



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Evaluación de los eventos metabólicos y moleculares en un sistema
termoinducido de *Escherichia coli* recombinante durante la producción del
antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SARA RESTREPO PINEDA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO - AGOSTO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Evaluación de los eventos metabólicos y moleculares en un sistema
termoinducido de *Escherichia coli* recombinante durante la producción del
antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SARA RESTREPO PINEDA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO - AGOSTO, 2016



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de mayo del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna RESTREPO PINEDA SARA con número de cuenta 514353063 con la tesis titulada "Evaluación de los eventos metabólicos y moleculares en un sistema termoinducido de *Escherichia coli* recombinante durante la producción del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*", realizada bajo la dirección del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán:

- Presidente: Dr. Georges Dreyfus Cortes
Vocal: Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros
Secretario: Dr. Enrique García Hernández
Suplente: Dr. Antonino Báez Rogelio
Suplente: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 1 de julio del 2016.



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

- ∞ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.*
- ∞ Al apoyo económico recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario): 589949/308750, a los proyectos de CONACyT 178528, 220795, 247473. Así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPITT)-UNAM IN-209113, IN- 208415.*
- ∞ A mi tutor principal, el Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán y a los estimados miembros del Comité Tutor, el Dr. Enrique García Hernández y el Dr. Julio César Carrero Sánchez.*

Agradecimientos Personales

∞ *Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán, por la dirección de este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Porque desde el inicio creyó en mis capacidades y me abrió las puertas para vivir esta experiencia. Porque nunca ha dejado de exigirme y de enseñarme a hacer Ciencia. Porque es un ejemplo a seguir y cada día aprendo de él. Gracias Mau por ser un excelente tutor, amigo y colega!*

∞ *A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, por su amabilidad y su constante apoyo en este camino. Por compartirme sus conocimientos y tener siempre la disposición de ayudarme!*

∞ *A mis tutores, el Dr. Enrique García y el Dr. Julio César Carrero por su valiosa asesoría y su seguimiento durante la elaboración de este trabajo.*

∞ *A los miembros del jurado, el Dr. Georges Dreyfus, el Dr. Roberto Arreguín, el Dr. Enrique García, el Dr. Antonino Báez y la Dra. Clara Espitia por su cordialidad, su atención y su tiempo para evaluar mi tesis.*

∞ *A mis papás, por su amor y su cuidado:*

A mi mamá porque nunca me dejó desistir, porque me dio alas para volar, porque siempre ha estado ahí para escucharme, porque ha creído en lo que puedo lograr y porque después de esta experiencia nos hemos unido mucho más.

A mi papá, que es la mejor persona que conozco, porque me enseñó a ganarme las cosas por mis propios méritos, por su calma y paciencia, por darme una educación impecable y por hacer tantos esfuerzos para que yo salga adelante.

∞ *A mi hermana Magaly, por sus consejos, por preocuparse tanto por mí. Porque se ha encargado de que me sienta un poquito más cerca de casa. Por ser siempre detallista, atenta y especial conmigo.*

☞ *A mi hermana Durpi por ser mi guía y consejera espiritual, porque sus palabras siempre me sanan y me reconfortan, porque su sabiduría nunca deja de sorprenderme. Porque me enseñó a tenerle amor a lo que hago, a creer en mí y a ser feliz ante cualquier situación.*

☞ *A mi bebé de ojos canela, Simón, que está siempre en mi mente y en mi corazón.*

☞ *A mis amigas y amigos de toda la vida, porque a pesar de este desfase espacio-temporal me siguen acompañando, soportando y me sacan miles de sonrisas. Los quiero mucho...Stephy, Sapu, Puppy, Diana Carolina, Purpu y muchos más.*

☞ *A Giro por ser mi amigo, mi cómplice, mi confidente, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y a enamorarme de este proyecto, por escucharme y secar mis lágrimas en tantas ocasiones.*

☞ *A Ram Gamboa por ser un buen amigo, por transmitirme su energía y su fortaleza, por sus enseñanzas y su ejemplar espíritu de investigador.*

☞ *A Greti, Darki, Saumi, Diegui, la Dra. Perrito, Ram García...porque son amigos increíbles, me hacen los días más felices y rompen mi rutina con sus locuras. Al resto de mis compañeros del laboratorio, los que siguen y algunos que ya se fueron, por que se convirtieron en mi familia mexicana, por su cariño y su ayuda no sólo en lo académico, sino también en lo personal.*

☞ *A quienes van y vienen, dejando huella de alguna manera.*

*Dedico esta tesis a mi familia...que son los que nunca me fallan.
Ellos son mi motor y mi apoyo en cada paso.*

Al Universo...todo llega, todo pasa y todo cambia.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en el Departamento de Biotecnología y Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán. Se agradece el apoyo técnico del Ing. Abel Blancas Cabrera, técnico académico de la Unidad de Bioprocesos.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario): 589949/308750, así como de los proyectos CONACYT 178528, 220795, 247473 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT)-UNAM IN-209113 y IN-208415.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
1. INTRODUCCIÓN	- 3 -
1.1. Expresión de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	- 3 -
1.2. Agregación proteica y formación de cuerpos de inclusión	- 4 -
1.3. Proteína modelo: antígeno ESAT-6 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 5 -
2. ANTECEDENTES	- 9 -
2.1. Sistemas de producción de proteínas recombinantes inducidos por temperatura	- 9 -
2.1.1. Sistema termoinducible λ pR/pL - cl857	- 9 -
2.2. Respuesta de Choque Térmico (HSR) en <i>Escherichia coli</i>	- 10 -
2.2.1. Chaperonas moleculares: control de la calidad conformacional del proteoma	- 13 -
2.3. Convergencia de las respuestas de estrés asociadas a la producción de proteínas recombinantes	- 14 -
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 16 -
4. HIPÓTESIS	- 17 -
5. OBJETIVOS	- 17 -
5.1. Objetivo general	- 17 -
5.2. Objetivos específicos	- 17 -
6. MATERIALES Y MÉTODOS	- 18 -
6.1. Materiales	- 18 -
6.1.1. Cepa Bacteriana	- 18 -
6.1.2. Plásmido	- 18 -
6.1.3. Medios de cultivo	- 19 -
6.1.3.1. Medio complejo	- 19 -
6.1.3.2. Medio definido	- 19 -
6.1.4. Anticuerpos para Western Blot	- 20 -
6.2. Métodos	- 20 -
6.2.1. Preparación y transformación de células de <i>E. coli</i> ATCC 53606 quimiocompetentes	- 20 -
6.2.2. Selección de las clonas transformantes	- 20 -
6.2.3. Generación del banco de trabajo de la cepa <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6)	- 21 -
6.2.4. Preparación de los pre-inóculos	- 21 -
6.2.5. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados	- 21 -
6.2.6. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores	- 22 -
6.2.7. Medición de la absorbancia del cultivo	- 23 -
6.2.8. Determinación de la biomasa como peso seco	- 23 -
6.2.9. Medición de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en matraces agitados	- 23 -
6.2.10. Cuantificación de glucosa	- 23 -
6.2.11. Cuantificación de ácidos orgánicos	- 24 -
6.2.1. Recuperación y purificación de los cuerpos de inclusión	- 25 -
6.2.1.1. Método de recuperación y purificación de cuerpos de inclusión por sonicación y uso de detergentes	- 25 -

