 mM añadido al inicio (I/t0) y a las 3 horas (I/t3) comparado con una cinética control sin inducir (S/I). Se muestra únicamente la banda correspondiente a 41 kDa

En cuanto a la expresión de la proteína recombinante dependiente de la edad de inducción se obtuvo un resultado inesperado. Dado que las proteínas recombinantes suelen ser similares a metabolitos secundarios (no relacionados al crecimiento), el modelo seguido usualmente es la inducción al final de la fase exponencial de crecimiento. En este caso particular se detectó una sobreexpresión incrementada a las 4 horas tras inducir al inicio de la etapa exponencial iniciando el cultivo mientras no sucedió lo mismo a las 4 horas post-inducción al inducir al final de la misma fase (**Figura 7.8**). De manera similar Martínez-Martínez *et al.*, 2007 reportaron que la producción de glicina oxidasa recombinante en *E. coli* Rosetta (DE3) se producía durante el crecimiento exponencial en un cultivo en lote alimentado.

La inducción al inicio del cultivo no permitió alcanzar una etapa estacionaria sino más allá de las 8 horas y mientras continuaba el crecimiento se incrementaba ligeramente la cantidad de proteína producida, manifestando un comportamiento similar a un metabolito primario. El fenómeno se puede explicar por la naturaleza del sistema de expresión. El operón lac es un sistema que permite a la bacteria adaptarse a las condiciones del medio para poder desarrollarse exitosamente por lo tanto juega un papel importante en el crecimiento exponencial dependiente de la fuente de carbono disponible (Santillán y Mackey, 2008) condición en este caso simulada con la adición de IPTG. Al adicionar IPTG se habilita la transcripción de los genes bajo dominio del promotor del operón, incluida la T7 RNA polimerasa, posibilitando la sobreexpresión del gen clonado en el plásmido pET-22b. Durante la fase exponencial de crecimiento la maquinaria celular se encuentra funcionando al máximo y los ácidos orgánicos aún existen en concentraciones bajas por lo que no hay demasiada represión metabólica ni estrés celular. Como se aprecia en la

Figura 7.7 la maquinaria celular que se destinaría al crecimiento se enfoca de manera importante en la producción de proteína recombinante.

Con el cultivo I/t0 produciendo mayores cantidades de rPE_PGRS26 se llevó a cabo una cinética de producción en gel de acrilamida mediante electroforesis SDS-PAGE (**Figura 7.9**) comparando I/t0 con el control para comprobar el efecto del inductor sobre la producción y si el microorganismo producía proteína recombinante de forma incontrolada.

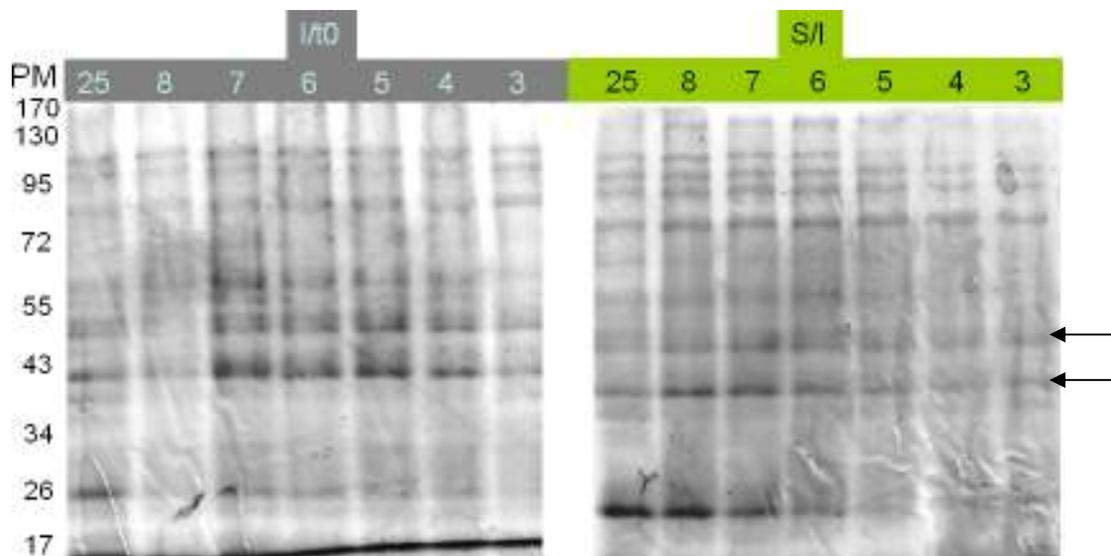


Figura 7.9 Cinética de producción de cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de cultivo con medio Luria Bertani, a pH inicial de 7.5, agitados e incubados a 37°C. tras inducción al inicio del cultivo (I/t0) vs un control sin inducir (S/I). La proteína se señala con dos flechas negras

La expresión en el sistema sin inducir es considerable y también es explicada con el nivel de expresión basal del operón *lac* independientemente de la expresión basal de *rPE_PGRS26*, el sistema inducido al inicio del cultivo presenta mayor cantidad de proteína lo que hace necesario inducir el sistema.

7.5 Escalamiento a cultivos en biorreactor de 1.0 L

Tras determinar las mejores condiciones de cultivo en matraces agitados (IPTG a 0.2 mM, medio LB e inducción al inicio del cultivo) se llevó a cabo un cultivo en lote (CL) con los antibióticos carbenicilina (0.050 mg/mL) y cloranfenicol (0.034 mg/mL) en un biorreactor Applikon de 1.0 L acoplado a un controlador ADI 1030 (Applikon™). El controlador mantenía la tensión de oxígeno disuelto TOD $\geq 30\%$ (Sharma *et al.*, 2007), temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2 . La TOD se reguló mediante agitación, la temperatura mediante una chaqueta de calentamiento y un sistema que permitía el paso de agua de enfriamiento al interior del reactor, mientras que el pH se reguló mediante adición automática de hidróxido de sodio 0.5 N o bien ácido clorhídrico 0.5 N, con bombas peristálticas. Las variables anteriores se registraron en línea cada 2 minutos por medio de la aplicación BioXpert® Lite (Applikon™) instalada en una PC conectada al controlador. Los valores de AU se obtenían en un espectrofotómetro tras tomar una muestra del reactor cada hora durante 10 horas. La cinética de crecimiento y los valores registrados para las variables controladas se muestran en la **Figura 7.10** mientras que la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td) se despliegan en la **Tabla 7.4**.

