



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EL PAPEL DE LA POTENCIA VOLUMÉTRICA EN LA PRODUCCIÓN Y GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN BACTERIAS FILAMENTOSAS: APA (PROTEÍNA DE 45/47 kDa) DE *Mycobacterium tuberculosis* EN *Streptomyces lividans*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:
LUZ DEISY MARÍN PALACIO

TUTOR PRINCIPAL
DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILO ROLDÁN
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARIA SOLEDAD CÓRDOVA
Centro de Ciencias Aplicadas Y Desarrollo Tecnológico. CCADET

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

MÉXICO, D. F. Febrero, 2016



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.

Agradecimientos

Al programa Francisco José de Caldas, COLCIENCIAS por el apoyo financiero para la realización de mis estudios.

A la Universidad EAFIT por brindarme el apoyo económico y el tiempo para continuar con mi formación académica.

Al Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán, mi director de tesis, por darme la bienvenida en su grupo de investigación y permitirme trabajar en su laboratorio. Por su apoyo académico y financiero con los proyectos 2533, 103214 y 103393, CONACYT-INNOVAPYME 137854 y PAPIIT-UNAM IN-228509-3

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistencia a congresos y la estancia internacional.

A mi comité tutorial, Dra. Maria Soledad Córdova y Dr. Luis Servín, por sus valiosas asesorías.

Al Dr. Enrique Galindo, por ayudarme a conseguir la pasantía en el laboratorio del Prof. Dr Jochen Büchs, en la Universidad RWTH- Aachen - Alemania.

Al Prof. Dr. Jochen Büchs y al Dr. Wolf Klöckner de la Universidad RWTH- Aachen por las facilidades otorgadas para realizar las mediciones de potencia volumétrica en matraces.

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz y su grupo de trabajo 2010-2014 por el acompañamiento brindado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Clara Espitia por la donación de los anticuerpos usados en este trabajo.

Al Dr. Enrique Soto, por su asesoría en las mediciones de reología.

Al Ing. Abel Blancas, al biólogo Jesús Villegas y a todo el grupo de planta piloto 2010-2014 por su ayuda incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, Monse, Ram, Mafer y Pedro, muchas gracias por todo su apoyo durante estos años compartidos en el lab.

A todas las personas, familia y amigos, que han vivido conmigo la realización esta parte de mi proyecto de vida. Les doy las gracias por haberme brindado su apoyo incondicional y estar siempre ahí, en el camino.

Índice general

	Pág
Índice general	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xi
Resumen	1
Abstract	4
1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	11
2.1 Hidrodinámica en biorreactores agitados mecánicamente	11
2.1.1 Mezclado	11
2.1.2 Potencia volumétrica.....	13
2.1.3 Efecto de las fuerzas mecánicas sobre la fisiología de microorganismos	14
2.2 Cultivos filamentosos: <i>Streptomyces</i> como modelo de estudio	21
2.2.1 Relación entre la morfología y la reología de los caldos	23
2.2.2 Relación entre la morfología y producción de metabolitos.....	27
2.3 Glicosilación de proteínas	28
2.3.1 Proteína de 45/ 47 kDa (APA)	32
2.3.2 <i>Streptomyces lividans</i> como una opción para la producción heteróloga de proteínas O-glicosiladas	34
3. Hipótesis	37
4. Objetivos	38
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38

5. Metodología	39
5.1 Condiciones de crecimiento	39
5.2 Métodos analíticos	40
5.3 SDS-PAGE y Western blotting	41
5.4 Análisis de proteína por espectrofotometría de masas	42
5.5 Morfología micelar	43
5.6 Cuantificación de potencia volumétrica en matraces agitados	44
5.7 Configuración del biorreactor	45
6. Resultados y Discusión	47
6.1 Determinación de la potencia volumétrica en matraces agitados	47
6.2 Comportamiento cinético y morfológico de los cultivos de <i>Streptomyces lividans</i> en las tres configuraciones de matraz	50
6.3 Comportamiento reológico de los cultivos de <i>Streptomyces lividans</i> en las tres configuraciones de matraz	58
6.4 Reproducción de la P/V obtenida en matraces con resorte en matraces convencionales	60
6.5. Caracterización cinética, morfológica y reológico de cultivos de <i>S. lividans</i> en matraces convencionales, reproduciendo la P/V de matraces con resorte	61
6.6 Identificación de APA en matraces convencionales reproduciendo la P/V de matraces con resorte	69
6.7 Escalado de P/V obtenido en matraces en biorreactor de 1.2 L	74
6.8 Cinética de crecimiento bacteriano de <i>S. lividans</i> en biorreactores agitados	77
6.9 Comportamiento reológico de los cultivos de <i>S. lividans</i> en biorreactores agitados	79
6.10 Parámetros morfológicos de los cultivos de <i>S. lividans</i> en biorreactor.....	82
6.11 Determinación de proteína APA en biorreactores agitados	87
7. Conclusiones	91

8. Recomendaciones	93
9. Bibliografía	94
10. Anexos	113

Índice de figuras

	Pág
Figura 1. Relación entre la morfología y otros aspectos de los bioprocesos (Modificado de Kossen 2000)	19
Figura 2. Tipos de morfología de <i>Streptomyces</i> crecidos en cultivo sumergido (Pamboukian et al., 2002)	22
Figura 3. Representación de los cinco tipos de enlaces azúcar-péptido que han sido identificados (Spiro, 2002)	29
Figura 4. Ensayo de ligando de <i>M. tuberculosis</i> de fracciones enriquecidas con glicoproteínas obtenidas a partir del caldo de cultivo filtrado encubado con ConA resuelto por gel 2-D (tomado de González-Zamorano et al., 2009)	32
Figura 5. Diseño de los matraces de 250 mL utilizados en estos experimentos. A. Matraz convencional, B. Matraz bafleado, C. Matraz con resorte (Gamboa-Suasnavart et al., 2011)	40
Figura 6. Equipo para la medición de potencia volumétrica en matraces agitados. A. Plataforma de agitación, B. Torque con sensor integrado	44
Figura 7. Medición en línea de la potencia volumétrica de cultivos de <i>S lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) a 150 rpm y 30°C en tres geometrías de matraz. Matraz convencional (MC), matraz bafleado (MB), matraz con resorte (MR). Y número de fase para cultivos en matraz convencional (○)	47
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C y diámetro de agitación de 25 mm. Matraces convencionales (●), matraces bafleados (■) y matraces con resorte (▲)	50
Figura 9. Diámetro promedio de pellets de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C y diámetro de agitación de 25 mm. Matraz Convencional (barras con líneas verticales), matraz bafleado (barras abiertas), matraz con resorte (barras con líneas horizontales). Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente (p=0.05) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	54

Figura 10. Cinética de morfología micelar de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecidas en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30 °C y diámetro de agitación de 25mm. A. Matraz convencional (MC), B. Matraz bafleado (MB), y C. matraz con resorte (MR). Las muestras fueron tomadas a las 24, 36, 60 y 78 h de cultivo. (La barra indica 1000 μ m, aumento de 4X)	56
Figura 11. Distribución del diámetro los pellets de <i>S. lividans</i> obtenidos en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C. A. Matraz convencional (MC); B. Matraz bafleado (MB); y C. Matraz con resorte (MR). Las muestras fueron tomadas a las 24 (.....), 36 (_ . _ .), 60 (_ _ _), y 78 (____) h de cultivo	57
Figura 12. Parámetros reológicos de cultivos de <i>S lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C. A. Índice de consistencia. B. Índice de comportamiento. Matraces convencionales (●), matraces bafleados (■) y matraces con resorte (▲)	59
Figura 13. Potencia volumétrica para <i>S lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) reproduciendo la P/V de matraz con resorte en matraz convencional con 15 mL de volumen de llenado y 150 rpm (MC-15mL), matraz convencional con 25 mL de volumen de llenado y 168 rpm (MC-25mL).....	61
Figura 14. Cinética de crecimiento de biomasa <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces convencionales con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (-♦-), y matraces convencionales con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm (-O-). Matraz con resorte (-▲-)	62
Figura 15. Diámetro promedio de pellets de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en matraces convencionales con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (barras negras), y matraces convencionales con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm MC (barras grises). Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente (p=0.05) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	65
Figura 16. Distribución morfológica de los pellets <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces convencionales. A. Volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm. B. Volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm. Muestras tomadas a las 36 (.....), 48 (_ . _ .), 60 (_ _ _), and 72(____) h de cultivo	66

Figura 17. Parámetros reológicos de cultivos de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa). A. Índice de consistencia., B. Índice de comportamiento., C. Viscosidad aparente a una deformación de 90 s ⁻¹ . Matraz convencional con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (-♦-), y Matraz convencional con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm (-O-)	68
Figura 18. (A) SDS-PAGE de la proteína total secretada precipitada con metanol-cloroformo en matraces convencionales con 15, 25 y 50 mL (C15, C25, C50), con resorte (R), <i>S. lividans</i> silvestre (wt) APA de <i>E.coli</i> (C+). Western blot de APA de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) usando (B) AntiAPA Mab6A3, (C) Anti-ConA	70
Figura 19. Análisis de MALDI-TOF correspondiente al péptido del extremo carbono-terminal generado de la digestión con Lys C (Roche ®, Alemania) producido en: A y B. Matraz con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm, C. Matraz con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm, D. Matraz con volumen de llenado de 50 mL y 150 rpm	72
Figura 20. Relación entre el número de potencia y el Reynolds. 1. Turbina Rushon. 2. Paletas. 3. Propela marina (tomado de Doran, 1995)	76
Figura 21. Cinética de crecimiento de de <i>S. lividans</i> recombinante cultivado en biorreactores de 1.2 L a 30°C y TOD del 10%, agitados a 260 rpm (Línea continua,-O-) y 340 rpm (Línea continua, -●-) y su comparación con crecimiento de <i>S. lividans</i> recombinante cultivado en matraces convencionales (Línea discontinua -O-) y matraces con resorte (Línea discontinua, -●-)	77
Figura 22. Parámetros reológicos de cultivos de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en biorreactores agitados a 260 rpm (-O-) y 340 rpm (-●-). A. Índice de consistencia, B. Índice de comportamiento	81
Figura 23. Distribución morfológica de los pellets <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) en biorreactores agitados. A. 260 rpm, B. 340 rpm. Muestras tomadas a las 24 (.....), 36 (_ . _ . .), 60 (_ _), and 72(____) h de cultivo	84
Figura 24. Diámetro promedio de pellets de <i>S. lividas</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en biorreactores agitados a 260 rpm (barras blancas) y 340 rpm (barras negras). Las muestras fueron tomadas a las 24, 36, 60, 72 h de cultivo. Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente (p=0.05) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	85

Figura 25. A. SDS-PAGE de la proteína total secretada precipitada con metanol.-cloroformo en reactores agitados a 260 rpm y 340 rpm. Western blot de APA de *S. lividans* usando (B) AntiAPA Mab6A3, (C) Anti-ConA. *S. lividans* silvestre (wt) APA de *E.coli* (C+) 88

Figura 26. Análisis de MALDI-TOF para el péptido 8 generado de la digestión con Lys C (Roche ®, Alemania) producido en reactores A) 260 rpm, B) 340 rpm 89

Índice de tablas

	Pág
Tabla 1. Péptidos teóricos de la digestión de APA utilizando la enzima LysC (Roche ®, Alemania)	43
Tabla 2. Comparación morfológica de los cultivos de <i>S. lividans</i> recombinante llevados a cabo en matraces convencionales (MC), matraces bafleados (MB) y matraces con resorte (MR) de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C. Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico indica que no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	53
Tabla 3. Comparación morfológica de los cultivos de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) llevados a cabo en matraces convencionales con 15 mL de volumen de llenado y agitación de 150 rpm (MC-15 mL) y matraces convencionales con 25 mL de volumen de llenado y 168 rpm (MC-25 mL). Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico indica que no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	64
Tabla 4. Pesos observados (Da) del péptido correspondiente al extremo carbonoterminal de APA generado de la digestión con Lys C (Roche®, Alemania)	71
Tabla 5. Parámetros de agitación en biorreactores a las P/V de matraces agitados	76
Tabla 6. Resumen de parámetros experimentales a diferentes velocidades de agitación	79
Tabla 7. Comparación morfológica de los cultivos de <i>S. lividans</i> recombinante productora de APA (45/47 kDa) llevados a cabo en biorreactores agitados a 260 rpm y 340 rpm. Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico indica que no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD	83
Tabla 8. Microescala de Kolmogorov y diámetro promedio de pellets, para diferentes tiempos de cultivo en biorreactores agitados	87
Tabla 9. Pesos observados (Da) del péptido correspondiente al extremo carbonoterminal de APA generado por digestión con Lys C (Roche®, Alemania) obtenidos en biorreactores agitados y en matraces convencionales y con resorte	90

Resumen

Las bacterias del género *Streptomyces* producen una amplia gama de productos naturales, tales como antibióticos, antifúngicos, antimicrobianos, agentes antitumorales, así como herbicidas, pigmentos y otros compuestos bioactivos. Además, algunas cepas de *Streptomyces lividans* se utilizan como huéspedes para la expresión de proteínas heterólogas.

En cultivos sumergidos, *S. lividans* presenta una morfología que va desde micelio disperso hasta pellets. Esta distribución morfológica depende de las condiciones hidrodinámicas y la tensión de oxígeno disuelto en el sistema de cultivo, que a su vez puede afectar la productividad del proceso. Durante los cultivos, estos microorganismos están sometidos a estrés hidrodinámico y la potencia volumétrica (P/V) ha sido ampliamente usada para la caracterización de la hidrodinámica macroscópica en biorreactores y para el escalado de los procesos microbianos.

En el presente trabajo, se caracterizó en línea, la P/V de los cultivos de *S. lividans* en tres geometrías de matraz (matraz convencional -MC-, matraz bafleado -MB- y matraz con resorte -MR-) y se determinó el efecto de esta, sobre el crecimiento, morfología, producción y O-manosilación de una O-glicoproteína recombinante (APA de *Mycobacterium tuberculosis*). Adicionalmente, se reprodujo la P/V de MR en MC y los cultivos de *S. lividans* se escalaron a un biorreactor de 1.2 L, usando la P/V obtenida en MC y MR como criterio de escalado.

Durante la fase exponencial del crecimiento, se obtuvo una alta P/V en MB (0.51 kW/m³), seguido de MR (0.44 kW/m³) y MC (0.22 kW/m³). Durante la fase estacionaria hubo una disminución del 20 % de la P/V en MB y MR; mientras que,

en MC se encontró un aumento a 0.38 kW/m^3 , probablemente por cambios en la morfología micelial y sus efectos sobre la reología de los caldos.

Con el fin de determinar si la P/V tiene un papel importante en los cambios de crecimiento y morfología micelial, se hicieron dos aproximaciones para reproducir la potencia volumétrica obtenida en MR en MC. La primera, manteniendo la velocidad de agitación a 150 rpm y disminuyendo el volumen de llenado a 15 mL (15 mL-MC) y en un segundo experimento, aumentando la velocidad de agitación a 168 rpm con volumen de llenado de 25 mL (25 mL-MC). Encontrándose diferencia en el crecimiento, morfología y producción de proteína. El comportamiento en la velocidad específica de crecimiento ($0.15 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), y concentración final de biomasa ($4.7 \pm 0.3 \text{ g/L}$) en MC-15 mL fue similar a los cultivos llevados a cabo en matraces con resorte ($0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y $5.2 \pm 0.1 \text{ g/L}$) Sin embargo, diferencias significativas fueron encontradas en MC-25 mL ($0.10 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ y $2.5 \pm 0.4 \text{ g/L}$) con respecto a MC-15 mL y MR. Se encontraron pellets más grandes, medidos como diámetros promedio, en MC-15 mL y MC-25 mL ($400 \mu\text{m}$), comparados con los MR ($200 \mu\text{m}$) y se obtuvo mayor producción de proteína los cultivos de matraces convencionales con 15 mL de medio ($45 \pm 2 \%$ de la proteína total) comparados con los cultivos en matraces convencionales con 25 mL de medio y matraces con resorte, donde la producción de la proteína APA fue de $36 \pm 3 \%$ y 35.2% de la proteína total, respectivamente.

Adicionalmente, la P/V medida en matraces convencionales y con resorte se usó como criterio de escalado a biorreactores de 1.2 L, encontrándose que la P/V como criterio de escalado, no reproduce el comportamiento morfológico y la producción de biomasa en los cultivos en MC, lo cual indica que la P/V no es un parámetro definitivo para determinar el crecimiento de bacterias y la morfología, ni siquiera, la producción de glicoproteínas. Pero se podría proponer que la

transferencia de oxígeno en el centro del pellet y el estrés hidromecánico podrían ser parámetros más relevantes que la P/V.

Abstract

Bacteria of the genus *Streptomyces* are widely used to produce a wide range of natural products such as antibiotics, antifungals, antimicrobials, antitumor agents and herbicides, pigments and other bioactive compounds. Also, some strains of *Streptomyces lividans* are commonly used as hosts for expression of heterologous proteins.

In submerged cultures, *S. lividans* has a morphology ranging from dispersed mycelia to pellets. This distribution of the mycelial morphology depends largely on the hydrodynamic conditions of the system and the dissolved oxygen tension in the culture, which may affect productivity processes. During cultivation, those microorganisms are subjected to hydrodynamic stress and, volumetric power input (P/V), which has been widely used to characterize macroscopic hydrodynamics in bioreactors and scale-up.

In the present work, the evolution of the specific power input (P/V) was characterized on-line during *S. lividans* growth in three flask geometries (Conventional normal flask -MC-, Baffled flask -MB-, and Coiled flask -MR-) and we determined its effect on the growth, morphology, production and O-mannosylation of a recombinant O-glycoprotein (APA of *Mycobacterium tuberculosis*). During the exponential phase of growth, the highest P/V values were obtained in MB (0.51 kW/m³), followed by the MR (0.44 kW/m³) and MC (0.22 kW/m³). During the stationary phase, there was a decrease of 20% of the P/V in MB and MR, while an increase in MC was found (0.38 kW/m³), probably due to changes in the mycelial morphology and their effects on the rheology of the broths.

In order to discern the specific role of P/V in the determination of growth and morphology of *S. lividans*, two different approaches were taken: to increase the

power input up to those values found in coiled flasks, but this time in conventional normal Erlenmeyer flasks (MC). The first approach was setting the shaking frequency to 150 rpm and decreasing filling volume of 50 mL to 15 mL (15mL-MC). The second approach was to increase shaking frequency to 168 rpm to filling volume of 25 mL. However, differences in growth, morphology and productivity of the recombinant protein were found.

Specific growth rate behavior ($0.15 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), and final concentration of biomass ($4.7 \pm 0.3 \text{ g/L}$) in MC-15mL was similar to cultures performed in coiled flask ($0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ and $5.2 \pm 0.1 \text{ g/L}$). However, significant differences were found in MC-25 mL ($0.10 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ and $2.5 \pm 0.4 \text{ g/L}$) with respect to MR and MC-15mL. Larger pellets, measured as average diameters, were found in MC-15mL and MC-25mL (400 μm) compared to MR (200 μm). An increased in the production protein was obtained in cultures MC-15 mL ($45 \pm 2 \%$ of the total) compared with MC-25 mL and coiled flask, where APA production were to $36 \pm 3 \%$ and 35.2% of the total protein, respectively.

Additionally, the P/V obtained in MC and MR were used as scale up criteria to 1.2 L bioreactor. It was found that, the P/V does not reproduce the morphological behavior and biomass production in the cultures of MC. Our data indicates that the role of P/V, as a global parameter in *S. lividans* cultures in shake flasks, is not clearly defined as an important parameter to determine *S. lividans* growth, morphology, recombinant protein production, and its post-translational modifications. But we could propose that the oxygen transfer in the center of the pellet and the hydromechanical stress may be more relevant than the P/V.

1. Introducción

Una de las modificaciones postraduccionales más importante en la biosíntesis de proteínas es la glicosilación. En eucariotes los mecanismos de glicosilación han sido bien caracterizados (Jenkins, 2007; Li and d'Anjou, 2009), e inclusive se han descubierto algunas enfermedades en humanos relacionadas con fallas en los mecanismos de glicosilación (Grunewald et al., 2002; Lehle et al., 2006). Sin embargo, la información sobre la estructura, función y producción de proteínas glicosiladas de origen procariótico sigue siendo poca y más aún, si se basa en la producción de proteínas heterólogas (Wieland, 1988; Brooks, 2004; Graumann and Premstaller, 2006; Hitchen and Dell, 2006c; Brooks, 2009). Además, y muy recientemente el estudio de la biosíntesis y actividad de proteínas O-glicosiladas en bacterias patógenas se ha tornado un tópico de investigación relevante, pues se ha demostrado la participación de estas proteínas glicosiladas en la patogénesis bacteriana, como también la relación del grado de glicosilación y la actividad inmunogénica (Espitia and Mancilla, 1989; Horn et al., 1999; Benz and Schmidt, 2002; Schmidt et al., 2003; Hitchen and Dell, 2006). Como es de esperarse, la obtención de estas glicoproteínas de sus hospederos patógenos no es una tarea fácil, tanto por los requerimientos de bioseguridad de los laboratorios como por las pocas concentraciones que podrían recuperarse de cada proteína en su hospedero natural (Young et al., 1992; Bellinzoni y Riccardi, 2003). Usar hospederos no patógenos procariotas es una buena alternativa para obtener estas proteínas de manera heteróloga con patrones de glicosilación similares, y esto podría permitir revelar blancos terapéuticos novedosos para combatir las infecciones bacterianas, así como nuevos métodos de diagnóstico (Tremblay et al., 2002; Lara et al., 2004; Vallin et al., 2006). Son pocos los reportes en la literatura donde se producen proteínas recombinantes glicosiladas en procariotas (Lara et al., 2004; Graumann y Premstaller, 2006; Vallin et al., 2006; Gamboa-Suasnavart et al., 2011; Gamboa-Suasnavart et al., 2013; Marín-Palacio et al.,

2014), pero si se ha reportado que en muchos de los casos las proteínas glicosiladas juegan papeles funcionales muy importantes en sus hospederos (Espitia y Mancilla, 1989; Tissot et al., 2009; Devasahayam, 2007; Lairson et al., 2008; Dalpathado y Desaire, 2008). Dentro de estas actividades funcionales se puede mencionar el papel que juegan los carbohidratos en la superficie celular en el reconocimiento y unión selectiva a otras células o a moléculas solubles (Schachter, 1984). Cabe remarcar además, la importancia de las proteínas terapéuticas en el mercado mundial donde para el 2009, más de 165 productos habían sido aprobados por las agencias reguladoras y al menos 500 productos estaban en desarrollo clínico o preclínico (Durocher y Butler, 2009). De estos, aproximadamente el 70% fueron glicoproteínas producidas en eucariotes. A partir de 2003, los productos del mercado mundial de biofarmacéuticos se estimó en más de \$ 30 mil millones (Sethuraman y Stadheim, 2006) y para el 2006, este mercado fue de 57 mil millones dólares norteamericanos con una tasa compuesta de crecimiento anual del 12 % hasta 2010 (Durocher y Butler, 2009), esperando alcanzar unas ventas de más de 300×10^9 millones de dólares para el año 2050 (Palomares et al., 2002).

Específicamente, en *Mycobacterium tuberculosis* se han reportado varias proteínas O-glicosiladas con funciones específicas en la patogénesis de la bacteria (Espitia y Mancilla, 1989; Dobos et al., 1995; Espitia et al., 1995; Dobos et al., 1996; Diaz-Silvestre et al., 2005). Aunque las proteínas O-glicosiladas representan no más del 10 % del total que es secretado por la bacteria, se ha reportado que sus actividades antigénicas son importantes para ser estudiadas como modelo de inmunización y/o vacunación (Sable et al., 2011; Romain et al., 1999; Sable et al., 2011). De manera particular, la proteína APA (*Alanine and Proline rich Antigenic*, o proteína de 45/47 kDa) es uno de los principales antígenos inmunodominantes que son secretados por la micobacteria (Dobos et al., 1995; Espitia et al., 1995; Dobos et al., 1996). Aunque la función específica de

APA en *M. tuberculosis* no está claramente definida se cree que tiene función de adhesina (Ragas et al., 2007), como también aquella de elicitar respuestas linfoproliferativas y producción de citocinas (Kumar et al., 2003). Como antígeno, se ha demostrado que la capacidad de elicitar la respuesta inmune en linfocitos T y en cobayos es función del patrón de O-glicosilación de la proteína APA, lo cual pudo demostrar las diferencias en la producción heteróloga de APA en diversos hospederos (Horn et al., 1999). Por lo descrito previamente, y la posibilidad de modificar la O-glicosilación de los cuatro residuos de treonina de APA y su productividad en un hospedero como *S. lividans*, se considera a esta como una candidata muy interesante para ser estudiada y posiblemente usada en vacunación y/o pruebas de diagnóstico (Espitia et al., 1995; Vallin et al., 2006; Sable et al., 2011). Si bien es cierto, *S. lividans* ha sido usado para la producción de proteínas recombinantes desde hace años (Anne y Van, 1993; Binnie et al., 1997), hasta el momento, solo Gamboa-Suasnavart et al., (2011) ha demostrado como se ve afectada la O-glicosilación y la producción de una proteína heteróloga (APA) en cultivo sumergido por efecto de las condiciones de cultivo, específicamente en *S. lividans*. En este trabajo, Gamboa-Suasnavart et al. (2011) evaluó el efecto de diferentes configuraciones de matraces (matraces convencionales -MC- , matraces bafleados -MB- y matraces con resorte -MR-) en la morfología final de *S. lividans*, la producción y O-glicosilación de la proteína APA, observando agregados más grandes en MC (diámetro de 1.57 ± 0.41 mm) comparados con los MB (0.23 ± 0.06 mm) y MR (0.16 ± 0.05 mm). Adicionalmente, altas productividades de la proteína APA fueron observadas en MB y MR, tres veces más que lo obtenido en MC. Por otra parte, en el péptido del carbono terminal obtenido por degradación con Lys-C hasta cinco residuos de manosas unidas fueron encontrados en MB y MR y solo dos residuos de manosa en MC. Estos resultados sugieren que tanto la morfología micelal de *S. lividans* y la producción de APA está siendo afectada por la geometría del matraz; esto causado por un efecto combinado de la aireación e hidrodinámica en el cultivo

(Gamboa-Suasnavat et al., 2011). Recientemente en nuestro grupo, Gamboa-Suasnavat et al. (2013) propusieron un criterio de escalado basado en la morfología de *S. lividans*. En este sentido, un modelo matemático de la literatura (Tought y Prosser, 1996) que relaciona la morfología con la potencia volumétrica entregado al sistema fue utilizado por Gamboa-Suasnavat et al. (2013) para obtener una morfología de *S. lividans* en biorreactor similar a la producida en matraces con resorte. Este criterio de escalado fue satisfactorio en cuanto a la reproducción de la morfología, así como en producción de proteína APA y la glicosilación. Sin embargo, la concentración de biomasa no fue similar, sugiriendo que pueden existir otros factores que estarían influyendo en el metabolismo celular. Durante los cultivos, los microorganismos son sometidos a estrés hidrodinámico. La potencia volumétrica (P/V) es un parámetro esencial para especificar las condiciones de cultivo de microorganismos en matraces agitados y biorreactores de tanque agitado. Muchas características físicas de los reactores, como lo es el estrés hidrodinámico y la transferencia de calor están directamente relacionados con la P/V , por lo que se considera un parámetro importante para la optimización y escalado de los cultivos (Sumito et al., 1972; Klockner y Büchs, 2011). Adicionalmente, respuestas biológicas como daño celular está influenciado por la energía de disipación a través de cambios de suministro de oxígeno, eliminación de dióxido de carbono, grado de mezcla y estrés hidrodinámico (Büchs et al., 2001).

Es por ello que en este proyecto se evaluó el efecto de la potencia por unidad de volumen (P/V) presente en un cultivo sumergido sobre la producción y glicosilación de la proteína APA recombinante en *S. lividans*, como función del metabolismo celular asociado a los cambios morfológicos miceliares, su cinética de crecimiento y parámetros reológicos de los cultivos. Inicialmente, se determinaron los perfiles de P/V en los matraces con las diferentes geometrías de matraz y luego se escalaron estas condiciones en un biorreactor de 1.2 L manteniendo constante la

tensión de oxígeno disuelto y la temperatura, y de esta manera determinar si el cambio de P/V presenta alteraciones en la producción y glicosilación de la proteína.

Nuestros principales interrogantes se han basado en determinar la energía en términos de la potencia volumétrica que se entregan en las diferentes configuraciones de matraces y que podrían ser escaladas a un biorreactor. Esto con el fin de hacer un cambio de escala razonado de matraces a biorreactor y poder cuantificar las diferencias en las cinéticas de crecimiento y la expresión y O-manosilación de la proteína APA. En términos mecanísticos queremos entender como el efecto del estrés hidrodinámico, medido como P/V puede afectar la morfología micelar de *S. lividans* y la expresión de la proteína de 45/47 kDa y a su vez, como influye la velocidad de crecimiento y la morfología micelar de *S. lividans* en la expresión de APA y la glicosilación, particularmente la cantidad de manosas unidas en el extremo C-terminal.

2. Antecedentes

2.1 Hidrodinámica en biorreactores agitados mecánicamente

2.1.1 Mezclado

En cultivo sumergido, la agitación es un parámetro importante para mantener la homogeneidad y una buena transferencia de calor y de masa (Raposo y Lima-Costa, 2006). Además, es necesario para minimizar los gradientes de concentración de nutrientes (Smith et al., 1990). En cultivos aerobios, la operación de transferencia de masa más crítica es la disolución del oxígeno requerido para la respiración de los microorganismos y en gran medida, la potencia requerida para este, viene dada por el agitador en un tanque agitado (Smith et al., 1990). Este mezclado puede ser caracterizado por la escala y la intensidad de la mezcla (van't Riet y Tramper 1991). La escala de la mezcla representa la dimensión más pequeña (volumen, masa) del sistema analizado en el que se permite la falta de homogeneidad; mientras que, la intensidad de mezclado es definido como la desviación de la mezcla perfecta (van't Riet y Tramper 1991; Cascaval et al., 2007).

El mezclado también puede ser analizado desde el punto de vista del nivel de homogenización. Dos niveles de homogenización pueden ser encontrados dentro del reactor: macromezclado y micromezclado (Martín et al., 2008). El macromezclado consiste en la distribución uniforme del contenido de la masa total del sistema por medio del movimiento de líquido inducido por el agitador (Cascaval et al., 2007). Este prevalece alrededor de la región del micromezclado, y determina la homogenización interna, el movimiento de las burbujas a través del reactor y los patrones de flujo en el cual los remolinos (*eddies*) de turbulencia son del tamaño del reactor. Adicionalmente, la contribución de la aireación superficial del tanque, así como el efecto de la geometría del impulsor y el tanque a la transferencia de masa dependen de esta escala de mezclado (Martín et al., 2008).

El micromezclado prevalece cerca del impulsor, donde pequeños remolinos denominados *eddies* definen los gradientes de velocidad que rodean las burbujas. Consiste en una mezcla a escala molecular y es controlada por difusión molecular. Independientemente del flujo generado en todo el sistema, a escala de micromezclado, el flujo es laminar (Galaction et al., 2004; Martín et al., 2008). Para la descripción de *eddies* en un sistema de fluidos, a menudo se utiliza la teoría de la cascada de la energía. Donde la energía cinética turbulenta se transfiere continuamente a partir de grandes *eddies* a los más pequeños y los *eddies* más pequeños disipan la energía en forma de calor. El diámetro y la velocidad de estos remolinos terminales se pueden expresar en caso de condiciones de turbulencia isotrópica por la microescala de Kolmogorov de longitud (λ_k) o de velocidad (v_k) (Kolmogorov 1958; Kelly et al., 2006).

$$\lambda_k = \left(\frac{v_L}{\varepsilon}\right)^{0.25} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$v_k = (v_L \varepsilon)^{0.25} \quad \text{Ecuación 2}$$

La microescala de Kolmogorov o el tamaño de los *eddies* más pequeños está en función de la velocidad de energía de disipación (ε) y la viscosidad cinemática del fluido (ν_L). Altas potencias volumétricas generan *eddies* pequeños, causando como resultado un incremento en la interacción célula-eddy (van Suijdam y Metz, 1981; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Rocha-Valadez et al., 2007). Los *eddies* de dimensiones similares a las partículas suspendidas son responsables de la tensión mecánica, la cual está relacionada con la energía de entrada en el sistema de reacción (Hempel, 1988; Kusters, 1991). Dado que, según la teoría de Kolmogorov, la potencia por unidad de volumen determina la energía y el tamaño

de los remolinos, la P/V ha sido utilizada tradicionalmente en el diseño y escalado de reactores (Martín et al., 2008).

2.1.2 Potencia volumétrica

Durante los cultivos, los microorganismos son sometidos a estrés hidrodinámico, junto con estrés nutricional. La potencia volumétrica (P/V) ha sido ampliamente usada para la caracterización de la hidrodinámica macroscópica en biorreactores y para el escalado de los procesos microbianos (Sumino et al., 1972; Büchs et al., 2001). Es indudable, que uno de los factores que más impacta la economía de un proceso biotecnológico es el consumo de energía; por esta razón, el consumo de potencia específica del motor para la agitación de los caldos de cultivo es uno de los puntos críticos en el escalado de un biorreactor. Por si fuera poco, la potencia específica también influye en los rendimientos y productividades de los procesos de fermentación aerobios (Aiba et al., 1973; Tamura et al., 1997; Rosa et al., 2005; Yu et al., 2012). En efecto, la respuesta biológica, incluyendo el daño celular se ve muy influenciada por la energía de disipación a través de cambios en el suministro de oxígeno, eliminación de dióxido de carbono, grado de mezcla y estrés hidrodinámico (Büchs et al., 2001). La potencia (P) es generalmente considerada como el producto del torque (M) y la velocidad angular (ω). De otro lado, el torque puede ser descrito como el producto de la fuerza (F) y el brazo de palanca (r). La fuerza es obtenida por la multiplicación del estrés de cizalla (τ) y el área de fricción (A). Consecuentemente:

$$P = M \omega = F r \omega = \tau A r \omega \quad \text{Ecuación 3}$$

El consumo de potencia por agitación es una función de propiedades físicas, condiciones de operación, geometría del tanque y del impulsor. El análisis dimensional provee la siguiente relación:

$$\frac{P}{\rho N^3 D_i^5} = f \left[\frac{\rho N D_i^2}{\mu}, \frac{N^2 D_i}{g}, \frac{D_T}{D_i}, \frac{H}{D_i}, \dots \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

El grupo adimensional del lado izquierdo corresponde al número de potencia (N_p), que es la relación de fuerza de arrastre en el impulsor y la fuerza inercial. El primer término de la derecha es el número de Reynolds (Re), definido como la relación entre la fuerza inercial y las fuerzas viscosas y el segundo término es el número de Froude (N_F) que tiene en cuenta la fuerza de gravedad, que afecta el consumo de energía debido a la formación del vórtice en un recipiente agitado (Dutta, 2008).

Para el caso de matraces Erlenmeyer, son pocas las publicaciones que tratan aspectos ingenieriles para establecer estos como biorreactores agitados y de esta manera permitir un incremento de escala del bioproceso. Se ha demostrado que la potencia volumétrica en matraces agitados a bajas viscosidades puede describirse en función del número modificado de Newton (Ne'), el cual es función del número de Reynolds (Re), de acuerdo a lo descrito por Büchs et al. (2000a):

$$Ne' = \frac{P}{\rho n^3 d^4 V_L^{1/3}} \quad \text{Ecuación 5}$$

P: Potencia (W)

n: Velocidad de agitación (s^{-1})

d: Diámetro del matraz (m)

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\eta} \quad \text{Ecuación 6}$$

ρ : Densidad (Kg/m^3)

V_L : Volumen de llenado (m^3)

η : Viscosidad dinámica del fluido (Pa.s)

2.1.3. Efecto de las fuerzas mecánicas sobre la fisiología de microorganismos

Uno de los parámetros claves en el desarrollo de procesos que utilizan biocatalizadores es su sensibilidad al estrés hidrodinámico. Los biorreactores pueden generar fuerzas en la región del impulsor, a lo largo de las paredes, y en las interfaces aire-líquido. Estas fuerzas pueden ser lo suficientemente intensas

como para inhibir o destruir de forma permanente la actividad de los catalizadores biológicos. Los hongos, las bacterias, células vegetales y células animales son sensibles a las fuerzas generadas en biorreactores. Hay dos aspectos importantes a este problema. El primero es la estructura celular y la fisiología, que dicta cómo una célula puede responder al estrés hidrodinámico. El segundo es el tipo de fuerzas ejercidas en la célula y la magnitud y la duración de la misma (Prokop y Bajpai, 1992).