6.2.1.2.	Método de recuperación y purificación de cuerpos de inclusión con el agente "BugBuster™"	- 25 -
6.2.2.	Cuantificación de proteína por el método de Bradford	- 26 -
6.2.3.	Análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	- 26 -
6.2.4.	Tinción de las proteínas del gel de poliacrilamida	- 26 -
6.2.5.	Transferencia e Inmunodetección de ESAT-6 por Western Blot	- 26 -
6.2.6.	Inmunodetección de chaperonas moleculares de <i>E. coli</i> por Western Blot	- 26 -
6.2.7.	Caracterización de los cuerpos de inclusión	- 27 -
6.2.7.1.	Digestión proteolítica de los cuerpos de inclusión con Proteínasa K	- 27 -
6.2.7.2.	Solubilización de los cuerpos de inclusión con Cloruro de Guanidinio (GuHCl)	- 27 -
7. RESULTADOS - 28 -		
7.1.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio de cultivo LB usando un sistema termoinducido	- 28 -
7.2.	Comparación del crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados a 30°C usando diferentes medios de cultivo definidos	- 30 -
7.3.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces y biorreactores con medio de cultivo definido usando un sistema termoinducido	- 31 -
7.3.1.	Consumo de glucosa	- 34 -
7.3.2.	Producción de acetato	- 36 -
7.3.3.	Perfiles de oxígeno disuelto (TOD)	- 37 -
7.3.4.	Perfiles de pH	- 39 -
7.4.	Evaluación de la expresión de la proteína ESAT-6 producida por <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados con medio LB	- 40 -
7.4.1.	Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes	- 40 -
7.4.2.	Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster	- 41 -
7.5.	Evaluación de la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 en <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados con medio definido	- 43 -
7.5.1.	Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes	- 43 -
7.5.2.	Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster	- 43 -
7.6.	Evaluación de la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 en <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en biorreactores de 1.2 L con medio definido	- 44 -
7.6.1.	Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes	- 44 -
7.6.2.	Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster	- 45 -
7.7.	Expresión de chaperonas moleculares en cultivos termoinducidos de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactor	- 46 -
7.8.	Caracterización de los CI de ESAT-6 obtenidos en un sistema termoinducido	- 50 -
7.8.1.	Resistencia de los CI de ESAT-6 a la degradación por proteínasa K	- 50 -
7.8.2.	Solubilización de los CI de ESAT-6 con cloruro de guanidinio	- 51 -
8. DISCUSIÓN - 54 -		
8.1.	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores bajo diferentes temperaturas de inducción	- 54 -
8.2.	Consumo de glucosa en cultivos termoinducidos de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido	- 55 -
8.3.	Producción de acetato en cultivos termoinducidos de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido	- 57 -
8.4.	Perfiles de oxígeno disuelto (TOD) en cultivos termoinducidos de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido	- 59 -

8.5.	Evaluación de la expresión de la proteína ESAT-6 producida por <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados y biorreactores. ___	- 61 -
8.6.	Expresión de chaperonas moleculares en cultivos termoinducidos de <i>E. coli</i> ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactor. _____	- 64 -
8.7.	Caracterización de los CI de ESAT-6 obtenidos en un sistema termoinducido _____	- 66 -
8.7.1.	Resistencia de los CI de ESAT-6 a la degradación por proteínasa K _____	- 66 -
8.7.2.	Solubilización de los cuerpos de inclusión de ESAT-6 con cloruro de guanidinio _____	- 68 -
9.	CONCLUSIONES _____	- 70 -
10.	PERSPECTIVAS _____	- 71 -
11.	LITERATURA CITADA _____	- 72 -
12.	ANEXOS _____	-86-

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuerpos de inclusión de *E. coli* productora de Esfingomielinasa D recombinante bajo microscopio electrónico. Izquierda: Secciones transversales de *E. coli* con presencia de cuerpos de inclusión. Derecha: Cuerpos de inclusión purificados por sonicación y lavados con detergentes (ambas fotos fueron tomadas de Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

Figura 2. Distribución de la proteína recombinante G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) entre la fracción soluble (citoplasma) e insoluble (CI) y los porcentajes de la actividad biológica específica en cada fracción (tomada de Peternel *et al.*, 2008a).

Figura 3. Micrografía electrónica de barrido con color artificial de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (crédito para NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases; USA).

Figura 4. Modelo estructural del heterodímero formado por los antígenos ESAT-6 y CFP10 de *Mycobacterium Tuberculosis* (tomada de Abdallah *et al.*, 2007).

Figura 5. Regulación molecular del sistema termoinducible λ pR/pL-cl857 de *E. coli*. A 30°C el represor cl857 se encuentra unido a tres dominios (oL1/oR1, oL2/oR2 y oL3/oR3) de la región operadora de los promotores pR/pL, impidiendo la transcripción (A). Por encima de los 37°C se libera el represor, permitiendo la llegada de la RNA polimerasa y la posterior transcripción del gen de interés (B) (tomada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Figura 6. Simulación por dinámica molecular de la estructura del factor σ^{32} a 30°C y 42°C. Se observa accesibilidad reducida a la región de unión a DnaK (residuos 198-VLYL-201 en amarillo) bajo choque térmico (tomada de Chakraborty *et al.*, 2014).

Figura 7. Mecanismos de acción de chaperonas moleculares en el citoplasma de *E. coli* (tomada de Baneyx & Mujacic, 2004).

Figura 8. Sistema de termoinducción en *E. coli*: relación entre la Respuesta de Choque Térmico (HSR) y la producción de proteínas recombinantes (tomada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Figura 9. Construcción del plásmido pDeltaBlue en fase con el inserto de la secuencia que codifica para la proteína ESAT-6.

Figura 10. Matraces Erlenmeyer convencionales de 250 mL de volumen, cada uno con 50 mL de medio definido Lara y Caspeta (A) o con medio LB (B).

Figura 11. Biorreactor de 1.2 litros conectado al sistema biocontrolador ADI 1010 (*Applikon, Netherlands*).

Figura 12. Cromatograma estándar para la cuantificación de ácidos orgánicos en una columna Aminex® HPX-87H (tomado del boletín "Chromatography Aminex HPLC columns" N°63333 - 2012 de BIO-RAD).

Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio LB a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 0.6-0.7 u.a. (6 h) como indica la flecha.

Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con medio LB a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (○);

cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 0.7-0.8 u.a. (3 h) como indica la flecha.

Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados usando diferentes medios de cultivo. Todas las cinéticas se llevaron a cabo a 30°C. Cultivo en Medio Lara (◇); Medio Lara + casaminoácidos (◆); Medio Caspeta (☆); Medio Caspeta + casaminoácidos (★); Medio LB (●).

Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.4-1.7 u.a. (5 h) como indica la flecha.

Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h) como indica la flecha.