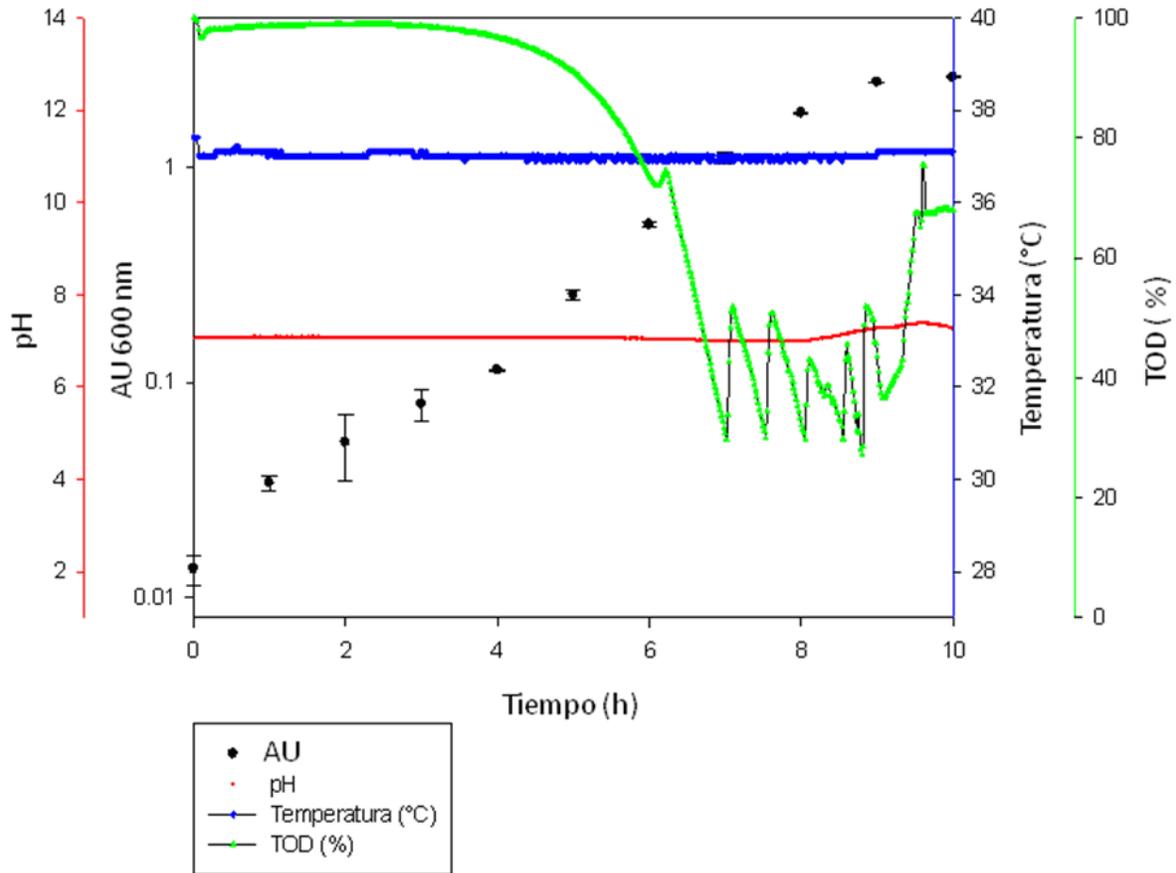


Figura 7.10 Cinética de crecimiento de un cultivo en lote inducido al inicio con IPTG a una concentración 0.2 mM de IPTG, en medio Luria Bertani contenido en un biorreactor de 1.0 L. Se llevó un control sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2

Las variables de pH, temperatura y tensión de oxígeno disuelto (TOD) fueron controladas exitosamente manteniendo el pH = 7.5 ± 0.2 , temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y TOD $\geq 30\%$. La cinética de crecimiento muestra una fase exponencial (horas 0 a 7), una fase de desaceleración (hora 7 a 8) y fase estacionaria (horas 8 a 10). Los valores para la velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y

biomasa obtenida a las 8 horas de cultivo registrada como AU para el cultivo en lote llevado a cabo en biorreactor y matraz agitado se muestran en la **Tabla 7.4**.

Tabla 7.4 Velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y biomasa alcanzada a las 8 horas de cultivo registrados para los cultivos llevados a cabo en matraz agitado y biorreactor controlado con tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2

Parámetro	Matraz agitado	Biorreactor
μ (h^{-1})	0.45 ± 0.01	0.60
td (h)	1.50 ± 0.01	1.20
td (min)	89.97 ± 0.44	72.29
Biomasa a 8h (AU)	1.26 ± 0.001	1.80

El crecimiento en el reactor en lote inducido al inicio de la fase exponencial de crecimiento y del cultivo sigue una tendencia similar que el matraz con las mismas características (**Figura 7.7 - $1/t_0$**) alcanzándose a las 8 horas de cultivo casi 30% más crecimiento en el biorreactor que en el matraz agitado. De manera similar, la velocidad específica de crecimiento en el reactor es casi 25% mayor, disminuyendo el tiempo de duplicación aproximadamente 20 minutos. Dado que las diferencias principales entre el reactor y el matraz radican en el control de las condiciones ambientales, éstas pueden ser las que determinen la variación en el

crecimiento entre ambos sistemas. Ya se había demostrado un fenómeno similar al comparar medios de cultivo donde el medio más rico, el TB, mitigaba de cierta manera el efecto adverso sobre el crecimiento tras la inducción (**Figura 7.5**).

Para determinar si el nivel de expresión se afectó en algún sentido de manera importante, se tomaron muestras del cultivo a partir de las 3 horas y hasta las 10 para llevar a cabo una electroforesis SDS-PAGE (**Figura 7.11**) como prueba cualitativa de producción.

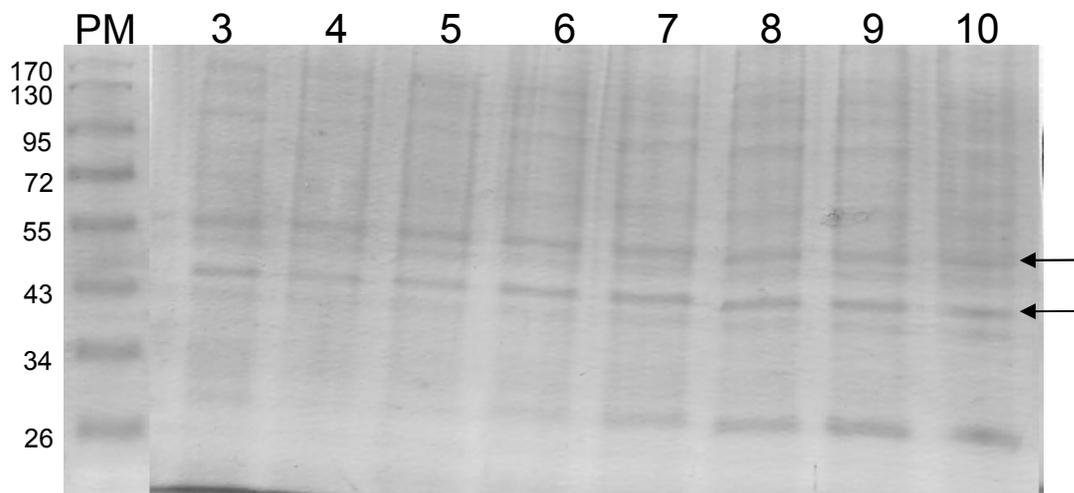


Figura 7.11 Cinética de producción de un cultivo en lote inducido al inicio con IPTG a una concentración 0.2 mM de IPTG, en medio Luria Bertani contenido en un biorreactor de 1.0 L. Se llevó un control sobre la tensión de oxígeno disuelto (TOD) $\geq 30\%$, temperatura $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 7.5 ± 0.2 . La proteína se señala con dos flechas negras