Adicionalmente, está bien documentado que en cultivo sumergido los microorganismos filamentosos como hongos y algunas bacterias, poseen la habilidad de crecer en diferentes morfologías (desde micelio disperso hasta pellets) dependiendo de las condiciones de proceso tales como: velocidad de corte, tamaño de inóculo, reología del caldo, disponibilidad de oxígeno y nutrientes y geometría del reactor (Tamura et al., 1997; Cui et al., 1997; Amanullah et al., 1998; Casas López et al., 2004; ; O' Cleirigh et al., 2005; Kelly et al., 2006; Purwanto et al., 2009). Además, la formación de producto puede ser dependiente no solo de los niveles de biomasa sino también de los perfiles morfológicos del cultivo (Tamura et al., 1997).

Varios estudios han demostrado los efectos de las fuerzas mecánicas en la morfología de microorganismos filamentosos y la productividad del proceso global. Por ejemplo, Tamura et al. (1997) para evaluar el efecto de las condiciones de corte en la morfología de *S. fradiae* (medida como área micelial) y la producción de tilosina, variaron la agitación desde 250 rpm a 900 rpm manteniendo constante la velocidad de aireación a 1.0 vvm. Los autores reportan que velocidades de agitación iguales y mayores a 400 rpm favorecían la formación de micelio disperso, mientras que a velocidades menores, la morfología de pellets, medida como área promedio del pellet incrementaba. Además, encontraron que las máximas velocidades de producción de tilosina estaban relacionadas con altas velocidades de agitación sugiriendo que morfologías de micelio disperso y/o

pellets de tamaño reducido (menores a $4 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) pueden maximizar la velocidad de producción, al ser comparado con los cultivos agitados a 250 rpm, donde el área promedio del pellet estuvo alrededor de $1,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, lo que podría causar una limitación de sustrato y oxígeno dentro del pellet (Tamura et al., 1997). Aunque, Rosa et al. (2005) no evaluó los cambios morfológicos ocurridos en una cepa de *S. clavuligerus* al observar la producción de ácido clavulánico en medios complejos con glicerol y derivados de soja como principales nutrientes, encontró que su producción estaba fuertemente afectada por las condiciones de corte una vez que se suministra el suficiente oxígeno (concentración de oxígeno disuelto superior al 20 %), concluyendo que las altas velocidades del impulsor, producen altas velocidades de corte, mejorando la concentración y la productividad del ácido clavulánico.

Amanullah et al. (1999), reportaron la influencia de las condiciones de agitación en la morfología y la producción de α -amilasas (proteína homóloga) y amiloglucosidasa (proteína heteróloga) en una cepa de *Aspergillus oryzae* en quimiostato variando la velocidad de agitación desde 1000 rpm hasta 550 rpm, que corresponden a energía de disipación en el cultivo desde 12 kW/m^3 hasta 2.2 kW/m^3 , encontrando que variaciones en la intensidad de agitación generan cambios en la morfología micelial. Áreas de pellets no superiores a $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ fueron encontrados en los sistemas agitados a 1000 rpm (12 kW/m^3), mientras que áreas de pellets entre 5 y $9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ fueron obtenidos en los sistemas agitados a 550 rpm (2.2 kW/m^3). Sin embargo, los autores encontraron que la producción de las proteínas fue independiente de la velocidad de agitación en el intervalo de 550 a 1000 rpm. Adicionalmente, la conclusión más importante en este estudio fue que variaciones significativas en la morfología del micelio como consecuencia de los cambios en la velocidad de agitación no afectaron la producción de proteínas, a velocidades específicas de crecimiento constante.

El efecto de la agitación y aireación fueron evaluados por Silva-Santisteban y Maugeri (2005) en *Kluyveromyces marxianus* para la producción de inulinasas. Para ello, los autores evaluaron diferentes velocidades de agitación (entre 50 rpm y 550 rpm), aireación (0.5 vvm a 2.0 vvm) y tipo de impulsor (turbina Rushton, propela tipo marina e impulsor de paletas inclinadas). Los resultados obtenidos muestran que la producción de la enzima estuvo afectada por las condiciones de agitación, mejorándose su actividad cuando se incrementaba la agitación desde 150 rpm a 450 rpm. Al evaluar el tipo de impulsor, se encontró que la turbina Rushton permite valores altos de K_{La} (102 h^{-1}) y un efecto negativo en la viabilidad celular. La propela tipo marina generó un bajo K_{La} (17 h^{-1}) y un efecto poco significativo en la viabilidad, mientras que el impulsor de paletas inclinadas mostró un efecto intermedio. Con respecto a la actividad enzimática, los cultivos agitados con impulsor de paletas inclinadas, presentaron mayores actividades (176 UI/mL), seguido por la propela tipo marina (126 UI/mL) y turbina Rushton (122 UI/mL). Estos resultados muestran que el comportamiento del microorganismo no solo se relaciona con la velocidad de transferencia de oxígeno, sino que la hidrodinámica del sistema juega un papel importante ya que la sensibilidad al esfuerzo de corte es una característica intrínseca de cada microorganismo lo que podría llegar a ser un factor limitante en la optimización de los procesos de escalado (Silva-Santisteban y Maugeri, 2005).

Rodríguez-Porcel et al. (2005) evaluaron el efecto de la morfología de los pellets de *Aspergillus terreus* sobre la reología de los caldos en tanque agitado. Encontrando que el diámetro del pellet y su compactación se vieron afectados por la intensidad de la agitación. Sin embargo, la productividad total de biomasa no fue afectada. Intensidades de agitación de hasta 300 rpm, correspondientes a velocidades en la punta del impulsor de 1.02 ms^{-1} , generaron pellets estables con diámetros aproximados de $2300 \mu\text{m}$. Mientras que, a velocidades de agitación superiores a 600 rpm (velocidad en la punta del impulsor mayor a 2.03 ms^{-1}) se obtuvieron pellets de hasta $900 \mu\text{m}$ de diámetro. Esta disminución en el tamaño

del pellet podría deberse a la erosión de la superficie, incluso a bajos niveles de agitación, donde no se presentó una reducción inicial en el tamaño del pellet, se favoreció una reducción en los filamentos aparentemente debido a los eddies que podrían estar forzando las hifas periféricas en el pellet, favoreciendo la compactación del mismo. Al correlacionar el diámetro de los pellets con la potencia gaseada por unidad de volumen P_g/V , los autores encontraron, que este parámetro influye significativamente en las dimensiones de los pellets.

En este mismo sentido, Purwanto et al. (2009) evaluaron el efecto de la agitación en los cambios morfológicos de *Aspergillus niger* durante la producción de tanasa. Se evaluaron velocidades de agitación entre 0 y 200 rpm en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio, encontrando que incrementos en la velocidad de agitación favorecía la actividad de tanasa (2.75 U/mL a 130 rpm), y que una velocidad de 100 rpm favorece la producción de biomasa. Los autores indican que velocidades de agitación por encima de 130 rpm reducen la producción de enzima, condición que puede ser debida a alteraciones en la célula causadas por altos esfuerzo de corte y alta abrasión, lo que generaría una caída en la producción.

De una manera general, las condiciones de operación durante el cultivo pueden tener un impacto en el crecimiento celular, síntesis de producto y morfología de la célula, que a su vez pueden influir en la reología de los caldos afectando los fenómenos de transporte en el biorreactor. Una relación estrecha entre morfología y otros aspectos de los bioprocesos se muestra en la figura 1.

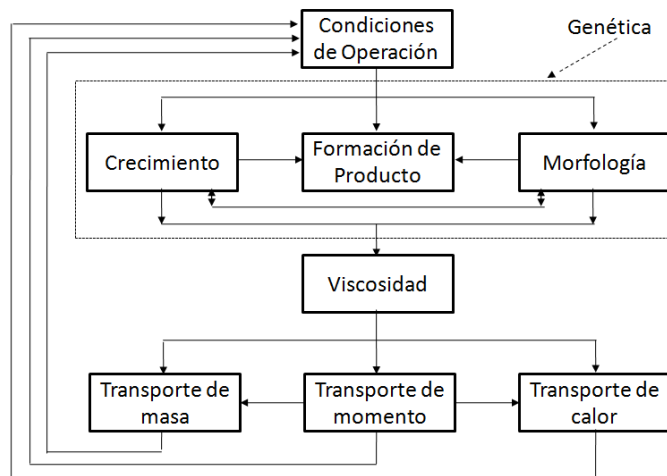


Figura 1. Relación entre la morfología y otros aspectos de los bioprocesos (Modificado de Kossen, 2000)

En este sentido, la respuesta al estrés hidrodinámico puede generar efectos subletales que se manifiestan en alteraciones metabólicas en la célula tales como cambios en su morfología, crecimiento y productividad y aunque se percibe como perjudicial, en algunos casos puede ser beneficioso (Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006), aumentando la concentración celular en *Bacillus subtilis* (Sahoo et al., 2003), aumentando la producción de antraquinonas en cultivos de *R. tinctorum* (Busto et al., 2008) y mejorando la producción de lavendamicina en cultivos de *Streptomyces flocculus* (Xia et al., 2014). Estudios en el efecto de la respuesta celular al estrés hidrodinámico se ha evaluado en células de mamíferos, plantas y hongos, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la información de este tipo de estrés en células bacterianas es escasa. Para el caso de bacterias, Sahoo et al., (2003), evaluó la respuesta al esfuerzo de corte en un biorreactor de flujo tipo Couette con un cultivo de *Bacillus subtilis*. Los autores encontraron que el tamaño celular disminuyó en un 50 % cuando la velocidad de deformación aumentó a 1482 s^{-1} comparados con los crecidos en un cultivo control con una velocidad de deformación de 0.028 s^{-1} , cuyas células fueron más alargadas alcanzando tamaños celulares promedio de $3.05 \mu\text{m}$. Adicionalmente, la velocidad

específica de crecimiento se incrementó en un 245%, y la máxima concentración celular aumentó en un 190% cuando la velocidad de deformación aumentó de 0.028 a 1.482 s⁻¹. El nivel específico de catalasa intracelular aumentó en un 335% y de proteasa en un 87% a 1482 s⁻¹, en comparación con los cultivos de control a una velocidad de deformación 0.028 s⁻¹. Más interesante aun; el nivel de corte influyó en la expresión génica mediante el factor transcripcional σ^B y especies reactivas al oxígeno (siROS), donde las siROS fueron 9.3 veces más altas a elevadas velocidades de deformación en comparación con las condiciones de control.

Aunque muchos estudios del efecto del estrés hidrodinámico se han enfocado en determinar los efectos subletales (cambios morfológicos, crecimiento y productividad), algunos autores han evaluado como este tipo de estrés afecta la glicosilación de proteínas recombinantes en sistemas modelo de células de Ovario de Hamster Chino (CHO). Por ejemplo, Senger y Karim (2003) investigaron el esfuerzo de corte como posible parámetro para el control de la glicosilación de la proteína recombinante activadora del plasminógeno (r-tPA) en células CHO, encontrando que la producción total de r-tPA fue maximizada en condiciones moderadas de estrés (valores de Re entre 5.59 y 7.46 x10³), como también la viabilidad celular de las células CHO. Sin embargo, la composición de la proteína r-tPA producida bajo niveles perjudiciales de esfuerzo de corte (valores de Re de 9.31 x10³) fue enriquecida en la glicofoma tipo II. Adicionalmente, Godoy-Silva et al. (2009), manteniendo controlado la tensión de oxígeno disuelto en 30 %, evaluaron la respuesta fisiológica de células CHO a estrés hidrodinámico, cuantificado por la velocidad de disipación de energía a la que las células fueron expuestas en una cámara de tortura. Los autores encontraron en el anticuerpo monoclonal, tres glicofomas mayoritariamente, G0, G1 y G2. Donde G1 y G2 son glicofomas que difieren de G0 en uno o dos azúcares más, respectivamente. De estas tres glicofomas G0 es la más dominante, mientras que

G2 se presenta en menor cantidad. Sin embargo, en condiciones de estrés hidrodinámico, la distribución de estas tres glicofomas fue significativamente sesgada hacia G1 y G2, cambios que se direccionan hacia las glicosilaciones más complejas, sugiriendo que el estrés hidrodinámico induce la capacidad de glicosilación de células CHO.

Con los ejemplos presentados previamente, se puede concluir que cada microorganismo es único en su desarrollo morfológico y fisiológico y que la producción de metabolitos requiere un conocimiento detallado de las características de crecimiento y la fisiología del microorganismo. Así, por cada una de las fermentaciones, las condiciones fisiológicas y la etapa correcta del desarrollo deben ser establecidas para maximizar la formación de producto.

En concordancia con lo anterior, el objetivo de este proyecto es lograr determinar, el efecto de la potencia volumétrica sobre la O-glicosilación y productividad de una proteína producida de manera heteróloga en un actinomiceto. Estos cultivos inicialmente llevados a cabo en cultivos en matraces, se escalaron a biorreactor, en función de la P/V. A su vez, se determinó cómo son afectadas la velocidad específica de crecimiento, la productividad de la proteína heteróloga, como la morfología micelial y su posible relación con la expresión y O-glicosilación de la proteína APA. Al final de este proyecto pretendemos presentar a *S. lividans* como un posible actinomiceto no patógeno que pueda producir de manera eficiente proteínas O-manosiladas con características similares a aquellos actinobacterias patógenas como los miembros de los géneros *Mycobacterium*

2.2 Cultivos filamentosos: *Streptomyces* como modelo de estudio

Los microorganismos filamentosos tales como los Actinomicetos y hongos filamentosos son usados en varios bioprocesos. *Streptomyces sp.* es un género de Actinomicetos, un grupo de bacterias Gram positivas generalmente con alto contenido de GC (65-75%) que son ampliamente usadas para producir un gran

número de metabolitos secundarios incluyendo antimicrobianos, antifúngicos, agentes antihelmínticos, agentes antitumorales, herbicidas, pigmentos y otros componente bioactivos (Rokem et al., 2007; Sánchez y Demain, 2011, Olmos et al., 2013). Adicionalmente, algunas cepas son usadas para la expresión de proteínas heterólogas (Lee y Lee, 1996; Sianidis et al., 2006; Vrancken et al., 2008; Anné et al., 2012).

Predominantemente, los Actinomicetos se encuentra en el suelo y en la vegetación en descomposición, tienen un ciclo de vida complejo similar al ciclo de los hongos. Creciendo en sustratos como micelio aéreo que luego forma esporas. A escala industrial, son crecidos en cultivo sumergido, donde su micelio vegetativo forma una red de hifas (Anné y Van Mellaert, 1993; Anné et al., 2012). Esta formación de agregados es típica durante el crecimiento en cultivo sumergido y puede dividirse en varios estados morfológicos: pellets (son compactos y con perímetros convexos mayores a 950 μm), clumps (menos compactos y con perímetros convexos entre 950 μm y 600 μm) y filamentos que pueden ser ramificados o no, como se muestra en la figura 2 (Pamboukian et al., 2002).

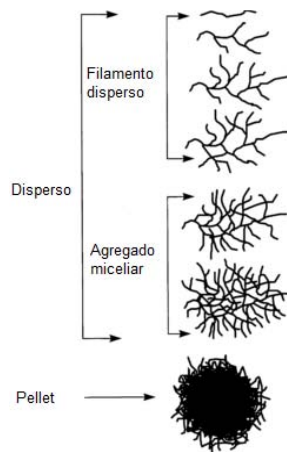


Figura 2. Tipos de morfología de *Streptomyces* crecidos en cultivo sumergido (Pamboukian et al., 2002).

La morfología y formación de la estructura varían de una especie a otra, con base en la genética de cepa (Jakimowicz y van Wezel, 2012) y de los mecanismos fisiológicos que están implicados en el desarrollo de un tipo morfológico en particular (Kossen, 2000). Adicionalmente, la velocidad de crecimiento y los cambios morfológicos dependen de las condiciones de cultivo: composición del medio, pH, temperatura, intensidad de mezclado, concentración de oxígeno disuelto e inóculo (Tought y Prosser, 1996; Cui et al., 1998; Celler et al., 2012).

En *Aspergillus*, los cambios de morfología durante el crecimiento afectan el consumo de nutrientes y la velocidad de consumo de oxígeno en cultivo sumergido (Schugerl et al., 1983). Además, la morfología puede tener un efecto significativo sobre la reología de los caldos de fermentación y su rendimiento en el biorreactor. El crecimiento filamentoso resulta en caldos con alta viscosidad, con comportamiento no newtoniano de carácter pseudoplástico (Kristiansen y Bullock, 1988; van Wezel et al., 2006; van Wezel et al., 2009). Las altas viscosidades tienen un impacto negativo en la transferencia de masa de los caldos, especialmente en la velocidad de transferencia gas-líquido. El crecimiento en pellets exhibe bajas viscosidades y comportamientos Newtonianos (Chain et al., 1966). Sin embargo, con frecuencia la región central de los pellets grandes se somete a autólisis por limitación de nutrientes. El aumento de la agitación, puede mejorar el transporte, pero puede resultar también en rasuramiento o ruptura del pellet y lisis (Meyerhoff y Tiller 1995), generando efectos significativos en el metabolismo celular y la síntesis de producto (Philips, 1966; Elmayergi et al., 1973, Papagianni, 2004).

2.2.1 Relación entre la morfología y la reología de los caldos

El cultivo de microorganismos filamentosos en biorreactor es un proceso dinámico complejo, que se ve afectado por las condiciones de flujo y la evolución de las propiedades reológicas del medio. Estas propiedades se ven afectadas principalmente por cambios en la composición del medio, la concentración de

biomasa y la morfología de los microorganismos (Berovič et al., 1993; Nuñez-Ramírez., 2012).

La Ley de Newton es el modelo más simple de los modelos reológicos. Aquí, la viscosidad dinámica se define como la relación entre el esfuerzo de corte aplicado y el movimiento resultante del fluido, definido como velocidad de deformación

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde η es la viscosidad (Pa s), τ es el esfuerzo de corte (Pa) y γ es la velocidad de deformación (s^{-1}). La viscosidad de un fluido Newtoniano es independiente de la velocidad de deformación (Wucherpfennig et al., 2010). Para los fluidos no Newtonianos la relación es más compleja y puede ser descrita por la Ley Ostwald de Waelen (Núñez-Ramírez et al., 2012)

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde K y n son parámetros empíricos, K ($Pa \cdot s^n$) es el índice de consistencia y n (adimensional) es el índice de comportamiento de flujo. Debido a que n determina precisamente el modo en que se desarrolla el flujo, si $n < 1$ el fluido se denomina pseudoplástico (estos fluidos fluyen más fácilmente aumentando la velocidad de deformación). Por el contrario, cuando $n > 1$ la resistencia a fluir aumenta con un aumento de la velocidad de corte, y el fluido se denomina dilatante (Núñez-Ramírez et al., 2012).

Comportamientos no newtonianos son característicos de los sistemas de cultivos de hongos y bacterias miceliales, las hifas pueden enredarse, resultando suspensiones altamente viscosas que se caracterizan por ser dependientes de la velocidad de deformación (Ju et al., 1991; Berovič et al., 1993; Goudar et al., 1999; Núñez-Ramírez et al., 2012) .

En el caso de *Aspergillus terreus* para la producción de lovastantina; Casas López et al. (2005), encontraron que los caldos de cultivo presentaban comportamientos no newtonianos, tanto de carácter pseudoplástico como dilatante. Para bajas velocidades de agitación (300 rpm) el índice de consistencia (K) incrementó debido al incremento del tamaño del pellet (1200-2500 μm), mostrando un comportamiento no newtoniano de carácter pseudoplástico ($n < 1$). Sin embargo, el comportamiento reológico cambió drásticamente en los cultivos llevados a cabo a altas velocidades de agitación (800 rpm), donde los tamaños del pellets disminuyeron (1200- 600 μm), encontrándose un índice de consistencia constante durante el tiempo de cultivo y presentándose comportamientos no newtonianos de carácter dilatante ($n > 1$) (Casas López et al., 2005). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Porcel et al. (2005), quienes encontraron comportamientos dilatantes en cultivos de *A. terreus* a intensidades de agitación altas (800 rpm), donde los pellets son más pequeños y compactos (diámetros entre 500 μm y 1500 μm), comparados con los obtenidos a velocidades de agitación de 300 rpm (diámetro de pellet de 2500 μm , aproximadamente) donde se presentaban comportamientos de carácter pseudoplástico (Rodríguez-Porcel et al., 2005). Estos resultados contrastan con lo obtenido por Pamboukian et al., (1998) quienes en cultivos de *A. awamori* siempre observaron comportamientos no newtonianos de carácter pseudoplástico independiente de la morfología encontrada (Pamboukian et al., 1998).

Ghojavand et al. (2011) evaluaron el efecto del tamaño del inóculo, con la morfología y la reología de los caldos en cultivos de *Saccharopolyspora erythraea*, encontrando que en tamaños de inóculos pequeños (10^3 y 10^4 esporas /mL) dominan las morfologías en forma de pellets, generando reologías newtonianas. Mientras que, si hay incrementos en la concentración de clumps/micelio disperso; debido al incremento en la concentración de esporas; los caldos de cultivo presentan comportamientos no newtonianos de carácter pseudoplástico (Ghojavand et al., 2011).

Pamboukian y Facciotti (2005) al evaluar los patrones reológicos en cultivos de *Streptomyces olindensis* en sistemas en lote y alimentado encontraron que el medio de cultivo al inicio de la fermentación presentaba comportamiento newtoniano, pero a medida que transcurría el tiempo el índice de comportamiento del fluido (n) disminuía hasta valores de 0.25, mostrando el fluido comportamientos no Newtonianos de carácter pseudoplásticos. Adicionalmente, el índice de consistencia (K), aumentaba a medida que disminuía el número de pellets y aumentaban los clumps y los filamentos dispersos (Pamboukian y Facciotti, 2005). En este sentido Tamura et al., (1997) observaron en cultivos de *S. fradiae*, que pellets grandes (área: 3×10^4 - $1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) presentaban viscosidades menores a 50 cP al compararlas con pellets de áreas más pequeñas ($\sim 3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) que presentaban viscosidades por encima de 100 cP, posiblemente debido a la alta relación entre filamentos y micelio disperso (Tamura et al., 1997).

La importancia de observar los patrones reológicos en los caldos de cultivo se debe a que la viscosidad de los caldos de fermentación afecta en gran medida los fenómenos de transporte en el biorreactor que, a su vez, tienen una fuerte influencia en la eficiencia y la productividad de todo el proceso. Por lo tanto, una comprensión del comportamiento del flujo del fluido es necesaria con el fin de desarrollar estrategias de cultivo que ayuden a superar las posibles limitaciones en la transferencia de masa, cantidad de movimiento y transferencia de calor en fermentadores (Papagianni, 2004).

Es por ello que varios autores han evaluado la regulación de la morfología de pellets manipulando la viscosidad de los cultivos. O'Clérigh et al. (2005) utilizaron goma xantana como regulador de la viscosidad aparente de los caldos de fermentación de *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus*, con el fin de controlar la interacción entre partículas, la agregación y por lo tanto, la formación de pellets. Un aumento en la cantidad de pellets y en la concentración de biomasa, así como una disminución en el volumen de los pellets fue observada en los cultivos que

fueron suplementados con 3 g/L de goma xantana (O’Cleirigh et al., 2005). Resultados similares fueron obtenidos por Yen y Li (2014) quienes al incrementar la viscosidad de los caldos con 3 g/L de carboximetilcelulosa podían disminuir el diámetro de los pellets de *Streptomyces hygroscopicus* de 0.34 mm a 0.18 mm, maximizando la producción de rapamicina, con respecto al control (Yen y Li, 2014).

2.2.2 Relación entre la morfología y producción de metabolitos

Un factor importante en el uso de actinomicetos a nivel industrial es que, al igual que los hongos filamentosos, estos microorganismos crecen como redes complejas de hifas ramificadas, produciendo estructuras multicelulares denominadas pellets. Estos cambios morfológicos resultan en altas viscosidades de los caldos de fermentación y bajos rendimientos por unidad de tiempo, como un cuello de botella en las aplicaciones industriales (van Veluw et al., 2012).

Ciertas morfologías de crecimiento están directamente relacionadas con la producción de compuestos de interés industrial, por ejemplo, el micelio disperso es requerido en la producción de penicilina por *P. chrysogenum*, mientras que los pellets son preferidos para incrementar los rendimientos de la producción de ácido cítrico por *A. niger* (Solomons, 1980; Metz, 1976; Papagianni, 2004)

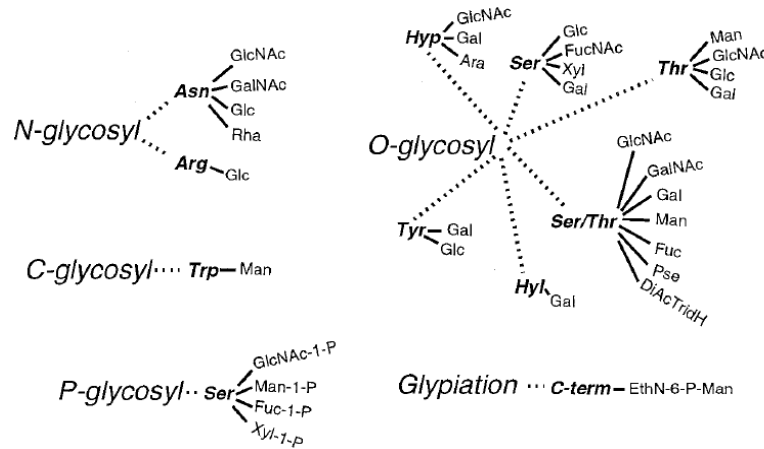
Gupta et al. (2007) evaluaron la producción de lovastatina en cultivos de *A. terreus* encontrando que la presencia de pellets intermedios entre 1.8-2.0 mm con características menos compactas favorecía la producción del antibiótico (Gupta et al., 2007). Resultados similares fueron encontrados en *Saccharopolyspora erythaea* donde los clumps favorecían la producción de eritomicina (Ghojavand et al., 2011). Por otra parte, morfologías de pellets pequeños de *S. fradiae* fueron más efectivos en la producción de tilosina (Tamura et al., 1997), al igual que en la producción de natamicina por *S. natalensis* (El-Enshasy et al., 2000) y rapamicina por *S. hygroscopicus* (Yen y Li, 2014).

Van-Wezel et al. (2006) sobreexpresaron el factor SSgA que está relacionado funcionalmente con la división celular y la morfogénesis (Noens et al., 2005). Un aumento de la expresión de SSgA alteró la morfología de *S. lividans*, resultando en clumps más pequeños con un efecto fuertemente positivo tanto en la velocidad de crecimiento como en la producción de tirosinasa (van Wezel et al., 2006). Para el caso de *Aspergillus sp.* la relación entre morfología y producción depende de la especie. Lin et al. (2010) reportan que la producción de glucoamilasa se ve favorecida por pellets pequeños, irregulares y no estructurados de *A. niger* (Lin et al., 2010). En el caso de *A. sojae*, la producción de poligalacturonasa se ve favorecía por la morfología en forma de pellets (Gögus et al., 2006); mientras que, la producción de amilasas y amiloglicosidasas por *A. oryzae* no se ve afectada por la morfología del microorganismo (Amanullah et al., 1999). Gamboa-Suasnavart et al., (2011) evaluaron el efecto de diferentes configuraciones de matraces (matraces convencionales -MC-, matraces bafleados -MB- y matraces con resorte -MR-) en la morfología de *S. lividans*, y la producción de una proteína recombinante (APA de *M. tuberculosis*), los autores observaron que en los diámetros promedio de pellets más pequeños, que fueron obtenidas en MB (0.23 ± 0.06 mm) y MR (0.16 ± 0.05 mm), se obtenían mayores productividades con respecto al MC donde se alcanzaron diámetros promedio de pellets de 1.57 ± 0.41 mm (Gamboa-Suasnavart et al., 2011).

2.3 Glicosilación de proteínas

La glicosilación es una modificación postraduccional que se dan tanto en eucariotes como en bacterias y arqueas (Chiba y Jigami, 2007; Lommel y Strahl, 2009). En eucariotes, se distribuye en un amplio espectro filogenético que va desde organismos unicelulares, como las levaduras y los tripanosomas, a los tejidos altamente diferenciados de los reinos animal y vegetal. Trece diferentes monosacáridos y 8 tipos de aminoácidos participan en estos enlaces, para que al menos 31 combinaciones de aminoácido-azúcar existan. Las uniones

glicopeptídicas se pueden organizar en cinco grupos muy distintos (Figura 3). En muchos casos, más de un tipo de unión aminoácido-azúcar se puede producir en la misma proteína, dependiendo de la maquinaria enzimática disponible (Spiro, 2002).



La abreviación Hyl e Hyp se refiere a hidroxilisina e hidroxiprolina, respectivamente. DiAtrideooxyhexose se refiere a 2,4-diacetamino-2,4,6-trideoxihexosa. Pse se refiere a ácido pseudoamínico (5,7-diacetamino-3,5,7,9- tetradeoxi-L-glicero-L-mano-ácido nonulosínico)

Figura 3. Representación de los cinco tipos de enlaces azúcar-peptido que han sido identificados (Spiro, 2002).

En los eucariotas, las posibilidades combinatorias de los carbohidratos se utilizan para la modulación de la función de las proteínas. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de carbohidratos y glicoconjugados asociados a la pared celular, el dogma aceptado había sido que los procariontes no eran capaces de glicosilar proteínas (Palomares et al., 2004; Chiba y Jigami, 2007). En bacterias Gram-negativas muchas glicoproteínas están asociadas con factores de virulencia de los patógenos de importancia médica (Schmidt et al., 2003; Palomares et al., 2004). Además, pasos importantes en la patogénesis han sido vinculados a la sustitución de glicanos en la superficie, lo que indica que la glicosilación de proteínas bacterianas tiene funciones específicas en la infección y patogénesis y pueden interferir con la respuesta inflamatoria del sistema inmune del hospedero. Por lo

tanto, las modificaciones de los carbohidratos y las vías de glicosilación de las proteínas bacterianas se han convertido en nuevos objetivos para las medidas terapéuticas y profilácticas (Schmidt et al., 2003). Gran parte del conocimiento sobre la glicosilación de estas proteínas microbianas se ha obtenido de estudios sobre la capa superficial de arqueas y bacterias. Durante los últimos años, la glicosilación de apéndices superficiales, como los flagelos y los pilli se han descrito para bacterias. Muchas de las glicoproteínas descritas para bacterias están expuestas en la superficie (Harboe y Wiker, 1992; Díaz-Silvestre et al., 2005), y se ha demostrado que estas no solo tienen un papel importante en la patogenicidad sino que también pueden tener papeles en la adhesión, protección contra cortes proteolíticos, solubilidad, ensamble de proteínas, variación antigénica e inmunidad protectora (Szymanski y Wren, 2005; North et al., 2009). Si bien es cierto, que no se conoce completamente la relación estructura-función de la glicosilación en las proteínas, hay muchas funciones biológicas importantes que han sido atribuidas a las O-glicosilaciones. Existen en la literatura varias propuestas de un papel directo de estas en la supervivencia en ambientes hostiles (Wieland, 1988; Lechner y Wieland, 1989; Baumeister y Lembcke, 1992), confiriendo resistencia a proteasas al formar motivos estructurales con otras proteínas adyacentes. Otros reportes han presentado las O-glicosilaciones como coordinadores en los procesos de exportación de las proteínas (Ostash et al., 2008).

En el caso específico de las O-glicosilaciones y en especial la O-manosilación de procariotes, se ha reconocido un gran número de proteínas modificadas post-traduccionalmente en el grupo de los actinomicetos con alto contenido de GC. A este grupo pertenecen miembros de los géneros de *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Streptomyces* (Lommel y Strahl, 2009; Espitia et al., 2010). Para el caso de *M. tuberculosis* varias glicoproteínas han sido identificadas como resultado de reactividad con lectinas, análisis de carbohidratos y también con reconocimientos con anticuerpos específicos (Espitia et al., 1989). Por ejemplo,

los epítomos inmunodominantes de la glicoproteína 38 kDa se han relacionado con la modificación del 25% de los hidratos de carbono (Espitia et al., 1989). Por su parte, la glicolipoproteína de 19 kDa ha sido implicada con la respuesta inmune humoral y celular y se ha encontrado que la función de la glicosilación puede ser para regular la escisión proteolítica del antígeno (Herrmann, et al., 1996). Adicionalmente, se ha caracterizado la O-glicosilación de la proteína secretada de 45/47 kDa (APA) en el amino y carbono terminal (Dobos, et al., 1996). La proteína APA no glicosilada expresada en *E. coli* causa una menor hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) o menor estimulación de las células T. En *M. smegmatis* presentó un patrón de O-glicosilación diferente con efectos reducidos en DTH y en células T, lo que indica que la proteína de 45/47 kDa requiere una determinada O-glicosilación para su actividad inmunogénica (Horn et al., 1999).

Se han reportado 13 proteínas O-manosiladas en *M. tuberculosis* (Smith et al., 2014), 5 en *S. coelicolor* y 4 en *Corynebacterium efficiens* (Espitia et al., 2010). González-Zamorano et al. (2009) reportaron 34 spots con afinidad a ConA en geles de 2D, cuando se hace una purificación del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* por cromatografía de afinidad a ConA (Figura 4). Estos resultados proponen que aún falta investigación sobre la determinación y funcionalidad de las proteínas O-glicosiladas en *M. tuberculosis* (González-Zamorano et al., 2009). De toda la información publicada hasta el momento, en cuanto a las proteínas actinobacterianas que son O-manosiladas, solamente APA de *M. tuberculosis* ha sido producidas de manera heteróloga entre bacterias del género *Mycobacterium* y *Streptomyces* (Lara et al., 2004; Vallin et al., 2006; Gamboa-Suasnavart et al., 2011; Gamboa-Suasnavart et al., 2013) y se pudo demostrar que esta proteína está O-manosilada, revelando la capacidad de los *Streptomyces* de manosilar proteínas heterólogas (Lara et al., 2004).

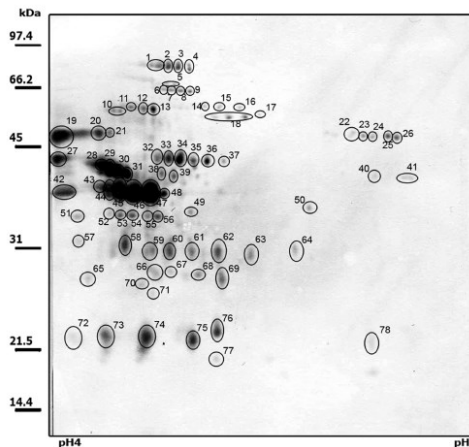


Figura 4. Ensayo de ligando de *M. tuberculosis* de fracciones enriquecidas con glicoproteínas obtenidas a partir del caldo de cultivo filtrado e incubado con ConA resuelto por gel 2-D (tomado de González-Zamorano et al., 2009).

2.3.1 Proteína de 45/ 47 kDa (APA)

Debido a la interacción temprana con el sistema inmune del huésped, APA ha sido estudiada como posible candidata a vacuna y/o herramienta de diagnóstico (Gioffré et al., 2009). Este antígeno de 45/47 kDa fue identificado en *M. bovis* por Romain et al., (1993), quien lo describió con abundantes residuos de alanina y prolina que le permitió el nombre Antígeno rico en prolina y alanina (APA). En adición, esta proteína tiene un dominio de unión a fibronectina y ha sido identificada en diferentes especies de *Mycobacterium* (Romain et al., 1993). Laqueyrie et al., (1995) describió la clonación y expresión de APA de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* mientras que Espitia et al. (1995) estudió la proteína ortóloga de *M. bovis* y encontró similitudes estructurales y antigénicas con la proteína APA de *M. tuberculosis*. El análisis de la estructura de glicanos realizado por Dobos et al. (1996) mostró que los residuos de treonina de las posiciones 10, 18, 27 y 277 son glicosilados con enlaces α -(1,2) manosa, manobiosa o manotriosa sustituyentes que resulta en un máximo de nueve residuos de manosa por cadena peptídica. Los residuos Thr10 y Thr18 son glicosilados con

disacáridos de α -D-Man-(1,2)- α -D-Man. Una sola α -D-Man estaba vinculada a Thr27 y la Thr277 estaba modificada con α -D-Man o α -D-Man-(1,2)- α -D-Man o un trisacárido α -D-Man-(1,2)- α -D-Man- α -D-Man. La glicosilación del residuo de Thr 277 fue confirmado por Smith et al. (2014) quienes adicionalmente encontraron uno, dos o tres hexosas entre los residuos Thr274, Thr276, Thr277 y Thr279. Estas heterogeneidades en los residuos de treonina del extremo carbono-terminal podrían ser causantes de las diferencias en migración de la proteína en 45/47 kDa al ser evaluada por SDS.