Figura 18. Cinética de crecimiento de biomasa para la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados (A) y biorreactores (B) con medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

Figura 19. Consumo de glucosa de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados con medio definido usando un sistema termoinducible. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Figura 20. Consumo de glucosa de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con medio definido usando un sistema termoinducible. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Figura 21. Producción de acetato de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados usando medio definido. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Figura 22. Producción de acetato de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L usando medio definido. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Figura 23. Perfil de TOD de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. La medición se hizo online con el equipo FIBOX 3 usando el sensor PSt3 (PreSens). Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Figura 24. Perfiles de TOD de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactor de 1.2 L con 1L de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. Línea sólida (—): cultivo sin inducción a 30°C; línea punteada (---): cultivo con inducción a 39°C y línea segmentada (---): cultivo inducción a 42°C. La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Figura 25. Perfil de pH de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Figura 26. Perfil de pH de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con 1 L de medio de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. Línea sólida (—): cultivo sin inducción a 30°C; línea punteada (---): cultivo con inducción a 39°C y línea segmentada (---): cultivo inducción a 42°C. La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Figura 27. Expresión de ESAT-6 (~11.64 kDa) en un sistema termoinducido usando matraces agitados con medio LB. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % teñido con azul de Coomassie (A) y se hizo el Western Blot de ESAT-6 empleando anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 2: Marcador de peso molecular; carril 3 y 4: Cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) sin inducir; carril 5: Proteína total soluble (PTS) de cultivos de la cepa transformada inducida a 42°C y carril 6: CI a 39°C. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

Figura 28. Expresión de ESAT-6 (~11.64 kDa) en un sistema termoinducido usando matraces agitados con medio LB. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 16% teñido con azul de Coomassie (A) y se hizo el Western Blot de ESAT-6 empleando anti-ESAT-6 (B). En el gel, carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: Lisado celular total de *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 4: Vacío; carril 5: CI a 39°C de la clona A; carril 6: PTS clona A; carril 7: Vacío; carriles 8, 9 y 10: CI de la clona C₄. En el Western blot, carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 4: Vacío; carril 5: CI a 39°C de la clona A; carril 6: Vacío; carril 7: PTS de la clona C₄; carril 8: vacío y carril 9: CI a 39°C de la clona C₄ y carril 10: vacío. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

Figura 29. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC-53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en matraces agitados con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 2: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 3: Marcador de peso molecular; carriles 4 y 5: PTS y CI de la sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 6 y 7: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 8 y 9: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

Figura 30. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC-53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en matraces agitados con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular; carriles 5 y 6: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 7 y 8: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 9 y 10: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

Figura 31. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en biorreactor de 1.2 L con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 2: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 3: vacío; carril 4 Marcador de peso molecular; carril 5 y 6: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 7 y 8: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 9 y 10: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

Figura 32. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en biorreactor de 1.2 L con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4 y 5: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 6 y 7: PTS y CI de la

cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 8 y 9: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente; carril 10: vacío. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

Figura 33. Inmunodetección de DnaK en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L con 1.0 L (**B**) de medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaK a ~70 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

Figura 34. Inmunodetección de DnaJ en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaJ a ~41 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

Figura 35. Inmunodetección de GroEL en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroEL ~60 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

Figura 36. Inmunodetección de GroES en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroES ~10 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

Figura 37. Cinética de degradación proteolítica de 50 µg/mL de CI de ESAT-6 cosechados a las 25 h a partir de cultivos en matraces a diferentes temperaturas de inducción. Para la degradación se empleó proteína K a una concentración final de 12 µg/mL. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

Figura 38. Cinética de degradación proteolítica de 50 µg/mL de CI de ESAT-6 cosechados a las 25 h a partir de cultivos en biorreactores a diferentes temperaturas de inducción. Para la degradación se empleó proteína K a una concentración final de 12 µg/mL. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ).

Figura 39. Perfil de solubilización de CI de ESAT-6 cosechados al tiempo final de cultivos en matraces agitados termoinducidos usando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína solubilizada después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h, cuantificada por Bradford. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

Figura 40. Perfil de solubilización de CI de ESAT-6 cosechados al tiempo final de cultivos en biorreactores termoinducidos usando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína solubilizada después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h, cuantificada por Bradford. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ).

Figura 41. Principales rutas metabólicas de *E. coli* involucradas en el consumo aerobio de glucosa, síntesis de acetato y dióxido de carbono (CO₂). El consumo de glucosa se realiza principalmente mediante la vía del sistema fosfotransferasa (PTS), que genera de forma simultánea piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP). El acetato se forma a partir de piruvato por acción de la piruvato oxidasa y de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa. La PEP carboxilasa es la vía anaplerótica necesaria para el reabastecimiento de los intermediarios del ciclo del TCA consumidos para la formación de biomasa (tomado de Eiteman & Altman, 2006).

Figura 42. Ciclo de TCA y ruta alterna del glioxilato en *E. coli* (tomado de Phue & Shiloach, 2004).

Figura 43. Representación del desarrollo de los perfiles de OTR (negro) y TOD (azul) en cultivos aerobios. Cuando el oxígeno suministrado no es consumido en su totalidad, el sistema opera siempre por debajo de la OTR máx y la TOD permanece superior a cero (**A**). La OTR se incrementa con la respiración de los microorganismos hasta alcanzar el límite que el sistema es capaz de proveer bajo condiciones específicas de operación (**B**) (modificado de Maier & Büchs, 2001).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas en *E. coli* (tomada de Lara, 2011 – modificada de Graumann & Premstaller, 2006).

Tabla 2. Resumen de algunas proteínas obtenidas con el uso del sistema termoinducible λ pL/pR-cl857 (modificada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Tabla 3. Algunos antígenos proteínicos usados en el diagnóstico de la tuberculosis (modificada de Palma & Bocanegra, 2007).

Tabla 4. Preparación medio de cultivo complejo Luria – Bertani (Sezonov *et al.*, 2007).

Tabla 5. Preparación medios de cultivo definidos.

Tabla 6. Anticuerpos anti-chaperonas de *E. coli* usados para realizar Western blot de cultivos termoinducidos.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando diferentes medios definidos en matraces agitados a 30°C.

Tabla 8. Parámetros cinéticos representativos de los cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio definido.

Tabla 9. Rendimiento de ESAT-6 recombinante en los CI de cultivos termoinducidos a 39°C usando matraces agitados de 250 mL con medio complejo LB. Se comparan los CI purificados por dos métodos diferentes: sonicación y agente BugBuster.

Tabla 10. Rendimientos de ESAT-6 recombinante en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido a 39°C y 42°C en matraces agitados de 250 mL y biorreactores de 1.2 L con medio definido. Los CI se purificaron usando el agente BugBuster.

Tabla 11. Resumen de los inmunodetecciones para las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES en las fracciones soluble (PTS) e insoluble (CI) de cultivos termoinducidos de *E. coli* realizados en matraces y biorreactores conteniendo medio definido.

Tabla 12. Algunos rendimientos de la proteína ESAT-6 producida en cepas recombinantes de *E. coli* usando diferentes estrategias de cultivo.