El biorreactor controlado presentó buenos niveles de expresión de rPE_PGRS26 hasta la hora 10 de cultivo. Considerando que se empleó un medio de cultivo como

el LB, que el escalamiento no fue grande y que el reactor de 1L utilizado es aún muy manejable y no presenta microambientes ni gradientes de sustrato u oxígeno importantes, no es de sorprender que los niveles de expresión observados en matraz no se vieron afectados significativamente por el proceso de escalamiento a 1.0 L (Humphrey, 1998). Igualmente, el estrés hidrodinámico asociado a la presencia de baffles, la turbina y las revoluciones por minuto de la misma no afecta en gran medida a la bacteria empleada. Posiblemente al continuar escalamientos a niveles mayores se encuentren diferencias importantes en los niveles de expresión orientadas al aumento o disminución de productividad (Humphrey, 1998). En vista de que en los cultivos en matraz, al prolongar los cultivos más allá de las 15 horas se llegaba a perder proteína y la producción no aumentaba significativamente con el tiempo, se decidió detener el cultivo del reactor en momentos tempranos de la etapa estacionaria.

7.6 Purificación de rPE_PGRS26

Tras finalizar el cultivo en el biorreactor (ver punto 6.3 de metodología), se obtuvieron los cuerpos de inclusión (CI) a partir de la biomasa generada. Los gramos de biomasa húmeda y los CI extraídos se muestran en la **Tabla 7.5** y el grado de pureza de los mismos (electroforesis SDS-PAGE) en la **Figura 7.12**.

Tabla 7.5 Peso obtenido de biomasa húmeda a las 10 horas de cultivo en lote en biorreactor de 1L y peso de cuerpos de inclusión (CI) húmedos derivados de la biomasa

Fracción húmeda al final del cultivo	Peso obtenido (g)
Biomasa	6.500
Cuerpos de inclusión (CI)	1.630

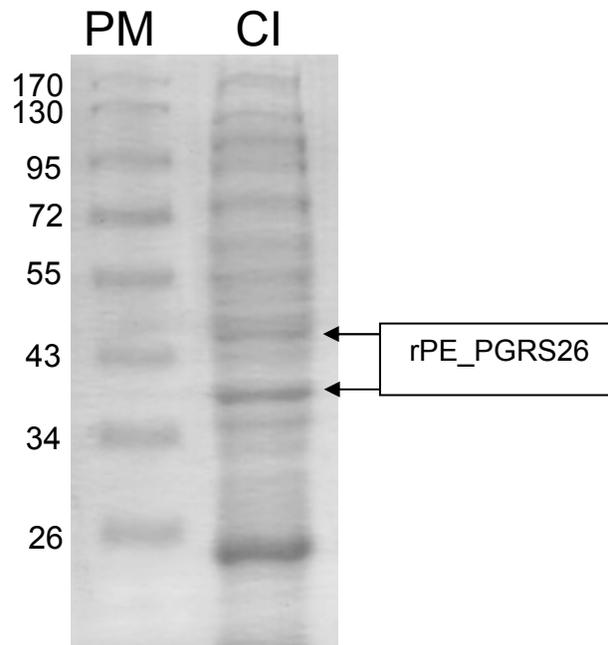


Figura 7.12 Electroforesis SDS-PAGE de cuerpos de inclusión (CI) purificados mostrando su grado de pureza y enriquecimiento de rPE_PGRS26

Los CI obtenidos del biorreactor en lote, a pesar de representar un primer paso de purificación, muestran gran cantidad de proteínas contaminantes así como la proteína de interés aunque enriquecida puesto que las dos subespecies poseen bandas más intensas que la mayoría de las demás proteínas. Los cuerpos de inclusión suelen presentar muchas proteínas contaminantes al igual que ácidos

nucléicos y fosfolípidos (Batas *et al.*, 1998). Se hicieron pruebas previas solubilizando los CI en buffer cromatográfico A (Anexo 1) durante diferentes tiempos encontrándose que a los 2 días se obtenía la mayor cantidad de proteína recombinante soluble. Tras solubilizar se llevó a cabo la cromatografía de afinidad con níquel en un cromatógrafo FPLC Econo® (Bio-Rad) a flujo = 0.45 mL/min y 0.1 AUFS durante 105 minutos (100% buffer A – 20 min, de 0 a 100% buffer B – 50 min, 100% buffer B – 15 min, 100 a 0% buffer B – 10 min, 100% buffer A – 10 min) El cromatograma se muestra en la **Figura 7.13**.