Se plantea que las O-glicosilaciones de APA en *M. tuberculosis* incrementan su estabilidad a ambientes intra y extra celulares y como soporte de esto es el hecho de que APA O-glicosilada es más resistente a la digestión proteolítica (Jentoft, 1990). Finalmente, uno de los roles más importantes de estas modificaciones recae como elemento clave en los aspectos de inmunogenicidad y patogenicidad del microorganismo (Dobos et al., 1995; Dobos et al., 1996). En este caso, la O-manosilación de proteína de 45/47 kDa (APA) de *M. tuberculosis* es crucial para la antigenicidad de células T durante las infecciones micobacterianas en seres humanos y en ratones (Nandakumar et al., 2013) y además, presenta diferentes capacidades de estimular la respuesta de linfocitos T cuando cambia su perfil de O-manosilación (Espitia et al., 1995; Horn et al., 1996; Horn et al., 1999).

Con la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos, son necesarias nuevas vacunas y medicamentos para controlar los principales agentes de la enfermedad (Frieden et al., 2003). En este sentido, las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis* son claras candidatas en el desarrollo de vacunas inmunogénicas y los principales objetivos de nuevos medicamentos. Sin embargo, los avances en este campo se han obstaculizado por la poca disponibilidad de proteínas recombinantes extracelulares idénticas a la conformación nativa. Un alto nivel de expresión y secreción de estas proteínas en la forma nativa ha demostrado ser difícil de obtener en *Escherichia coli*

(Laqueyrie et al., 1995). Dos micobacterias no patógenas de rápido crecimiento como *M. smegmatis* y *M. vaccae*, también han sido utilizadas como alternativa para la producción heteróloga de la proteína con rendimientos de 5-10 veces más que lo producido en *M. tuberculosis* (Harth et al., 1997; Lakey et al., 2000, Spratt et al., 2003).

2.3.2 *Streptomyces lividans* como una opción para la producción heteróloga de proteínas O-glicosiladas

En la producción de ciertas proteínas recombinantes es de particular interés que estas se sinteticen extracelularmente, con una estructura terciaria correcta para mantener su actividad biológica. Es de mayor interés si la actividad biológica está comprometida por ciertas modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones, y que estas proteínas sean obtenidas de forma eficiente, rápida y económica (Palomares et al., 2004). En este sentido, cepas de *Streptomyces* son bien conocidas por ser productoras de antibióticos y están caracterizadas por su capacidad de excretar proteínas (Morosoli et al., 1997; Pozidis et al., 2001, Noda et al., 2010). Como muchas otras eubacterias, *Streptomyces* tiene la capacidad de glicosilar sus propias proteínas, así como proteínas heterólogas (Kluepfel et al., 1990; MacLeod et al., 1992, Ong et al., 1994). Dentro de estos microorganismos, *S. lividans* ha sido el hospedero de elección para la producción de proteínas heterólogas, esto debido a que posee un bajo nivel de actividad proteolítica endógena, carece de un poderoso sistema de restricción-modificación que actúa como una barrera de entrada y propagación, fundamentalmente de vectores bifuncionales derivados de *E. coli* y posee sistemas de vectores conocidos, (Anné et al., 2012). La existencia de vectores de expresión de la proteína inducible en *Streptomyces* permite la producción de grandes cantidades de proteínas adecuadas para la caracterización inmunológica y bioquímica de las glicoproteínas (Lara et al., 2004).

Por otra parte, *S. lividans* como modelo en la producción de proteínas heterólogas ha sido usada en la expresión de algunas proteínas provenientes de micobacterias. Lara et al. (2004), expresaron la proteína 45/47 kDa de *M. tuberculosis* en *S. lividans*; con el fin de evaluar el potencial del sistema de expresión para la obtención de O-glicoproteínas de *M. tuberculosis* como vacunas y / o potencial de diagnóstico.

Igualmente, Vallin et al. (1996), expresaron la proteína de 45/47 kDa (Rv1860) de *M. tuberculosis* en *S. lividans*, y produjeron la proteína en un biorreactor de 1.5 L de trabajo, logrando recuperar por inmunocromatografía alrededor 80 mg de la proteína recombinante por litro de medio de cultivo. Adicionalmente, pruebas *in vivo* con la proteína APA purificada a partir de la *S. lividans* indujeron alta respuesta proliferativa de linfocitos (Vallin et al., 1996). Estos resultados sobre la producción heteróloga de la APA, su inmunogenicidad y capacidad antigénica, muestran el potencial de *S. lividans* como un valioso hospedero en la producción de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*. Es importante mencionar que el trabajo de Vallin et al. (1996), fue el primer reporte donde escalaron la producción de APA en *S. lividans*. Sin embargo, los autores no indicaron el criterio de escalado que utilizaron para hacer el escalado de matraces Erlenmeyer de 250 mL al biorreactor de 2.5 L (volumen nominal), ni tampoco caracterizaron los patrones de glicosilación de la proteína que generaron la respuesta inmune. Sin embargo, los autores resaltan que no controlar el pH en la fermentación favorece altos rendimientos de la proteína.

Como se mencionó anteriormente Gamboa-Suasnavart et al. (2011) evaluaron la producción de APA recombinante en tres geometrías de matraz (Matraz convencional –MC-, matraz con resorte –MR- y matraz baffleado –MB-) encontrando que en MR y MB donde los diámetros morfológicos fueron más pequeños (~0.20 mm), se favorecía la producción de la proteína, comparado con diámetros de ~1.57 mm obtenidos en MC (Gamboa-Suasnavart et al., 2011). Con

base en estos resultados, Gamboa-Suasnavart et al. (2013) establecieron una estrategia de escalado a biorreactor de 1.5 L usando correlaciones entre potencia volumétrica (P/V) y morfología, adaptadas de Tough y Prosser (1996). Los resultados obtenidos muestran que la estrategia de escalado fue exitosa en términos morfológicos, Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento se redujo en el biorreactor ($0.09 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) comparado con matraces ($0.12 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) y de igual manera la producción de la proteína recombinante. En términos de la calidad de la proteína (medido como número de manosas encontradas en el extremo carbono terminal) cinco manosas fueron encontradas en en la proteína APA producida a nivel de matraces, mientras que la proteína obtenida en biorreactor alcanzó hasta 6 manosilaciones. Sin embargo, la concentración de biomasa final no fue similar. Lo que indica, que la morfología de *S. lividans* pudiera ser ecalada, utilizando esta estrategia de escalado. Sin embargo, factores como la velocidad de transferencia de oxígeno, la energía de disipación/circulación pueden estar influyendo en el metabolismo bacterial (Gamboa-Suasnavart et al., 2013).

3. Hipótesis

Incrementos en la potencia volumétrica de los cultivo de *S. lividans*, disminuye la morfología miceliar de *Streptomyces lividans*, aumentando la producción de la proteína de 45/47 kDa, y la cantidad de manosas unidas a la proteína. Principalmente, aquellas unidas al péptido carbono-terminal, que es donde se ha reportado mayor variabilidad.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el papel de la potencia volumétrica en cultivos de *S. lividans* sobre la producción y glicosilación de la proteína de 45/47 KDa (APA) de *Mycobacterium tuberculosis* usando *Streptomyces lividans*. En especial, la manosilación de la región carbono-terminal, que está reportada como aquella de mayor variabilidad.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar cuantitativamente los efectos de la potencia volumétrica presentes en matraces convencionales, bafleados y con resorte y su efecto en el crecimiento y morfología micelar de *Streptomyces lividans*.
- Escalar la potencia volumétrica presente en la geometría de matraz convencional y con resorte en un biorreactor de 1.2 L.
- Determinar cómo la potencia volumétrica afecta las cinética de crecimiento, proteína total, morfología y la producción de APA en *Streptomyces lividans*.
- Determinar las concentraciones de proteína recombinante APA por densitometría en geles de SDS-PAGE e identificar por Western Blots *anti-APA* y *ConA* las fracciones glicosiladas.
- Evaluar la producción de APA y asociar la producción con las diferencias morfológicas de *Streptomyces lividans* causadas por los cambios en la P/V.
- Determinar el efecto de la P/V sobre la cantidad promedio de manosas de la proteína de 45/47 kDa (APA) usando espectrometría de masas.

5. Metodología

5.1 Condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa de *S. lividans* 1326 modificada con el plásmido pIJ6021MT-45 que contiene el gen que codifica para la proteína de 45/47 kDa bajo el promotor inducible de tiosstrepton, previamente descrito por Lara et al. (2004). Las esporas fueron obtenidas en medio sólido con la siguiente composición (g/L): Agar (30), Manitol (40) y Harina de soya (40) (De Smet et al., 1993) conteniendo kanamicina (50 µg/mL). Se dejaron incubando por 10 días a 30°C. Para la pregerminación de esporas estas fueron cultivadas en medio YT (Tryptona 16 g/L, Extracto de levadura 10 g/L y Cloruro de Sodio 5 g/L) a 37°C durante 8 h y 150 rpm. Las esporas germinadas fueron centrifugadas a 3500 rpm por 10 min y resuspendidas en 1 mL de medio LB (Tryptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L) complementado con 34 % de sacarosa, pH inicial de 7.2 y fueron inoculadas a una densidad óptica de 0.015 u.a. (600 nm). Las esporas germinadas fueron transferidas a matraces (Schott Duran) de 250 mL con tres diferentes diseños previamente reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2011) (Figura 5) y al biorreactor Applikon® de 1.2 L (volumen nominal), en medio Luria –Bertani con kanamicina (50 µg/mL) complementado con 34% de sacarosa y pH inicial de 7.2 y a una temperatura de 30°C. Estos cultivos se llevaron a cabo por 72 h, con adición de tiosstrepton (10 µg/mL) en la mitad de la fase exponencial. Subsecuentemente, los filtrados fueron obtenidos por remoción del micelio por centrifugación a 3500 rpm por 25 min a 4°C y filtrados con filtros Millipore de 0.45 µm. La proteína total fue recuperada por precipitación con metanol, cloroformo, agua usando la relación 4:1:3 (v/v) por cada mililitro de sobrenadante (Wessel y Flügge, 1984). La mezcla fue centrifugada a 3500 rpm por 25 min y el precipitado obtenido fue resuspendido en 100 µL de un buffer de fosfatos.

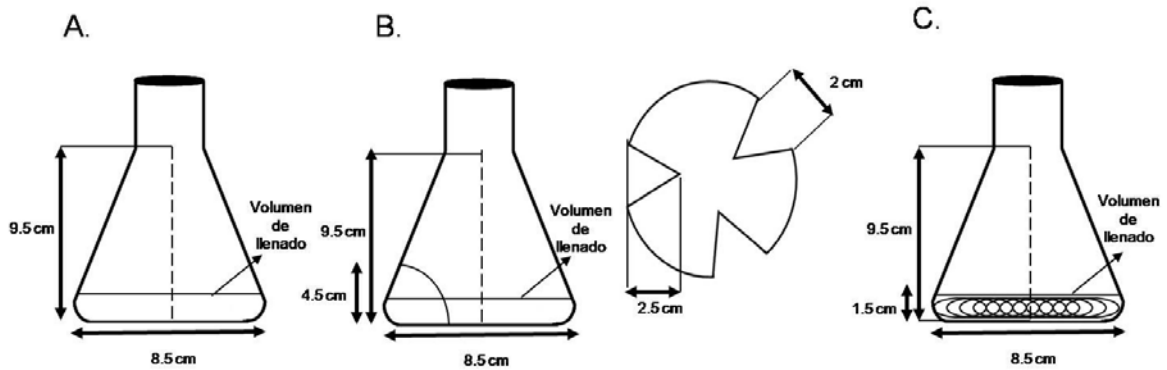


Figura 5. Diseño de los matraces de 250 mL utilizados en estos experimentos. A. Matraz convencional, B. Matraz bafleado, C. Matraz con resorte (Gamboa-Suasnavart et al., 2011).

5.2 Métodos analíticos

La determinación de biomasa se llevó a cabo por gravimetría de peso seco (g/L) y por densitometría a 600 nm (Peña et al., 2000; Gamboa-Suasnavart et al., 2011). Los parámetros reológicos fueron determinados en un Reometro-Physico MCR 301. Todas las determinaciones se hicieron a temperatura de 30°C usando la aguja PP50/TG, una distancia plato-plato de 1 mm y una velocidad de deformación entre 0.1 y 100 s⁻¹. La determinación de la viscosidad aparente fue calculada de acuerdo a la ecuación 9.

$$\eta_a = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde

η_a : Viscosidad aparente (Pa.s)

K : es el índice de consistencia (Pa.sⁿ)

n: índice de comportamiento de flujo (adimensional)

$\dot{\gamma}$: Velocidad de deformación (s⁻¹)

La determinación de proteína total se realizó por el ensayo de proteína de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay. Cat #500-0006). Este es un ensayo colorimétrico que sirve para medir la concentración de proteína total y el principio del método se basa en la fijación de colorante de Bradford (Bradford, 1976). Para la cuantificación de proteína total, se tomaron 800 uL de muestra y se mezclaron con 200 uL del reactivo concentrado. La mezcla fue incubada por 5 min y posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm.

5.3 SDS-PAGE y Western blotting

La electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% que contienen SDS y subsecuentemente todos los procedimientos de transferencia se llevaron a cabo usando métodos estándar (Laemmli, 1970; Towbin et al., 1979). Veinte microgramos de proteína total obtenida por la precipitación con metanol-cloroformo fueron mezclados con Loading Buffer 2x y cargados en los geles de poliacrilamida. Para obtener los Western Blot, los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF (Millipore USA) previamente activada con metanol. La unión no específica fue bloqueada por incubación de las membranas con leche descremada al 5 % (w/v) en PBS-Tween 20 (0.05% v/v) durante 1 h y lavadas con PBS-Tween 20 (0.05% v/v) por 5 min. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario mAb6A3 en una dilución 1:1000 durante 12 h a 4°C o con anti-concanavalina A (ConA)-peroxidasa (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de dos lavados con PBS-Tween 20 (0.05%), las membranas fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una dilución 1/2,000. La tinción de las membranas se realizó usando un Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) y las imágenes fueron tomadas usando el escaner de quimioluminiscencia C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

5.4 Análisis de proteína por espectrofotometría de masas

Las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida, correspondientes al peso observado de la proteína APA (45/47 kDa), fueron cortadas, lavadas con agua ultrapura, desteñidas con una solución de buffer de carbonatos (100 mM) y metanol al 50%, deshidratadas con acetonitrilo y rehidratadas con buffer de carbonatos (25 mM). Para la digestión de la proteína, la banda previamente desteñida se mezcló con la enzima LysC (Roche, No. Cat. 11047825001, Alemania) en concentración 1:1000, permitiendo la digestión durante 16 h. La recuperación de los 8 péptidos generados se hizo con Acetonitrilo:agua:TFA (70%:25%:5%). En la tabla 1, se presentan los péptidos teóricos de la proteína APA usando la enzima LysC (Roche®, Alemania).

Para la determinación de los sitios de glicosilación correspondiente al péptido del carbono terminal de la proteína recombinante APA, se recurrió a la espectrometría de masas por MALDI-TOF. Las masas se determinaron en un equipo Bruker del Instituto de Química de la UNAM (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) equipado con un láser de nitrógeno de 20 Hz a $\lambda = 337$ nm. El espectro fue detectado en modo lineal positivo para el rango de masas entre 3800 a 6000 Da. 1.0 mL de solución de la proteína obtenida en cada digestión, se mezcló con 5 mL de acetonitrilo al 30% y TFA 0.1%, y se saturó con ácido sinapínico. Posteriormente, 1.0 μ L de esta solución fue depositado en la placa de MALDI-TOF y se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior lectura.

Tabla 1 Péptidos teóricos de la digestión de APA utilizando la enzima LysC (Roche®, Alemania)

Péptido	Posición de corte	Tamaño del péptido (a.a)	Secuencia	Masa (Da)
P1	106	106	DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPP AAANTPNAQPGDPNAAPPADPNAPPPVIAPNAP QPVRIDNPVGGFSFALPAGWVESDAAHFDYG SALLSK	10310.43
P2	134	28	TTGDPPFPQGQPPPVANDTRI VLGRLDQK	2987.36
P3	145	11	LYASAEATDSK	1155.22
P4	188	43	AAARLGSDMGEFYMPYPGTR INQETVSLDANGVSGSASY EVK	4604.05
P5	194	6	FSDPSK	679.72
P6	234	40	PNGQIWTGVIGSPAANAPDA GPPQRWFVWVWLG TANNPVDK	4199.69
P7	238	4	GAAK	345.39
P8	286	48	ALAESIRPLVAPPPAPAPAP AEPAPAPAPAGEVAPTPTTP TPQRTLPA	4624.31

5.5 Morfología micelar

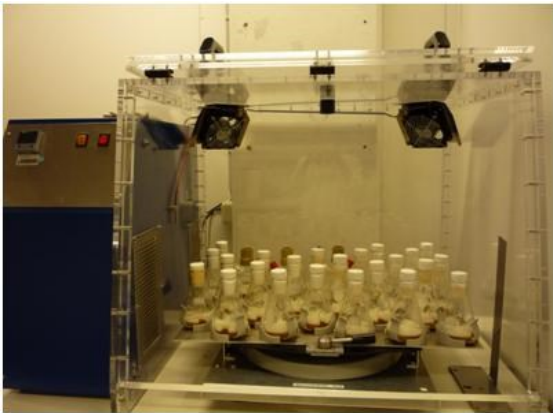
Las muestras de cada cultivo fueron fijadas con una solución de formalina (10% v/v) en una relación 1:1. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Coolpix 4300 (Nikon, Tokyo Japan), acoplada a un microscopio (Nikon Optiphot-2, Tokyo Japan). Usando un aumento de 4X. El análisis de imágenes se hizo utilizando el software ImageJ (National Institutes on Health, NIH, Bethesda, Maryland, USA) disponible en línea (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Al menos 150 imágenes fueron analizadas en cada tiempo de cultivo. Para la medición de área, diámetro y perímetro de los pellets, las imágenes fueron transformadas a escala de grises y procesadas utilizando el algoritmo del software. La prueba de rangos múltiples de Tukey HSD fue utilizada para el análisis estadístico usando el Software Statgraphics Centurion XV.

5.6 Cuantificación de potencia volumétrica en matraces agitados

Las medidas de P/V se realizaron en el grupo del Dr. J. Büchs (Aachen University of Technology, Alemania) en cultivos en matraces bafleados, con resorte y convencionales.

El equipo para la medición de la potencia volumétrica en matraces agitados que se muestra en la figura 6, consiste en un dispositivo con un sensor de torque integrado, una rueda libre, un acople flexible, un agitador orbital, medidor y controlador de velocidad, medidor de torque, convertidor A/D y sistema de adquisición de datos (Büchs et al., 2000a).

A.



B.

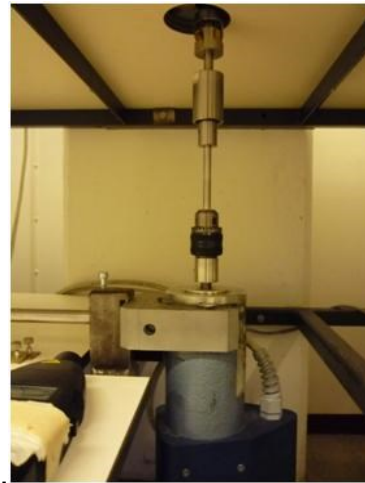


Figura 6. Equipo para la medición de potencia volumétrica en matraces agitados. A. Plataforma de agitación, B. Torque con sensor integrado.

La plataforma de agitación se fija a un marco para evitar oscilaciones. La agitación del sistema es alimentada por una unidad con un sensor de torque integrado. Los datos de torque y velocidad de agitación son registrados y guardados en un PC a

través de un convertidor A/D, que se utiliza para calcular la P/V de acuerdo a la ecuación 10

$$\frac{P}{V_L} = \frac{(M_1 - M_2) * 2 * \pi * N}{z * V_L} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

P: Potencia (W)

M₁: Torque para sistema con líquido (Ncm)

M₂: Torque para sistema sin líquido (Ncm)

n: frecuencia de agitación (rpm)

z: Número de matraces

V_L: Volumen de llenado (mL)

Para la determinación de M₁ en en cada configuración de matraces es necesario ubicar en la plataforma de agitación 26 matraces, cada uno con 50 mL de medio de producción y registrar en el tiempo los datos de torque bajo las condiciones de cultivo a evaluar (para el caso inicial de nuestro trabajo 150 rpm y 30°C).

Para la determinación de M₂ (el cero del sistema), es necesario ubicar en la plataforma de agitación el peso equivalente a lo que pesa la plataforma con frascos con líquido. Se mide el torque durante 15 h aproximadamente bajo las condiciones de cultivo trabajadas (150 rpm y 30°C). Es necesario hacer el cero cuando hay cambios significativos en el peso inicial de todo el sistema y cada que se varía la velocidad de agitación.

5.7 Configuración del biorreactor

El biorreactor usado en este estudio es de 1.2 L de volumen nominal (Applikon®, USA), con 0.8 L de volumen de trabajo. El biorreactor tiene una relación altura/diámetro del tanque (H/D_t) de 2.0 y está equipado con dos impulsores tipo Rushton de 0.045 m de diámetro y dos baffles. El control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se llevó a cabo usando cascada de aire y oxígeno mediante un controlador Applikon ®ADI1010 con una velocidad de burbujeo de aire de 0.5

v.v.m, controlando la temperatura a 30°C. La P/V volumétrica obtenida en matraces convencionales y con resorte con 50 mL de medio de cultivo fue usada como criterio de escalado. La velocidad de agitación a la que debe ser operados los impulsores fue calculado usando la ecuación 11 y 12.

$$Np = \frac{P}{\rho N^3 D_i^5} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

Np: Número de potencia (adimensional)

P: Potencia (W)

N: Velocidad del impulsor (rpm)

D_i: Diámetro del impulsor (m)

ρ: Densidad (Kg/m³)

Para el cálculo de la potencia gaseada, se usó la ecuación 12 propuesta por Nagata (1975).

$$\text{Log}_{10} \frac{P_g}{P} = -192 * \left(\frac{D_i}{D_t}\right)^{4.38} * Re^{0.115} * Fr^{1.96} \frac{D_i}{D_t} * A_e \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

P: Potencia sin gasear (W)

P_g: Potencia gaseada (W)

D_t: Diámetro del tanque (m)

D_i: Diámetro del impulsor (m)

N: Velocidad del impulsor (rps)

Re: Número de Reynolds (adimensional)

Fr: Número de Froude (N²D_i/g) (adimensional)

g: gravedad, 9.8 m²/s

A_e: Número de aireación (F_g/ND_i³) (adimensional)

F_g: Caudal de aire (m³/s)

Finalmente, es importante considerar que la ecuación 11 y 12 son para biorreactores con geometría estándar, que incluyen cuatro baffles. Para obtener una mejor aproximación de la potencia volumétrica en términos de número de baffles usado en este trabajo, se utilizó la corrección propuesta por Dickey et al. (2004). Cuando dos baffles son usados y la fracción del baffle (w/D_t)_{trabajo}/ (w/D_t)_{estándar} es de 1.2, la P/V calculada debe ser multiplicada por 0.8. Donde: w: ancho del baffle (m) y D_t: Diámetro del tanque (m).

6. Resultados y Discusión

6.1 Determinación de la potencia volumétrica en matraces agitados

El desarrollo de la potencia volumétrica (P/V) en matraces de 250 mL convencionales, bafleados y con resorte (MC, MB, MR) en cultivos de *S. lividans*, medidos por el método descrito por Büchs et al. (2000a), se muestra en la figura 7. Manteniendo la misma velocidad de agitación de 150 rpm y el mismo volumen de llenado de 50 mL, la P/V se mantiene prácticamente constante durante las primeras 50 h de cultivo. Las P/V más altas se obtuvieron en MB (0.51 kW/m^3), seguidas de los MR (0.44 kW/m^3) y MC (0.22 kW/m^3). Posteriormente, el comportamiento de la P/V no es constante, disminuye a 0.44 kW/m^3 en MB y a 0.35 kW/m^3 en MR; mientras que, en MC aumenta a 0.38 kW/m^3 .

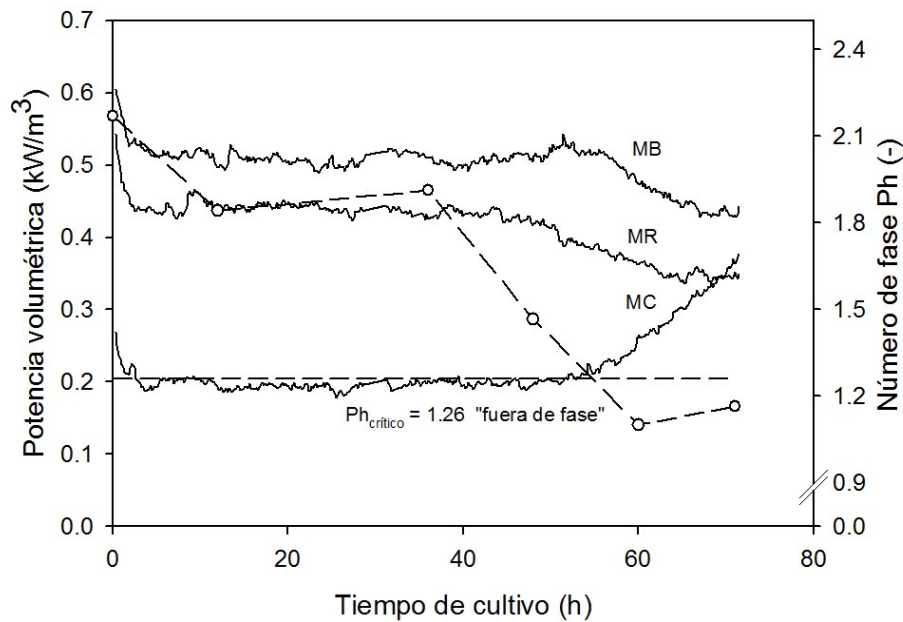


Figura 7. Medición en línea de la potencia volumétrica de cultivos de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) a 150 rpm y 30°C en tres geometrías de matraz. Matraz convencional (MC), matraz bafleado (MB), matraz con resorte (MR). Y número de fase para cultivos en matraz convencional (\circ).

Al comparar la P/V medida experimentalmente con la correlación propuesta por Büchs et al. (2000a, b), se encuentra que para el matraz convencional con 50 mL de volumen de llenado, la P/V obtenida por la correlación fue de 0.22 kW/m^3 , no habiendo diferencias con la obtenida experimentalmente. Sin embargo, para matraces bafleados, donde el número modificado de Newton (Ne') solo depende del volumen de llenado de acuerdo a la correlación propuesta por Peter et al., (2006) se presenta un error del 67%. Posiblemente, estas diferencias se presenten porque las dimensiones de los baffles usados en este experimento (25 mm de profundidad y 45 mm de altura) son diferentes a los usados por Peter et al. 2006 (14 mm de profundidad y 35 mm de altura). Estas diferencias en las características de los baffles, así como la posición de estos pueden generar cambios significativos en la velocidad de transferencia de oxígeno así como baja reproducibilidad entre los experimentos (Büchs, 2001; Suresh et al., 2009).

Los valores iniciales de P/V durante las primeras 50 h están de acuerdo con los valores obtenidos por Peter et al. (2006), quienes al trabajar con soluciones acuosas de polivinilpirrolidona, reportaron mayor resistencia al flujo en matraces con baffles al ser comparados con matraces convencionales, generando por ello mayores P/V (Peter et al., 2006). También han sido empleadas técnicas computacionales de dinámica de fluidos (CFD) utilizando parámetros de turbulencia con la finalidad de investigar las características hidrodinámicas en matraces convencionales y matraces bafleados. Li et al. (2013) modeló gráficas de contorno de velocidad del agua en ambos tipos de matraces, encontrando velocidades de distribución más homogéneas en matraces convencionales, mientras que en matraces bafleados se mostraron fuertes gradientes de velocidad. Esto está acorde con las altas intensidades de turbulencia que presentan los matraces bafleados. Por ello, la energía de disipación en matraces bafleados es mucho más alta que en matraces convencionales. Este desempeño en matraces bafleados está relacionado con la resistencia que presenta el baffle para el movimiento del fluido. Cuando el líquido golpea contra el baffle, salpica sobre este

generando velocidades y energías de disipación local más altas, lo que indica una mejor mezcla y mejor capacidad de transferencia de masa (Li et al., 2013).

Por otro lado, la P/V en MR, presenta un valor intermedio entre MB y MC, lo que sugiere que el resorte funciona como un obstáculo que aumenta la energía de disipación y promueve un aumento en el coeficiente de transferencia de masa, así como una buena incorporación de la fase gaseosa en el sistema, a pesar de que esas contribuciones sean más pequeñas que en MB.

Los valores constantes de P/V en el tiempo, durante las primeras 50 h de cultivo, contrastan con los obtenidos por Peña et al. (2007), quienes al evaluar, la potencia volumétrica en cultivos de *Azotobacter vinelandii* para la producción de alginatos en matraces convencionales, encontraron un incremento exponencial (debido a un incremento en la viscosidad de caldos de cultivo) durante la fermentación, alcanzando un valor máximo de 1.4 kW/m³ después de las 40 h de cultivo. Sin embargo, los autores reportan una disminución de la P/V, después de las 48 h de cultivo aproximadamente (P/V de 1.2 kW/m³), debido a una disminución en la viscosidad de los caldos y posibles fenómenos de sistemas fuera de fase. Además, Peter et al. (2006) demostró que en diámetros de agitación de 25 mm (diámetro de agitación de las incubadoras de este trabajo) y matraces con baffles, los sistemas podrían operar en fuera de fase. Este fenómeno que ha sido descrito por Büchs et al. (2001), para matraces convencionales, ocurre cuando las partes del líquido no pueden seguir el movimiento de agitación y por lo tanto permanecen en el fondo del frasco con poco movimiento. Debido a que en este estado el volumen de líquido no forma una hoz característica y no puede moverse alrededor de la pared del frasco, este fenómeno está asociado con reducción en la potencia, reducción en la transferencia de masa y en la irreproducibilidad del flujo (Büchs et al., 2000b). En orden de determinar si un sistema está fuera de fase; Büchs et al. (2001) introdujeron un número adimensional denominado número de fase (Ph) que indica que si el valor es mayor o igual a 1.26, el sistema podría estar operando “en

fase” (Buchs et al., 2001). Los resultados de Ph obtenidos para MC (Figura 7) calculados a partir de la correlación de velocidad de corte efectiva (Giese et al., 2014), revela que el Ph a las 60 h de cultivo es menor que el valor crítico de 1.26; sugiriendo que para este tiempo, los cultivos presentan condiciones de fuera de fase. Sin embargo, estos sistemas fuera de fase no pueden ser fácilmente asociados al final del cultivo en MB y MR, y la complejidad reológica de los cultivos podría estar relacionada también con los cambios en la P/V.

6.2 Comportamiento cinético y morfológico de los cultivos de *Streptomyces lividans* en las tres configuraciones de matraz

La caracterización cinética del crecimiento bacterial de *S. lividans* crecido en matraces con diferentes diseños (convencional, bafleado y con resorte) agitados a 150 rpm y 30°C en medio LB suplementado con sacarosa al 34 %, se presenta en la figura 8.

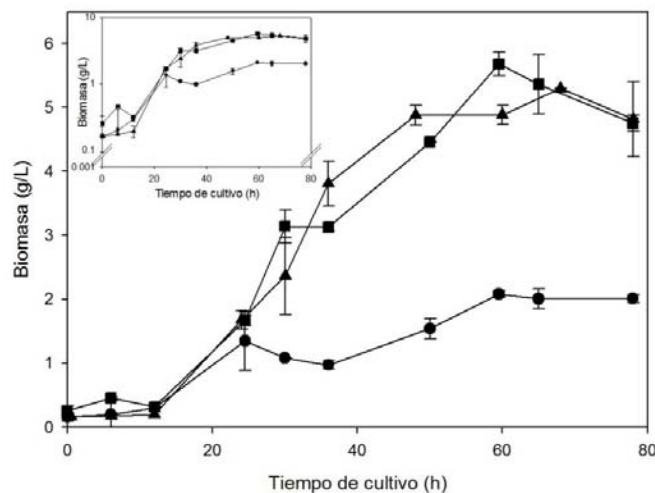


Figura 8. Cinética de crecimiento de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C y diámetro de agitación de 25mm. Matraces convencionales (●), matraces bafleados (■) y matraces con resorte (▲)

Se obtienen altas concentraciones de biomasa en MB (5.6 ± 0.2 g/L), y en MR (5.2 ± 0.1 g/L), lo cual ocurre a altas P/V (0.51 y 0.44 kW/m³, respectivamente; mientras que, a una P/V de 0.22 kW/m³, que corresponde a MC, la concentración de biomasa final obtenida fue de 2.1 ± 1.2 g/L (Figura 8). Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.14 ± 0.01 h⁻¹ para MR 0.10 ± 0.01 h⁻¹ para MB, y de 0.08 ± 0.01 h⁻¹ para MC. Estos resultados, están de acuerdo con lo reportado por Gamboa-Suasnavart et al. (2011) en términos de velocidad específica de crecimiento, quienes previamente reportaron un intervalo de 0.08 a 0.14 h⁻¹ para los mismos diseños de matraz. Sin embargo, hay diferencias en la concentración final de biomasa obtenidas en este trabajo. Estas diferencias en biomasa pueden ser atribuidas al tamaño del inóculo, como lo reportó previamente Manteca et al. (2008) en *S. coelicolor*, donde a bajas densidades de inóculo (10^5 esporas/mL) la velocidad de crecimiento era menor al ser comparado con un tamaño de inóculo mayor (10^7 esporas/mL). Comportamientos similares a los obtenidos en este trabajo en función de matraces convencionales y matraces con baffles fueron encontrados por Yun et al. (2001), quienes al evaluar cultivos de *S. lividans* en matraces bafleados y matraces convencionales con resorte y sin resorte, encontraron velocidades de crecimiento más bajas (0.17 h⁻¹) en cultivos con matraces convencionales, comparados con los otros dos sistemas, donde las velocidades específicas de crecimiento estuvieron alrededor de 0.29 h⁻¹. Adicionalmente, en cultivos de *S. pristinaespiralis*, se encontró que la P/V afecta positivamente la concentración celular y la producción de pristamicina (Mehmood et al., 2010; Mehmood et al., 2011; Mehmood et al., 2012).

Comportamientos similares fueron obtenidos por Peña et al. (1997) quienes al evaluar la producción de alginatos en cultivos de *Azotobacter vinelandii* en matraces bafleados y convencionales encontraron una concentración celular más alta (16×10^8 células/mL) y velocidades específicas de crecimiento mayores (0.15

h^{-1}) en matraces bafleados comparados con matraces convencionales (8×10^8 células/mL y $0.09 h^{-1}$). Estos resultados sugieren que el crecimiento celular en matraces convencionales podría tener limitación de oxígeno, comparado con los matraces bafleados y con resorte (Galindo et al., 1993; Peña et al., 1997). Es por ello, que muchos estudios han usado matraces bafleados para mejorar la oxigenación o la mezcla de los caldos de fermentación (Peña et al., 1997; Yun et al., 2001; Bermek et al., 2004; Galindo et al., 2004; Gamboa-Suasnavart et al., 2011).

Para todos los cultivos se encontró una fase de latencia de aproximadamente 12 h. Adicionalmente, se observaron dos distintas etapas en el crecimiento exponencial en los cultivos llevados en MC (Figura 8), pero se observó solo una fase de crecimiento en MB y MR, como en los cultivos reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2011). Estas dos fases de crecimiento son consistentes con lo previamente reportado en *S. coelicolor* A3(2) (Manteca et al., 2007; Manteca et al., 2008; Rioseras et al., 2014) donde fueron observados dos estados de crecimiento; el primero, donde presenta micelio compartimentalizado (micelio primario), el cual comienza a morir en el centro del pellet para continuar con la aparición de micelio multinucleado que crece a partir de hifas viables (Manteca et al., 2008). Este fenómeno de dos fases de crecimiento podría estar asociado con bajas potencias volumétricas en combinación con bajos tamaños del inóculo en *S. coelicolor* (Tough y Prosser 1996; Manteca et al., 2008; Manteca y Sánchez 2009), *S. fradiae* (Tamura et al., 1997; Khaliq et al., 2009), *S. noursei* (Jonsbu et al., 2002), y *S. natalensis* (el-Enshasy et al., 2000).