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

° C	Grados centígrados
μ	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)
μ _s	Velocidad específica de crecimiento antes de inducir (h ⁻¹)
μ _i	Velocidad específica de crecimiento después de inducir (h ⁻¹)
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
AcO	Acetato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BSA	Albúmina de suero bovino
C ₄	Clona 4
CI	Cuerpos de inclusión
C-terminal	Carboxilo terminal de una cadena peptídica
Da	Daltones
DO	Densidad Óptica (unidades de absorbancia)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros)
g	Gramo
glc	Glucosa
GuHCL	Cloruro de guanidinio
h	Hora
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
hFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos humano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
hPPI	Pre-proinsulina humana
HSP	Heat Shock Protein
HSR	Heat Shock Response (Respuesta de Choque Térmico)
IEF	Buffer para muestras de isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
kDa	Kilo-Daltones
L	Litro
LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
M	Molar
Mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N°	Número
nm	Nanómetros
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
N-terminal	Amino terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato de sodio

pDB	Plásmido Delta-Blue
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PPD	Prueba de la tuberculina
PTS	Proteína total soluble
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qS	Velocidad específica de consumo de glucosa ($\text{g}_{\text{glc}}/\text{g}_{\text{células}} \cdot \text{h}$)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Tb	Tuberculosis
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos/ciclo de Krebs
TBS	Buffer Tris Salino
TOD	Tensión de oxígeno disuelto (%)
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
u.a.	Unidades de absorbancia
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
$X_{\text{máx}}$	Concentración de biomasa máxima (g/L)
Y_{xs}	Rendimiento de biomasa con respecto a la glucosa consumida ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{glc}}$)

RESUMEN

En las últimas décadas, se ha estudiado ampliamente la producción de proteínas recombinantes de interés farmacéutico o industrial en *Escherichia coli*, con el fin de encontrar estrategias que permitan aumentar los rendimientos del proceso y disminuir los costos de producción a gran escala. El uso de sistemas de expresión inducidos por temperatura es una de las estrategias más estudiadas a nivel biotecnológico. Estos sistemas no requieren la adición de inductores químicos como el IPTG, que puede ser costoso y tóxico para las células y para los humanos. Otra ventaja es que se minimizan riesgos de contaminación por manipulación del cultivo. Sin embargo, el estrés generado por el aumento de temperatura sumado a la producción de proteína recombinante, muchas veces pueden afectar negativamente el crecimiento celular.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar el crecimiento y los niveles de producción del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* y de algunas proteínas asociadas a la respuesta de choque térmico en una cepa recombinante de *E. coli*, usando un sistema de expresión inducido por temperatura. Adicionalmente, se evaluaron algunas características de los cuerpos de inclusión de ESAT-6 obtenidos por dos métodos distintos (físico y químico). Para lograr este objetivo se llevaron a cabo cultivos sumergidos de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL y en biorreactores de 1.2 L, probando medios de cultivo y temperaturas de inducción diferentes. La expresión de las proteínas fue determinada en geles SDS-PAGE y Western blot, mientras que los agregados fueron sometidos a degradación enzimática con proteínasa K y desnaturalización con cloruro de guanidinio para determinar su estabilidad.

La cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en todos los cultivos inducidos térmicamente (tanto a 39°C como a 42°C) alcanzó una biomasa menor que en los cultivos sin inducir (a 30°C). Además, en matraces agitados con medio definido no se consumió totalmente la glucosa, el acetato se acumuló con el tiempo y hubo limitación de oxígeno, lo que pudo provocar una disminución en la densidad óptica al final del cultivo. Contrariamente, en los biorreactores donde el pH y la concentración de oxígeno disuelto en el medio estaban controlados, la glucosa se consumió por completo y el acetato previamente acumulado se asimiló como una segunda fuente de carbono, lo que permitió mantener la biomasa constante hacia el final del cultivo. Además, se encontró que en un sistema inducido por temperatura tanto en matraces agitados como en biorreactor, se acumuló la proteína recombinante ESAT-6 en forma de cuerpos de inclusión (incluso en aquellos cultivos sin termoinducción) y hubo expresión diferencial de las chaperonas. Por ejemplo, DnaK se expresó preferencialmente en las fracciones solubles obtenidas bajo termoinducción a 39°C y 42°C, mientras que GroEL estuvo asociada mayoritariamente a los cuerpos de inclusión en todas las temperaturas de cultivo. Finalmente, se encontró que los cuerpos de inclusión de ESAT-6 obtenidos tras termoinducción fueron menos resistentes a la degradación por proteínasa K y más sensibles a la solubilización por agentes caotrópicos que aquellos formados a 30°C.

ABSTRACT

The production of recombinant proteins of pharmaceutical or industrial interest in *Escherichia coli* has been extensively studied to find strategies to increase yields and reduce costs of production at large scale. The use of expression systems induced by temperature is one of the most studied. The thermo-inducible systems do not require the addition of chemical inducers like IPTG, which may be expensive and toxic to cells and humans. Other advantage of this system is that handling-associated contamination risks are minimized. However, the stress generated by the temperature increase used for the production of recombinant protein can often affect negatively cell growth.

The main objective of this study was to analyze the growth and production levels of the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* and some proteins associated with heat shock response in a recombinant strain of *E. coli*, using an expression system induced by temperature. Additionally, some characteristics of the inclusion bodies of ESAT-6 obtained by two different methods (physical and chemical) were also evaluated. To achieve this goal, submerged culture of the recombinant strain *E. coli* ATCC 53606 (PDB + ESAT-6) in 250 mL shake flasks and 1.2 L bioreactors were carried out, testing different culture media and induction temperatures. The expression of proteins was determined by SDS-PAGE and Western blot. The protein aggregates were subjected to enzymatic degradation with proteinase K and denaturation with guanidinium chloride to determine their stability.

E. coli ATCC 53606 (PDB + ESAT-6) cultures induced at 39°C and 42°C reached lower biomass than cultures without thermal induction (30°C). In addition, in shake flasks cultures with defined medium, the glucose was not consumed completely, acetate was accumulated over time and there was oxygen limitation, which could be the cause of the fall in the biomass obtained at the end of culture. Conversely, bioreactor cultures where pH and dissolved oxygen concentration was controlled, the glucose was consumed completely and the acetate was assimilated as a second carbon source, which maintained culture biomass constant through the end of culture. Furthermore, we found that the recombinant protein ESAT-6 produced in a thermoinducible system in shake flasks and bioreactors was accumulated as inclusion bodies (even in non-induced cultures) and chaperones were differentially expressed. For example, DnaK was expressed in the soluble fraction obtained under heat induction at 39°C and 42°C preferentially, while GroEL was present in inclusion bodies at all temperatures. Finally, the ESAT-6 inclusion bodies obtained after heat induction were less resistant to degradation by proteinase K and more sensitive to solubilization by chaotropic agents than those formed at 30°C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La expresión de proteínas usando ADN recombinante es una estrategia ampliamente usada tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial, para producir proteínas de interés en grandes cantidades y a menores costos (Neubauer & Winter, 2001). Para la producción recombinante el organismo más empleado es la bacteria *Escherichia coli*, que comparada con otros sistemas de expresión ofrece innumerables ventajas, incluyendo su rápido y abundante crecimiento en sustratos económicos, la posibilidad de realizar fermentaciones de alta densidad celular, el relativamente fácil escalamiento de los procesos y la disponibilidad de una gran variedad de promotores fuertemente inducibles (Baneyx, 1999; Babu *et al.*, 2000; Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Además, debido a su larga historia como sistema modelo, la genética de *E. coli* ha sido bien caracterizada y muchas herramientas de ingeniería genética han sido desarrolladas para facilitar la clonación y expresión de genes en este organismo (Baneyx & Mujacic, 2004).

Una aparente desventaja es la tendencia de esta bacteria a formar agregados de la proteína heteróloga, llamados cuerpos de inclusión (CI). En la Tabla 1, se muestran ejemplos de proteínas de interés farmacéutico, de las cuales algunas pueden formar cuerpos de inclusión durante su proceso de producción.

Tabla 1. Algunas proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas en *E. coli* (tomada de Lara, 2011 – modificada de Graumann & Premstaller, 2006).