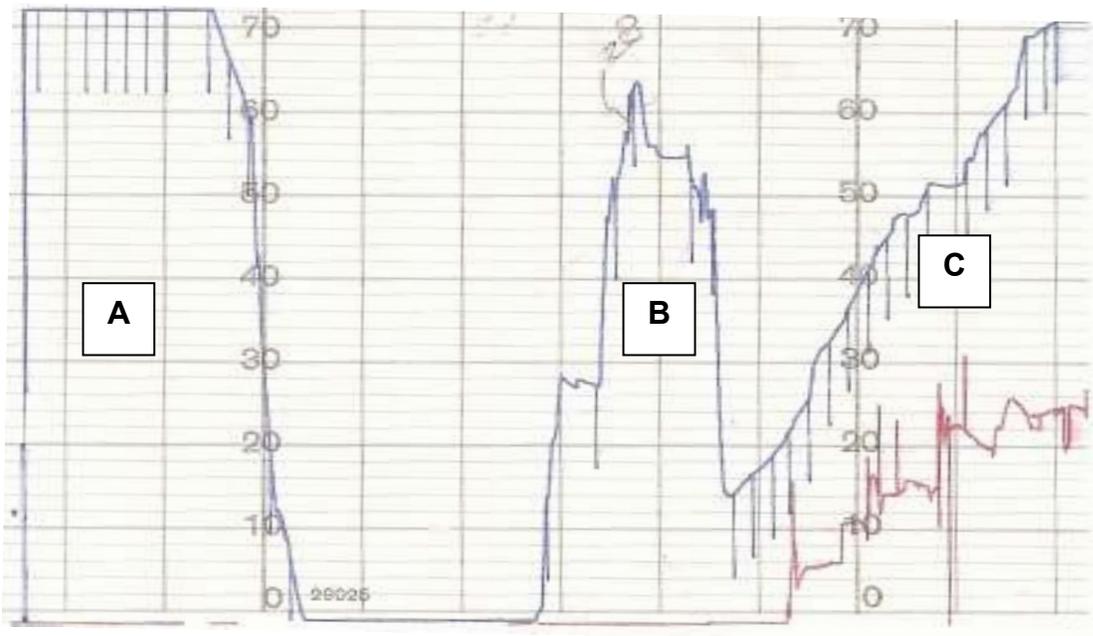


Figura 7.13 Cromatograma de purificación FPLC de rPE_PGRS26 a partir de CI obtenidos del biorreactor en lote. (A) representa la proteína no asociada a la resina, (B) la proteína eluída y (C) el gradiente creciente de imidazol

La cromatografía FPLC, como segundo paso de purificación posterior a la obtención de CI, elimina gran cantidad de esas proteínas contaminantes en la primera etapa de la misma al eluirse por un periodo prolongado proteínas no afines al níquel de la resina (pico A de la **Figura 7.13**). La proteína de interés comienza a desprenderse entre 5 y 10 minutos después de comenzar el gradiente de elución apreciado en el segundo pico registrado en el cromatograma (pico B de la **Figura 7.13**). Al parecer, rPE_PGRS26 tiene una afinidad moderada por la resina niquelada lo cual dificulta el proceso de purificación mediante éste método, dado que otras proteínas que contengan cierto porcentaje de histidinas se mantendrán como contaminantes tras completar la cromatografía.

Las fracciones correspondientes tanto al pico A como al B, fueron analizadas mediante Dot Blot en busca de rPE_PGRS26 (**Figura 7.14**). Se trazaron 12 cuadrantes, en los primeros 4 se colocaron muestras correspondientes al pico A y a partir del cuadrante 5 se colocaron muestras en orden siguiendo la evolución del pico B.

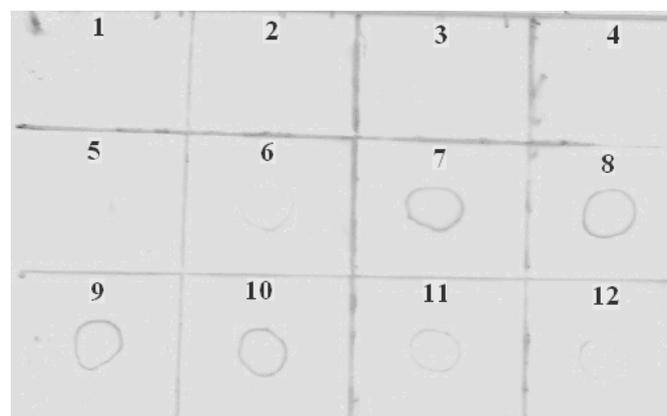


Figura 7.14 Dot blot de fracciones de purificación. Los cuadrantes 1-4 y 5-12 corresponden al Pico A y Pico B de la cromatografía (ver **Figura 7.13**) respectivamente

Únicamente cuatro de las fracciones del pico B mostraron una fuerte señal positiva, correspondiente a la presencia de rPE_PGRS26 y a la región de máxima absorbancia registrada. Con lo anterior en cuenta se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE para evaluar cualitativamente la pureza de las 4 fracciones (**Figura 7.15**). Las subespecies de rPE_PGRS26 se señalan con unas flechas mientras que las impurezas más abundantes con un óvalo.

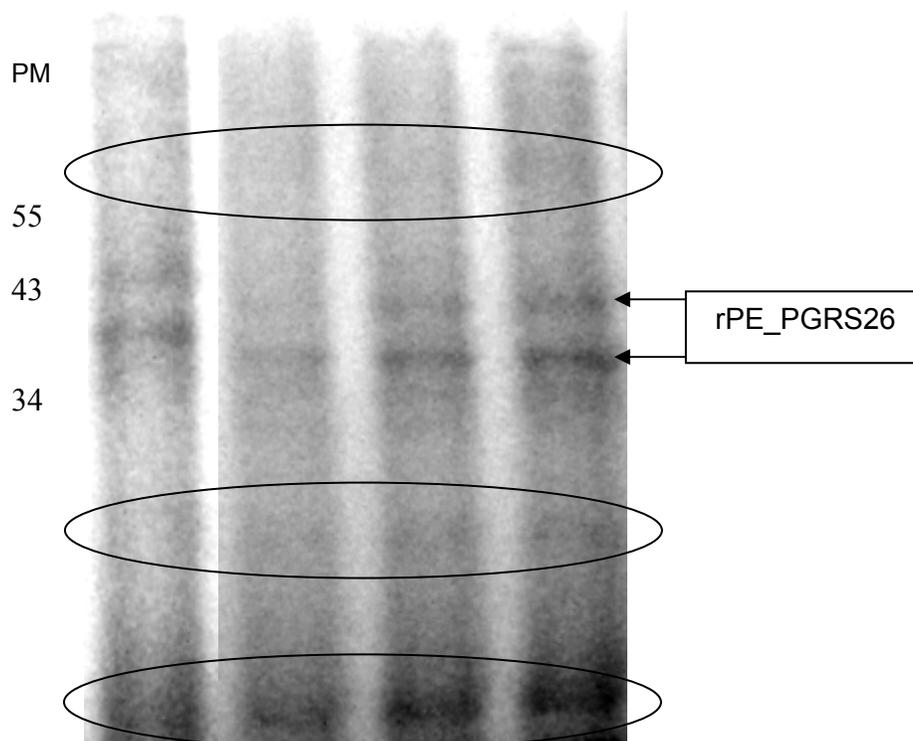


Figura 7.15 Análisis de pureza cualitativo de las 4 fracciones de cromatografía correspondientes al pico de purificación B (ver **Figura 7.13**)

La electroforesis muestra la proteína de interés y la presencia de impurezas. La cromatografía de afinidad con níquel no logró remover la totalidad de proteína contaminante en este caso. Sin embargo, se procedió a generar una única solución de dichas fracciones y se sometió a un proceso de dializado, renaturalización y purificación y concentración en un sistema de purificación Amicon® Ultra (Millipore™) con tamaño de poro de 3000 kDa. Tras la serie de lavados con buffer estabilizador Tris-HCl con glicerol al 20% y posterior concentración a 0.5 mL se procedió a buscar a rPE_PGRS26 en el concentrado final estabilizado mediante otro Dot Blot mostrando un resultado positivo (**Figura 7.16**).