La cinética del tamaño de los pellets medido como diámetro promedio, área y perímetro para MC, MB y MR fue evaluada en el cultivo a las 24, 36, 60 y 78 h de cultivo y mostrados en la tabla 2 y figuras 9, 10 y 11.

Tabla 2. Comparación morfológica de los cultivos de *S. lividans* recombinante llevados a cabo en matraces convencionales (MC), matraces bafleados (MB) y matraces con resorte (MR) de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30 °C. Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico misma no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

	MC	MB	MR
Tiempo h)	Área(μm^2)		
24	6776 \pm 468 ^{a,b}	3109 \pm 205 ^a	5248 \pm 476 ^{a,b}
36	25955 \pm 1722 ^d	8654 \pm 537 ^{a,b,c}	8893 \pm 514 ^{a,b,c}
60	82372 \pm 4562 ^f	10034 \pm 480 ^{a,b,c}	14117 \pm 709 ^c
78	65436 \pm 2088 ^e	10013 \pm 560 ^{a,b,c}	12148 \pm 538 ^{b,c}
	Perímetro (μm)		
24	518 \pm 26 ^{a,b,c}	366 \pm 17 ^a	446 \pm 23 ^{a,b}
36	958 \pm 39 ^d	551 \pm 18 ^{a,b}	474 \pm 16 ^{a,b}
60	2406 \pm 91 ^e	588 \pm 19 ^{b,c}	653 \pm 19 ^c
78	2246 \pm 58 ^e	580 \pm 23 ^{b,c}	634 \pm 19 ^c

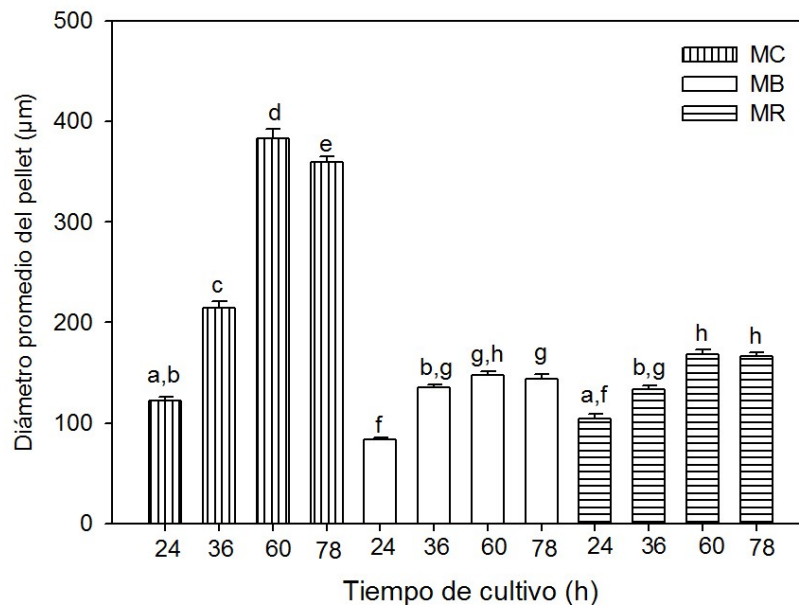


Figura 9. Diámetro promedio de pellets de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30 °C y diámetro de agitación de 25 mm. MC (barras con líneas verticales), MB (barras abiertas), MR (barras con líneas horizontales). Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

Durante etapas tempranas del cultivo, el diámetro promedio de los pellets fue de aproximadamente 100 µm para los tres diseños de matraz. En todos los casos, el pellet crece hasta un estado estable. En MC, el diámetro promedio del pellet aumentó a 370 ± 82 µm; sin embargo, se obtuvieron diámetros de pellets de hasta 700 µm (Figura 10 y Figura 11). Mientras que en los cultivos realizados en MB y MR, los diámetros promedio de los pellets obtenidos fueron de 160 ± 40 µm, 60% más pequeños que los obtenidos en MC. Los tamaños de pellets fueron significativamente más bajos en MC que lo reportado por Gamboa-Suasnavart et al. (2011), pero no se obtuvieron grandes diferencias en MB y MR (Tabla 2) contra los reportados previamente (Gamboa-Suasnavart et al., 2011; Gamboa-Suasnavart et al., 2013). Aparte de esto, la misma tendencia que reportó

Gamboa-Suasnavart et al. (2011) fue encontrada en este trabajo, con pellets más grandes en MC y sin diferencias significativas entre MB y MR. Estas diferencias entre ambos trabajos podrían atribuirse a diferencias del inóculo, como previamente fue reportado para *S. coelicolor* por Manteca et al. (2008), indicando que mientras la P/V es responsable de cambios morfológicos, el tamaño del inóculo también juega un papel importante. Adicionalmente, en trabajos realizados por Cui et al. (1998) en *A. awamori*, se demuestra que los tamaños de los pellets disminuyen al aumentar la energía de disipación en el intervalo evaluado de 0.2 a 5.7 W/kg, concluyendo que el tamaño de estos está determinado por las fuerzas mecánicas.

A una P/V de 0.22 kW/m³ los pellets observados son esféricos, compactos en el centro y con una región esponjosa en la zona periférica; mientras que, los pellets crecidos a 0.51 y 0.44 kW/m³ (MB y MR) tienen forma ovalada y son menos compactos presentando mayor cantidad de micelio disperso (Figura 10). Estos cambios en los tamaños de los pellets entre las configuraciones de matraz, podrían ser explicados por diferencias en la velocidad de energía de disipación debido a las diferencias en P/V entre los cultivos.

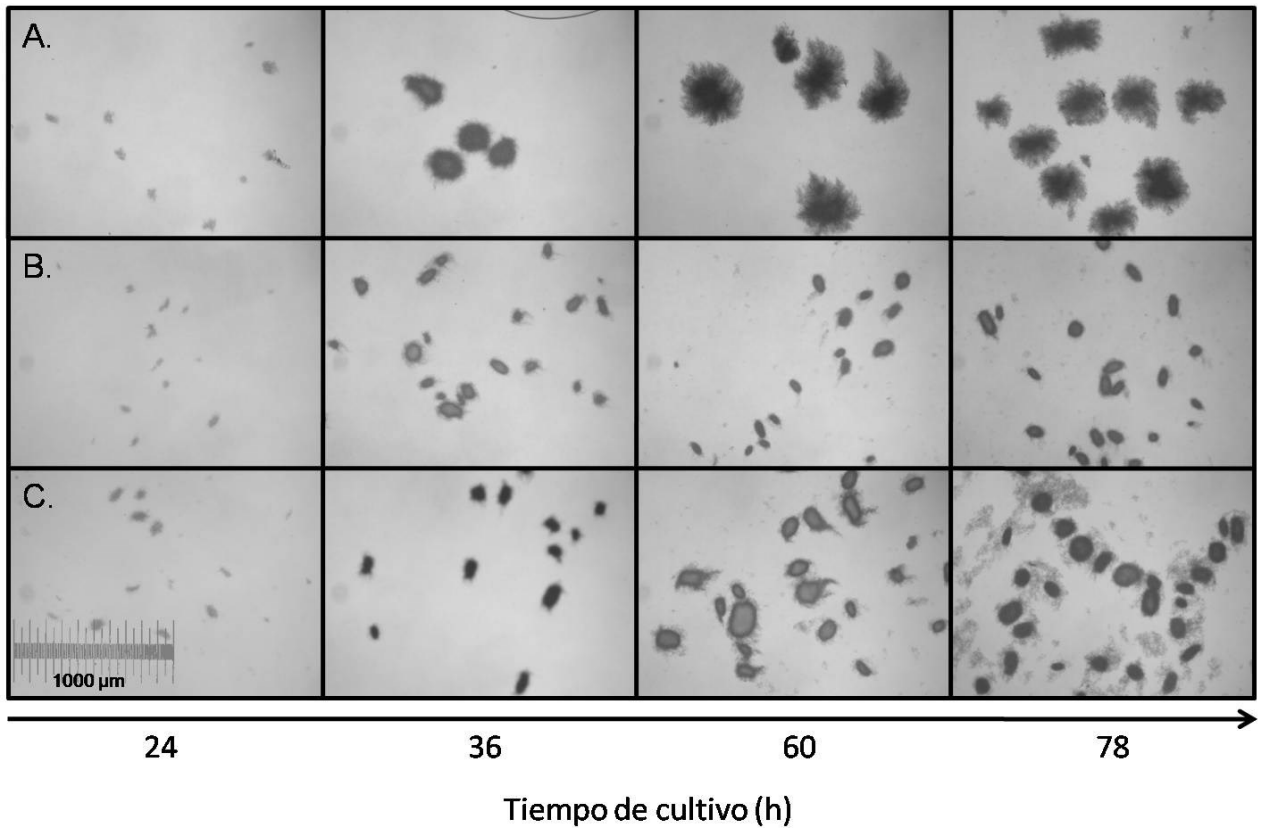


Figura 10. Cinética de morfología micelar de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecidas en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30 °C y diámetro de agitación de 25mm. A. Matraz convencional (MC), B. Matraz bafleado (MB), y C. matraz con resorte (MR). Las muestras fueron tomadas a las 24, 36, 60 y 78 h de cultivo. (La barra indica 1000 µm, aumento de 4X).

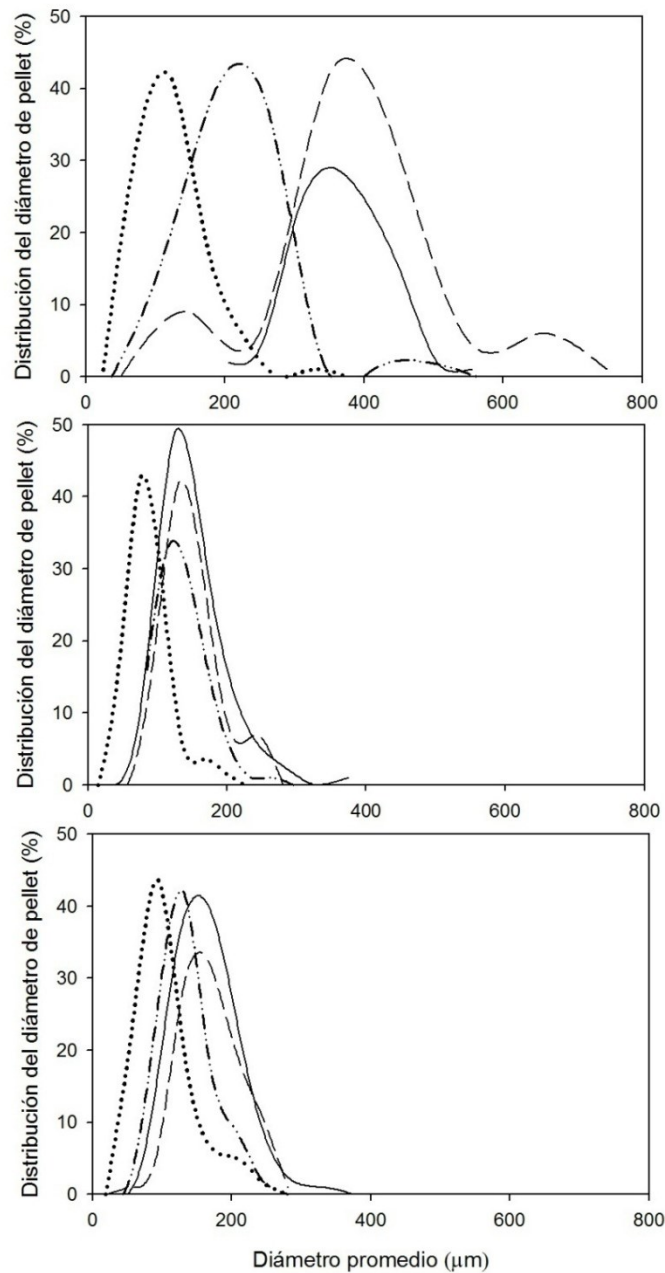


Figura 11. Distribución del diámetro los pellets de *S. lividans* obtenidos en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C. A. Matraz convencional (MC); B. Matraz baffleado (MB); y C. Matraz con resorte (MR). Las muestras fueron tomadas a las 24 (·····), 36 (— · — ·), 60 (— — —), y 78(—) h de cultivo.

6.3 Comportamiento reológico de los cultivos de *Streptomyces lividans* en las tres configuraciones de matraz

Las figuras 12 y 13 presentan los parámetros reológicos y reogramas de las suspensiones microbianas para los diseños de matraz evaluado a diferentes tiempos de cultivo. Se observa que las suspensiones son dependientes de la velocidad de deformación, presentando comportamientos no Newtonianos de carácter pseudoplástico, relación que puede ser descrita por la Ley de Ostwald de Waele o Ley de potencia. Este comportamiento pseudoplástico ha sido encontrado en fermentaciones fúngicas (Rodríguez-Porcel et al., 2005), cultivos de actinomicetos (Warren et al., 1995) y cultivos bacterianos que producen polisacáridos (Peña et al., 2007). Adicionalmente, la viscosidad de los caldos aumenta con el tiempo de cultivo. Esto debido a la formación de biomasa (Peter et al., 2004) y a la morfología de los microorganismos (Packer and Thomas, 1990; Rilly et al., 2000).

El comportamiento reológico de los caldos de cultivo de *S. lividans* en las tres configuraciones de matraz en términos del modelo de Ostwald de Waele, la evolución del índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento (n) son mostrados en las figuras 12.

Al final del cultivo, el índice de consistencia incrementa tres veces en MC ($0.111 \pm 0.024 \text{ mPas}^n$) cuando es comparado con el MB y el MR (0.042 ± 0.009 y $0.045 \pm 0.003 \text{ mPas}^n$, respectivamente), pero el índice de comportamiento disminuyó en un 33% en MC (0.40 ± 0.06) al compararlo con MB y MR (0.62 ± 0.05 and 0.63 ± 0.01 , respectivamente). Estos cambios en las características reológicas de los cultivos parecen estar relacionados con los cambios en la P/V encontrados entre las 56 y 58 h de cultivo (Figura 7).

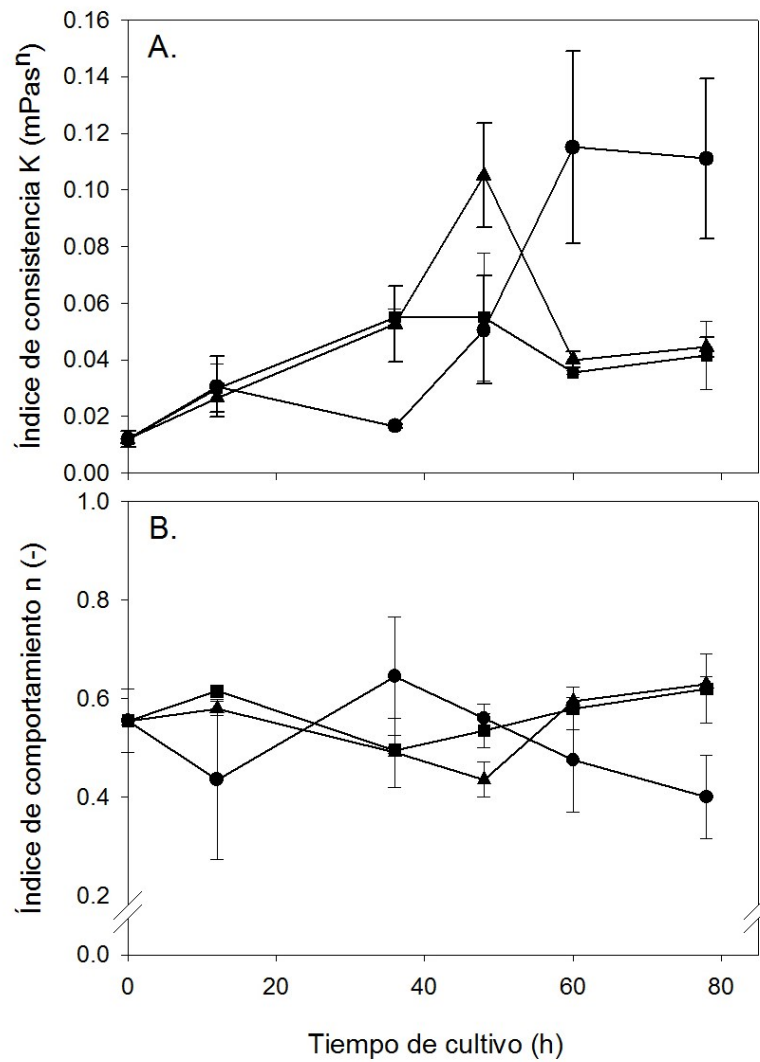


Figura 12. Parámetros reológicos de cultivos de *S. lividans* en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de llenado, incubados a 150 rpm, 30°C. A. Índice de consistencia. B. Índice de comportamiento. Matraces convencionales (●), matraces bafleados (■) y matraces con resorte (▲).

El aumento en P/V al final de los cultivos en MC o la disminución en la P/V de MR y MB, podrían estar relacionados con el aumento del índice de consistencia en MC o su disminución en MR y MB (Figura 12.A), como también, con la disminución del índice de comportamiento en MC y su aumento en MR y MB (Figura 12.B). Esto indica un aumento de la viscosidad aparente en los cultivos en MC o una disminución de la misma en MR y MB.

Los cambios pseudoplásticos pueden seguramente estar asociados con los cambios en los tamaños morfológicos de *S. lividans* en las etapas finales de los cultivos en MC. Comportamientos similares fueron encontrados en cultivos de *S. clavuligerus* (Gouveia et al., 2000), *S. pristinaespiralis* (Mehmood et al., 2010), y *S. olindensis* (Giudici et al., 2004; Pamboukian y Facciotti 2005).

6.4 Reproducción de la P/V obtenida en matraces con resorte en matraces convencionales

Con el fin de determinar si la P/V tiene un papel importante en los cambios en crecimiento y morfología micelial, se llevaron a cabo dos aproximaciones para reproducir la potencia volumétrica obtenida en resorte en matraces convencionales. Con base en el valor de P/V obtenido en matraces con resorte el número modificado de Newton (ecuación 5), se plantearon dos experimentos. El primero, manteniendo la velocidad de agitación a 150 rpm y disminuyendo el volumen de llenado a 15 mL y un segundo experimento, aumentando la velocidad de agitación a 168 rpm con volumen de llenado de 25 mL. Los resultados de esta equivalencia se muestran en la figura 13.

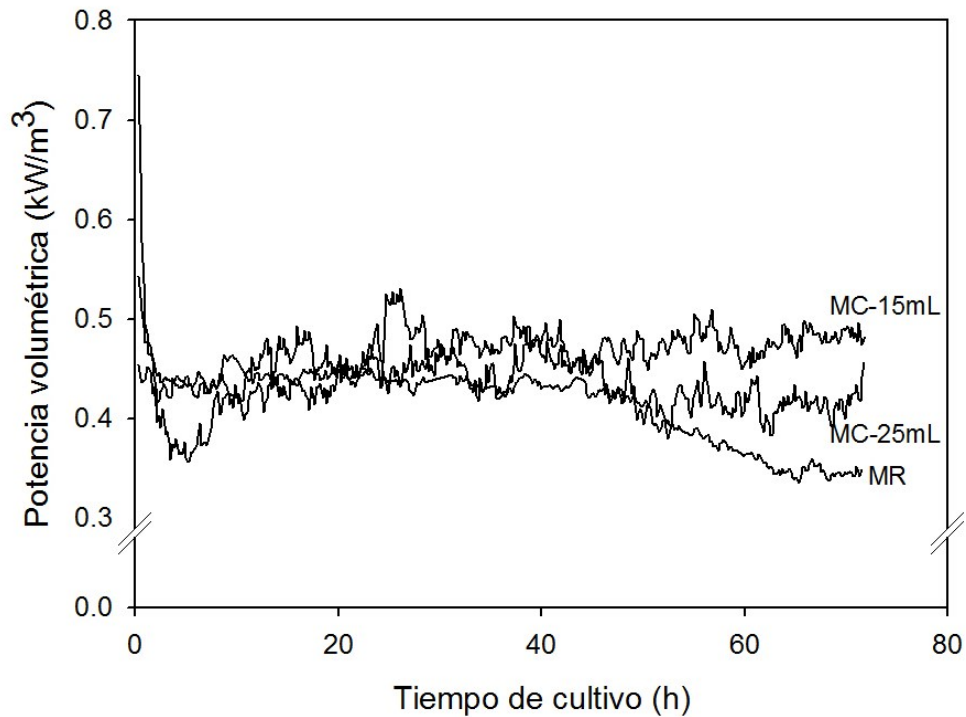


Figura 13. Potencia volumétrica para *S. lividans* recombinante reproduciendo la P/V de matraz con resorte en matraz convencional con 15 mL de volumen de llenado y 150 rpm (MC-15mL), matraz convencional con 25 mL de volumen de llenado y 168 rpm (MC-25mL).

6.5. Caracterización cinética, morfológica y reológica de cultivos de *S. lividans* en matraces convencionales, reproduciendo la P/V de matraces con resorte

La caracterización cinética del crecimiento bacterial de *S. lividans* crecido en matraces convencionales con un volumen de llenado de 15 mL (150 rpm) y 25 mL (168 rpm), se presenta en la figura 14.

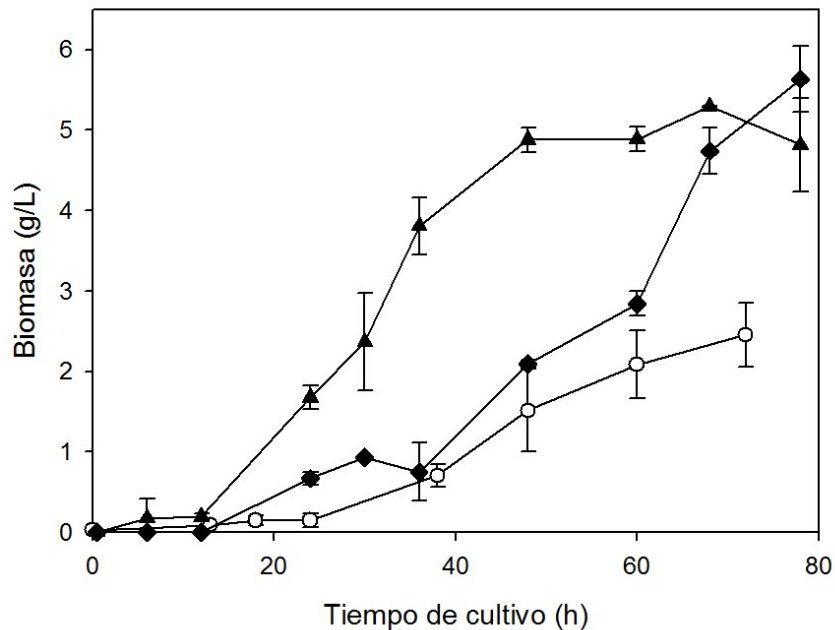


Figura 14. Cinética de crecimiento de biomasa *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) en matraces convencionales con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (-◆-), y matraces convencionales con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm (-○-). Matraz con resorte (-▲-).

Como se muestra en la figura 14, la máxima concentración de biomasa (4.7 ± 0.3 g/L) fue obtenida en los cultivos llevados a cabo en matraces convencionales con 15 mL de volumen de llenado y agitados a 150 rpm (MC-15mL). Bajo estas condiciones la velocidad específica de crecimiento (μ) fue estimada en 0.15 ± 0.01 h^{-1} . Para el caso de los cultivos agitados a 168 rpm (MC-25mL) con un volumen de llenado de 25 mL, se alcanzó una concentración de biomasa de 2.5 ± 0.4 g/L con una velocidad específica de crecimiento de 0.10 ± 0.03 h^{-1} . Este comportamiento en la velocidad específica de crecimiento, y concentración final de biomasa en MC-15 mL fue similar a los cultivos llevados a cabo en matraces con resorte (Figura 8). En contraste, los cultivos llevados a cabo en MC-25mL no presentaron diferencias significativas en la concentración de biomasa y la velocidad específica de crecimiento con los cultivos en MC y 50 mL de volumen de llenado. A pesar de

que la P/V suministrada al sistema era la misma en MC-15 mL y MC 25 mL, los resultados en crecimiento celular muestran que este tipo de estrategia para igualar la P/V no es la más adecuada, al menos para los cultivos micelares evaluados en este trabajo. Esto es seguramente por las diferencias en la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, por sus siglas en inglés; oxygen transfer rate). El efecto del volumen de llenado en la OTR ha sido reportado previamente en otros modelos como *Corynebacterium glutamicum* (Anderlei et al., 2004; Zimmermann et al., 2006), *E. coli* (Losen et al., 2004), *Hansenula polymorpha* (Anderlei y Büchs, 2001), *Pichia pastoris* (Maier et al., 2004), así como también el tipo de matraz en la OTR (Maier y Büchs 2001). En *S. pristinaespiralis*, el efecto de la energía de disipación en el crecimiento celular son indirectos, a través de un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno (Mehmood et al., 2012).

Con el fin de determinar si la P/V es la responsable de los cambios morfológicos de *S. lividans*, se determinaron los parámetros morfológicos promedio (área, diámetro y perímetro) de los pellets en los cultivos de matraz convencional con 15 y 25 mL de medio (Tabla 3, figuras 15 y 16). Los diámetros promedio de los pellets para ambos sistemas son mayores a 400 μm para todos los tiempos de cultivo evaluados, teniendo pequeñas poblaciones de 1000 μm de diámetro. Estos tamaños contrastan con los obtenidos en matraces con resorte, donde el diámetro promedio no superó las 200 μm . Estos datos indican que, no sólo la P/V (como un parámetro global en matraces agitados), está jugando un papel importante en la fisiología de *S. lividans*, sino también la velocidad de transferencia de oxígeno y/o los gradientes de energía específica de disipación asociados a las indentaciones en MB o al resorte en el MR.

Tabla 3. Comparación morfológica de los cultivos de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) llevados a cabo en matraces convencionales con 15 mL de volumen de llenado y agitación de 150 rpm (MC-15 mL) y matraces convencionales con 25 mL de volumen de llenado y 168 rpm (MC-25 mL). Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico indican que no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

	MC-15 mL	MC-25 mL
Tiempo (h)	Área (μm^2)	
36	85175 \pm 3978 ^{a,b}	130932 \pm 8681 ^{c,d,e}
48	104312 \pm 7306 ^{b,c}	75625 \pm 4075 ^a
60	152683 \pm 5376 ^e	129501 \pm 4295 ^d
72	83767 \pm 2944 ^{a,b}	89312 \pm 2874 ^{a,b}
	Perímetro (μm)	
36	1661 \pm 48 ^a	2076 \pm 85 ^b
48	1844 \pm 41 ^{a,b}	1683 \pm 44 ^a
60	2452 \pm 62 ^c	2488 \pm 63 ^c
72	1574 \pm 36 ^a	19867 \pm 54 ^b

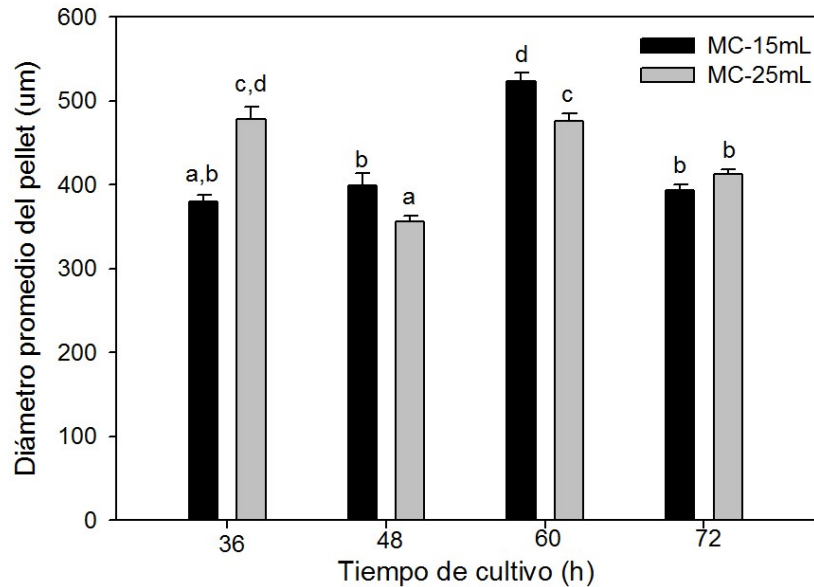


Figura 15. Diámetro promedio de pellets de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en matraces convencionales con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (barras negras), y matraces convencionales con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm MC (barras grises). Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

Yin et al. (2008) reportaron que limitaciones de oxígeno disuelto al inicio del cultivo de *S. avermitilis*, generan pellets de mayor área y baja densidad. Esto sugiere que los cultivos llevados a cabo en matraces convencionales podrían tener limitación de oxígeno. Trabajos realizados en nuestro grupo, indican que los cultivos en matraces convencionales presentan menores velocidades de transferencia de oxígeno (OTR). Sin embargo, este parámetro no podría explicar completamente el tamaño del pellet, ya que al comparar el comportamiento morfológico de *S. lividans* en matraces convencionales (50 mL, 25 mL y 15 mL de volumen de llenado), los mayores diámetros promedio se encontraron en los cultivos con 25

mL y 15 mL, donde existe menor limitación de oxígeno ($OTR > 4$ mmol/Lh), comparado con los cultivos en 50 mL ($OTR < 2$ mmol/Lh).

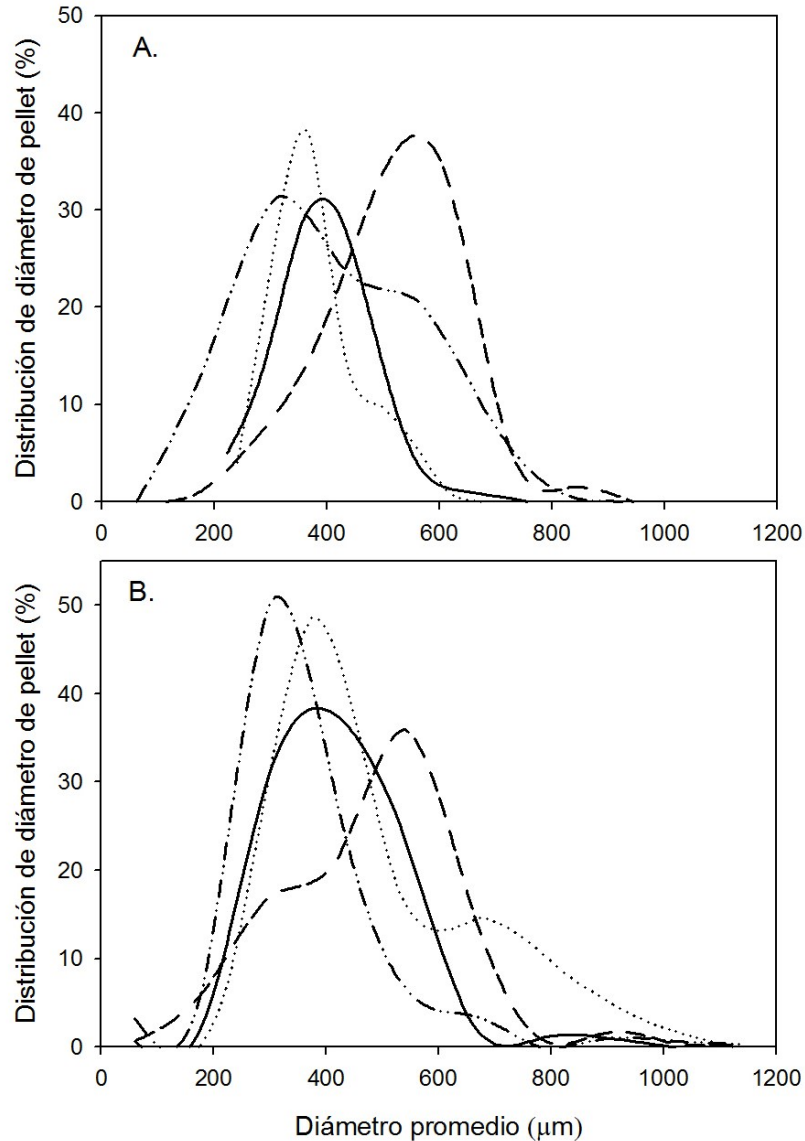


Figura 16. Distribución morfológica de los pellets *S. lividans* recombinante en matraces convencionales. A. Volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm. B. Volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm. Muestras tomadas a las 36 (.....), 48 (-.-.-), 60 (- - -) y 72(—) h de cultivo.

El comportamiento reológico de los cultivos de *S. lividans* en matraces convencionales reproduciendo la P/V del MR, es mostrado en la figura 17. Para ambos cultivos en MC-15 mL y MC-25 mL, se presentan comportamientos no Newtonianos de carácter pseudoplástico, obteniéndose un aumento en la viscosidad aparente con el tiempo de cultivo (Figura 17). El índice de consistencia (Figura 19.A) aumenta con el tiempo de cultivo, alcanzando un valor de 0.056 ± 0.005 mPasⁿ para MC-15mL y de 0.085 ± 0.013 mPasⁿ para MC-25mL al final del cultivo; valores mayores que los alcanzados en MR (0.045 ± 0.003 mPasⁿ), pero menores a los obtenidos en MC-50 mL (0.111 ± 0.024 mPasⁿ). El índice de comportamiento permaneció prácticamente constante en el tiempo de cultivo 0.62 ± 0.01 y 0.56 ± 0.05 para MC-15 mL y MC-25 mL, respectivamente (Figura 17.B).

Al comparar el comportamiento reológico de los cultivos en MR (Figura 12) y matraces convencionales con 15 y 25 mL de medio (Figura 17), puede observarse que los MC alcanzan viscosidades similares a las obtenidas en MR. Sin embargo, en los cultivos en matraces con resorte, la viscosidad disminuye al final del cultivo a pesar de que en este tiempo se presenta la mayor concentración celular. Esto indica que la viscosidad estaría influenciada por el tamaño del pellet y su concentración, como fue reportado por Rodríguez-Procel et al. (2005) en cultivos de *A. terreus* llevados a cabo en tanques agitados y columnas de burbujeo.

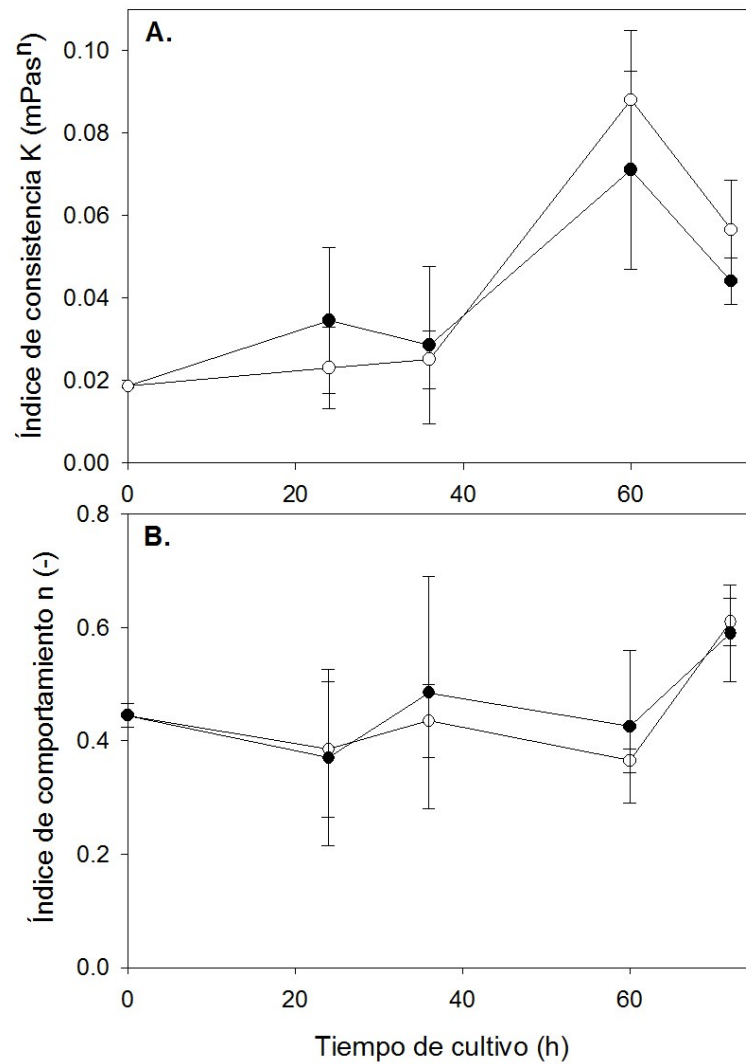


Figura 17. Parámetros reológicos de cultivos de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa). A. Índice de consistencia., B. Índice de comportamiento. Matraz convencional con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm (-♦-), y Matraz convencional con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm (-O-).