MOLÉCULA RECOMBINANTE	OBSERVACIONES	COMPAÑÍAS PRODUCTORAS
Activador del tejido del plasminógeno	Forma cuerpos de inclusión	<i>Roche</i>
Insulina humana y análogos	Forma cuerpos de inclusión	<i>Eli Lilly, Aventis, Probiomed</i>
Hormona del crecimiento humano	Forma cuerpos de inclusión o es acumulada en periplasma	<i>Genentech, Eli Lilly, Pfizer, Novo, Nordisk, Probiomed y otros</i>
Calcitonina de salmón	Secretada	<i>Unigene</i>
Factor estimulante de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)	Forma cuerpos de inclusión	<i>Probiomed</i>
Factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF)	Forma cuerpos de inclusión	<i>Amgen, Probiomed</i>
Hormona paratiroidea humana	Forma cuerpos de inclusión	<i>Eli Lilly</i>
Asparaginasa	Componente de vacuna combinada	<i>Merck</i>
Interferón β -1b	Forma cuerpos de inclusión	<i>Schering AG, Chiron</i>
Interferón γ -1b	Forma cuerpos de inclusión	<i>Genentech, Intermune</i>

1.2. Agregación proteica y formación de cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión (CI) son partículas electrodensas que contienen agregados de proteína recombinante parcialmente estructurada (Taylor *et al.*, 1986). Pueden ser fácilmente visibles bajo el microscopio electrónico (Figura 1), ya que tienen un tamaño entre 50 a 800 nm e incluso pueden alcanzar hasta 1 μm de diámetro (Bowden *et al.*, 1991; Peternel *et al.*, 2008; Margreiter *et al.*, 2008).

En un principio los CI se consideraban agregados amorfos, pero se ha demostrado que tienen segmentos ordenados con una estructura de tipo β -amiloide, la cual puede estar determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés (García-Fruitós & Villaverde, 2010; García-Fruitós *et al.*, 2011). Además, debido a esta característica tienen afinidad por colorantes de tinción amiloidogénica como la Tioflavina-T y el Rojo Congo, pudiendo caracterizarse estructuralmente por métodos espectrofotométricos (Przybycien, *et al.*, 1994; Carrió *et al.*, 2005; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014). Las características de los CI van a depender de las condiciones del proceso tales como el pH, la temperatura, el tiempo de cultivo, la concentración de inductor, entre otras (Strandberg & Enfors, 1991; Jürgen *et al.*, 2010; Baig *et al.*, 2014; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

La formación de los CI es un fenómeno dinámico que ocurre principalmente cuando hay condiciones de estrés, sobre-expresión de la proteína recombinante o escasez de las proteínas de choque térmico (como DnaK/J, GroE/L, IbpA e IbpB, entre otras), las cuales ayudan a replegar, impedir el mal plegamiento o degradar a las proteínas sobre-expresadas (Gatti-Lafranconi, 2011; Mitraki & King, 1989; Valdez-Cruz, *et al.*, 2011).

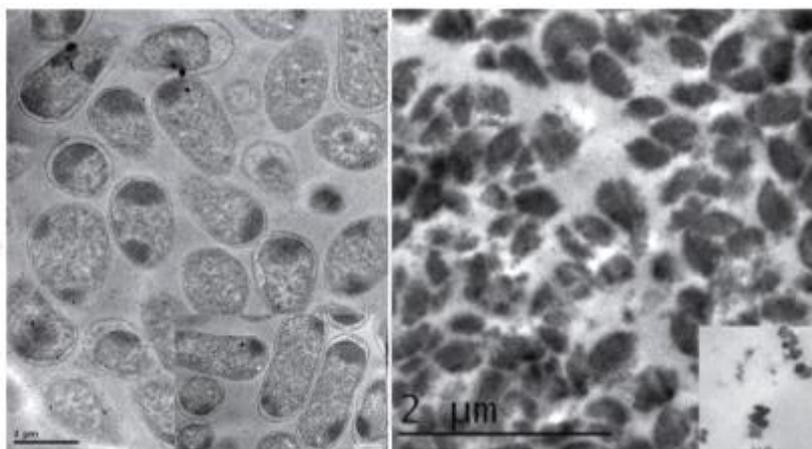


Figura 1. Cuerpos de inclusión de *E. coli* productora de la proteína esfingomielinasa D recombinante bajo microscopio electrónico. Izquierda: Secciones transversales de *E. coli* con presencia de cuerpos de inclusión. Derecha: Cuerpos de inclusión purificados por sonicación y lavados con detergentes (ambas fotos fueron tomadas de Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

Durante muchos años la formación de los cuerpos de inclusión fue un evento indeseado, pues se consideraban desechos sin actividad biológica y se buscaba obtener la proteína recombinante de forma soluble (Ferrer-Mirallés *et al.*, 2009). Hoy en día, se sabe que puede obtenerse proteína heteróloga biológicamente activa aunque se encuentre parcialmente plegada dentro de los CI (García-Fruitós *et al.*, 2007; García-Fruitós, 2010). Se ha reportado que hasta el 90% del cuerpo de inclusión es proteína recombinante, acompañado minoritariamente de otras proteínas endógenas, lípidos y restos de material genético (Rinas & Bailey, 1992; Carrió & Villaverde, 2002; Carrió & Villaverde, 2003; Margreiter *et al.*, 2008).

Como un ejemplo de la actividad de una proteína recombinante agregada en forma de CI, Peternel y colaboradores (2008) reportaron que hasta el 98% de la proteína recombinante G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) producida en *E. coli*, quedaba en la fracción insoluble y dentro de esta fracción hasta el 50% de la proteína era activa (Figura 2). Sin embargo, en el mismo

trabajo se encontró que para otras proteínas, como la GFP (Proteína verde fluorescente) recombinante, aunque el 77% quedó en los CI sólo un 6% fue activa o también para la forma N-truncada de la linfotoxina α , hasta el 91% quedó en la fracción insoluble pero sólo el 0.1% mantuvo su actividad biológica. Esto indica que tanto la distribución de la proteína heteróloga entre la fracción soluble e insoluble, así como su actividad biológica específica, varían dependiendo de la proteína (Peternel *et al.*, 2008a).

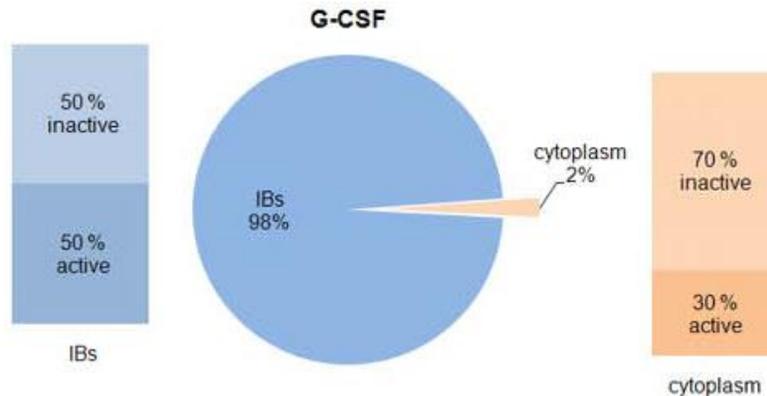


Figura 2. Distribución de la proteína recombinante G-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) entre la fracción soluble (citoplasma) e insoluble (CI) y los porcentajes de la actividad biológica específica en cada fracción (tomada de Peternel *et al.*, 2008a).