Figura 7.16 Dot Blot del concentrado final estabilizado con Tris-HCl con glicerol al 20%

En caso de no estabilizar la proteína rPE_PGRS26 purificada en un medio con glicerol, las bandas correspondientes ya no eran visibles en electroforesis, Western Blot o Dot Blot al cabo de 4 o 5 días. Pero al agregar el buffer estabilizador, se mantuvo la señal positiva en el Dot Blot y se apreciaron bandas en electroforesis (**Figura 7.17**), incluso después de 2 semanas almacenado a 4°C.

El glicerol presente en el buffer estabilizador (entre un 10 a 40%) ejerce su cualidad para estabilizar la estructura globular de la proteína al promover la formación de una capa de hidratación delgada en torno a la proteína, separándola de las moléculas de glicerol dado que es termodinámicamente desfavorable una asociación proteína-glicerol. En otras palabras, se crea una especie de coraza de hidratación en torno a la proteína globular de manera que mantiene su forma nativa (Gekko y Timasheff, 1981).

A partir del concentrado estabilizado que dio resultado positivo a la existencia de rPE_PGRS26, se le cuantificó la proteína total por método de Bradford (Anexo 1) y se llevó a cabo otra electroforesis SDS-PAGE (**Figura 7.17**) para apreciar el grado de pureza y poder determinar semicuantitativamente la cantidad de proteína mediante densitometría o análisis de imágenes utilizando el software Image J. Tras analizar las bandas de proteína presentes en el gel de electroforesis, los resultados que arrojó el software se muestran en la **Tabla 7.6**.

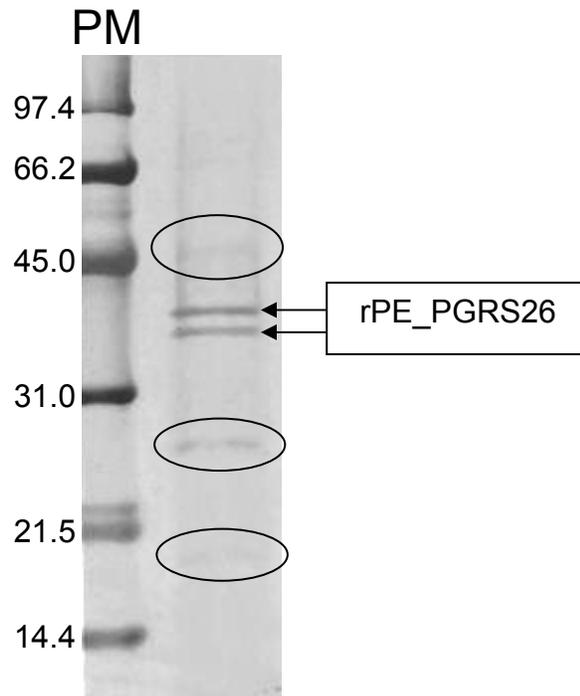


Figura 7.17 Electroforesis SDS-PAGE del concentrado final estabilizado tras el proceso de dializado, renaturalización, purificación y concentración en un sistema Amicon® Ultra (Millipore™) con tamaño de poro de 3000 kDa. Las impurezas presentes se muestran encerradas en óvalos

El grado de pureza de la proteína se elevó tras los lavados en el Amicon® Ultra (Millipore™). Puede ser que el tiempo de almacenamiento que transcurrió entre el análisis de las fracciones obtenidas y el lavado con buffer estabilizador (2 semanas a 4°C aproximadamente) haya bastado para que, tanto las proteínas contaminantes como rPE_PGRS26, se degradaran. Dicha degradación propició una desaparición casi total de las proteínas contaminantes mientras que las dos

bandas correspondientes rPE_PGRS26, al ser las más abundantes, permanecieron presentes aunque en menor concentración. Al degradarse las proteínas en fragmentos más pequeños, éstos lograron atravesar por la membrana del Amicon® Ultra (Millipore™).

Tabla 7.6 Cuantificación de proteína recombinante del concentrado final estabilizado, utilizando software Image J

Proteína total: 0.829 mg/mL		
	44kDa (mg/mL)	41kDa (mg/mL)
Proteína rPE_PGRS26	0.358	0.204
Total rPE_PGRS26	0.562 (~70%)	

Las dos bandas correspondientes a las subespecies recombinantes permanecen inseparables hacia el final del proceso aunque dichas bandas representan cerca del 70% de la proteína total (**Tabla 7.6**). Si bien las proteínas con tallo de histidina llegan a purificarse con eficiencias de hasta el 95% (Hengen, 1995), el grado de impurezas presentes en los cuerpos de inclusión puede llegar a afectar negativamente la purificación y la renaturalización llega a dar rendimientos bajos pues se pueden formar agregados (Batas *et al.*, 1998). Al final puede ser que el protocolo de obtención de CI no sea el ideal en este caso y tenga que se modificado a fin de obtener menos impurezas desde el inicio. Cabe señalar que se llevaron a cabo muchas purificaciones bajo diferentes condiciones: cambios en

composición de buffers de cromatografía, tiempos de solubilización de CI y estabilización o no de la proteína purificada. Sólo se presentó el proceso de purificación completo que arrojó mejores resultados.

Es muy posible que al someter el dializado final a otro paso de purificación, como electro-elución o electroforesis con posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa, sea perfectamente utilizable en ensayos inmunogénicos de gran trascendencia.

8. CONCLUSIONES

- ✚ El Banco de Trabajo (BT) y Banco Maestro (BM) no fueron significativamente diferentes respecto a producción y crecimiento, por lo que el BT será utilizado para los ensayos a futuro dejando intacto el BM.
- ✚ La mejor concentración de inductor (IPTG) para la sobreexpresión de rPE_PGRS26 fue 0.2 mM, añadido al inicio de la fase exponencial de crecimiento.
- ✚ El medio Luria Bertani demostró ser el mejor medio para producción y escalamiento en cultivo en lote únicamente.
- ✚ No hubo diferencia significativa en expresión entre reactor de 1.0 L y matraz agitado Erlenmeyer de 250 mL.
- ✚ Se regularon exitosamente las condiciones de oxígeno, temperatura y pH al interior del reactor de 1L en cultivo en lote registrándose un aumento de biomasa, manteniendo el nivel de expresión de rPE_PGRS26.
- ✚ El reactor en cultivo en lote alimentado no se pudo llevar a cabo puesto que el MM no permitió desarrollo de la cepa de trabajo.
- ✚ El proceso de purificación de los CI es consistente y aunque no se obtiene proteína pura, la purificación con FPLC permite la eliminación de la mayor parte de las proteínas contaminantes y tras dializar la proteína en un Amicon ® Ultra, se logró estabilizar por más de 4 semanas en buffer Tris-HCl con glicerol al 20% logrando una pureza final de más del 70%.