6.6 Identificación de APA en matraces convencionales reproduciendo la P/V de matraces con resorte

Estudios realizados previamente por Gamboa-Suasnavart et al. (2011), mostraron que la producción de la proteína APA de *S. lividans* se favorecía en cultivos llevados a cabo en matraces con resorte y bafleados (concentración tres veces mayor que la obtenida en matraces convencionales), donde se presentaron los menores tamaños morfológicos. Proponiendo que la producción de la proteína puede ser atribuida a estos cambios morfológicos, los cuales están determinados por parámetros hidrodinámicos y de transferencia de oxígeno.

Con el objetivo de determinar si los cambios en la producción de APA de *S. lividans* se debe a parámetros hidrodinámicos, en este trabajo se reprodujo en matraces convencionales la P/V obtenida en matraces con resorte. La producción de la proteína APA fue evaluada mediante SDS-PAGE, Western Blot (figura 18A, B y C) y densitometría. Los análisis de densitometría muestran que la mayor producción de proteína fue obtenida en los cultivos de matraces convencionales con 15 mL de medio (45 ± 2 % de la proteína total) comparados con los cultivos en matraces convencionales con 25 mL de medio y matraces con resorte, donde la producción de la proteína APA corresponde al 36 ± 3 % y 35.2 % de la proteína total, respectivamente. Mientras que bajas producciones fueron encontradas en MC-50mL ($25.2 \pm 3\%$). Estos resultados indican, que la morfología de *S. lividans*, no está directamente involucrada en la producción y secreción de la APA, como lo propone el trabajo de Gamboa-Suasnavart et al. (2011). En este caso, al reproducir la P/V de los matraces con resorte en matraces convencionales con 15 y 25 mL de volumen de llenado se obtuvieron tamaños morfológicos similares y mayores a los matraces convenciones con 50 mL de medio, y la producción de la proteína no fue desfavorecida. Esto sugiere que la P/V del sistema es un factor clave en la producción de APA. Este parámetro global ha sido relacionado con

muchos fenómenos físicos que toman lugar en el biorreactor, como el suministro de oxígeno, remoción de dióxido de carbono, grado de mezclado, intensidad de la turbulencia, homogeneidad de la fase líquida y estrés hidrodinámico (Büchs et al., 2001; Mehmood et al., 2010; Olmos et al., 2013). En la sección 6.5 se expuso que la OTR en matraces convencionales con 15 mL y 25 mL era superior a los 4 mmol/Lh, concentración suficiente para mantener los requerimientos mínimos de oxígeno que esta alrededor de 2.5 mmol/kg h (Gamboa-Suasnavart, datos no publicados), esto indica que la producción de la proteína podría estar influenciada por la concentración de oxígeno, específicamente en no haber limitación de este; como en el caso de matraces convencionales con 50 mL, donde la OTR es menor (<2 mmol/Lh) a los requerimientos mínimos.

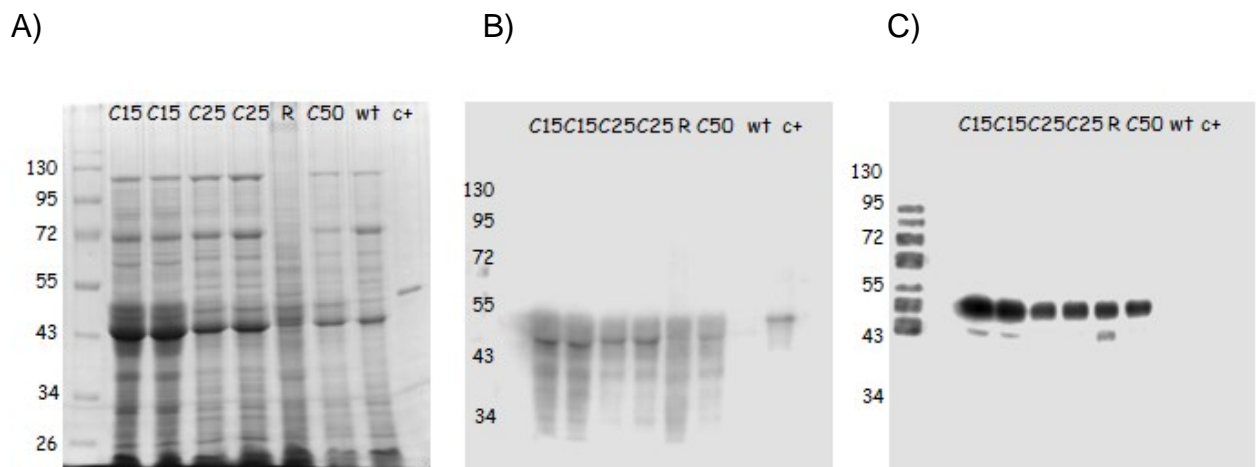


Figura 18. (A) SDS-PAGE de la proteína total secretada precipitada con Metanol-cloroformo en matraces convencionales con 15, 25 y 50 mL (C15, C25, C50), con resorte (R), *S. lividans* silvestre (wt) APA de *e.coli* (C⁺). Western blot de APA de *S. lividans* usando (B) AntiAPA Mab6A3, (C) Anti-ConA.

Se han reportado cuatro sitios de O-manosilación en APA de *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los cuales se localiza en la región carbono-terminal (Dobos et

al., 1996; Horn et al., 1999). La composición de carbohidratos de este sitio se determinó por espectrometría de masas y se encontraron hasta 6 residuos de manosa en MC-50 mL, MC-15mL y MC-25 mL (Tabla 4 y figura 19). Los datos de MC-50mL son diferentes a los reportados previamente en nuestro grupo por Gamboa-Suasnavart et al., (2011), quienes encontraron hasta dos residuos de manosas en los cultivos realizados en MC, y hasta cinco residuos de manosas se determinaron en MR y MB.

Tabla 4. Pesos observados (Da) del Péptido correspondiente al extremo carbonoterminal de APA generados de la digestión con Lys C (Roche ®, Alemania)

Matraz	Peso observado (Da)						
	Manosas						
	0	1	2	3	4	5	6
Resorte*	4645.2	4804.4	4967.7	5130.3	5274.7	5292.2	5455.5
Convencional 50mL y 150 rpm	4627.7	4790.2	4952.3	5116.2	5278.2	5438.9	5601.1
Convencional 15mL y 150 rpm	4627.7	4788.7	4957.8	5112.9	NI	5435.8	5604.6
Convencional 25mL y 168 rpm	4627.8	4788.3	4950.0	5112.5	5271.1	NI	5604.1

*Gamboa-Suasnavart et al (2011). NI: No se logra identificar.

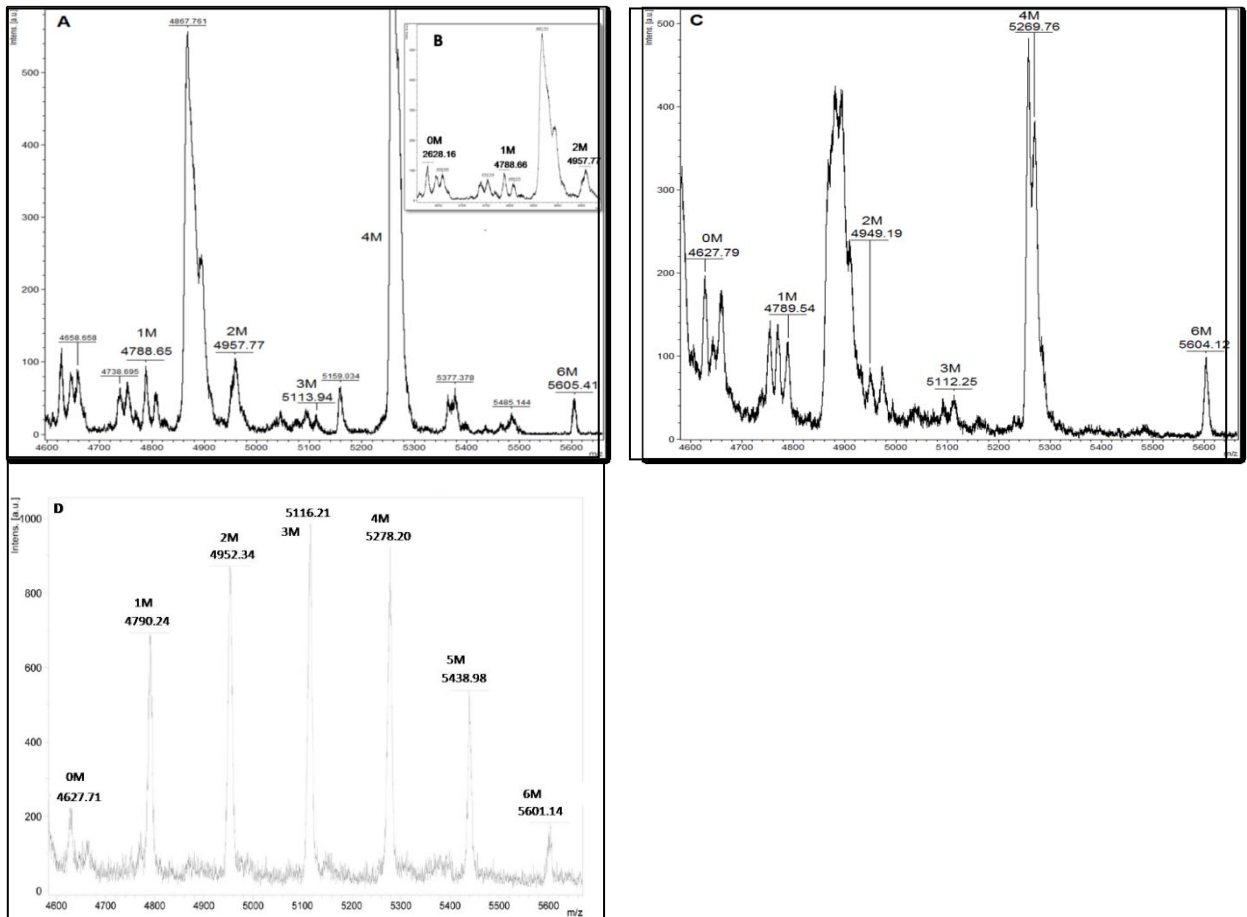


Figura 19. Análisis de MALDI-TOF para el péptido correspondiente al extremo carboxi-terminal generado de la digestión con Lys C (Roche®, Alemania) producido en: a) y b) Matraz con volumen de llenado de 15 mL y 150 rpm, c) Matraz con volumen de llenado de 25 mL y 168 rpm, D) Matraz con volumen de llenado de 50 mL y 150 rpm.

Las diferencias en el número de residuos de manosa que se encuentran en el extremo carboxi-terminal de la APA recombinante en MC en este trabajo y los residuos de sólo 2 manosas reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2011), son probablemente debidas a la diferencia de 4 veces en tamaño de los pellets de nuestro trabajo comparados con los de Gamboa-Suasnavart et al. (2011). Esto sugiere que también el suministro de oxígeno es un paso limitante en el interior de pellets grandes, como los reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2011), limitando seguramente modificaciones post-traduccionales tales como O-

manosilación de las proteínas recombinantes. También, como se discutió previamente, las diferencias inevitables en crecimiento/morfología pueden atribuirse a diferencias en el tamaño del inóculo (Manteca et al., 2008; Mehmood et al., 2010; Mehmood et al., 2011; Mehmood et al., 2012). Como consecuencia de los cambios en el tamaño de pellets en este trabajo, se espera una concentración diferente de oxígeno crítico para asegurar una difusión adecuada en el agregado. De acuerdo con la correlación propuesto por Cui et al. (1998), concentraciones de 0.8 mg/L y 1.2 mg/L de oxígeno disuelto serían necesario para una buena difusión de este en pellets de diámetros de $370 \pm 80 \mu\text{m}$ y $700 \mu\text{m}$ (diámetro máximo de pellets obtenidos en este trabajo). En contraste, se necesitarían 14.28 mg/L de oxígeno para satisfacer los requerimientos en pellets con diámetros de 1.57 ± 0.41 mm, que fueron obtenidos por Gamboa-Suasnavart et al. (2011). Por lo tanto, sugerimos que en agregados de 1.57 ± 0.41 mm existe la limitación de oxígeno, pero en los pellets obtenidos en este trabajo posiblemente sea menos o no exista.

La hipótesis de que un valor límite en el tamaño de pellet sería necesario para lograr un cierto número de residuos de manosas, al menos en el extremo carbonoterminal de la proteína APA, como resultado de una limitación de oxígeno, podría ser confirmada mediante un estudio sistemático. Esto se podría hacer con el fin de demostrar que la P/V y velocidad de transferencia de oxígeno, junto con el tamaño del inóculo tiene un papel importante en la aparición de micelio multinucleado en *S. lividans*, como la distribución del tamaño de agregados. Esto podría realizarse en cultivos en biorreactores, donde los fenómenos de transferencia de masa y momento pueden ser estudiados por separado (Trujillo-Roldán et al., 2004). Por ejemplo, Manteca et al. (2008) observaron que el centro de los pellets contiene células inactivas, debido a un rápido consumo de los sustratos (nutrientes y/o oxígeno) dentro del núcleo de los pellets. Yun et al. (2001) reportaron que para pellets con diámetros menores a 2 mm las limitaciones en los fenómenos de transferencia de masa eran poco probables. Sin embargo, podría existir un límite

en el tamaño del agregado que puede afectar modificaciones post-traduccionales de proteínas, como en el caso de los agregados de MC reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2011). Se puede proponer que no sólo el tamaño del inóculo, sino también, la baja agitación/aireación pueden estar jugando un papel específico en la determinación de los dos fenómenos de la fase de crecimiento, sobre todo en a bajas P/V (como en la MC), donde un arresto transitorio en la fase de crecimiento podría ser activado (Manteca et al., 2008).

Los resultados sobre la determinación de la P/V en matraces con diferentes configuraciones, así como su efecto en el crecimiento, morfología miceliar de *S. lividans*, parámetros reológicos de los caldos de cultivos, así como su efecto en la producción y O-glicosilación de APA de *Mycobacterium tuberculosis* fueron publicados en Biochemical Engineering Journal, bajo el título “The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks”. Luz D. Marín-Palacio, Ramsés A. Gamboa-Suasnavart, Norma A. Valdez-Cruz, Luis Servín-González, Ma. Soledad Córdova-Aguilar, Enrique Soto, Wolf Klöckner, Jochen Büchs, Mauricio A. Trujillo-Roldán (Anexo 1).

6.7 Escalado de P/V obtenido en matraces en biorreactor de 1.2 L

Los matraces agitados han sido ampliamente utilizados para el estudio y optimización de procesos biotecnológicos, ya que permiten llevar a cabo numerosos experimentos con un mínimo de material (Büchs et al., 2001). A pesar de estas ventajas, los matraces agitados presentan diversas limitaciones, entre ellas la de no poder controlar individualmente las condiciones ambientales de cultivo, tales como pH, oxígeno disuelto, agitación, entre otros. Sin embargo, muchos procesos requieren producirse en mayor escala y estudiar por separado la influencia de factores ambientales en el cultivo. Por esto, es necesario escalar los procesos de matraces agitados a biorreactores, en los que es posible monitorear y

controlar variables de proceso de manera independiente (Gamboa-Suasnavart et al., 2013). Los procesos en matraces agitados han sido problemáticos y poco entendido, principalmente por la falta de conocimiento relacionado con los procesos de transferencia de masa, hidrodinámica, potencia entregados al sistema (Suresh et al., 2009), y los patrones de mezclado (Gerson y Kole, 2001). Gracias al desarrollo de sistemas para medir la potencia volumétrica en matraces agitados (Büchs et al., 2000a; Büchs et al., 2000b) ha sido posible caracterizar (en línea) los cambios de P/V en cultivos con altas y bajas viscosidades. Parámetro que es usualmente usado para el escalado y operación de biorreactores. Este parámetro global es conocido por estar relacionado con muchos fenómenos físicos que toman lugar en el biorreactor, tales como, suministro de oxígeno, remoción de dióxido de carbono, macro y micro mezclado, intensidad de la turbulencia, homogeneidad de la fase líquida y estrés hidrodinámico (Olmos et al., 2013).

Con el fin de establecer si los cambios en morfología y en producción de la glicoproteína recombinante APA, en matraces agitados con diferentes geometrías son debidos a cambios en la P/V, se utilizó una nueva estrategia de cultivo. En este sentido, se escaló la P/V obtenida a biorreactores de 1.2 L y así observar si se presentaban los mismos comportamientos en crecimiento, morfología y producción de la proteína APA que en matraces agitados.

Asumiendo que el biorreactor de 1.2 L con dos impulsores tipo Rushton opera en flujo turbulento, y a partir de la figura 20, se determina el número de potencia (N_p) que arroja un valor de de 5.5.

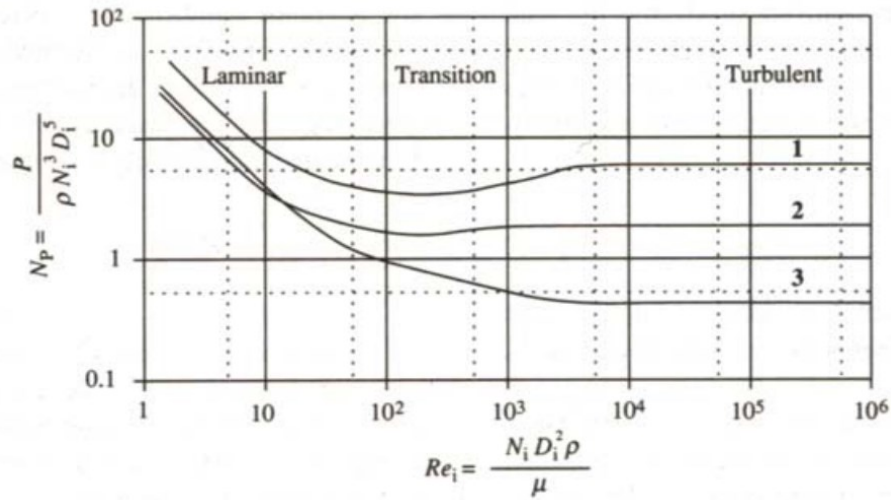


Figura 20. Relación entre el número de potencia y el Reynolds. 1. Turbina Rushton. 2. Paletas. 3. Propela marina (tomado de Doran, 1995).

Con el valor de N_p , las P/V obtenidas en las diferentes geometrías de matraz y teniendo en cuenta que se utilizaron dos impulsores tipo Rushton con una relación entre el diámetro del tranque y el diámetro de impulsor de 3:1 y reemplazando en la ecuación 11 y 12, se obtienen las velocidades de agitación a la que debe ser operado el biorreactor (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de agitación en biorreactores a las P/V de matraces agitados

Geometría matraz	P/V _{experimental} (kW/m ³)	P _g /P	N del bioreactor (rpm) usando P	N del bioreactor (rpm) usando P _g
Convencional	0.22	0.97	260	259
Resorte	0.44	0.96	340	336

N: Velocidad de agitación, P: potencia por agitación, P_g: potencia gaseada

Como se observa en la tabla 5, no se aprecian cambios significativos en la velocidad de agitación usando potencia sin gasear y potencia gaseada, por lo que se decidió utilizar el valor de agitación ajustado a la decena superior (260 rpm y 340 rpm).

6.8 Cinética de crecimiento bacteriano de *S. lividans* en biorreactores agitados.

La caracterización cinética del crecimiento de *S. lividans* recombinante en biorreactor agitado con dos impulsores tipo Rushton a velocidades de agitación de 260 rpm y 340 rpm que suministran P/V iniciales de 0.22 kW/m³ y 0.44 kW/m³ obtenidas en MC y MR respectivamente, se presenta en la figura 21.

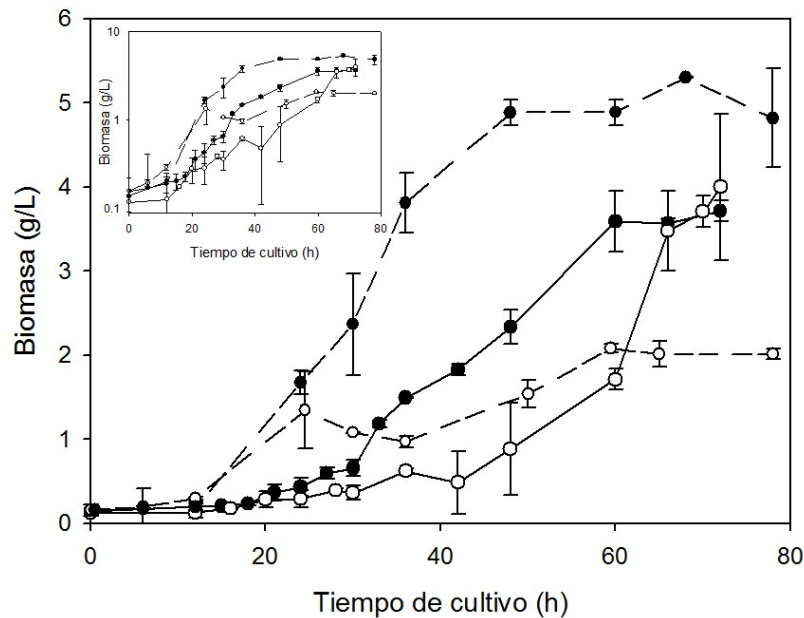


Figura 21. Cinética de crecimiento de *S. lividans* recombinante cultivado en biorreactores de 1.2 L a 30°C y TOD del 10%, agitados a 260 rpm (Línea continua,-O-) y 340 rpm (Línea continua, -●-) y su comparación con crecimiento de *S. lividans* recombinante cultivado en matraces convencionales (Línea discontinua -O-) y matraces con resorte (Línea discontinua, -●-).

El crecimiento celular de *S. lividans*, a velocidades de agitación de 260 rpm (P/V: 0.22 kW/m³) y 340 rpm (P/V: 0.44 kW/m³) presenta una fase de latencia de 20 horas aproximadamente, a partir de la cual empieza a observarse una fase de crecimiento exponencial con una duración de 30 horas para ambos cultivos. Un

crecimiento ligeramente más rápido (Tabla 6) en la P/V de 0.44 kW/m³, puede ser explicado por una mejor transferencia de masa y suministro de oxígeno. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas en la concentración celular. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kelly et al. (2006) y Lin et al. (2010) quienes al trabajar con cultivos de *A. niger* AB1.13 encontraron que aunque altas energías de disipación favorecían la velocidad específica de crecimiento, promovían menores concentraciones de biomasa. Sin embargo, Rodríguez-Porcel et al. (2005) en cultivos de *A. terreus*, no encontraron diferencias en la concentración celular al trabajar velocidades de agitación entre 300 rpm y 800 rpm. Justen et al. (1998) al evaluar la influencia de las condiciones de agitación en el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* encontraron que la velocidad específica de crecimiento al igual que la concentración total de biomasa incrementaron con la intensidad de agitación (600-1400 rpm), sugiriendo que la alta fragmentación de micelio promueve el crecimiento por incremento en la formación de nuevas puntas hifales (Justen et al., 1998)

Adicionalmente, el crecimiento celular en matraces agitados y biorreactor fueron comparados con base en peso seco de la biomasa obtenido al final del cultivo. Se encontró que para el escalado de la P/V de MC (0.22 kW/m³) a reactor de 1.2 L agitado a 260 rpm, 50 % más biomasa fue obtenida en el biorreactor comparado con el MC. Esta disminución en MC puede ser debida posiblemente a que la inducción de gas en el matraz es solo debido a la aireación superficial, mientras que en el biorreactor agitado a 260 rpm, el oxígeno disuelto puede ser suficiente para estar disponible en el crecimiento del microorganismo, no habiendo agotamiento de oxígeno disuelto, debido a la agitación y aireación que proporcionan una buena mezcla al sistema (Shukla et al., 2001). Es por ello que modificaciones en matraces convencionales por la introducción de baffles (Freedman, 1970) o resortes de acero (Hopwood et al., 1985) y otros accesorios son usados frecuentemente con el fin de proveer suficiente aireación y evitar la formación de pellets en microorganismos filamentosos (Suresh et al., 2009).

Para el caso del escalado de la P/V obtenida en MR (0.44 kW/m³) a reactor de 1.2 L agitados a 340 rpm, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de biomasa final, alcanzándose para ambos sistemas una concentración de biomasa 5.2 ± 0.01 g/L, ni diferencias en la velocidad específica de crecimiento (biorreactores agitados a 340 rpm de 0.12 ± 0.007 h⁻¹ y MR 0.14 ± 0.01 h⁻¹).

Tabla 6. Resumen de parámetros experimentales a diferentes velocidades de agitación

Condiciones de agitación		Parámetros cinéticos		
Velocidad de agitación (rpm)	P/V (kW/m ³)	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	APA (% proteína total)	X _{máx} (g/L)
260	0.22	0.09 ± 0.01	26.1±0.5	5.1 ± 0.05
340	0.44	0.12 ± 0.01	25.4±2.2	5.2 ± 0.04

6.9 Comportamiento reológico de los cultivos de *S. lividans* en biorreactores agitados

El comportamiento reológico de las suspensiones celulares de *S. lividans* obtenidos en biorreactor de 1.2 L agitados a 260 rpm y 340 rpm, que suministran una P/V de 0.22 kW/m³ y 0.44 kW/m³, respectivamente se muestran en la figura 22. Al comparar los parámetros reológicos (K y n), entre las dos velocidades de agitación, no se presentan diferencias significativas. Los cultivos desarrollan comportamientos no newtonianos de carácter pseudoplástico (n<1) (Figura 24), similares a los obtenidos en cultivos en matraces (Figura 12). El índice de consistencia (K) es esencialmente el mismo durante las primeras 30 h de cultivo, e

incrementa para las 50 h de cultivo a un valor de 0.08 ± 0.012 mPasⁿ (Figura 22.A), mientras que el índice de comportamiento (0.056 ± 0.08) permanece constante durante todo el tiempo de cultivo (Figura 22.B).

La viscosidad aparente de los caldos de fermentación (Figura 22.C) fue calculada con base en la ecuación 13, utilizando la velocidad de deformación (γ) reportada por Sánchez-Pérez et al. (2006) para flujos turbulentos en fluidos no Newtonianos en tanque agitado (Ecuación 12).

$$\gamma = \left(\frac{4N_p \rho D^2}{\pi 3^3 K} \right)^{1/(1+n)} N^{3/(1+n)} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

γ : Velocidad de deformación (s⁻¹)

K : es el índice de consistencia (Pa.sⁿ)

n: índice de comportamiento de flujo (adimensional)

N_p: Número de potencia (adimensional)

ρ : Densidad (Kg/m³)

D: Diámetro del impulsor (m)

N: Velocidad de agitación (s⁻¹)

La figura 22.C presenta la evolución de la viscosidad aparente del medio de cultivo durante la fermentación. La viscosidad de los caldos aumenta durante todo el tiempo de cultivo para ambas velocidades de agitación. Aumentos que pueden explicarse por el incremento en la concentración celular hasta el final de la fase exponencial. Sin embargo, durante las etapas posteriores del proceso, el aumento de la viscosidad no se explica por la concentración de biomasa ya que esta permanece constante después de las 50 h de cultivo (Figura 23). Adicionalmente, aunque el comportamiento en el crecimiento celular para ambas velocidades de agitación es similar, se obtuvieron mayores viscosidades en los cultivos agitados a 260 rpm (10.84 ± 0.5 mPas) comparados con los cultivos llevados a 340 rpm (5.96 ± 2.1 mPas). Estos comportamientos coinciden con que a velocidades de agitación de 260 rpm se presentan valores más bajos de velocidad de deformación, al ser comparados con los llevados a cabo a 340 rpm (Tabla 8).

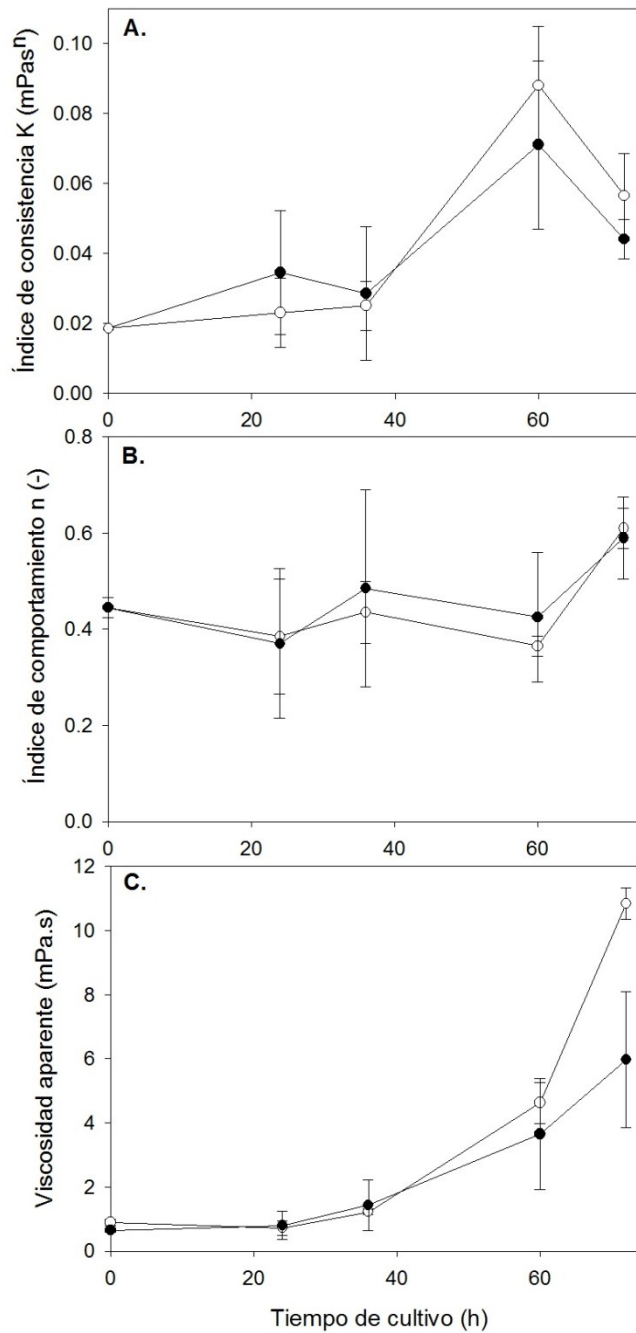


Figura 22. Parámetros reológicos de cultivos de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) en biorreactores agitados a 260 rpm (-O-) y 340 rpm (-●-). A. Índice de consistencia, B. Índice de comportamiento.

6.10 Parámetros morfológicos de cultivos de *S. lividans* en biorreactor

Con el objetivo de determinar las características morfológicas de los agregados miceliares, se tomaron muestras de biomasa al inicio, a la mitad y al final de la fase exponencial y al final del cultivo. Estas muestras fueron analizadas por microscopía determinándose el diámetro, área y perímetro promedio (Tabla 7). La distribución morfológica de los pellets en diferentes tiempos de cultivo para los sistemas agitados a 260 rpm y 340 rpm son mostrados en la figura 23. De acuerdo a estos resultados se puede decir que el tamaño de los pellets incrementa, después de la germinación de esporas hasta la mitad de la fase exponencial, tiempo en el que se observa una disminución del tamaño que puede ser resultado de la erosión o fragmentación de la superficie. Esto concuerda con lo obtenido por Rocha-Valadez et al. (2007) quienes al evaluar la influencia de la frecuencia de circulación en la morfología de *Thricoderma harzianum*, encontraron una disminución en el tamaño de los pellets después de 96 h de cultivo.

Tabla 7. Comparación morfológica de los cultivos de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) llevados a cabo en biorreactores agitados a 260 rpm y 340 rpm. Los valores con la misma letra, para cada parámetro morfológico indica que no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

Tiempo (h)	260 rpm	340 rpm
	Área (μm^2)	
24	9620 \pm 383 ^{a,b}	7081 \pm 204 ^a
36	34752 \pm 1170 ^e	23316 \pm 525 ^d
60	9990 \pm 503 ^{a,b}	15524 \pm 1698 ^c
72	10796 \pm 555 ^b	8631 \pm 525 ^{a,b}
	Perímetro (μm)	
24	548 \pm 13 ^{a,b}	490 \pm 10 ^a
36	1148 \pm 26 ^e	936 \pm 17 ^d
60	605 \pm 18 ^b	812 \pm 50 ^c
72	602 \pm 19 ^b	638 \pm 25 ^b

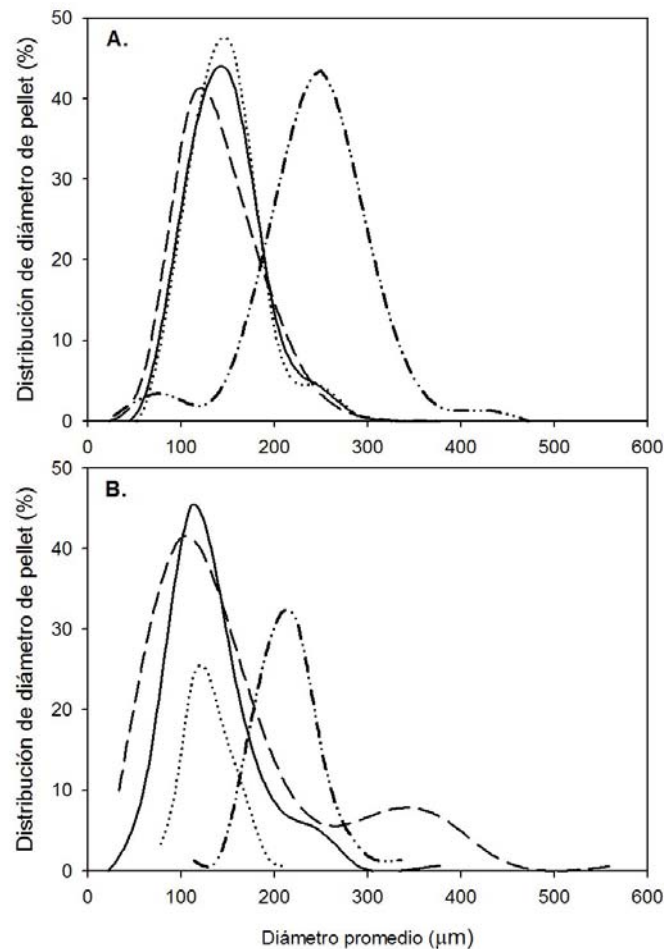


Figura 23. Distribución morfológica de los pellets *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) en biorreactores agitados. A. 260 rpm, B. 340 rpm. Muestras tomadas a las 24 (····), 36 (-·-·-), 60 (- - -) y 72(—) h de cultivo.

Al observar el diámetro promedio de los pellets, para las dos velocidades de agitación (Figura 26) a mitad de la fase exponencial, se encuentran agregados más grandes en los cultivos agitados a 260 rpm ($244.5 \pm 5.1 \mu\text{m}$), comparados con los pellets obtenidos a velocidades de agitación de 340 rpm ($214.1 \pm 13.6 \mu\text{m}$), lo que muestra la influencia de la P/V en los parámetros morfológicos, por lo menos al inicio del cultivo. Sin embargo, después de la mitad de la fase exponencial, el tamaño de los pellets disminuye para ambos sistemas, presentándose parámetros morfológicos estadísticamente similares (Figura 24). Esto sugiere que las P/V

evaluadas en estos sistemas (0.22 y 0.44 kW/m^3), después de la fase exponencial del crecimiento celular no tiene un efecto significativo en el tamaño de los pellets. Justen et al. (1996) muestran que la P/V es un parámetro que poco correlaciona el daño de las hifas cuando se utilizan diferentes escalas de operación e indica que los cambios en la morfología (a las misma P/V) dependen significativamente de la geometría del impulsor. Además, los mismos autores proponen que la energía de disipación/tiempo de circulación (EDCF) podría mostrar una mejor correlación en la morfología micelial (Justen et al., 1998), se considera así, que la fragmentación de la hifa es causada por un pasaje intermitente del micelio a través de la región del impulsor de alta energía de disipación. Nuestros resultados sugieren que para el caso de *S. lividans* una EDCF de 0.87 $\text{kW/m}^3\text{s}$, que es generado a una P/V de 0.22 kW/m^3 podría ser suficiente para dispersar el micelio a un tamaño uniforme, específicamente después de la fase exponencial del crecimiento.