Como al interior de los CI las proteínas recombinantes se encuentran parcialmente plegadas y en agregados grandes, pueden sufrir menor degradación por parte de proteasas citoplasmáticas, favoreciendo la acumulación y estabilidad del producto (Kane & Hartley, 1988). Cheng y colaboradores (1981) examinaron la producción de un alelo mutante (X90) de la β -galactosidasa que es rápidamente degradado en *E. coli* silvestre. En contraste a lo esperado, las moléculas de X90 sintetizadas en exceso en una cepa de *E. coli* hospedera fueron altamente estables y esto lo atribuyen a la formación de agregados de proteína, ya que dentro de ellos los sitios de corte de la proteína son relativamente inaccesibles, previniendo el corte endoproteolítico (Cheng *et al.*, 1981).

No obstante, para la recuperación y purificación de las proteínas recombinantes, los CI deben ser separados por ruptura celular, lavados, centrifugados y solubilizados a altas concentraciones de agentes caotrópicos, como la urea y el cloruro de guanidinio (Thomas & Baneyx, 1996; Margreiter *et al.*, 2008; Burgess, 2009). En este proceso de solubilizar, renaturalizar y purificar a la proteína recombinante, muchas veces se corre el riesgo de perder su actividad biológica (Singh & Panda, 2005). Por eso, en los últimos años se han desarrollado protocolos que requieren pocos pasos para el tratamiento de los CI y que no afecten la actividad biológica de las proteínas (Hoffmann & Rinas, 2004; Burgess, 2009; Baig *et al.*, 2014). Actualmente, muchos bioprocesos a gran escala consideran la producción de proteínas recombinantes en forma de CI como una estrategia para obtener altos rendimientos (Khalilzadeh, *et al.*, 2008).

1.3. Proteína modelo: antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por el bacilo aerobio *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 3). Aunque la tuberculosis pulmonar es la forma más común (hasta el 85% de los casos) e importante en términos epidemiológicos, puede afectar también a otras partes del cuerpo como el tejido osteoarticular, los ganglios linfáticos, el tracto gastrointestinal, entre otros (Sharma & Mohan, 2004).

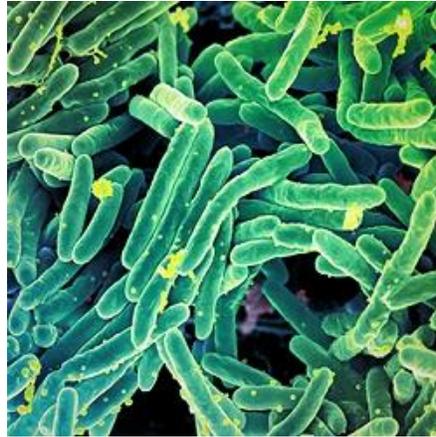


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido con color artificial de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (crédito para NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases; USA).

La tuberculosis se ha convertido en las últimas décadas en una de las enfermedades transmisibles más mortales. En el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que nueve millones de personas en el mundo enfermaron de tuberculosis y que 1.5 millones, de los cuales 360,000 eran VIH-positivos, murieron por esta causa. Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, afectando principalmente a niños, mujeres y pacientes inmunodeprimidos (OMS: Reporte Global de Tuberculosis, 2014). La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad debido a un agente infeccioso, después del SIDA (Araujo *et al.*, 2008; Pimienta *et al.*, 2012).

Hoy en día crece la alarma por la propagación mundial de cepas de *Mtb* multirresistentes (OMS: Reporte Global de Tuberculosis, 2013), es decir, aquellas cepas que no responden a los fármacos de primera línea que se emplean en su tratamiento (Pimienta *et al.*, 2012). En *Mtb* la resistencia adquirida a antibióticos clásicos como la rifampicina y la isoniazida es causada principalmente por mutaciones espontáneas en genes cromosómicos (Da Silva y Palomino, 2011; Kochi *et al.*, 1993). Además, debido a que la pared celular de este bacilo está constituida principalmente por ácidos micólicos hidrofóbicos que llegan a conformar ~50% de su peso seco, presenta baja permeabilidad a antibióticos (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011, Gorocica *et al.*, 2005). La OMS estima que alrededor de 50 millones de personas están infectadas con cepas de *Mtb* resistentes a las drogas anti-tuberculosas (Araujo *et al.*, 2008).

Adicionalmente, la tuberculosis afecta también a animales, en especial a ganado bovino (Waters *et al.*, 2012 y Van Pinxteren *et al.*, 2000), convirtiéndose en un importante problema de salud animal que cuenta con aproximadamente 50 millones de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* a nivel mundial (Chen *et al.*, 2014). Debido a esto, las pérdidas económicas por el sacrificio de cabezas de ganado y la amenaza zoonótica que representa la tuberculosis bovina, son otro aspecto de alerta en muchos países (Aagaard *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2013).

En 1921, se desarrolló la primera vacuna contra la tuberculosis, proveniente de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, conocida como BCG o Bacilo Calmette-Guérin (Oettinger *et al.*, 1999). Aunque está claro que las personas vacunadas tienen menor riesgo de desarrollar las formas extrapulmonares de la enfermedad, especialmente en casos de tuberculosis meníngea y miliar en niños (Trunz *et al.*, 2006), las estadísticas demuestran que en adultos la vacuna tiene una eficacia variable, que va desde el 96% hasta la nulidad para casos de tuberculosis pulmonar (Rodrigues & Smith, 1990).

Por otra parte, los métodos de diagnóstico de la tuberculosis también presentan ciertas dificultades. La prueba más usada para el diagnóstico de la enfermedad latente es la prueba de la tuberculina conocida como prueba PPD (Derivado Proteico Purificado). La PPD es una mezcla pobremente

definida de diferentes antígenos, los cuales están presentes tanto en cepas patógenas (*Mtb* y *M. bovis*) como también en varias micobacterias no tuberculosas (NTM) del ambiente y en la cepa vacunal BCG (Aagaard *et al.*, 2010). Por esta razón, esta prueba no puede distinguir eficazmente entre individuos infectados, individuos sanos que han sido vacunados con BCG e individuos que han estado en contacto con NTM (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2008 y Pimienta *et al.*, 2012).

Uno de los métodos inmunológicos propuestos para el diagnóstico de la tuberculosis es la detección de anticuerpos séricos formados contra antígenos de *Mycobacterium* (Palma & Bocanegra, 2007). Por lo tanto, la identificación de antígenos específicos del bacilo es una alternativa para el diseño de vacunas y plataformas diagnósticas más sensibles (Mustafa *et al.*, 2008; Seghrouchni *et al.*, 2009). Los antígenos pueden ser proteínas, polisacáridos, lípidos o alguna molécula que forma parte de un organismo y que tiene la capacidad de desencadenar una reacción antigénica o inmune en otro organismo. Una de las ventajas de emplear antígenos proteicos para el inmunodiagnóstico es que éstos pueden producirse mediante la tecnología del ADN recombinante, lo que permite su expresión a gran escala con bajo costo y se pueden purificar por pasos simples para tener productos libres de contaminantes (Ocampo *et al.*, 2013). En la Tabla 2 se reúnen algunos de los principales antígenos proteicos descritos y estudiados de *Mtb*.

Tabla 2. Algunos antígenos proteínicos usados en el diagnóstico de la tuberculosis (modificada de Palma & Bocanegra, 2007).