- ✚ El concentrado dializado protéico es apto para ensayos inmunogénicos en animales de laboratorio y así determinar si es buen candidato para vacunación o diagnóstico.

9. Anexo 1 (Preparaciones)

9.1 Medios de cultivo

Medio LB (1L):

- Triptona..... 10 g
- Extracto de levadura..... 5 g
- NaCl..... 10 g
- Agua destilada.....aforo a 1L

Fijar pH a 7.5

Medio Agar LB (1L):

- Triptona..... 10 g
- Extracto de levadura.....5 g
- NaCl10 g
- Agar..... 15 g
- Agua destilada.....aforo a 1L

Fijar pH a 7.5

Medio TB (1L):

- Extracto de levadura..... 24.0 g
- Triptona.....12.0 g
- K₂HPO₄..... 12.5 g
- KH₂PO₄..... 2.3 g
- Agua destilada.....aforo a 1L

Fijar pH a 7.5

Medio Mínimo (1L):

Stock 1 100X (100mL)	Cantidad	Stock 2 200X (50mL)	Cantidad	Stock 3 (50mL)	Cantidad	Solución Principal (1L)	Cantidad
Ácido cítrico	40.00 g	CoCl₂	25 mg	Acetato de hierro III	1.00 g	Glucosa	15.00 g
Acetato de zinc	0.13 g	MnCl₂	150 mg	Agua destilada	Aforo 50 mL	MgSO₄	1.20 g
Agua destilada	Aforo 100 mL	CuCl₂	15 mg			KH₂PO₄	13.30 g
		Na₂MoO₄	25 mg			(NH₄)₂HPO₄	4.00 g
		EDTA	84 mg			Agua destilada	Aforo 1 L
		H₃BO₃	30 mg				

- Esterilizar solución principal y stocks 1, 2 y 3 en autoclave.
- Agregar a 450mL de solución principal 5 mL de stock 1 filtrado + 5 mL stock 2 + 5 mL stock 3 + 50 µL de solución de tiamina-HCl estéril
- Ajustar pH a 7.5

9.2 Preparación de antibióticos e IPTG

Carbenicilina 1000X (1 mL)

- Carbenicilina..... 50 mg
- Agua destilada.....1 mL

Cloranfenicol 1000X (1 mL)

- Cloranfenicol..... 34 mg
- Metanol1 mL

IPTG 0.5 mM 1000X (1 mL)

- IPTG.....119.15 mg
- Agua destilada.....1 mL

9.3 Preparaciones para electroforesis SDS-PAGE y transferencia

1. Preparación de solución de acrilamida al 30% (100 mL)

- Acrilamida grado electroforesis..... 29.2 g
- Bis acrilamida grado electroforesis..... 0.8 g
- Agua destilada..... aforo a 100 mL

Buffers para preparar gel de acrilamida (250 mL)

250 mL Buffer Separador 4X (pH=8.8)		250 mL Buffer de apilamiento 4X (pH=6.8)	
Tris Base	45.42 g	Tris Base	15.14 g

SDS	1.00 g	SDS	1.00 g
Agua destilada	Aforo 250 mL	Agua destilada	Aforo 250 mL

Gel de acrilamida al 10%

Gel Separador (10 mL)		Gel de apilamiento (3 mL)	
Buffer Separador 4X	2.5 mL	Buffer de apilamiento 4X	625 µL
Agua destilada	4.0 mL	Agua destilada	1.5 mL
Acrilamida al 30%	3.4 mL	Acrilamida al 30%	750 µL
Persulfato de Amonio (APS) al 10%	50 µL	Persulfato de Amonio (APS) al 10%	10 µL
N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED)	15 µL	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED)	10 µL

Buffer de corrimiento electroforético 1X (1 L)

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.00 g
Glicina grado electroforesis	1.44 g
SDS	1.00 g
Agua destilada	Aforo 1 L

Buffer de transferencia (1 L)

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.03 g
Glicina grado electroforesis	14.40 g
SDS	0.50 g
Metanol	200 mL
Agua destilada	Aforo 1 L

Ajustar pH = 8.3

Buffer de carga reductor 2X (10 mL)

- Glicerol.....2.0 mL
- Tris-HCl (pH 6.8).....2.5 mL
- SDS 10%.....4.0 mL
- Azul de bromofenol.....1 mg
- Mercaptoetanol.....0.2 mL
- Agua destilada.....1.5 mL

Preparación azul de Coomassie R-250

- Coomassie R-2500.06 g
- Metanol100 mL
- Ácido acético18 mL
- Agua destilada.....130 mL

9.4 Preparaciones para Western Blot, Dot Blot y extracción de cuerpos de inclusión

Buffer de fosfatos PBS 20X (1 L)

- NaCl.....160.0 g
- KCl.....4.0 g
- Na₂HPO₄..... 28.8 g
- KH₂PO₄4.8 g
- Agua destilada.....aforo 1 L

Buffer PBS (200 mL)

- Buffer PBS 20X..... 10 mL
- Agua destilada.....190 mL

Ajustar pH a 7.2

Buffer PBS – Tween 20 al 0.05% (100 mL)

- Buffer PBS 1X..... 100 mL
- Tween 20.....0.05 mL

Ajustar pH a 7.2

Buffer de bloqueo para Western Blotting (10 mL)

- Buffer PBS – Tween 20 al 0.05%.....10mL
- Albúmina sérica bovina.....0.01g

Ajustar pH a 7.2

Buffer de anticuerpo anti-histidina para Western Blotting (10 mL)

- Buffer PBS – Tween 20 al 0.05%.....10 mL

- Albúmina sérica bovina.....0.01 g
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-his₆-peroxidasa (Roche).....10 µL

Fijar pH a 7.2

Solución reveladora de 3,3'-diaminobenzidina DAB (10 mL)

- PBS-Tween20 al 0.05%.....10 mL
- H₂O₂.....20 µL
- DAB en polvo.....5 mg

Solución PBS – Triton X100 al 2% (100 mL)

- Buffer PBS 1X.....98 mL
- Triton X100.....2 mL

9.5 Preparaciones para cromatografía y almacenamiento final de rPE_PGRS26

Buffers cromatográficos

Unión: Buffer cromatográfico A		Elusión: Buffer cromatográfico B	
Urea	360.4 g	Urea	360.4 g
Imidazol	680.8 mg	Imidazol	34.04 g
Na ₂ HPO ₄	7.1 g	Na ₂ HPO ₄	7.1 g
Nacl	29.2 g	Nacl	29.2 g

Agua destilada	Aforo a 1 L	Agua destilada	Aforo a 1 L
-----------------------	-------------	-----------------------	-------------