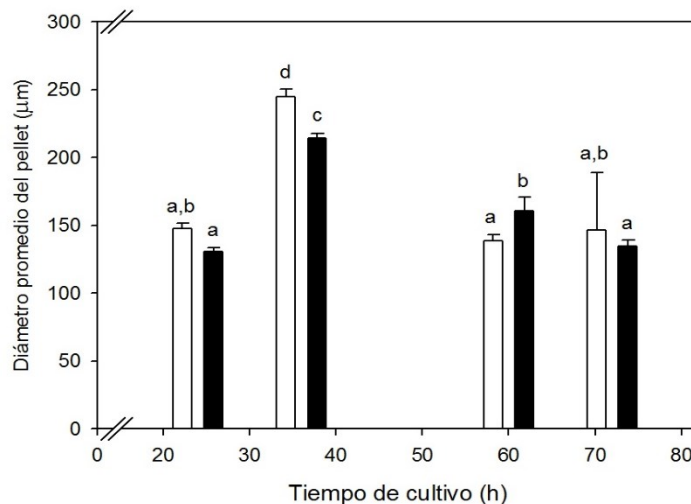


Figura 24. Diámetro promedio de pellets de *S. lividans* recombinante productora de APA (45/47 kDa) crecida en biorreactores agitados a 260 rpm (barras blancas) y 340 rpm (barras negras). Las muestras fueron tomadas a las 24, 36, 60, 72 h de cultivo. Las barras que tienen la misma letra no difieren estadísticamente ($p=0.05$) por la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

Adicionalmente, la reducción en el tamaño del pellet, puede deberse al razuramiento o fragmentación de hifas, que ocurre cuando las fuerzas de cizallamiento locales exceden la resistencia a la tracción de las hifas (van Suijdam y Metz, 1981). Como la microescala (λ) de Kolmogorov ha sido utilizado para establecer el mecanismo responsable de esta fragmentación (Li et al., 2002); en la Tabla 8, se presentan los valores de λ usando la viscosidad aparente de los caldos y la energía de disipación calculada para el inicio del cultivo de este trabajo. El tamaño de la microescala incrementa durante el cultivo, alcanzando tamaños de 282 y 149 μm en los cultivos agitados a 260 y 340 rpm respectivamente. La disminución en el tamaño del pellet después de las 36 h de cultivo, podría explicarse por la abrasión que genera la interacción pellet-eddie. Sin embargo, no se encuentra una relación directa entre el tamaño del eddy de Kolmogorov y la morfología de *S. lividans* en este trabajo.

Tabla 8. Microescala de Kolmogorov y diámetro promedio de pellets, para diferentes tiempos de cultivo en biorreactores agitados.

Tiempo de cultivo (h)	260 rpm				340 rpm			
	γ (s^{-1})	η (mPa.s)	λ (μm)	Diámetro pellet (μm)	γ (s^{-1})	η (mPa.s)	λ (μm)	Diámetro pellet (μm)
0	184.5	0.89 \pm 0.1	43.6	--	322.1	0.66 \pm 0.1	29.1	--
24	193.8	0.72 \pm 0.2	40.5	147. \pm 4	274.8	0.81 \pm 0.4	36.9	131 \pm 3
36	152.2	1.3 \pm 0.1	58.2	245 \pm 6	202.3	1.4 \pm 0.8	58.4	214.0 \pm 4
60	78.3	4.6 \pm 0.6	157.6	138 \pm 4	133.3	3.7 \pm 1.7	109.2	160 \pm 10
72	53.1	10.8 \pm 0.5	282.3	146.3 \pm 43	108.4	6.0 \pm 2.1	148.9	134 \pm 5

Al comparar el tamaño de los agregados entre matraces y reactores para la misma potencia volumétrica de 0.22 kW/m^3 , se observan diámetros de pellets más grandes en matraces convencionales (382 \pm 102 μm) al ser comparados con cultivos agitados a 260 rpm, (244 \pm 4.0 μm). Además, las morfologías encontradas en matraces con resorte y biorreactor agitado a 340 rpm, presentan diámetros

máximos promedio de 168.7 ± 42 μm y 214 ± 4.0 μm , respectivamente. Estas diferencias en tamaños morfológicos pueden responder a los diferentes patrones de mezcla que se presentan en matraces agitados y en biorreactores con agitación mecánica. Es por ello, que el escalado de matraces a biorreactores agitados puede verse obstaculizado (Gerson y Kole, 2001).

En este sentido, Büchs y Zoels (2001), demostraron que el consumo de potencia se distribuye de manera más uniforme en los procesos de agitación orbital que en los tanques agitados. Por lo tanto, el estrés hidrodinámico podría ser más bajo en matraces agitados explicando el porqué se encuentran tamaños de pellets más grandes en MC, que en biorreactores.

Intervalos más estrechos de tamaños morfológicos en cultivos en biorreactor fueron encontrados (Tabla 7 y 8), resultados similares a los reportados por Gamboa-Suasnavart et al. (2013), quienes en el proceso de escalado alcanzaron diámetros de 150 ± 10 μm en biorreactor agitado a 300 rpm y una TOD del 10%. Esto puede indicar que la velocidad máxima de disipación de energía local en todo el biorreactor es más alta que la distribución en matraces agitados. Esto está de acuerdo con Peter et al. (2006), quienes reportaron que en el mismo consumo de energía, la velocidad máxima de disipación de energía en los biorreactores de tanque agitado es diez veces más alta que en matraces agitados.

6.11 Determinación de proteína APA en biorreactores agitados

La producción de la proteína APA fue evaluada mediante SDS-PAGE, Western Blot (figura 25 A, B Y C) y densitometría. Los análisis de densitometría muestran que la producción de proteína APA para el sistema agitado a 260 rpm, equivalente a una P/V de 0.22 kW/m^3 , fue de 27 ± 0.5 %, similar a la obtenida en matraces convencionales con 50 ml de medio ($25 \pm 3\%$). Mientras que para los cultivos agitados a 340 rpm, donde se suministra una P/V de 0.44 kW/m^3 , la producción de la proteína fue 25 ± 2.2 %, diez por ciento menos que lo obtenido en matraces con resorte (35.2 %). Sin embargo, no se presentan diferencias significativas en la

producción de rAPA en los cultivos llevados en biorreactores de 1.2 L. Estos resultados sugieren que la morfología de *S. lividans* no está directamente relacionada con producción y secreción de la APA por lo menos en las condiciones evaluadas, pues tamaños morfológicos similares a los encontrados en matraces con resorte fueron obtenidos en los cultivos en biorreactores de 1.2 L, sin igualar la producción de APA obtenida en MR.

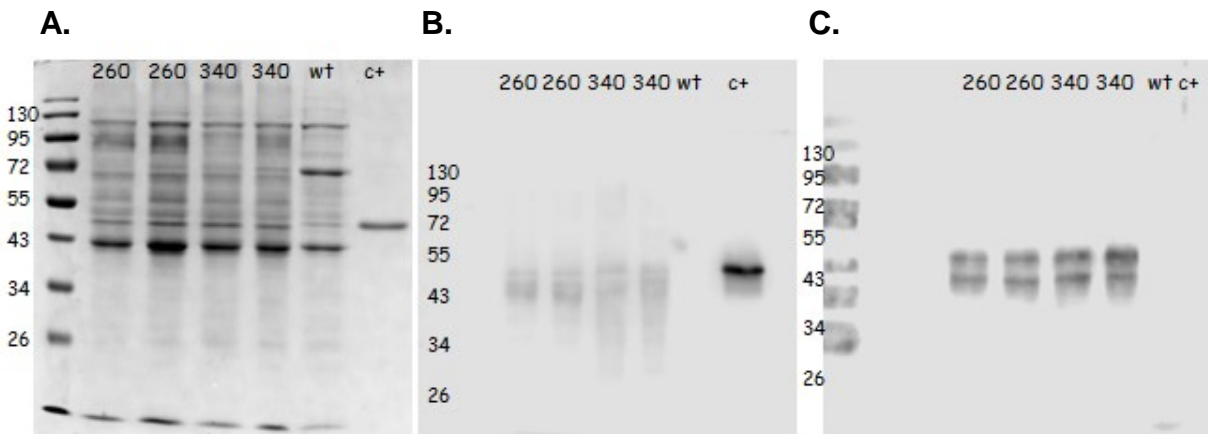


Figura 25. A. SDS-PAGE de la proteína total secretada precipitada con Metanol.-cloroformo en reactores agitados a 260 rpm y 340 rpm. Western blot de APA de *S. lividans* usando (B) AntiAPA Mab6A3, (C) Anti-ConA. *S. lividans* silvestre (wt) APA de *E. coli* (C⁺).

La caracterización de la O-glicosilación del extremo carbono-terminal de APA obtenido por digestión con LyC, se muestra en la tabla 9 y figura 26. Se observa, que para las velocidades de agitación de 260 rpm y 340 rpm no se encuentra la señal correspondiente al péptido 8 sin glicosilar que tiene un peso teórico de 4624.3 Da, ni el péptido con una manosa. La unión de una hexosa a una cadena péptica, se caracteriza por el incremento en el peso molecular de 163 Da. Esta diferencia fue encontrada en 7 señales posteriores a la del péptido sin glicosilar. Estas cantidades de manosas (7 unidades) unidas al carboxilo terminal de la proteína APA, no habían sido previamente reportadas, ni para la proteína nativa

(Dobos et al., 1996), ni para la recombinante producida en *S.lividans* (Lara et al., 2004).

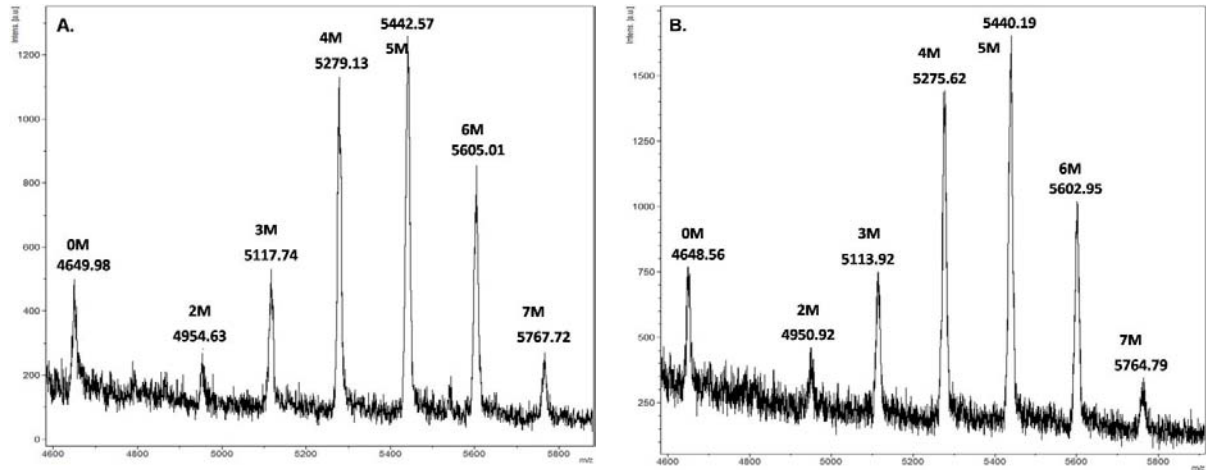


Figura 26. Análisis de MALDI-TOF para el péptido 8 generado de la digestión con Lys C (Roche ®, Alemania) producido en biorreactores de 1.2 L a 30°C y TOD del 10%. A. 260 rpm y B. 340 rpm.

Tabla 9. Pesos observados (Da) del Péptido correspondiente al extremo carbonoterminal de APA generado de la digestión con Lys C (Roche ®, Alemania) obtenidos en biorreactores agitados y en matraces convencionales y con resorte.

Tipo de cultivo	Peso observado (Da)							
	Manosas							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Matraz Convencional 50 mL	4627.7	4790.2	4952.4	5116.2	5278.2	5438.9	5601.1	ND
Biorreactor 260 rpm	ND	ND	4954.6	5117.7	5279.1	5442.6	5605.0	5767.7
Matraz con Resorte*	4645.2	4804.4	4967.7	5130.3	5292.2	5455.5	ND	ND
Biorreactor 340 rpm	ND	ND	4952.7	5114.1	4277.2	5439.1	5602.6	5764.6

*Gamboa-Suasnavart et al., (2011). ND: No detectado

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la potencia volumétrica como criterio de escalado de matraz a biorreactor no reproduce el comportamiento cinético de los cultivos de *S. lividans* en términos de velocidad específica de crecimiento (0.074 ± 0.004 y $0.09 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$) para matraz convencional y reactor de 1.2 L agitado a 260 rpm, En cuanto a producción de proteína recombinante determinada por densitometría de geles, se obtuvo una producción superior al 25.5 % respecto a la proteína total para todos los sistemas. Adicionalmente, la calidad de la proteína recombinante medida como cantidad de manosas unidas al péptido del carbono terminal, fue mayor en los cultivos llevados en biorreactor de 1.2 L. Se encontraron hasta siete manosas en cultivos llevados a cabo en biorreactor de 1.2 L, una manosa más que las obtenidas en matraces convencionales y con resorte.

7. Conclusiones

En este trabajo fue desarrollada una aproximación para entender el rol de la potencia volumétrica en la fisiología de una cepa de *S. lividans* productora de una proteína recombinante APA de *Mycobacterium tuberculosis* usando tres diseños de matraz. Como anteriormente fue sugerido por Gamboa-Suasnavart *et al.* (2011), la morfología, el crecimiento y la producción y la O-glicosilación puede verse afectada por los procesos de transferencia de masa y momento.

La evolución de la P/V durante la producción de APA por *S. lividans* fue evaluada en tres diseños de matraz. Para las mismas condiciones de agitación y volumen de llenado, el MC proporciona aproximadamente, un 50 % menos de P/V que la suministrada por los MR y MB. Estos cambios podrían explicar, las diferencias en morfología, velocidad específica de crecimiento y producción de proteína. Sin embargo, al igualar la P/V de los matraces con resorte (MR) en matraces convencionales, no se reproducen los tamaños morfológicos de *S. lividans* obtenidos en MR, lo que sugiere que la transferencia de oxígeno y los patrones de flujo en el cultivo, pueden estar influenciando la morfología. Sin embargo, la reproducción de la P/V, fue satisfactoria en términos de la velocidad específica de crecimiento, producción de APA y glicosilación; por lo menos, en el péptido del carbono terminal obtenido por digestión con LysC.

La productividad específica de APA recombinante probablemente no se ve afectada por el tamaño de los agregados de la *S. lividans*, pero seguramente sí por la transferencia de oxígeno en el interior de ellos. Un aumento de OTR podría estar ocurriendo a través del aumento de la P/V, como se puede observar en matraces convencionales (MC-15 mL y MC-25 mL) donde la P/V se incrementó (0.44 kW/m^3), y donde los tamaños de los pellets fueron similares a los obtenidos en matraces convencionales con 50 mL de volumen de llenado (0.22 kW/m^3).

Nuestros datos indican que el papel de la P/V como un parámetro global en cultivos de *S. lividans*, no está claramente definido para determinar el crecimiento, la morfología, producción de la proteína recombinante y sus modificaciones postraduccionales (en este caso la O-glicosilación en el extremo carbono-terminal de APA).

La P/V inicial como criterio de escalado de matraz a biorreactor de 1.2 L no reproduce el comportamiento cinético de los cultivos de *S. lividans* en matraces agitados, bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, los resultados son satisfactorios en términos de producción de la proteína APA y O-glicosilación. Con respecto al tamaño de los pellets, no se encontraron tamaños morfológicos similares de *S. lividans* en los cultivos llevados a cabo en biorreactor agitado a 260 rpm, donde la P/V suministrada de 0.22 kW/m³, correspondía a la P/V de matraces convencionales con 50 mL de volumen de llenado. Esto podría deberse a diferencias en la evolución de la P/V y a los patrones de flujo que se presentan entre los matraces agitados y el biorreactor.

La reología de las suspensiones celulares de *S. lividans* tiene un comportamiento no Newtoniano en todos los tiempos de cultivo y la viscosidad aparente de los caldos aumenta debido a la concentración celular y a la morfología de los agregados. Sin embargo, no se puede describir una correlación entre concentración de biomasa, diámetro promedio de pellet y parámetros reológicos (índice de comportamiento, n; e índice de consistencia, k); esto puede ser debido a la variabilidad pellet/micelio disperso que se presentan en los cultivos sumergidos evaluados en este trabajo que dificultan la caracterización reológica de los caldos.

8. Recomendaciones

Como la hidrodinámica de los cultivos de *S. lividans* en la producción de APA recombinante no están completamente entendidos; se recomienda por técnicas computacionales de dinámica de fluidos (CFD) hacer una descripción experimental de las características de flujo del fluido tanto en matraces agitados como en el biorreactor de 1.2 L que permita generar información útil para mejorar las estrategias de escalado.

Como nuestros resultados sugieren que no solo la P/V podría estar influyendo en la producción y O-glicosilación de la proteína APA recombinante en *S. lividans*, se recomienda hacer estudios de los cultivos en biorreactor, a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) y así determinar si la disponibilidad de este o su limitación modifica la expresión de la proteína APA y su O-glicosilación.

Sería de interés evaluar el efecto del tipo de inóculo (esporas o micelio) y la concentración de este en la cinética de crecimiento, en la morfología de *S. lividans* y en consecuencia en la producción y O-glicosilación de APA. Un cambio “drástico” en el diámetro de los pellets puede ser crítico en la producción y O-glicosilación de APA ya que podría influir en la transferencia de masa al interior del pellet y en la relación de células activas en este.

Para describir una correlación entre reología y morfología de *S. lividans* en la producción de APA recombinante, se sugiere, hacer medición no solo del diámetro promedio del pellet, sino también del tamaño del micelio disperso y determinar la relación de ambos en el cultivo. Esto con el fin de comprender el comportamiento del fluido y así poder desarrollar estrategias que ayuden a superar las posibles limitaciones en la transferencia de masa, de momento.

9. Bibliografía

- Anderlei, T., and Büchs, J. 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), p.57-162.
- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., and Büchs, J. 2004. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 17(3), p. 187-194.
- Anné, J., Maldonado, B., Van Impe, J., Van Mellaert, L., and Bernaerts, K. 2012. Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, 158(4), p. 159-167.
- Anné, J., and Van Mellaert., L. 1993. *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiology Letters*, 114(2), p.121–8.
- Aiba, S., Hummphey, A E., and Millis N. 1973. *Biochemical Engineering*, Segunda edición. Academic Press, New York.
- Amanullah, A., Blair, R., Nienow, A W., Thomas C R. 1999. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (4), p 434-446.
- Ayazi-Shamlou, P., Makagiansar, H.Y., Ison, A.P., Lilly, M.D., Thomas, C.R. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 49, p. 2621–2631.
- Baumeister, W., and Lembcke, G. 1992. Structural features of archaebacterial cell envelopes: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24(6), p. 567-575.
- Bellinzoni, M., and Riccardi, G. 2003. Techniques and applications: The heterologous expression of *Mycobacterium tuberculosis* genes is an uphill road: *Trends Microbiology*, 11(8), p. 351-358.
- Benz, I., and M. A. Schmidt. 2002, Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*, 45(2), p. 267-276.
- Bermek, H., Gülseren, İ., Li, K., Jung, H., Tamerler, C. 2004. The effect of fungal morphology on ligninolytic enzyme production by a recently isolated wood-

- degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, p. 345–349.
- Berovič, M., Koloini, T., Olsvik, E S., and Kristiansen B. 1993. Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred-tank and bubble column reactors. *The Chemical Engineering Journal*, 53, p.836–840.
- Binnie, C., J. D. Cossar, and D. I. Stewart, 1997, Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*: *Trends Biotechnology*, 15(8), p. 315-320.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248–254.
- Brooks, S A. 2004. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system: *Molecular Biotechnology*, 28(3), p. 241-255.
- Brooks, S A. 2009. Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: current status and future perspectives: *Molecular Biotechnology*, 43(1), p. 76-88.
- Büchs J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), p. 91-98.
- Büchs, J., Zoels B. 2001. Evaluation of maximum to specific power consumption ratio in shaking bioreactors. *Journal Chemical Engineering Japan* 34, p. 647–653.
- Büchs, J., Lotter, S., Milbradt, C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7(2), p. 135–141.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B., 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* 68 (6), p, 589–593.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., Zoels, B., 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* 68 (6), p. 594–601.

- Casas López JL., Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM, Rodríguez-Porcel EM, Chisti Y. 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology* 116, p. 61–77.
- Cascaval, D., Galaction, A.-I., and Turnea, M. 2007. Comparative analysis of mixing distribution in aerobic stirred bioreactor for simulated yeasts and fungus broths. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 34(1), p. 35–47.
- Celler, K., Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M C., and van Wezel, G P. 2012. Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(3), p. 409–23.
- Chain, E., Gualandi, G., Morisi, G. 1966. Aeration studies: IV. Aeration conditions in 3000 litre submerged fermentations with various microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 8, p. 595–619.
- Chiba, Y and Jigami, Y. 2007. Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, p. 670–676.
- Cui, Y Q., Van der Lans, R G J M., and Luyben, K C A. 1998, Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation: *Biotechnology.Bioengineering*, 57 (4), p. 409-419.
- Dalpathado, D S., and H. Desaire. 2008. Glycopeptide analysis by mass spectrometry: *Analyst*, 133(6), p. 731-738.
- Devasahayam, M., 2007, Factors affecting the expression of recombinant glycoproteins: *Indian Journal Medical Research*, 126(1), p. 22 27.
- Diaz-Silvestre, H., Espinosa-Cueto, P., Sanchez-González, A., Esparza-Ceron, M A., Pereira-Suarez, A L., Bernal-Fernandez, G., Espitia, C., Mancill, R. 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microbial Pathogenesis*, 39, p. 97–107.
- Dickey, D S., Bittorf, K J., Ramsey, C J., Johnson, K E. 2004. Understand flow patterns in glass-lined reactors. *Chemical Engineering Progress*, 100, p. 21–25.

- Dobos, K., Swiderek, K., Khoo, K., Brennan, P J., Belisle, J T. 1995. Evidence for glycosylation sites on the 45-kiloDalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 63, p. 2846-2853.
- Dobos, K., Swiderek, K., Khoo, K., Brennan, P J., Belisle, J T. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal Bacteriology*, 178, p. 2498-2506.
- Doran, P M. 1995. *Bioprocess engineering principles*. Cap 7. Fluid Flow and Mixing Academic Press, p. 150.
- Durocher, Y and Butler, M. 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, p. 700–707.
- Dutta, R. 2008. Agitation and Aeration. Cap 9. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. Ed: Ane Books India and Springer, p. 221-258.
- El-Enshasy, H A., Farid, M A. and El-Sayed, E-S A. 2000. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal Basic Microbiology*, 40(5-6), p.333–342.
- Elmayergi, H., Scharer, J M., Moo-Young, M. 1973. Effects of polymer additives on fermentation parameters in a culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, p. 845–59.
- Espitia, C., and R. Mancilla, 1989, Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens: *Clinical and Experimental Immunology*, 77(3), p. 378-383.
- Espitia, C., R. Espinosa, R., Saavedra, R., Mancilla, F., Romain, A., Laqueyrie, A., and Moreno, C. 1995, Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50 to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45 to 47 kilodalton antigens. *Infection and Immunity*, 63(2), p. 580-584.
- Espitia, C., Servin-Gonzalez L., and Mancilla R. 2010. New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes. *Molecular BioSystems*, 6(5), p. 775-781.
- Freedman, D. 1970. The shaker in bioengineering. In Norris JR, Ribbons DW, eds. *Methods in Microbiology*, London: Academic Press, p. 175–185.
- Frieden, T R., Sterling T R., Munsiff, S S., Watt C J., Dye C. 2003 Tuberculosis. *Lancet*, 362, p. 887–889.

- Galaction, A. I., Cascaval, D., Oniscu, C., and Turnea, M. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, 20, p.85–94.
- Galindo, E., Flores, C., Larralde-Corona, P., Corkidi-Blanco, G., Rocha-Valadez, J.A., Serrano-Carreón, L. 2004. Production of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 18(1), p. 1-8.
- Galindo, E., Salcedo, G., Flores, C., Ramírez, M E. 1993. Improved shake flask test for the screening of xantha-producing microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, p. 122-124.
- Gamboa-Suasnavart, R., Valdez-Cruz, N., Córdova-Dávalos, L., Martínez-Otelo, J., Servín-Gonzalez, L., Espitia, C., Trujillo Roldán M A. 2011. The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 10, p. 110.120.
- Gamboa-Suasnavart, R., Marín-Palacio, L D., Martínez-Otelo, J., Espitia, C., Servín-Gonzalez, L., Espitia, C., Valdez-Cruz, N., Trujillo Roldán M A. 2013. Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 29, p. 1421–1429.
- Gerson, D F., and Kole, M M. 2001. Quantitative measurements of mixing intensity in shake-flasks and stirred tank reactors: use of the Mixmeter, a mixing process analyzer. *Biochemical Engineering Journal*, 7(2), p. 153-156.
- Ghojavand, H., Bonakdarpour, B., Heydarian, S M., & Hamedí, J. 2011. The inter-relationship between inoculum concentration, morphology, rheology and erythromycin productivity in submerged cultivation of *Saccharopolyspora erythraea*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering of Chemical Engineering*, 28(4), p. 565–574.
- Giese, H., Klöckner, W., Peña, C., Galindo, E., Lotter, S., Wetzel, K., Meissner, L., Peter C & Büchs, J. 2014. Effective shear rates in shake flasks. *Chemical Engineering Science*, 118, p. 102-113.

- Gioffré, A., Echeverría-Valencia, G., Arese, A., Morsella, C., Garbaccio, S., Delgado, F., Zumárraga, M., Paolicchi, F., Cataldi, A., Romano, M I. 2009. Characterization of the Apa antigen from *M. avium subsp. paratuberculosis*: A conserved *Mycobacterium* antigen that elicits a strong humoral response in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132, p. 199–208
- Godoy-Silva, R., Chalmers, J J., Casnocha, S A., Bass, L A., Ma N. 2009. Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, p. 1103–1117.
- Gögus, N., Tari, C., Oncü, S., Unluturk, S., and Tokatli, F. 2006. Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), p.171–178.
- González-Zamorano, M., Mendoza-Hernández, G., Xolalpa, W., Parada, C., Vallecillo, A. J., Bigi, F., and Espitia, C. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(2), p. 721-733.
- Goudar, C T., Strevett, K., and Shah, S N. 1999. Influence of microbial concentration on the rheology of non-Newtonian fermentation broths. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), p.310–5.
- Gouveia, E R., Baptista-Neto, A., Hokka, C O., and Badino Jr, A C. 2000. Studies on the rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(4-7), p. 827-834.
- Graumann, K., Premstaller A. 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, 1(2), p. 164-186.
- Grunewald, S., Matthijs, G., and Jaeken, J. 2002. Congenital disorders of glycosylation: a review: *Pediatric Research*. 52(5), p. 618-624.
- Gupta, K., Mishra, P., and Srivastava, P. 2007. A correlative evaluation of morphology and rheology of *Aspergillus terreus* during lovastatin fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, p.140–146.
- Haboe, M and Wiker H G. 1992. The 38 kDa protein of *Mycobacterim tuberculosis*: A review. *The Journal of Infectious Diseases*, 166, p. 874-884.

- Harth, G., Lee, B Y., Horwitz, M A. 1997. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic Mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infection and Immunity*. 66(1), p398-398.
- Hempel, D C. 1988. Fundamentals of scale-up for biotechnological processes in stirred fermentors. In: Finn RK, Pra ve P, editors. *Biotechnology focus 1*. Oxford University Press; p. 51–94.
- Hitchen, P. G., and A. Dell, 2006, Bacterial glycoproteomics: *Microbiology*, 152(6), p. 1575-1580.
- Hopwood, D A., Bibb, M J., Chater, K F., Bruton, K T., Kieser, C J., Lydiate, H M., Smith, D J., Ward, C P., Schrepf, H. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- Horn, C., Pescher P., Romain F., and Marchal G. 1996. Characterization of murine monoclonal antibodies specific for the 45/47 kDa antigen complex (APA) of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and BCG. *Journal of Immunological Methods*, 197(1-2), p. 151-159.
- Horn, C., Namane A., Pescher P., Riviere M., Romain F., Puzo G., Barzu O., and Marchal G. 1999. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern: *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), p. 32023-32030.
- Jakimowicz, D., and van Wezel, G.P. 2012. Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Molecular microbiology*, 85(3), p.393–404.
- Jenkins, N. 2007, Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects: *Cytotechnology*, 53(1-3), p. 121-125.
- Jonsbu, E., McIntyre, M., and Nielsen, J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of biotechnology*, 95(2), p. 133-144.
- Ju, L K., Ho, C S. and Shanahan, J F. 1991. Effects of carbon dioxide on the rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 38(10), p.1223–32.

- Jüsten, P., Paul, G C., Nienow, A W., and Thomas, C R. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(6), p. 762-775.
- Justen, P., Paul, G C., Nienow, A W., Thomas, C R. 1999. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology Bioengineering*. 59 (6), p. 762-.775.
- Kelly, S., Grimm, L H., Bendig, C., Hempel, D C., Krull, R. 2006. Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochemistry*, 41, p. 2113–2117.
- Khaliq, S., Akhtar K., Fzal Ghauri, M., Iqbal R., Mukhtar Khalid, A., Muddassar, M. 2009. Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702. *Microbiological Research*, 164, p. 469-477.
- Klöckner, W and Büchs, J. 2011 *Bioreactors – Design Shake-Flask Bioreactors*. In: Murray Moo-Young (ed.). *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, Elsevier, 2, p. 213–226.
- Cluepfel, D., Vats-Mehta S., Aumont F., Shareck F., and Morosoli R. 1990. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochemical Journal*. 267, p.45–50.
- Kolmogorov, AN.1958. Die lokale struktur der turbulenz in einer inkompressi- blen zahren flussigkeit bei sehr großen reynoldsschen zahlen. In: Goering H, editor. *Sammelband zur statistischen theorie der turbulenz*. Berlin: Akademie-Verlag; p. 71.
- Kossen, N W. 2000. The morphology of filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 70, p.1–33.
- Kumar, P., Amara, R. R., Challu, V. K., Chadda, V. K., and Satchidanandam, V. 2003. The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative positive individuals and affords protection in a guinea pig model: *Infection and Immunity*, 71(4), p. 1929-1937.

- Kristiansen, B., and Bullock, J D. 1988. Developments in industrial fungal biotechnology. In: Smith JE, Berry DR, Kristiansen B, editors. Fungal biotechnology. London: Academic Press, p. 203–23.
- Kusters, KA. 1991. The influence of turbulence on aggregation of small particles in agitated vessels. Doctoral Thesis, Technische Universiteit Eindhoven;
- Lairson, L L., Henrissat, B., Davies, G J., and Withers, S G. 2008, Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms: Annual Review of Biochemistry, 77, p. 521-555.
- Laemmli, U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, p. 680–685.
- Lahey, D L., Voladri, R K., Edwards, K M., Hager, C., Samten, B., Wallis, R S., et al. 2000. Enhanced production of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Escherichia coli* by replacement of low-usage codons. Infection and Immunity, 68, p. 233–8.
- Laqueyrie, A., Miltzer, P., Romain, F., Eiglmeier, K., Cole, S., and Marchal, G. 1995. Cloning, sequencing, and expression of the apa gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex. Infection and Immunity, 63, p. 4003–4010.
- Lara, M., Servín-González, L., Singh, M., Moreno, C., Cohen, I., Nimtz, M., and Espitia, C 2004, Expression, secretion, and glycosylation of the 45 and 47 kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. Applied and Environmental Microbiology, 70(2), p. 679-685.
- Lechner, J., and F. Wieland. 1989. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins: Annual Review of Biochemistry, 58(1), p.173-194.
- Lee, J H., and Lee, K J., 1996. Analysis of expression rate of cloned B -lactamase gene in a recombinant of *Streptomyces lividans*. Journal of Biotechnology, 52, p.161–165.
- Lehle, L., Strahl S., and Tanner W. 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases: Angewandte Chemie International Edition, 45(41), p. 6802-6818.

- Li, Z J., Shukla, V., Wenger, K., Fordyce, A., Pedersen, A G., and Marten, M. 2002. Estimation of hyphal tensile strength in production-scale *Aspergillus oryzae* fungal fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 77(6), p. 601-613.
- Li, H., and d'Anjou, M. 2009. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), p. 678-684.
- Lin, P. J., Scholz, A., and Krull, R. 2010. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 49. 213–220
- Li, C., Xia, J Y., Chu, J., Wang, Y H., Zhuang, Y P., and Zhang, S L. 2013. CFD analysis of the turbulent flow in baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 70, p140-150.
- Lommel, M and Strahl, S. 2009. Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans. *Glycobiology*, 19(8), p. 816–828.
- Losen, M., Frolich B., Pohl M., and Büchs J. 2004, Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures: *Biotechnology Progress*, 20(4), p. 1062-1068.
- Maier, U., Losen, M., and Büchs, J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas–liquid mass transfer in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 17(3), p. 155-167.
- MacLeod, A M., Gilkes N R., Escote-Carlson, L., Warren, R A., Kilburn, D G., and Miller Jr, R C. 1992. *Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*. *Gene*, 121, p. 143–147.
- Manteca, A., and Sanchez, J. 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, p. 2920-2924.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesia, C., and Sanchez, J. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters*, 274, p. 118-125.
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P., and Sanchez, J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, p. 3877-3886.

- Martín, M., Montes, F.J., and Galán, M. 2008. On the contribution of the scales of mixing to the oxygen transfer in stirred tanks. *Chemical Engineering Journal*, 145(2), p.232–241.
- Mehmood, N., Olmos, E., Marchal, P., Goergen, J L., and Delaunay, S. 2010. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas–liquid mass transfer coefficient, kLa. *Process Biochemistry*, 45, p. 1779–1786.
- Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J. L., Blanchard, F., Ullisch, D., Klöckner, W., Büchs J., and Delaunay, S. 2011. Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), p. 2151-2161.
- Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J. L., Blanchard, F., Marchal, P., Klöckner, W., Büchs, J., and Delaunay, S. 2012. Decoupling of oxygen transfer and power dissipation for the study of the production of pristinamycins by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 68, p. 25-33.
- Metz B. 1976. From pulp to pellet. PhD thesis, Delft Technical University, Delft, The Netherlands.
- Meyerhoff, J., and Tiller, V. 1995. Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. *Bioprocess Engineering*, 12, p.305–313.
- Morosoli, R., Shareck, F., and Kluepfel. D. 1997. Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 146, p. 167–174.
- Nandakumar, S., Kannanganat, S., Dobos, K M., Lucas, M., Spencer, J S., Fang, S., McDonald, M A., Pohl J., Birkness, K., Chamcha, V., Ramirez, M., Plikaytis, B., Posey, J E., Amara, R R., and Sable, S B. 2013. O-mannosylation of the *Mycobacterium tuberculosis* Adhesin Apa Is Crucial for T Cell Antigenicity during Infection but Is Expendable for Protection. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003705.
- Noda, S., Ito, Y., Shimizu, N., Tanaka, T., Ogino, C., and Kondo, A. 2010. Over-production of various secretory-form proteins in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification*, 73, p. 198–202.
- Noens, E E., Mersinias, V., Traag, B A., Smith, C P., Koerten, H K., and van Wezel, G P. 2005. SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58(4), p. 929-944.

- Nagata, S. 1975. *Mixing: Principles and application*. John Wiley. New York, N.Y, p. 55-62.
- North, S J., Hitchen, P G., Haslamm S M., and Dell A. 2009. Mass spectrometry in the analysis of N-linked and O-linked glycans. *Current Opinion in Structural Biology*, 19, p. 498–506
- Núñez-Ramírez, D. M., Medina-Torres, L., Valencia-López, J. J., Calderas, F., Lopez-Miranda, J., Medrano-Roldán, H., and Solís-Soto, A. 2012. Study of the rheological properties of a fermentation broth of the fungus *Beauveria bassiana* in a bioreactor under different hydrodynamic conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), p.1494–500.
- O’Cleirigh, C., Casey Walsh, PK., and O’Shea, DG. 2005. Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, p. 305–310.
- Olmos, E., Mehmood, N., Haj, L., Goergen, J L., Fick, M., and Delaunay, S. 2013 Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36 (3), p. 259-272.
- Ong, E., Kilburn, D G., Miller, R C., and Warren, R A. 1994. *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Journal of Bacteriology*, 176, p. 999–1008.
- Ostash, I., Ostash, B., Luzhetskyy, A., Bechthold, A. Walker, S., and Fedorenko, V. 2008. Coordination of export and glycosylation of landomycins in *Streptomyces cyanogenus* S136. *FEMS Microbiology Letters*, 285(2), p. 195-202.
- Packer, H L., and Thomas, CR. 1990. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, p. 870–881.
- Palomares, L A., Kuri-Breña, F., and Ramírez, O T. 2002. Industrial recombinant protein production. *The Encyclopedia of Life Support Systems*, 6(3.8).
- Palomares, L A., Estrada-Moncaca, S., and Ramirez, O T. 2004, Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*, 267, p. 15-52.