ANTÍGENO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	APLICACIÓN	REFERENCIA
ESAT-6	27%	-	Tb latente	Silva <i>et al.</i> , 2003
CFP-10	25%	97%	Tb BAAR-	Dillon <i>et al.</i> , 2000
16-kDa	57%	-	Tb VIH +	Uma Devi <i>et al.</i> , 2003
30-kDa	61%	95%	Tb pulmonar	Sada <i>et al.</i> , 1990
38-kDa	68%	96%	Tb pulmonar	Espitia <i>et al.</i> , 1989
TB16.3	98%	-	Tb VIH -	Welding <i>et al.</i> , 2005
	88%	-	Tb VIH +	Welding <i>et al.</i> , 2005

BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes; Tb: tuberculosis; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

En los últimos años, se ha encontrado que el antígeno inmunodominante ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target-6kDa), propio de *Mtb*, posee gran potencial para el diseño de herramientas diagnósticas y de mejores e innovadoras vacunas contra la tuberculosis (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Brock *et al.*, 2001; Brodin *et al.*, 2004). ESAT-6 es una proteína pequeña de 95 aminoácidos, con una masa molecular real de 9,903.87 Da y un pI entre 4.0 y 4.5 (Sorensen *et al.*, 1995). Esta proteína se encuentra codificada por el gen *EsxA* (*esat6*) que está en la región RD1 del genoma de *Mtb* (Berthet *et al.*, 1998). Los aminoácidos de ESAT-6 están altamente conservados entre micobacterias con identidades reportadas de de 100%, 98%, 92%, 72% y 38% para *M. bovis*, *M. kansaii*, *M. marinum*, *M. smegmatis* y *M. leprae*, respectivamente (Teutschbein *et al.*, 2009).

La proteína ESAT-6 tiene una estructura secundaria helicoidal formada un motivo de hélice-asa-hélice, anti-paralelas entre sí y mediante las cuales puede establecer fácilmente interacciones hidrofóbicas con otras proteínas. La estructura secundaria de ESAT-6 se compone por 56% de α -hélices, 7% de hojas β , 12% de giros y el 25% no estructurado (Renshaw, *et al.*, 2002).

ESAT-6 usualmente forma un heterodímero con CFP10 termodinámicamente estable (Figura 4), otro antígeno de *Mtb* (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Brodin *et al.*, 2004; Abdallah, *et al.*, 2007). La formación de este dímero parece ser indispensable para que se presente la secreción de ambas proteínas al medio y además, se ha encontrado que la combinación de ambos antígenos podría presentar mayor poder antigénico que cuando se administran por separado, alcanzando mayor especificidad que la vacuna BCG (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Pimienta *et al.*, 2012).

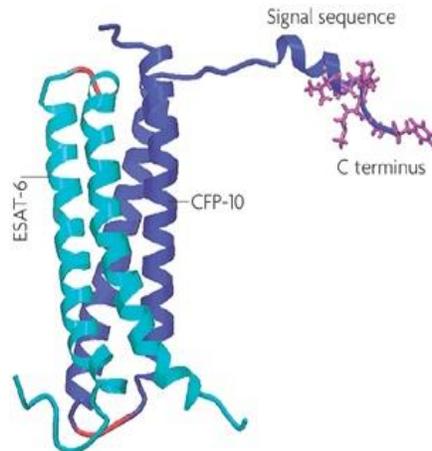


Figura 4. Modelo estructural del heterodímero formado por los antígenos ESAT-6 y CFP10 de *Mycobacterium Tuberculosis* (tomada de Abdallah *et al.*, 2007).

En 1996, gracias al análisis molecular de las diferencias genéticas entre *M. bovis* virulenta y la cepa atenuada *M. bovis* BCG, se identificó que la región RD1 de 9.5 Kb que contiene el gen que codifica para ESAT-6, fue eliminada o deletada de todas las subcepas BCG pero permanece en las cepas virulentas. Así, el uso del antígeno ESAT-6 para la detección de personas con tuberculosis puede ser una opción frente a la prueba PPD (Mahairas *et al.*, 1996; Oettinger *et al.*, 1999; Abdallah *et al.*, 2007; Hanif *et al.*, 2010).

Además, se ha demostrado que el antígeno ESAT-6 participa en una potente respuesta celular inmune caracterizada por el estímulo de las células T de pacientes con tuberculosis activa. ESAT-6 es reconocida por las células T durante la infección temprana (Ravn *et al.*, 1999; Brodin *et al.*, 2004), tanto en humanos como en ratones (Andersen *et al.*, 1995) y en ganado bovino (Pollock *et al.*, 1997; Vutla *et al.*, 2011). De igual forma, muchos estudios han demostrado que ESAT-6 estimula la producción del interferón gamma (INF- γ) a partir de la memoria inmune de los linfocitos T (Van Pinxteren *et al.*, 2000; Brock *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2008; Pimienta *et al.*, 2012) y participa en el incremento de los niveles de las interleucinas IL-4 y IL-10, que actúan como anti-inflamatorios (Torabi *et al.*, 2013), contribuyendo al desarrollo de la inmunidad antituberculosa. Esta fuerte antigenicidad de ESAT-6 puede utilizarse para elaborar diferentes ensayos diagnósticos, por ejemplo "skin test" (Hanif *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014) o pruebas ELISA (Pimienta *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistemas de producción de proteínas recombinantes inducidos por temperatura

Dentro de las estrategias empleadas para mejorar los procesos de producción de proteínas recombinantes se destaca el uso de sistemas de expresión inducidos por temperatura (Caulcott & Rhodes, 1986). La termoinducción es una estrategia que consta de dos fases de cultivo: una etapa inicial de crecimiento del microorganismo a temperatura moderada (28-30°C, generalmente) y una etapa posterior de producción en la cual se incrementa la temperatura del cultivo por encima de 37°C (Caspeta *et al.*, 2013; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Este sistema de inducción térmica tiene múltiples ventajas. En primer lugar, se evita el uso de medios especiales y la adición de antibióticos o inductores químicos como el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), que resultan ser costosos y tóxicos para las células y para los humanos. A nivel industrial, los inductores químicos deben ser completamente eliminados del producto y de los efluentes finales, implicando más pasos y costos en los procesos de purificación (Makrides, 1996; Lara, 2011). En segundo lugar, se minimizan riesgos de contaminación por manipulación del cultivo, ya que la temperatura se puede controlar externamente sin tener que poner en riesgo la esterilidad y estabilidad del sistema (Remaut *et al.*, 1981; Caspeta *et al.*, 2009; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

2.1.1. Sistema termoinducible λ pR/pL - cI857

Existen diversos tipos de sistemas termoinducibles, basados tanto en operones presentes de manera natural en los microorganismos productores o bien, basados en promotores y represores de fagos específicos (Palomares *et al.*, 2004). El sistema termoinducible utilizado en este trabajo es el λ pR/pL - cI857, el cual está basado en la inserción de un gen de interés en diferentes vectores que contengan los promotores fuertes pR y/o pL y el represor mutante termolábil cI857 del bacteriófago λ (Villaverde *et al.*, 1993; Menart *et al.*, 2003).