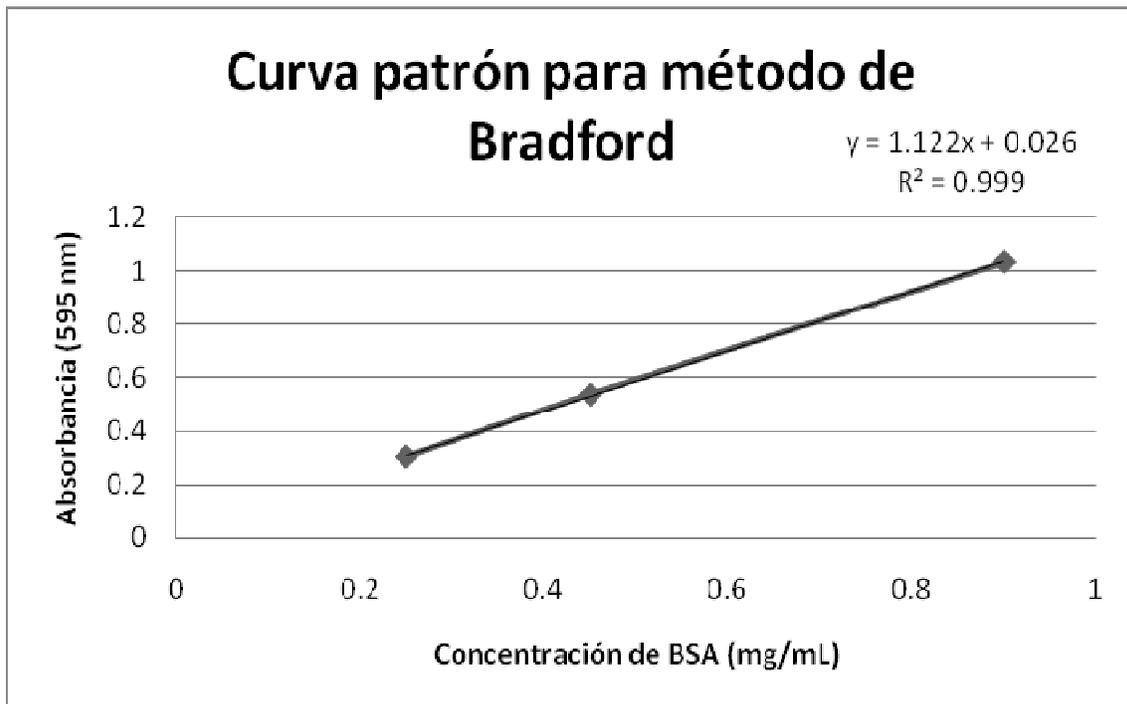
Ajustar ambos a pH = 8.0

Buffer final estabilizador de proteína Tris-HCl y glicerol 20% (1 L)

- Tris-HCl.....7.88 g
- NaCl.....8.77 g
- Glicerol.....20 % v/v
- Agua destilada.....Aforo a 1 L

Ajustar pH = 8.0

9.6 Curva patrón para método de Bradford



10. Referencias

1. ALDOR I.S., Krawitz D.C., Forrest W., Chen C., Nishihara J.C., Joly J.C., & Champion K.M. "Proteomic Profiling of Recombinant *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentations for Improved Production of an Antibody Fragment Biopharmaceutical". **Appl. Environ. Microbiol.** 2005 71 (4): 1717-1728.
2. ALLEN B. & Luli G. W. "A gradient-feed process for *E. coli* fermentations". **Biopharm. Manuf.** 1987 1: 38-41.
3. ANDERSON K. W., Grulke E. & Gerhardt P. "Microfiltration culture process for enhanced production of rDNA receptor cells of *Escherichia coli*". **Bio/Technol.** 1984 2: 891-896.
4. BABAEIPOUR V., Shojaosadati S.A., Khalilzadeh R., Maghsoudi N., Tabandeh F. "A proposed feeding strategy for the overproduction of recombinant proteins in *Escherichia coli*". **Biotechnol. Appl. Biochem.** 2008 49(Pt 2):141-7.
5. BÄCKLUND E., Markland K. & Larsson G. "Cell engineering of *Escherichia coli* allows high cell density accumulation without fed-batch process control". **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2008 31 (1): 11-20.
6. BANEYX F. "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*". **Curr. Opin. Biotechnol.** 1999 10: 411-421.
7. BANEYX F. & Mujacic M. "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*". **Nat. Biotechnol.** 2004 22: 1399 – 1408.

8. BANU S., Honoré N., Saint-Joanis B., Philpott D., Prévost M.C. & Cole S.T. "Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?" **Mol. Microbiol.** 2002 44 (1): 9 – 19
9. BATAS B., Schiraldi C and Chaudhuri J.B. "Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography" **J. Biotechnol.** 1999 68: 149–158
10. BETTON J.M. & Hofnung M. "Folding of a mutant maltose-binding protein of *Escherichia coli* which forms inclusion bodies". **J. Biol. Chem.** 1996 271 (14): 8046–8052.
11. BRENNAN M.J. & Delogu G. "The PE multigene family; a molecular mantra for mycobacteria". **Trends microbiol.** 2002 10 (5): 246-249.
12. BROWN S.W., Meyer H.-P. & Fiechter A. "Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1985 23: 5-9.
13. CALMETTE A. "La vaccination Preventive Contre la Tuberculose". Paris: **Masson et Cie.** 1927.
14. CHOI J.H., Keum K.C., & Lee S.Y. "Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*". **Chem Eng. Sci.** 2006 61 (3): 876-885.
15. CHUNG B.H, Sohn M-J., Oh S-W., Park U-S., Poo H., Kim B.S., Yu M. J. & Lee Y. I. "Overproduction of human granulocyte-colony stimulating factor fused to the pelB signal peptide in *Escherichia coli*" **J. Ferm Biotechnol.** 1998 85 (4): 443-446
16. CINAR A, Parulekar S.J., Ündey C y Birol G. Batch fermentation. Modeling, monitoring and control. Marcel Dekker Inc. USA 2003. p.p 26-27. ISBN 0-8247-4034-3

17. COLE S.T, Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule, Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M. A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J. E., Taylor K., Whitehead S. & Barrell B. G. "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence". **Nat.** 1998 393: 537-544.
18. DELOGU G. & Brennan M.J. "Comparative Immune Response to PE and PE_PGRS Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*". **Infection and Immunity** 2001 69 (9): 5606-5611.
19. DELOGU G., Sanguinetti M., Pusceddu C., Bua A., Brennan M.J., Zanetti S. & Fadda G. "PE_PGRS proteins are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in host tissues". **Microbes and Infection** 2006 8 (8): 2061-2067.
20. DELOGU G., Pusceddu C., Bua A., Fadda G., Brennan M.J. & Zanetti S. "Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure". **Mol. Microbiol.** 2004 52: 725-733.
21. DHEENADHAYALAN V., Delogu G, Sanguinetti M., Fadda G. & Brennan M.J. "Variable Expression Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Genes: Evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 Are Inversely Regulated In Vivo". **J. Bacteriol.** 2006 188 (10): 3721-3725.
22. DOBLE M., Gummadi S. *Biochemical Engineering*. Prentice Hall of India Pvt limited. Nueva Delhi 2007. p.p. 156-160. ISBN 978-81-203-3052-8