- Pamboukian, C R D., Facciotti, M C R., and Schmidell, W. 1998. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures. Brazilian Journal of Chemical Engineering of Chemical Engineering, 15(3), p 265-272.
- Pamboukian, C. R D., Guimarães, L M., and Facciotti, M C R. 2002. Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. Brazilian Journal of Microbiology, 33(1), p. 17-21.
- Pamboukian, C.R.D., and Facciotti, M C R. 2005. Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 22(01), p. 31–40.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes, Biotechnology Advances, 22, p. 189–259.
- Peña, C., Peter, C., Büchs, J., Galindo, E. 2007. Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. Biochemical Engineering Journal, 36, p. 73–80.
- Peña, C., Trujillo-Roldan M A., and Galindo, E. 2000, Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*: Enzyme and Microbial Technology, 27(6), p. 390-398.
- Peña, C., Campos, N., Galindo, E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. Applied Microbiology and Biotechnology, 48, p. 510-515.
- Peter, C P., Suzuki, Y., Rachinskiy K., Lotter, S., Büchs, J. 2006. Volumetric power consumption in baffled shake flasks. Chemical Engineering Science, 61, p. 3771–3779.
- Philips, D H. 1966. Oxygen transfer into mycelial pellets. Biotechnology and Bioengineering, 8, p. 456–460.
- Pozidis, C., Lammertyn, E., Politou, A. S., Anne, J., Tsiftoglou, A. S., Sianidis, G., and Economou, A. 2001. Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. Biotechnology and Bioengineering, 72 p. 611–619.

- Prokop, A., and Bajpai, R K. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Advances in Applied Microbiology*, 37, p.165–232.
- Purwanto, L A., Ibrahim, D., and Sudrajat, H. 2009 Effect of agitation speed on morphological changes in *Aspergillus niger* hyphae during production of tannase. *World Journal of Chemistry*, 4 (1), p. 34-38.
- Ragas, A., Roussel, L., Puzo, G., and Riviere, M. 2007, The *Mycobacterium tuberculosis* cell surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A: *Journal of Biological Chemistry.*, 282, 8, 5133-5142.
- Raposo, S and Lima-Costa M E. 2006. Rheology and shear stress of *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures grown in bioreactor. *Biotechnology Letters*, 28, p. 431–438.
- Rilly, G.L., Tucker, K.G., Paul, G.C., and Thomas, C.R. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, p. 160–172.
- Riostras, B., Lopez-Garcia, MT., Yague, P., Sanchez, J., and Manteca, A. 2014. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: Programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresource Technology*, 151, p. 191-198.
- Rocha-Valadez, J A., Galindo E., and Serrano-Carreón, L. 2007. The influence of circulation frequency on fungal morphology: A case study considering Kolmogorov microscale in constant specific energy dissipation rate cultures of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Biotechnology*, 130, p. 394–401.
- Rodriguez-Porcel, E M., Casas-López, J L., Sánchez-Pérez, J A., Fernández-Sevilla, J M., and Chisti, Y. 2005. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2), p. 139-144.
- Rokem, J S., Lantz, A E. and Nielsen, J. 2007. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*, 24(6), p.1262–87.
- Romain. F., Laqueyrie, A., Militzer, P., Pescher, P., Chavarot, P., Lagranderie, M., Auregan, G., Gheorghiu, M., and Marchal, G. 1993. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant

- target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infection and Immunity*, 61 (2), p. 742–750.
- Romain, F., C. Horn, P. Pescher, A. Namane, M. Riviere, G. Puzo, O. Barzu, and G. Marchal, 1999, Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses: *Infection and Immunity*, 67(11), p. 5567-5572.
- Rosa, J C., Neto, A B., Hokka, C.O., and Badino, A C. 2005. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27, p. 99–104.
- Sable, S B., Cheruvu, M., Nandakumar, S., Sharma, S., Bandyopadhyay, K., Kellar K L., Posey, J E., Plikaytis, B B., Amara, R R., Shinnick, T M. 2011. Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination. *PLoS ONE*, 6(7), e22718.
- Sahoo, S., Verma, R. K., Suresh, A. K., Rao, K. K., Bellare, J., and Suraishkumar, G. K. 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnology Progress*, 19, p. 1689-1696.
- Sanchez S and Demain AL. 2011. The Biochemical Basis. Secondary Metabolites. In: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, Elsevier, 1, p. 154–168.
- Sánchez-Pérez, J.A., Rodríguez-Porcel, E.M., Casas-López, J.L., Fernández- Sevilla, J.M., and Chisti, Y., 2006. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 124, p. 1–5
- Schachter, H. 1984. Glycoproteins: their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clinical Biochemistry*, 17, p3-14.
- Schmidt, M A., Riley L W., and Benz I. 2003. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiology*, 11(12), p. 554-561.
- Schugerl, K., Gerlach S. R., and Siedenberg D. 1998, Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergilli*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 60, p. 195-266.
- Senger, R S., Karim, M., and Nazmul. 2003. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnology Progress*, 19(4), p. 1199-1209.

- Sethuraman, N and Stadheim T. 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, p. 341–346.
- Shukla, V B., Parasu, V U., Kulkarni, P R., and Pandit, A B. 2001. Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 8, p. 19–29.
- Sianidis, G., Pozidis, C., Becker, F., Vrancken, K., Sjoeholm, C., Karamanou, S., Takamiya-Wik, M., van Mellaert L., Schaefer T., and Economou, A. 2006. Functional large-scale production of a novel *Jonesia sp.* xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *Journal of biotechnology*, 121(4), p. 498-507.
- Smith, GT., Michael, J., Sweredoski, and Sonja H. 2014. O-linked glycosylation sites profiling in *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *Journal of proteomics*, 97, p. 296-306.
- Smith, J J., Lilly, M D., and Fox, R I. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering*, 35(10), p.1011–23.
- Solomons, G L. 1980. Fermenter design and fungal growth. *Fungal biotechnology*. Academic, London, p. 55-79.
- Spiro, RG. 2002. Protein glycosilation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptides bonds. *Glycobiology*, 12(4), p. 43-56.
- Spratt, J M., Britton, W J., and Triccas, J A. 2003. Identification of strong promoter elements of *Mycobacterium smegmatis* and their utility for foreign gene expression in mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 224, p. 139–42.
- Sumino, Y., Akiyama, S., and Fukada H. 1972. Performance of the shaking flask. I. Power consumption. *Journal of Fermentation Technology*, 50, p. 203–208.
- Suresh, S., Srivastava, V C., and Mishra, I M. 2009. Critical analysis of engineering aspects of shaken flask bioreactors. *Critical reviews in biotechnology*, 29(4), p. 255-278.
- Szymanski, CM., and Wren B W. 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 3, p. 225-237.
- Tamura S., Park Y., Toriyama M., and Okabe M. 1997. Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under

- various shear conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(6), p. 523-528.
- Tissot, B., North, S J., Ceroni, A., Pang, P-C., Panico, M., Rosati, F., Capone, A., Haslam S M., Dell A., and Morris, H R. 2009 Glycoproteomics: Past, present and future. *FEBS Letters*, 583, p. 1728–1735.
- Tought, A J.. and Prosser, J I. 1996. Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in submerged batch culture, *Microbiology*, 3, p. 639–648.
- Towbin, H., Staehelin T., and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, p. 4350–4354.
- Tremblay, D., Lemay, J., Gilbert M., Chapdelaine Y., Dupont C., and Morosoli, R. 2002. High-level heterologous expression and secretion in *Streptomyces lividans* of two major antigenic proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(1), p. 43-48.
- Trujillo-Roldán, M A., and Valdez-Cruz, N A. 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 48 (3-4), p. 269-280.
- Trujillo-Roldan, M A., Moreno, S., Espín, G., and Galindo, E. 2004. The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6), p. 742-747.
- Vallin, C., Ramos, A., Pimienta, E., Rodríguez, C., Hernández, T., Hernández, I., Del Sol, R., Rosabal, G., Van Mellaert, L., and Anne, J. 2006. *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Tuberculosis*, 86(3-4), p. 198-202.
- Van-Suijdam, J C., and Metz, B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, p. 111–148.
- Van't Riet, K., and Tramper, J. 1991. *Basic bioreactor design*. M. Dekker Inc., New York.

- Van-Wezel, G P., Krabben, P., Traag, B A., Keijser, B J., Kerste, R., Vijgenboom, E., Heijnen J J., and Kraal, B. 2006. Unlocking *Streptomyces spp.* for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), p. 5283-5288.
- Van-Wezel, G P., McKenzie, N L., and Nodwell, J R. 2009. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. *Methods in Enzymology*, 458, p. 117-141.
- Van-Veluw, G J., Petrus, M L., Gubbens, J., de Graaf, R., de Jong, I P., Van-Wezel, G P., Wösten H A., and Claessen, D. 2012. Analysis of two distinct mycelial populations in liquid-grown *Streptomyces cultures* using a flow cytometry-based proteomics approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), p. 1301-1312.
- Vrancken, K., Van-Mellaert, L. and Anné, J. 2008. Characterization of the *Streptomyces lividans* PspA response. *Journal of Bacteriology*, 190(10), p.3475–81.
- Warren, S J., Keshavarz-Moore, E., Shamlou, P A., Lilly, M D., Thomas, C R., and Dixon, K.1995. Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(1), p. 80-85.
- Wessel, D., and Flügge, U I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), p. 141-143.
- Wieland, F. 1988. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins: *Biochimie*, 70(11), p. 1493-1504.
- Wucherpennig, T., Kiep, K A., Driouch, H., Wittmann, C., and Krull, R. 2010. Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Advances in Applied Microbiology*, 72, p. 89-136.
- Yen, H W and Li, Y L. 2014. The effects of viscosity and aeration rate on rapamycin production in an airlift bioreactor by using *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), p. 1149–1153.
- Yépez, B., and Maugeri, F. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, p. 717–724.
- Yin, P., Wang, Y H., Zhang, S L., Chu, J., Zhuang, Y P., Chen, N., Li, X F., and Wu, Y B. 2008. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin

- production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 39, p. 609–615.
- Young, D B., Kaufmann, S H., Hermans P W., and Thole J E. 1992, Mycobacterial protein antigens: a compilation. Molecular Microbiology, 6(2), p. 133-145.
- Yu, L., Chao, Y., Wensel, P., and Chen, S. 2012. Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. Biotechnology and Bioengineering, 109(7), p. 1755-1768.
- Yun, S I., Yahya, A R., Malten, M., Cossar, D., Anderson, W A., Scharer, J M., and Moo-Young, M. 2001. Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans*. Canadian Journal of Microbiology, 47, p. 1137-1140.
- Zhang, H., Williams-Dalson, W., Keshavarz-Moore, E., and Shamlou, P A. 2005. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas–liquid mass transfer in shake flasks. Biotechnology and Applied Biochemistry, 41(1), p. 1-8.
- Zimmermann, H F., Anderlei, T., Büchs, J., and Binder, M. 2006. Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 72(6), p. 1157-1160.

10. Anexos

Anexo 1.

Luz D. Marín-Palacio, Ramsés A. Gamboa-Suasnavart, Norma A. Valdez-Cruz, Luis Servín-González, Ma. Soledad Córdova-Aguilar, Enrique Soto, Wolf Klöckner, Jochen Büchs, Mauricio A. Trujillo-Roldán. 2014. The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 90: 224-233.



The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks



Luz D. Marín-Palacio^{a,b}, Ramsés A. Gamboa-Suasnavart^a, Norma A. Valdez-Cruz^c,
Luis Servín-González^c, Ma. Soledad Córdova-Aguilar^d, Enrique Soto^d,
Wolf Klöckner^e, Jochen Büchs^e, Mauricio A. Trujillo-Roldán^{a,*}

^a Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510, México, D.F., México

^b Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

^c Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, CP. 04510, México, D.F., México

^d Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, México, D.F., México

^e AVT–Biochemical Engineering, RWTH Aachen University, Worringer Weg 1, Aachen 52074, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2014

Received in revised form 12 May 2014

Accepted 12 June 2014

Available online 19 June 2014

Keywords:

Shaken bioreactors

Morphology

Orbital shaking

Power dissipation

Suspension rheology

Recombinant glycoproteins

ABSTRACT

The impact of flask geometry on *Streptomyces lividans* growth and morphology, production and O-mannosylation of a recombinant O-glycoprotein (APA from *Mycobacterium tuberculosis*) was described and associated to the evolution of the volumetric power input (P/V) in three shake flask geometries. During the exponential growth, the highest P/V was found in baffled flasks (BF) with 0.51 kW/m³, followed by coiled flasks (CF) with 0.44 kW/m³ and normal Erlenmeyer flasks (NF) with 0.20 kW/m³ (flasks volume of 250 mL, filling with 50 mL and agitated at 150 rpm). During the stationary phase, P/V decreased 20% in BF and CF, but increased two times in NF, surely due to changes in mycelial morphology and its effects on rheology. Also, NF cultures were carried out at a filling volume and agitation of 15 mL, 150 rpm (15 mL-NF), and 25 mL, 168 rpm (25 mL-NF), in order to raise P/V closely to the values obtained in CF. However, different growth, morphology and recombinant protein productivity were obtained. These data indicate that P/V is not a definitive parameter that can determine bacteria growth and morphology, not even glycoprotein production. But it can be proposed that the oxygen transfer in the center of the pellets and hydromechanical stress might be the more relevant parameters than P/V.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteria of the genus *Streptomyces* are widely used to produce a large range of secondary metabolites including antimicrobial, antifungal, antihelmintic and antitumor agents, as well as herbicides, pigments and other bioactive compounds [1,2]. Also, some strains as *S. lividans* are commonly used as hosts for the expression of heterologous proteins [3–7]. *Streptomyces* are prokaryotes with similar aspects to filamentous fungi, both are dispersed in the form of spores and its growth is branching hyphae that form a vegetative mycelium [8–11]. Specifically, in submerged cultures *S. lividans* presents a filamentous morphology that may be branched and

non-branched hyphae, clumped and pelleted [9,11]. Few attempts to understand a possible relation between morphology, growth and recombinant protein production have been reported [3,12,13]. Van Wezel et al. [13] described the successful morphological engineering of *S. coelicolor* and *S. lividans* through a controlled expression of the morphogene *ssgA*, leading to the improvement of growth by the fragmentation of the mycelial clumps resulting in increased growth rates for *S. lividans* of almost 45%, and the production of recombinant tyrosinase increased 2.5 times [13]. By using fluorescence microscopy and viability staining, Manteca et al. [14] reported that compartmentalized hyphae started to form pellets by radial growth of *S. coelicolor* A3(2), and in the center of the pellets a relatively quick cell death can be detected [14].

In various mycelial bacterial and fungal cultures it is known that the morphology of the culture largely depends on the hydrodynamic conditions, as well as on aeration and on culture

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 55 56223369.
E-mail address: maurotru@gmail.com (M.A. Trujillo-Roldán).

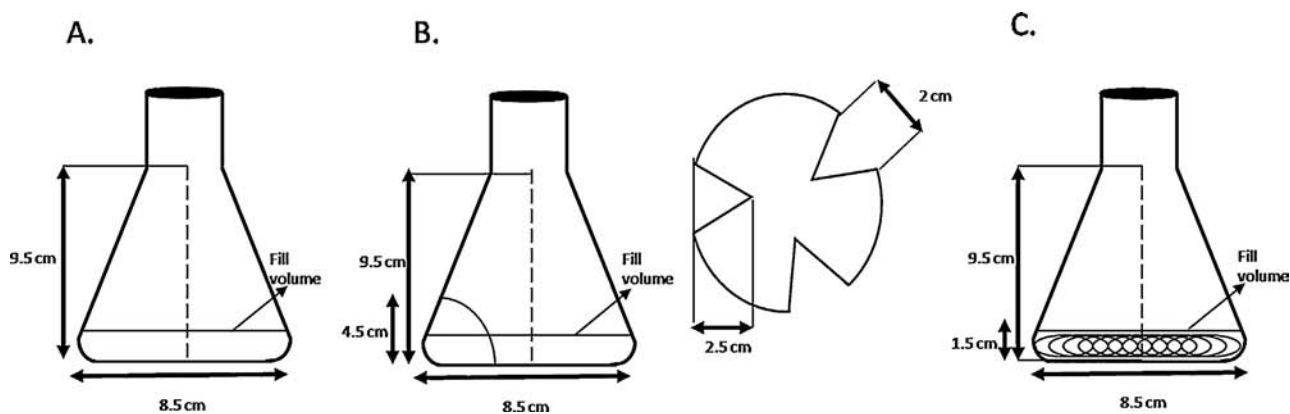


Fig. 1. Schematic diagrams of shake flasks used: (A) conventional Normal (NF); (B) baffled (BF); and (C) coiled shake flasks (CF).

Diagrams taken with permission from Gamboa-Suasnavart et al. [3].

medium [15–19]. When using shake flasks, the effects on morphology, growth, and recombinant protein production in filamentous bacteria cannot be easily measured independently because the hydrodynamic and aeration phenomena are interrelated. However, shake flasks are the most commonly used bioreactors for cultures in literature, and deciding which flask design to use for filamentous cultures will be a key step in production or clone selection or in the inoculum train [20–22]. On the other hand, the power input per unit of liquid volume (P/V) has been intensively used for the characterization of macroscopic hydrodynamics in bioreactors, and lately in shake flask cultures [20,23–31].

The morphology of *S. lividans* depends on the hydromechanical stress and on the oxygenation of the culture as was demonstrated [3], both determined by the design of the shake flasks used to grow these bacteria (normal conventional, baffled and coiled shake flasks). Moreover, the shake flask design might be playing a role in the regulation of the productivity and *O*-glycosylation of a recombinant glycoprotein. The small and dispersed mycelia aggregates obtained in baffled (BF), and coiled (CF) shake flasks improve the production and increase the degree of *O*-mannosylation of the recombinant glycoprotein (up to five mannoses attached to the carboxy-terminal of the protein), in comparison with the large aggregates obtained in conventional normal (NF) shake flasks, with just two mannoses attached [3]. These differences in flask geometry, and therefore, the volumetric power input involved, might play a role in the changes shown in morphology, growth rate, and protein production in *S. lividans*, thereby suggesting that hydrodynamic effects may be involved in the performance of the microorganism. Moreover, mathematical models and experimental data of *S. coelicolor* cultures in bioreactors have been used to correlate volumetric power input and bacterial morphology [32,33]. With this model, a prediction of aggregate size of *S. lividans* in aerated bioreactor cultures based on the volumetric power input was made. These data were used to obtain a culture morphology in the bioreactor, similar to that previously reported in baffled/coiled shake flasks [33]. This successful scale-up strategy suggests that power input has an important influence on growth, morphology, and recombinant protein productivity of *S. lividans*. The aim of the current study was to find out the role of the volumetric power input by measuring the shear viscosity, the morphology and the development of P/V during the cultivation of a recombinant *S. lividans* strain, using the three shake flask configurations as previously reported [3]. Additionally, a comparison of *S. lividans* growth and morphology, rheology and recombinant protein production and its *O*-mannosylation profile was made, when NF cultures were carried out at a P/V value similar to the P/V values obtained in CF.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms, culture conditions and analytical determinations

Streptomyces lividans 66 strain 1326 was used in this work [34,35], and it was transformed with plasmid pIJ6021MT-45, which carries the *M. tuberculosis* *apa* gene (Rv1860), cloned under the thiostrepton-inducible P_{tipA} promoter [36]. Spores of *S. lividans* were maintained in 20% glycerol and kept at -20°C , as a master bank. *S. lividans* spores were pregerminated in YT medium for 8 h at 37°C , and 150 rpm [36]; the germinated spores were then washed and inoculated to shake flasks at an optical density of around 0.015 at 600 nm (Beckman DU730 spectrophotometer, USA).

The same shake flask designs previously used by Gamboa-Suasnavart et al. [3] were used (250 mL-flasks filled with 50 mL of medium). Normal Erlenmeyer flasks (NF), Baffled flasks (BF) with three baffles, 2.5 cm depth and 4.5 cm height, and coiled flasks (CF) with a stainless steel spring at the bottom, 1.3 cm diameter, 19 standard wire gauge (SWG), as is shown in Fig. 1. Luria-Bertani's medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin and 34% w/v sucrose [36] was used. All cultures were carried out at 30°C and 150 rpm for 72 h, with the addition of the inducer thiostrepton (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 16 h of culture. At least 20 shake flasks were used for each kinetic and two shake flasks were removed at each kinetic data point for biomass, protein and image analysis [3].

The biomass was evaluated by dry weight; 5 mL of culture were filtered through a 0.45 μm pore size membrane (Millipore, USA), and washed once with one volume of distilled water. The mycelium obtained was dried for 24 h in an oven at 55°C , then placed for 2 h in a desiccator, and weighed afterwards [3].

The amount of protein in the culture supernatant was determined using the Bradford Method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Electrophoresis in 12% polyacrylamide gels containing SDS and subsequent immunoblotting procedures were carried out as previously described [3]. For Western blots, 30 μg of total protein separated by SDS-PAGE (10%) were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). The membranes were incubated with 5% (w/v) skim milk in PBS containing Tween 20 (0.05% v/v) for 1 h, washed with PBS Tween 0.05%, and then incubated with primary antibody (mAb6A3) at a 1:1000 dilution overnight at 4°C [3,36]. After three washes with PBS-Tween 20, the membranes were incubated with diluted peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a 1:2000 dilution for 2 h. After incubation, the blots were stained by using the Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) and images were taken using the theC-DiGit

Chemiluminescent Western Blot Scanner (Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

2.2. Protein digestion and MALDI-TOF analysis

O-linked glycans at the C-terminal region of recombinant APA were characterized and the protein was purified and digested with LysC with the aim to produce at least eight peptides as previously reported [3]. The 45 and 47 kDa bands were excised from SDS-PAGE gels, washed with water, destained with ammonium bicarbonate buffer (100 mM, 50% methanol), dehydrated with acetonitrile (100%), and rehydrated with ammonium bicarbonate buffer (25 mM) containing the Lys-C enzyme (Roche) in 1:1000 dilution. Digestion was carried out overnight at 37 °C, and 20 µL of trifluoroacetic acid (TFA, 0.1% v/v) were added to stop the reaction. A concentration step was carried out to obtain 20 µL or less (Speed-Vac concentrator, Savant-Thermo). Masses were determined in a Bruker Microflex matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) equipped with a 20 Hz nitrogen laser at $\lambda = 337$ nm. Spectra were recorded in reflector and/or linear positive mode for the mass range of 3800–6000 Da. 1.0 mL of sample solution was mixed with 5 mL of 30% acetonitrile, 70% water, 0.1% TFA, and saturated with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid or sinapinic acid. Then, 1.0 µL of this solution was deposited onto the MALDI target, and allowed to dry at room temperature. At least three MALDI-TOF analyses were done at the end of each independent culture.

2.3. Measurements of power input

The development of the volumetric power input (P/V) was characterized on-line during *S. lividans* growth and APA production using the method previously described [24,25]. This method is based on torque measurements in the drive of the shaking machine with appropriate compensation of friction losses. Operating conditions for all cultures were: 150 rpm, 30 °C, flasks with nominal flask volume of 250 mL, filling volume of 50 mL (or as otherwise stated), and shaking diameter of 2.5 cm.

2.4. Rheological measurements

Rheological parameters of the culture broth were measured using 50 mm plate/plate geometry in a controlled stress Rheometer (Physica MCR 101 Modular Compact Rheometer, Anton Paar, Graz, Austria) at a constant temperature of 30 °C, using shear rates between 0.1 and 100 s⁻¹, and a gap between two plates of 1 mm. It was ascertained that the measurements were carried out within the sensitive range of the rheometer used and with the adequate time to reach the steady state in each shear rate. The dependency of the viscosity on the shear rate was described by the Ostwald–de Waele law:

$$\eta = K\gamma^{n-1} \quad (1)$$

where η is the apparent viscosity (mPas), γ is the shear rate (s⁻¹), K is the consistency index (mPas ^{n}) and n is the flow behavior index (dimensionless).

2.5. Morphological measurements

The morphology of *S. lividans* in culture was measured as previously reported [3,33]. In brief, a sample of 20 µL of culture broth was fixed using a formalin solution (10%, v/v) in order to avoid the losses of the actual morphology, placed on a slide, and carefully covered with a cover slip. A minimum of 300 objects of each sample were analyzed for each determination. The image was captured with a digital camera Coolpix 4300 (Nikon, Tokyo Japan) mounted

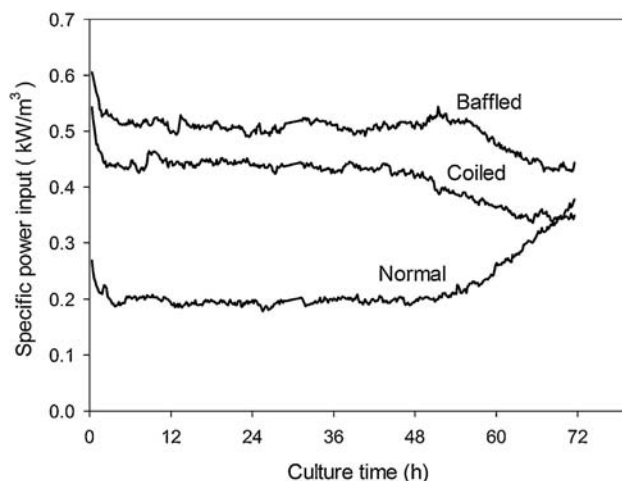


Fig. 2. Evolution of the volumetric power input during the cultivation of *Streptomyces lividans* producing rAPA from *M. tuberculosis*, in conventional normal (NF), baffled (BF), and coiled (CF) shake flasks with a nominal volume of 250 mL and 50 mL filling volume, incubated at a shaking frequency of 150 rpm and a shaking diameter of 25 mm.

on a microscope (Nikon Optiphot-2, Tokyo Japan) that used a 4× magnification. Image analysis was performed with the software package ImageJ (National Institutes on Health, NIH, Bethesda, MD, USA) available on-line (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

3. Results and discussion

3.1. Measurements of power input in three different shake flask designs

The development of P/V for cultures carried out in three different designs of 250 mL shake flasks (normal, baffled and coiled flasks, as is shown in Fig. 1) using a strain of *S. lividans* producing a recombinant protein is shown in Fig. 2. Maintaining the same agitation frequency of 150 rpm and the same filling volume of 50 mL, P/V remains substantially constant during the first 50 h, and the highest P/V was obtained for baffled flasks near 0.51 kW/m³, followed by coiled flasks of roughly 0.44 kW/m³, and then by conventional flasks of around 0.20 kW/m³. Comparing the experimentally measured P/V in NF (0.20 kW/m³), with the correlation proposed by Buchs (0.22 kW/m³) [24,25] a good approximation was achieved with a difference of just 9%. However, in baffled flask, the correlation predictions from Peter et al. [20] a difference of 67% was found. This can be due to differences in baffles dimensions used in this experiment (25 mm deep and 45 mm high) and those used by Peter et al. [20] (14 mm deep and 35 mm high). Thereafter, the behavior of the P/V is not constant, it decreases to 0.44 kW/m³ in BF and to 0.35 kW/m³ in CF, respectively. In contrast, it increases to almost 0.38 kW/m³ in NF. The initial values of P/V during the first 50 h are in agreement with values reported by Peter et al. [20], who proposed that the greater resistance to fluid flow in baffled flasks than in conventional normal ones generated greater P/V values [20]. By computational fluid dynamics (CFD) techniques, using volumetric average of turbulence parameters, Li et al. [27] found that each of these turbulence parameters in baffled flasks is greater than those in unbaffled flasks [27]. Velocity performance indicates that a greater velocity gradient is formed in baffled flasks. As a result, energy dissipation in baffled flasks is higher than that in unbaffled flasks. When the fluid hits the baffles, it splashes over the baffles, resulting in higher local velocity and energy dissipation, especially at the submerged corner between the baffle and the flask wall. This results in a better mixing and mass transfer capacity of baffled shake flasks [27].

On the other hand, to our knowledge, this is the first time that P/V was measured for any culture carried out in coiled flasks. P/V in CF has an intermediate value between conventional and baffled flasks (Fig. 2), suggesting that works as an obstacle that increase energy dissipation and promotes an increase in mass transfer coefficient as long as a good incorporation of the gas phase in the system, even though such contributions are smaller than in the baffled flask.

At the end of cultures carried out in NF, an increase in the medium apparent viscosity might be responsible for the increase of P/V [20,29]. An exponential increase in P/V, due to an increase in viscosity in cultures of alginate producing bacteria *Azotobacter vinelandii*, in normal conventional flasks has been found [29]. A maximum P/V of 1.4 kW/m^3 , but a reduction at the end of cultures (1.2 kW/m^3) were due to a decrease in apparent viscosity, and the possible occurrence of the “out of phase” phenomena. Also, it has been demonstrated that at least at shaking diameter of 25 mm (shaking diameter employed in this study), cultures carried out in baffled flasks were out of phase [20]. Out of phase phenomenon is generated when parts of the liquid cannot follow the agitation motion, and therefore, remain at the bottom of the flask with little movement. This is associated with a reduction in power, a reduction in mass transfer, and flow irreproducibility [25]. However, out of phase cannot be easily associated to the end of cultures in BF or CF (Fig. 2), and the rheological complexity of cultures might be related to these changes in P/V.

3.2. Biomass growth, morphology and rheology in three different shake flasks designs

The highest biomass production was obtained in BF ($5.6 \pm 0.2 \text{ g/L}$), and CF ($5.2 \pm 0.1 \text{ g/L}$), which occurred at the maximum volumetric power input (0.51 and 0.44 kW/m^3 , respectively), while at P/V of 0.20 kW/m^3 obtained in NF, the final biomass concentration was $2.1 \pm 1.2 \text{ g/L}$ (Fig. 3A). Moreover, the specific growth rate (μ) was significantly different in CF ($0.14 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), BF ($0.10 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$), and NF ($0.08 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) flasks. These results are in agreement with those reported by Gamboa-Suasnavart et al. [3] in terms of the specific growth rate, which has been previously reported in the range of 0.08 – 0.14 h^{-1} for the same shake flasks geometries [3]. However, there are differences in the final biomass concentrations obtained in this work (Fig. 3A) and those reported previously by other authors [3], where no significant differences were reported among BF, CF and NF (with an average of $3.3 \pm 0.2 \text{ g/L}$). This differences in biomass growth can be attributed to differences in the inoculum size, as previously reported for *S. coelicolor* A3(2), where the low density inoculum (10^5 spores/mL) grew at a lower specific growth rate, reaching lower biomass than cultures with high density inoculum (10^7 spores/mL) [37]. Similar behavior was reported for *S. pristinaespiralis* where P/V positively affects the biomass concentration and the concentration of pristamycins, but they also are affected by the mass transfer coefficient k_{La} [21–23]. Moreover, it should be noted that in all the experiments carried out in this work, we used the same transformed strain of *S. lividans* and the same master bank.

A lag phase could be observed during the first 12 h of culture in all cases. However, in NF two stages in the exponential phase was observed. This second growth phase in NF where consistent with those previously reported [19,37,38]. In *S. coelicolor* A3(2), two growth stages are seen: a first where compartmentalized mycelium (first mycelium) is obtained, which starts to die in the center of the pellet to lead the appearance of a multinucleated mycelium (second mycelium) that grows from the remaining viable hyphae [37]. This phenomena of two growth phases seem to be associated with low volumetric power input in combination with low inoculum size in *S. coelicolor* [32,37,39], *S. fradiae* [18,40], *S. noursei* [41], and *S. natalensis* [42].

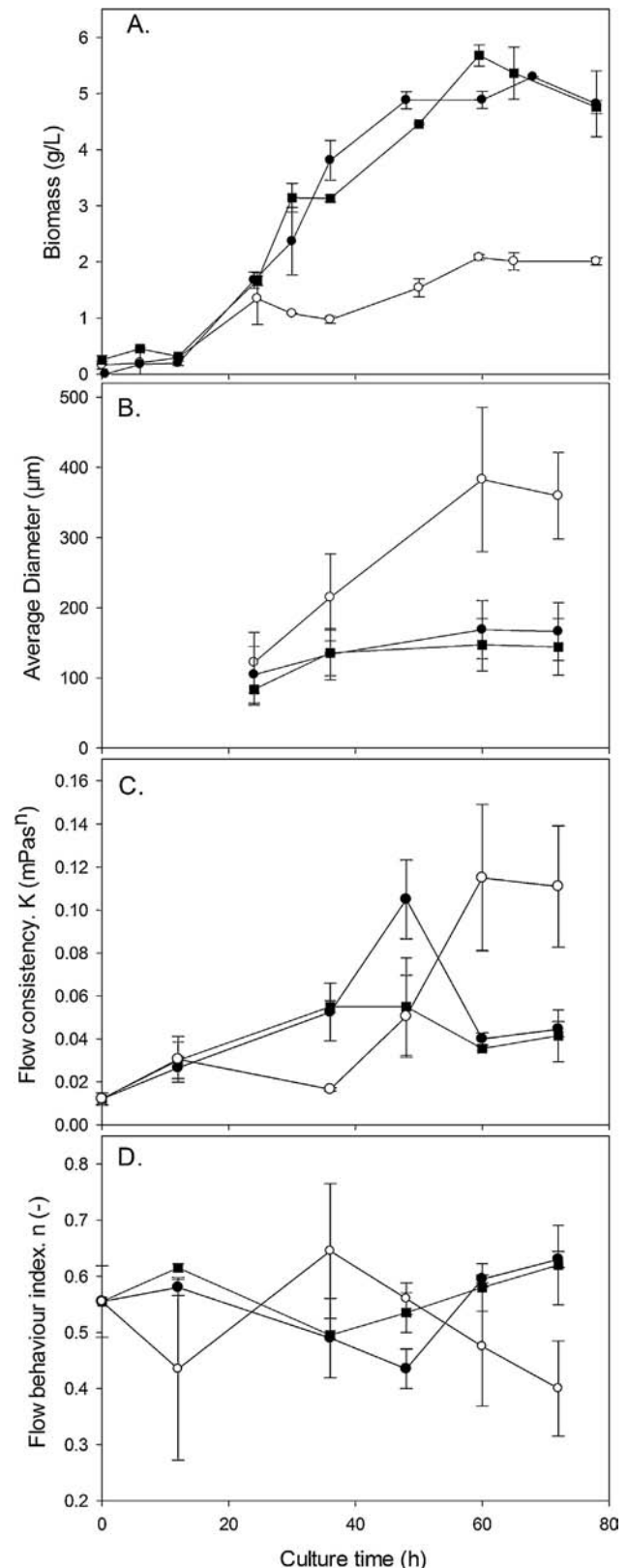


Fig. 3. (A) Kinetics of biomass growth of *S. lividans* producing rAPA from *M. tuberculosis*. (B) Average diameter and standard deviation of *S. lividans* pellets. (C) Evolution of the flow consistency index K (mPas^n) and (D) flow behavior index n (-) of cultures in conventional normal (open dots); baffled (square); and coiled (closed dots) shake flasks with a filling volume 50 mL incubated at a shaking frequency of 150 rpm and shaking diameter of 25 mm.

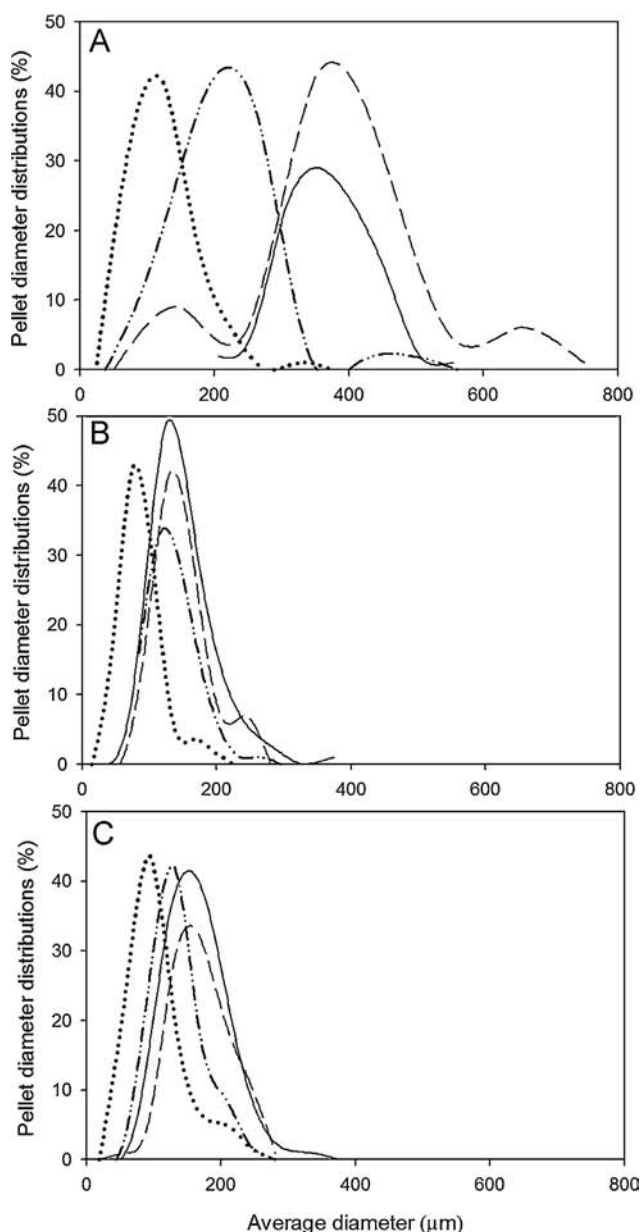


Fig. 4. *S. lividans* pellet diameter distributions in (A) conventional normal (NF); (B) baffled (BF); and (C) coiled (CF) shake flasks. Samples were taken at 24 h (dotted), 36 h (dash-dot-dot), 60 h (long-dash), and 78 h (solid) of culture.

According to previously reported data for 100 mL shake flasks [31], a P/V of around 0.1–0.2 kW/m³ was delivered to the cultures using conventional 100 mL shaking flasks with a working volume of 20 mL, incubated at 200 rpm (shaking diameter was not reported) [39], a value similar to that reported in this work for NF, that is almost 0.22 kW/m³ during the first 45 h of culture (Fig. 2).

The kinetics of the pellet size for NF, BF and CF was followed by sampling cultures at 24, 36, 60, and 78 h of culture in triplicates, and analyzing at least a minimum of 300 objects per sample for each determination (Figs. 3B and 4). During the first hours of the cultivation, the average diameter of the pellets to the three design flask were approximately 100 µm. However, the pellet grows in size until it reaches a stable state, being higher in normal flasks. In NF, pellets increased up to an average pellet size of 370 ± 82 µm, but a wide range of diameters was obtained, including pellets of up to 700 µm (Fig. 4), while in BF and CF cultures, the obtained average diameter was up to 160 ± 40 µm, with a narrow distribution and

approximately 60% smaller pellets in average than those obtained in NF. Significant differences are shown only at the end of cultivation time between CF and BF. This might be due to the flow patterns and velocity fields in these geometries that are different presenting greater heterogeneity in the intensity of turbulence in CF, which could to influence the greatest number of dispersed mycelium (Fig. S2 and Table S1 included in the supplementary data). Apart from that, the same trend as previously reported by Gamboa-Suasnavart et al. [3] was found in this work, with larger pellets in NF and no significant differences between BF and CF. This difference in pellet sizes between both works, might be attributed to differences in the inoculum size, as previously reported for *S. coelicolor* [37], indicating that while the power input is responsible for morphological changes, the inoculum size also plays an important role.

At a P/V of 0.20 kW/m³, the pellets were observed as internally compact and fluffy in the peripheral region (Fig. 5). Meanwhile, the pellets obtained at 0.51 and 0.44 kW/m³ (BF and CF) had an oval shape and were less compact (Fig. 5). These changes in the pellet size for the three flask geometries could be explained by differences in the energy dissipation rates due to the P/V delivered to cultures. BF and CF had higher P/V (0.51 and 0.44 kW/m³, respectively), compared to conventional flasks (0.20 kW/m³).

The rheological behavior of the bacterial cultures of *S. lividans* for the three flask geometries in terms of the Ostwald-de Waele model (The complete shear flow result is included as supplementary data in the manuscript, Fig. S1), the evolution of the flow consistency index (*K*), and the flow behavior index (*n*) are shown in Fig. 3C and D. At the end of the cultivation, the flow consistency index increases three times (0.111 ± 0.024 mPas^{*n*}) in NF cultures when compared to BF and CF cultures (0.042 ± 0.009 and 0.045 ± 0.003 mPas^{*n*}, respectively), but the behavior index decreases by 33% in NF (0.40 ± 0.06) in comparison with BF and CF (0.62 ± 0.05 and 0.63 ± 0.01, respectively). This change in the rheological characteristics of the cultures seems to be related to the change in the P/V behavior found between 56 and 58 h of culture (Fig. 2). The increase in P/V at the end of NF cultures or the decrease in CF and BF, might be related with the increase in NF or decrease in CF and BF of the consistency index. As also, with the decrease in NF and the increase in CF and BF in the apparent viscosity of the culture, and also an increase in NF but a decrease in CF and BF in the pseudoplastic behavior of cultures. The pseudoplastic changes may surely be associated with the changes in morphological sizes at late stages of the cultures in NF. Similar behaviors were found for mycelial cultures of *S. clavuligerus* [43], *S. pristinaespiralis* [23], and *S. olindensis* [10,44]. We could not realize whether these rheological changes are due to morphology or composition of the culture medium modifications, but these rheological changes concur with P/V behavior at the end of cultures. Furthermore, we observed dispersed mycelium and this was not quantified, and we thought that this can also be affected volumetric power (through rheological modifications).

3.3. Recombinant APA production and O-mannosylation in three different shake flasks designs

Significant differences were found in the recombinant APA protein produced, similar to the data previously reported [3]. A lower productivity was found in NF (lanes C50, Fig. 8) compare with CF (lane R, Fig. 8). Likewise, specific host released proteins at the end of cultures follow the same trend, with lower amounts of proteins in NF, and higher amounts in BF and CF [3].

There are four putative sites of O-mannosylation in APA from *Mycobacterium tuberculosis*, one of which is located at the carboxy-terminal region [45,46]. The carbohydrate composition of this site was determined by mass spectrometry and up to six mannose

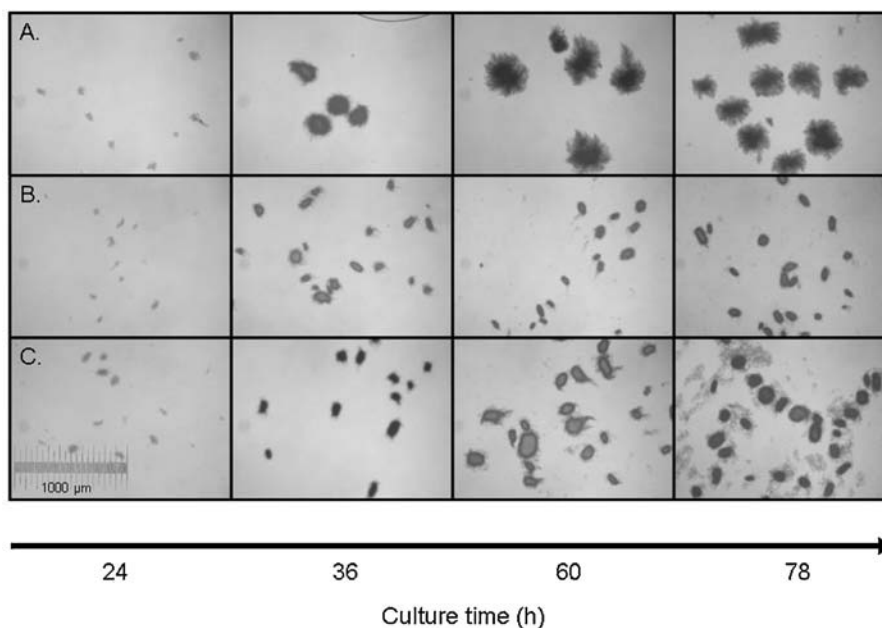


Fig. 5. Representative mycelial kinetic morphology of *S. lividans* cultured in (A) conventional normal (NF); (B) baffled (BF); and (C) coiled shake flasks (CF). Samples were taken at 24, 36, 60, and 78 h of culture. (Bar indicates 1000 μm , 4 \times magnification).

residues were found in NF and CF. These data are different to those previously reported in our group [3], where up to two mannose residues in cultures carried out in NF, and up to five mannose residues were determined in CF and BF.

The differences in the number of mannose residues found in the carboxy-terminal of recombinant APA in NF in this work, and the just two mannose residues previously reported [3], are most probably due to the four times difference in pellet size found. This suggests that also oxygen supply was a limiting step in the inside of large pellets, as those previously reported [3], surely limiting post-translational modifications such as *O*-mannosylation of the recombinant proteins. Also, as previously discussed, unavoidable differences in growth/morphology can be attributed to differences in inoculum size [21–23,37]. As a consequence of the changes in pellet size between works, a different critical oxygen concentration to ensure a properly diffuse into the aggregate is expected. According to the correlation proposed [15], 0.8 mg/L are required to suffice the diffusion in pellets of $370 \pm 80 \mu\text{m}$ diameter (this work), even with the maximal diameter of $700 \mu\text{m}$, 1.2 mg/L are needed. Contrastingly, 14.28 mg/L in $1.57 \pm 0.41 \text{ mm}$ [3] are needed. The solubility of oxygen in pure water at 25°C is 8.5 mg/L, approximately. Therefore, we suggest that in $1.57 \pm 0.41 \text{ mm}$ aggregates there is oxygen limitation but in the pellets obtained in this work there is not.

The hypothesis of a threshold value of aggregate size to achieve a certain number of mannose residues, at least in the carboxy-terminal of the APA protein, as a result of an oxygen limitation, could be confirmed by displaying a systematic study. This can be done in order to demonstrate that P/V and oxygen transfer rate, in conjunction with mycelium inoculum size, has an important role in triggering the multinucleated mycelium appearance in *S. lividans*, as the corresponding aggregate size distribution associated to this. This has to be done in cultures in bioreactors, where mass and momentum transfer phenomena can be studied separately [47]. It was reported that the center of mycelium pellets contains inactive cells, due to a rapid consumption of substrates (nutrients and/or oxygen) within the kernel of the pellets [37]. However, it has been found that mass transfer concerns were negligible in *S. lividans* growth, when pellets reach diameters around 2 mm, at least in terms of oxygen transfer [48]. Nevertheless, this threshold value of aggregate size can be smaller to affect post-translational

modifications of proteins, as in the case of NF aggregates reported in previous works [3]. It can be proposed that not only inoculum size, but also low agitation/aeration may be playing a specific role in determining the two growth phase phenomena, mainly at low power input (as in NF), where transient growth arrests can be triggered [37].

3.4. Biomass growth, morphology and rheology replicating the P/V from coiled flasks in normal flasks

In order to discern the specific role of P/V in the determination on growth and morphology of *S. lividans*, two different approaches were taken to increase the power input up to those values found in coiled flasks, but this time in conventional normal Erlenmeyer flasks (NF). The first approach was setting the shaking frequency to 150 rpm and decreasing filling volume of 50 mL–15 mL (15 mL-NF). These operating conditions were obtained using modified Newton number [24,25]. The second approach was done by setting the filling volume to 25 mL using modified Newton number equation [24], which gave us the result of 168 rpm (25 mL-NF) as the shaking frequency (Fig. 6). Even at the beginning of cultures the power input was similar in 15 mL-NF and 25 mL-NF to data obtained in coiled flasks, the decrease in P/V found at the end of cultures in CF, was not found in the normal shake flasks where P/V was increased (Fig. 6). For 15 mL-NF and 25 mL-NF, P/V measurements were 0.44 and 0.47 kW/m^3 respectively (Fig. 6), when compared those data with the correlation prediction proposed by Buchs et al. [24,25] values of 0.51 and 0.49 kW/m^3 were obtained. This prediction just has a difference of 14.7 and 5.1% to experimental data.

In cultures carried out in 15 mL-NF, a final concentration of biomass of $4.7 \pm 0.3 \text{ g/L}$ was obtained with a specific growth rate (μ) of $0.15 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. However, for those cultures carried out with a working volume of 25 mL and 168 rpm, a final biomass concentration of just $2.5 \pm 0.4 \text{ g/L}$ with a μ of $0.10 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ was obtained (Fig. 7A). In 15 mL-NF no significant difference in maximum biomass was found, and μ when compared with CF, showed a lag phase and a small growth become visible in the first 36 h of culture. In contrast, in 25 mL-NF no significant difference was found in maximum biomass and μ when compared with NF filled with 50 mL. In spite of a well-simulated volumetric power input

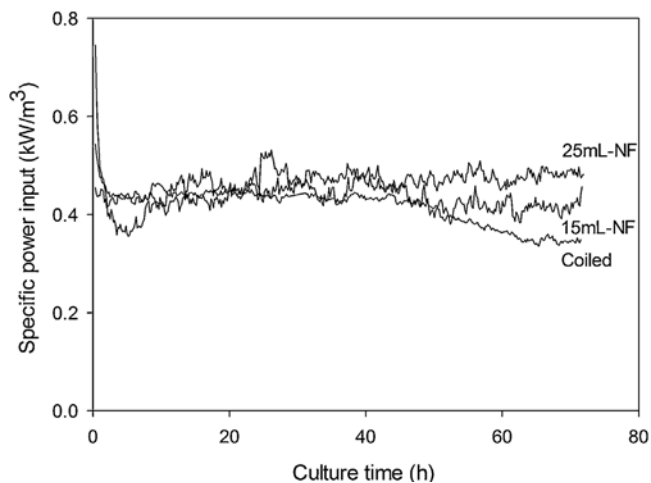


Fig. 6. Evolution of the volumetric power input during the cultivation of *S. lividans* producing rAPA from *M. tuberculosis*, in conventional normal (NF) shake flasks with a nominal volume of 250 mL at coiled flask equivalent P/V changing filling volume and agitation. 15 mL, 150 rpm (15 mL-NF), and 25 mL, 168 rpm (25 mL-NF). For comparison the P/V of a coiled flask (presented in Fig. 1) with a filling volume 50 mL incubated at a shaking frequency of 150 rpm and shaking diameter of 25 mm is included.

in 15 mL-NF and in 25 mL-NF, biomass growth results showed that this type of strategies to equate P/V were not adequate, at least for mycelial cultures. This is surely due to the differences in oxygen transfer rate (OTR) in NF, CF, 15 mL-NF and 25 mL-NF. The effect of the filling volume on OTR has been previously reported in other models as *Corynebacterium glutamicum* [49,50], *E. coli* [51], *Hansenula polymorpha* [52], *Pichia pastoris* [53] among others, as being also the effect of the type of shake flask on OTR [54]. In *S. pristinaespiralis* the effects of power dissipation on biomass growth were indirect, through the augmentation of oxygen transfer rates [22].

Aggregate diameters similar to NF ($370 \pm 80 \mu\text{m}$) were obtained in 15 mL-NF and 25 mL-NF ($412 \pm 107 \mu\text{m}$), and were higher than those in CF ($160 \pm 40 \mu\text{m}$), as can be seen in Fig. 6B. These data indicate that not only P/V, as a global parameter in shake flasks, is playing an important role in *S. lividans* physiology, but also oxygen transfer rate and/or gradients of specific dissipation energy associated to shake flasks indentations in BF or springs in CF play that role. Computational fluid dynamics associated to particle image velocimetry might be important tools to resolve these inquiries [27,31].

The rheological behavior of the bacterial cultures of *S. lividans* for conventional normal flasks with a filling volume of 25 mL and 168 rpm (25 mL-NF) and 15 mL and 150 rpm (15 mL-NF) in terms of the Ostwald-de Waele model, the evolution of the flow consistency index (K) and the flow behavior index (n) are shown in Fig. 7C and D. At the end of the cultivation, the flow consistency index was $0.055 \pm 0.004 \text{ mPas}^n$ for 15 mL-NF and $0.080 \pm 0.013 \text{ mPas}^n$ for 25 mL-NF and the flow behavior index was 0.62 ± 0.007 for 15 mL-NF and 0.55 ± 0.049 for NF-25 mL. No significant differences were found with the rheological parameters obtained in CF.

3.5. Recombinant APA production and O-mannosylation replicating the P/V from coiled flasks in normal flasks

Interestingly, higher recombinant APA productivity was found in 15 mL-NF ($45 \pm 2\%$ of total released proteins), no significant differences were obtained in 25 mL-NF ($36 \pm 3\%$), and coiled flasks (35.2%), and lower APA productivity was found in NF ($25.2 \pm 3\%$) (Fig. 8A). Also, this was corroborated by Western blots (Fig. 8B).

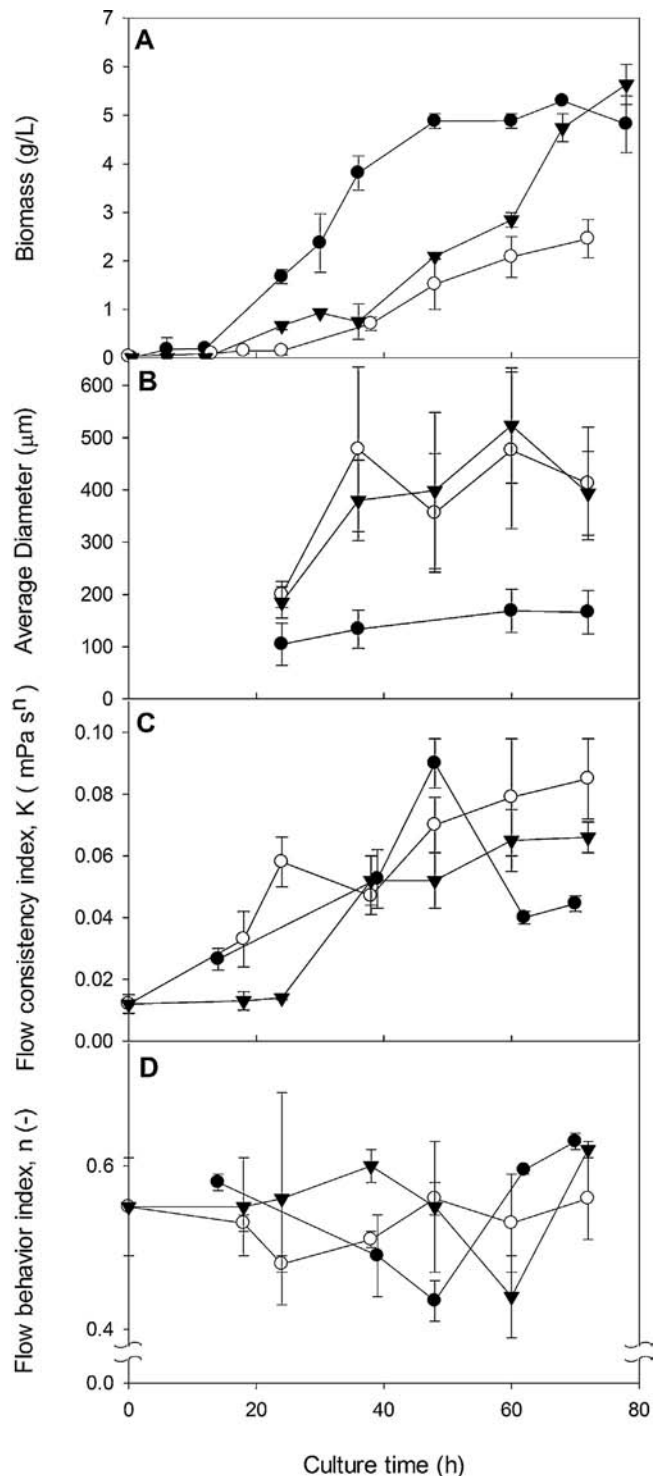


Fig. 7. (A) Kinetics of biomass growth of *S. lividans* producing rAPA from *M. tuberculosis*, in conventional normal flasks (NF) at equivalent P/V of coiled shake flasks. (B) Average diameter and standard deviation of *S. lividans* pellets. (C) Evolution of the flow consistency index K (mPas^n) and (D) flow behavior index n (-) of cultures at equivalent P/V, with a changing filling volume and agitation frequency of 15 mL and 150 rpm (15 mL-NF, triangles), and 25 mL and 168 rpm (25 mL-NF, open dots). For comparison the data presented in Fig. 1 for coiled flasks are included (CF, closed dots) with a filling volume 50 mL incubated at a shaking frequency of 150 rpm and shaking diameter of 25 mm.

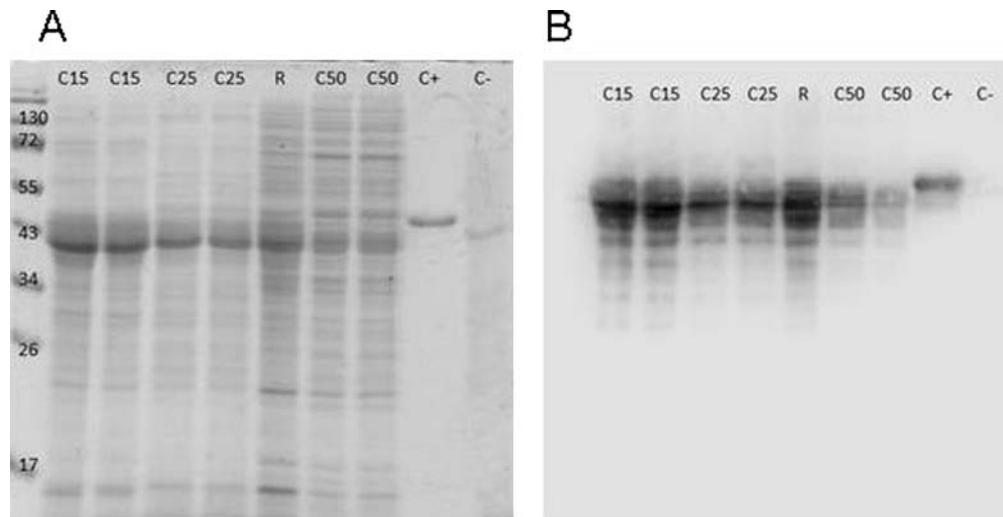


Fig. 8. (A) SDS-PAGE of total secreted proteins by *S. lividans* in the utilized shake flasks. (B) Western blot of rAPA production by *S. lividans* in the utilized shake flasks. Lane 1: page ruler. Lanes 2 and 3 (C15): two independent conventional normal flasks with a filling volume of 15 mL and 150 rpm (15 mL-NF). Lanes 4 and 5 (C25): two independent conventional normal flasks with a filling volume of 25 mL and 168 rpm (25 mL-NF). Lane 6 (R): coiled flasks. Lanes 7 and 8 (C50): two independent normal conventional shake flasks (NF). Lane 9: positive control, recombinant APA produced in bioreactor cultures of *E. coli*. Lane 10 (C-): negative control, *Streptomyces lividans* 66 strain 1326, without transformation.

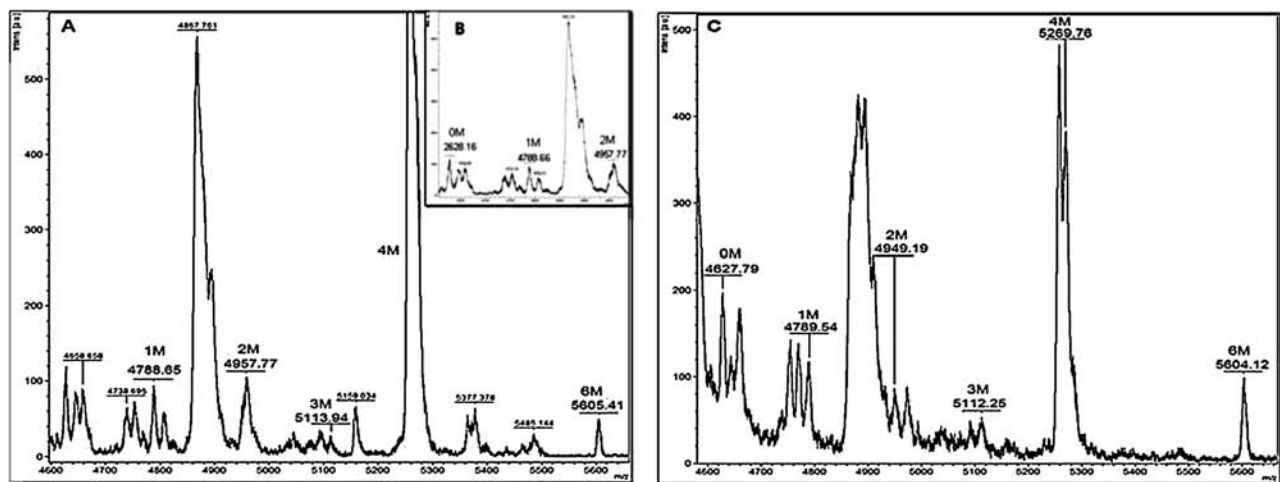


Fig. 9. MALDI-TOF analysis for the carboxy-terminal peptide of the recombinant APA protein by LysC digestion and obtained in (A) conventional normal flasks with a filling volume of 15 mL and 150 rpm (15 mL-NF) (B) the non *O*-glycoform with a molecular mass of 4628.16 Da in 15 mL-NF and (C) conventional normal flasks with a filling volume of 25 mL and 168 rpm (25 mL-NF). Numbers above each peak mean the number of mannose units linked to the peptide. At least three MALDI-TOF analyses were done at the end of each independent culture.

The positive control (APA protein produced in *E. coli*) was used as molecular weight reference in western blots (Fig. 8B), using the monoclonal antibody (mAb6A3) against the APA protein.

In other words, a significant effect on the specific heterologous protein productivity by increasing the volumetric power input (0.44 kW/m^3) in conventional flasks (15 mL-NF and 25 mL-NF), increases recombinant APA productivity, up to those obtained in coiled flasks (0.44 kW/m^3), although sizes of the cell aggregates are similar to those reported in conventional flasks (NF, 0.20 kW/m^3). On the other hand, the same *O*-mannosylation in the carboxy-terminal region and up to six mannose residues were found in 15 mL-NF and 25 mL-NF (Fig. 9). These results might support the idea that recombinant APA productivity is not being affected by size of the aggregate, but surely by the oxygen transfer rate inside the aggregate, through the increasing of the volumetric power input.

4. Conclusions

In this work, an approach has been developed to understand the role of the volumetric power input on the physiology of a recombinant strain of *S. lividans* producing the APA glycoprotein from *M. tuberculosis*, by using three shake flask designs. As it was previously suggested, the mass/momentum transfer is associated with the morphology, growth, APA production and *O*-mannosylation [3].

The specific recombinant APA productivity is probably not affected by the size of the *S. lividans* aggregates, but surely by the oxygen transfer inside them. The increase in OTR might be occurring through the increasing of the volumetric power input, as it can be seen in conventional flasks (15 mL-NF and 25 mL-NF), where volumetric power input was increased (0.44 kW/m^3) and although sizes of the cell aggregates are similar to those reported in conventional flasks (NF, 0.20 kW/m^3). Our data indicates that the role of

P/V, as a global parameter in *S. lividans* cultures in shake flasks, is not clearly defined as an important parameter to determine *S. lividans* growth, morphology, recombinant protein production, and its post-translational modifications (as it is the case of *O*-mannosylation of the carboxy-terminal peptide of APA).

Finally, the effect of the filling volume and shake flask glass composition on the OTR have been previously reported in other models [54]. However, to our knowledge no reports have been made on the geometry of the flasks. It would be attractive to study the OTR of filamentous bacterial cultures in order to determine whether this parameter has any role in the determination of growth and mycelial morphology.

Acknowledgements

This work was partially financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 178528, CONACyT-INNOVAPYME 214404), and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT-UNAM IN-210013 and IN-209113). The primary antibody mAb6A3 was donated by Dra. Clara Espitia. LDMP thanks the scholarship Francisco José de Caldas from Colciencias-Colombia and EAFIT University (Colombia), for support her PhD studies at the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. RAGS thanks the scholarship from CONACyT-México. We also thank Dr. Miguel Tapia Rodríguez for his technical assistance in image analysis and Ana Carmen Delgado for reviewing the English version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.010>.

References

- [1] A.K. Chaudhary, D. Dhakal, J.K. Sohng, An insight into the “-omics” based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction, *Biomed. Res. Int.* (2013) 968518.
- [2] K.S. Hwang, H.U. Kim, P. Charusanti, B.O. Palsson, S.Y. Lee, Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.008>.
- [3] R.A. Gamboa-Suasnavart, N.A. Valdez-Cruz, L.E. Cordova-Davalos, J.A. Martínez-Sotelo, L. Servín-González, C. Espitia, M.A. Trujillo-Roldán, The *O*-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 kDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks, *Microb. Cell Fact.* 10 (2011) 110.
- [4] L. Liu, H. Yang, H.D. Shin, J. Li, G. Du, J. Chen, Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: from transcription and translation regulation to secretion pathway selection, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 9597–9608.
- [5] E. Pimienta, J.C. Ayala, C. Rodríguez, A. Ramos, M.L. Van, C. Vallin, J. Anne, Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*, *Microb. Cell Fact.* 6 (2007) 20.
- [6] C. Vallin, A. Ramos, E. Pimienta, C. Rodríguez, T. Hernandez, I. Hernandez, S.R. Del, G. Rosabal, M.L. Van, J. Anne, *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins, *Tuberculosis (Edinb)* 86 (2006) 198–202.
- [7] K. Vrancken, J. Anne, Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*, *Future Microbiol.* 4 (2009) 181–188.
- [8] K. Flärdh, M.J. Buttner, *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 36–49.
- [9] J. Anne, B. Maldonado, I.J. Van, M.L. Van, K. Bernaerts, Recombinant protein production and *Streptomyces*, *J. Biotechnol.* 158 (2012) 159–167.
- [10] J. Anne, L. Van Mellaert, *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production, *FEMS Microbiol. Lett.* 114 (1993) 121–128.
- [11] R. Giudici, C.R. Pamboukian, M.C. Facciotti, Morphologically structured model for antitumoral retamycin production during batch and fed-batch cultivations of *Streptomyces olindensis*, *Biotechnol. Bioeng.* 86 (2004) 414–424.
- [12] G.P. van Wezel, M.J. van der, E. Taal, H. Koerten, B. Kraal, Effects of increased and deregulated expression of cell division genes on the morphology and on antibiotic production of streptomycetes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 78 (2000) 269–276.
- [13] G.P. van Wezel, P. Krabben, B.A. Traag, B.J. Keijsers, R. Kerste, E. Vijgenboom, J.J. Heijnen, B. Kraal, Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 5283–5288.
- [14] A. Manteca, D. Claessen, C. Lopez-Iglesias, J. Sanchez, Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event, *FEMS Microbiol. Lett.* 274 (2007) 118–125.
- [15] Y.Q. Cui, R.G. van der Lans, K.C. Luyben, Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 57 (1998) 409–419.
- [16] L.F. Dobson, C.C. O’Cleirigh, D.G. O’Shea, The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 859–866.
- [17] B.H. Junker, M. Hesse, B. Burgess, P. Masurekar, N. Connors, A. Sealey, Early phase process scale-up challenges for fungal and filamentous bacterial cultures, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 119 (2004) 241–277.
- [18] S. Tamura, Y. Park, M. Toriyama, M. Okabe, Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions, *J. Ferment. Bioeng.* 83 (1997) 523–528.
- [19] P. Yin, Y.H. Wang, S.L. Zhang, J. Chu, Y.P. Zhuang, N. Chen, X.F. Li, Y.B. Wu, Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 39 (2008) 609–615.
- [20] C.P. Peter, Y. Suzuki, J. Büchs, Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (2006) 1164–1176.
- [21] N. Mehmood, E. Olmos, J.L. Goergen, F. Blanchard, D. Ullisch, W. Klöckner, J. Büchs, S. Delaunay, Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2151–2161.
- [22] N. Mehmood, E. Olmos, J.L. Goergen, F. Blanchard, P. Marchal, W. Klöckner, J. Büchs, S. Delaunay, Decoupling of oxygen transfer and power dissipation for the production of pristinamycins by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks, *Biochem. Eng. J.* 68 (2012) 25–33.
- [23] N. Mehmood, E. Olmos, P. Marchal, J.L. Goergen, S. Delaunay, Relation between pristinamycin production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, *Process Biochem.* 45 (2010) 1779–1786.
- [24] J. Büchs, U. Maier, C. Milbradt, B. Zoels, Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 589–593.
- [25] J. Büchs, U. Maier, C. Milbradt, B. Zoels, Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (2000) 594–601.
- [26] J. Büchs, Introduction to advantages and problems of shaken cultures, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 91–98.
- [27] C. Li, J.Y. Xia, J. Chu, Y.H. Wang, Y.P. Zhuang, S.L. Zhang, CFD analysis of the turbulent flow in baffled shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 70 (2013) 140–150.
- [28] C. Peña, M. Millán, E. Galindo, Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks, *Process Biochem.* 43 (2008) 775–778.
- [29] C. Peña, C.P. Peter, J. Büchs, E. Galindo, Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 36 (2007) 73–80.
- [30] C. Reyes, C. Peña, E. Galindo, Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*, *J. Biotechnol.* 105 (2003) 189–198.
- [31] H. Zhang, W. Williams-Dalson, E. Keshavarz-Moore, P.A. Shamlou, Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 41 (2005) 1–8.
- [32] A.J. Tough, J.I. Prosser, Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in submerged batch culture, *Microbiology* 142 (1996) 639–648.
- [33] R.A. Gamboa-Suasnavart, L.D. Marín-Palacio, J.A. Martínez-Sotelo, C. Espitia, L. Servín-González, N.A. Valdez-Cruz, M.A. Trujillo-Roldán, Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 1421–1429.
- [34] T. Kieser, M.T. Moss, J.W. Dale, D.A. Hopwood, Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in “*Streptomyces lividans*”, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 72–80.
- [35] T. Kieser, M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater, D.A. Hopwood, Practical *Streptomyces* Genetics, John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich, United Kingdom, 2000.
- [36] M. Lara, L. Servín-González, M. Singh, C. Moreno, I. Cohen, M. Nimtz, C. Espitia, Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 679–685.
- [37] A. Manteca, R. Alvarez, N. Salazar, P. Yague, J. Sanchez, Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 3877–3886.
- [38] B. Rioseras, M.T. Lopez-García, P. Yague, J. Sanchez, A. Manteca, Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale

- bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production, *Bioresour. Technol.* 151 (2014) 191–198.
- [39] A. Manteca, J. Sanchez, *Streptomyces* development in colonies and soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 2920–2924.
- [40] S. Khaliq, K. Akhtar, M. fzal Ghauri, R. Iqbal, A. Mukhtar Khalid, M. Muddassar, Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702, *Microbiol. Res.* 164 (2009) 469–477.
- [41] E. Jonsbu, M. McIntyre, J. Nielsen, The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*, *J. Biotechnol.* 95 (2002) 133–144.
- [42] H.A. el-Enshasy, M.A. Farid, S. el-Sayed, Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*, *J. Basic Microbiol.* 40 (2000) 333–342.
- [43] E.R. Gouveia, A. Baptista-Neto, C.O. Hokka, J. Badino, Studies on the rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *Braz. J. Chem. Eng.* 17 (2000) 827–834.
- [44] C.R.D. Pamboukian, M.C.R. Facciotti, Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations, *Braz. J. Chem. Eng.* 22 (2005) 31–40.
- [45] K. Dobos, K. Khoo, K. Swiderek, P. Brennan, J. Belisle, Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 2498–2506.
- [46] C. Horn, A. Namane, P. Pescher, M. Riviere, F. Romain, G. Puzo, O. Barzu, G. Marchal, Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32023–32030.
- [47] M.A. Trujillo-Roldán, S. Moreno, G. Espin, E. Galindo, The roles of oxygen and alginate-lyase in determining the molecular weight of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2004) 742–747.
- [48] S.I. Yun, A.R. Yahya, M. Malten, D. Cossar, W.A. Anderson, J.M. Schärer, M. Moo-Young, Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans*, *Can. J. Microbiol.* 47 (2001) 1137–1140.
- [49] T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, J. Büchs, Online respiration activity measurement (OTR, CTR RQ) in shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 17 (2004) 187–194.
- [50] H.F. Zimmermann, T. Anderlei, J. Büchs, M. Binder, Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 1157–1160.
- [51] M. Losen, B. Frolich, M. Pohl, J. Büchs, Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1062–1068.
- [52] T. Anderlei, J. Büchs, Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 157–162.
- [53] U. Maier, M. Losen, J. Büchs, Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks, *Biochem. Eng. J.* 17 (2004) 155–167.
- [54] U. Maier, J. Büchs, Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 99–106.