23. ESPITIA C., Lacleste J.P., Mondragón-Palomino M., Amador A., Campuzano J., Martens A., Singh M., Cicero R., Zhang Y. & Moreno C. "The PE_PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins?" **Microbiol.** 1999 145: 3487–3495.
24. FLEISCHMANN R.D., Alland D., Eisen J. A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J. F., Nelson W. C., Umayam L. A., Ermolaeva M., Salzberg S. L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs W. R. Jr, Venter J. C., & Fraser C. M. "Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains" **J. Bacteriol.** 2002 184 (19): 5479-5490.
25. FLORES J. & Espitia C. "Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains". **Gene** 2003 318: 75-81.
26. FREEMAN B.A. Microbiología de Burrows. 22a edición. McGraw-Hill Interamericana. España 1986. p.p. 57-62. ISBN: 968-25-1501-7.
27. GARDNER, Simmons y Snustad. Principles of genetics. 8th edition. Wiley India Pvt. USA 2009. p.p 102-103, 110. ISBN 8126510439
28. GARNIER T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Cole S.T., Gordon S.V. & Hewinson R.G. "The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*". **PNAS**. 2003 100 (13): 7877-7882.
29. GEKKO K. & Timasheff S.N. "Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures". **Biochem.** 1981 20 (16): 4667–4676.

30. HENGEN P. "Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*". **TIBS** 1995 20 (7): 285-286.
31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> ; revisada Abril 2010
32. <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History/ProductRegulation/SelectionsFromFDLIUupdateSeriesonFDAHistory/ucm081964.htm> ; revisada Abril 2010
33. <http://www.biocompare.com/ProductListings/3882/IPTG.html?sap=true> ; revisada Abril 2010
34. HUMPHREY D. "Shake flask to fermentor: What have we learned?" **Biotechnol. Prog.** 1998, 14, 3-7
35. KANE J. F. & Hartley D. L. "Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*". **Trends in Biotechnol.** 1988 6: 95-101.
36. LANDWALL P. & Holme T. "Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture". **J. Gen. Microbiol.** 1977 103: 353-358.
37. MARTÍNEZ-MARTÍNEZ I., Kaiser C., Rohde A., Ellert A., García-Carmona F. , Sánchez-Ferrer & Luttmann R. "High-Level Production of *Bacillus subtilis* Glycine Oxidase by Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Rosetta (DE3)". **Biotechnol.** 2007 23 (3): 645-651.
38. MEYER H.-P., Kuhn H.-J., Brown S.W. & Fiechter A. "Production of human leukocyte interferon by *Escherichia coli*". In **Proceedings of the Third European Congress on Biotechnology** 1984 1: 499-505

39. RAMAKRISHNAN L., Federspiel N.A. & Falkow S. "Granuloma-Specific Expression of *Mycobacterium* Virulence Proteins from the Glycine-Rich PE-PGRS Family". **Sci.** 2000 288 (5470): 1436 – 1439.
40. RODRIGUES L.C. & Smith P.G. "Tuberculosis in developing countries and methods for its control". **Trans. R. Soc. Tropical Med. Hygiene.** 1990 84 (5): 739-744.
41. SANTILLAN M. & Mackey M.C. "Quantitative approaches to the study of bistability in the lac operon of *Escherichia coli*". **J. R. Soc. Interface** 2008 5, S29-S39.
42. SCHLEGEL H.G. *Microbiología General*. Nueva edición. Ediciones Omega. España 1997. p.p. 213-216. ISBN 84-282-1030-6
43. SCHMIDT M., Babub K., Khannab N., Martena S. & Rinas U. "Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*". **J. Biotechnol.** 1999 68 (1): 71-83
44. SHARMA S.S., Campbell J.W., Frisch D., Blattner F.R., Harcum S.W. "Expression of two recombinant chloramphenicol acetyltransferase variants in highly reduced genome *Escherichia coli* strains". **Biotechnol. Bioeng.** 2007. 98 (5): 1056-1070
45. SHULER M.L. & Kargi F. *Bioprocess Engineering*. 2da edición. Prentice Hall International Series In the Physical and Chemical Engineering Sciences. USA 2008. p.p. 155-158, 176. ISBN: 0-13-081908-5
46. SINGH P.P., Parra M., Cadieux N. & Brennan M.J. "A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS proteins". **Microbiol.** 2008 154: 3469-3479.

47. SINGH S.M. & Panda A.K. "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins". **J. Biosci. Bioeng.** 2005 99 (4): 303-310.
48. SØRENSEN H. P. y Mortensen K. K. "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*" **J. Biotechnol.** 2004 115 (2): 113-118
49. STUDIER F.W, & Moffatt B.A. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes". **J. Mol. Biol.** 1986 189 (1): 113-130.
50. TABOR S. and Richardson C.C. "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1985 82: 1074-1078.
51. TALARICO S., Zhang L., Marrs C.F., Foxman B., Cave M.D., Brennan M.J., & Yang Z. "Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS16 and PE_PGRS26 Genetic Polymorphism among Clinical Isolates". **Tuberculosis (Edinb)** 2008 88 (4): 283–294.
52. TOWBIN, H., T. Staehelin, and J. Gordon. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1996. 76:4350–4354.
53. VÁZQUEZ D.G., Orozco C.A., Ordaz L.C., García S.S. Laboratorio de biorreactores. Manual de prácticas. Instituto Politécnico Nacional. México 2007. p.p 6–7.
54. World Health Organization, 2008 <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/> ; revisada Marzo 2010
55. www.merck-chemicals.com.mx/life-science-research/pet-22b+-dna/EMD_BIO ; revisada Marzo 2010

56. YEE L. & Blanch H.W. "Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*". **Nat. Biotechnol.** 1992 10: 1550 – 1556.



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Química

**Efecto de condiciones
ambientales en la biosíntesis de
la proteína recombinante
PE_PGRS26 de *Mycobacterium
tuberculosis* en cultivos
sumergidos de *Escherichia coli***

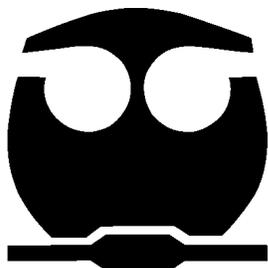
T E S I S

Para obtener el título de

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Pedro Emmanuel Navarro García



México, D.F.

2010