El represor termolábil cI857 proviene de la proteína cI del bacteriófago λ , la cual consta de dos dominios que participan en la regulación de los genes líticos y lisogénicos del fago, actuando como una especie de switch entre ambos ciclos (Maniatis *et al.*, 1973; Ptashne *et al.*, 1980; Dodd *et al.*, 2001). En 1966, Margaret Lieb hizo una mutación en la secuencia de cI, cambiando el residuo alanina (Ala) 66 por una treonina (Thr). Se descubrió que esta mutante mantenía a bajas temperaturas las mismas propiedades del tipo silvestre, pero se hacía inestable al aumentar la temperatura (Lieb, 1966; Valdez-Cruz *et al.*, 2010). La Ala 66 se encuentra ubicada en el extremo N-terminal de la proteína, envuelta en un core hidrofóbico de unión al ADN. Al reemplazar este aminoácido por una Thr de mayor tamaño y polaridad que la Ala, se desestabilizan las interacciones hidrofóbicas locales, lo que provoca la inestabilidad de la proteína a temperaturas superiores a 37°C (Lieb, 1981; Nauta *et al.*, 1997). Este hallazgo abrió la posibilidad de regular físicamente la afinidad de enlace de cI857 a los promotores λ pR/pL y fue el comienzo de su exploración biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

La expresión del gen es eficientemente regulada por el represor cI857 a temperaturas por debajo de 37°C, pues forma un octámero para interactuar con los dominios de la región operadora de los promotores pR/pL, bloqueando la transcripción de la RNA polimerasa (Figura 5). Al elevar la temperatura del cultivo, por arriba de 37°C, se libera el represor y permite la transcripción del gen de interés (Villaverde *et al.*, 1993; Dood *et al.*, 2004; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

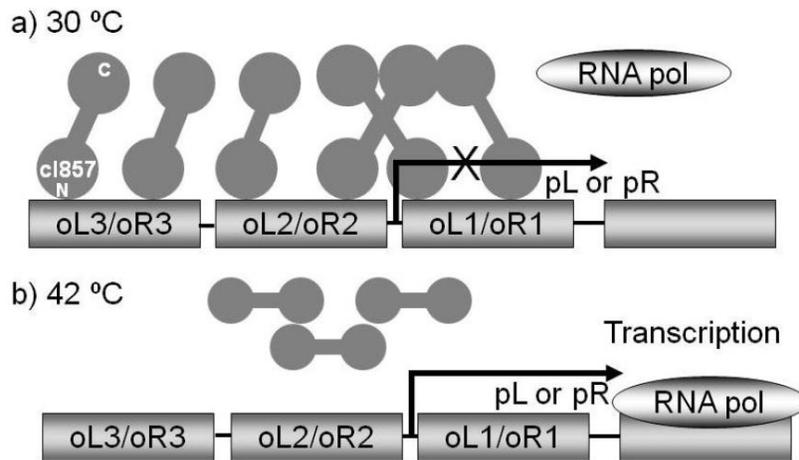


Figura 5. Regulación molecular del sistema termoinducible λ pR/pL-cl857 de *E. coli*. A 30°C el represor cl857 se encuentra unido a tres dominios (oL1/oR1, oL2/oR2 y oL3/oR3) de la región operadora de los promotores pR/pL, impidiendo la transcripción (A); Por encima de los 37°C se libera el represor, permitiendo la llegada de la RNA polimerasa y la posterior transcripción del gen de interés (B) (tomada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Se ha reportado que el sistema λ pR/pL - cl857 tiene la ventaja de que una sola copia del gen cl857 genera la suficiente cantidad de represor como para impedir completamente el reconocimiento del promotor, incluso en casos donde el promotor se encuentra en plásmidos multicopia (Remaut *et al.*, 1981). En teoría este sistema podría ser utilizado en cualquier cepa de *E. coli* y de hecho se ha aplicado en otras bacterias Gram negativas como *Erwinia* y *Serratia* (Leemans *et al.*, 1987). Dependiendo de la proteína recombinante, las condiciones de cultivo y la cepa productora se pueden llegar a obtener altos rendimientos (Remaut *et al.*, 1981; Makrides, 1996; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Hay antecedentes del amplio uso de este sistema de expresión para la producción de diferentes proteínas recombinantes, en particular aquellas de uso terapéutico (Tabla 3). Los primeros experimentos usando el promotor pL alcanzaron rendimientos entre 2 a 7% respecto a la proteína total celular (Bernard *et al.*, 1979; Yoakum *et al.*, 1982). Posteriormente, se obtuvieron rendimientos mayores al 30% (Remaut *et al.*, 1981; Schmidt *et al.*, 1999). Aunque hasta la fecha hay pocos reportes de los avances específicos que se han hecho a nivel industrial, es claro que este sistema se ha convertido en una alternativa importante que puede ser llevada desde la investigación hasta aplicaciones a mayor escala (Valdez-Cruz *et al.*, 2010), ya sea probando diferentes condiciones de cultivo (Aucoin *et al.*, 2006) y/o modificando las estrategias de termoinducción (Caspeta *et al.*, 2009; Caspeta *et al.*, 2013).

2.2. Respuesta de Choque Térmico (HSR) en *Escherichia coli*

Cuando la célula es sometida a un aumento de temperatura, se desencadena una respuesta molecular para protegerla de la desnaturalización de las proteínas y regular la homeostasis celular, dando como resultado un incremento en la tolerancia a las altas temperaturas. Esta respuesta es conocida como respuesta de choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés) y fue descrita por primera vez por los grupos de Neidhardt y Yura en 1978 (Lemaux *et al.*, 1978; Yamamori *et al.*, 1978). La HSR en *E. coli* es controlada por el factor de transcripción sigma 32 (σ^{32}), una holoenzima que al unirse a la RNA polimerasa, regula la expresión de por lo menos 120 genes que codifican para proteínas de choque térmico (Grossman *et al.*, 1987). Las 'Heat Shock Proteins' (o HSP) monitorean y responden al estado de plegamiento de las proteínas en las células. Algunas sirven como chaperonas, promoviendo el plegamiento y otras actúan como proteasas, degradando las proteínas dañadas o no plegadas; también están implicadas en la misma regulación de la HSR, manteniendo la homeostasis y viabilidad celular (Ron *et al.*, 2000; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Wick & Egli, 2004).

Tabla 3. Resumen de algunas proteínas obtenidas con el uso del sistema termoinducible λ pL/pR-cl857 (modificada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

PROTEÍNA	PLÁSMIDO	CONDICIONES DE CULTIVO/INDUCCIÓN	PRODUCCIÓN	REFERENCIAS
IFN-Y	pPL-I	Lote; matraces agitados; 28°C a 42°C	0.3 g/L	Lim & Jung, 1998
IFN-Y	pPL-I	Alimentado; 28°C a 42°C	7.43 g/L	Lim & Jung, 1998
Insulina A-cadena-Mut3sY	pMYW-a	Lote; matraces agitados; 30°C a 42°C	30% de la proteína celular total	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
Insulina A-cadena-Mut3sY	pMYW-a	Alimentado; cultivo de alta densidad celular; 30°C a 42°C	13% de la proteína celular total	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
IFN- α	pMYW-a	Alimentado; 30°C a 42°C	4.0 g/L	Babu <i>et al.</i> , 2000
hFGF-2	pIFGFB	Alimentado; 30°C a 42°C (6-8 h)	5.0-6.0 g/L	Rinas & Hoffmann, 2004
GFP	pND-GFP	Lote; matraces agitados; oscilaciones 37°C a 42°C (1h)	68 mg/L	Aucoin <i>et al.</i> , 2006
GFP	pND-GFP	Alimentado; oscilaciones 30 a 42°C (30 min)	273 mg/L	Aucoin <i>et al.</i> , 2006
His-tag-hPPI	pUC	Alimentado; 30°C a 42°C; vel. 0.4°C/min	3.3 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2009
His-tag-hPPI	pUC	Alimentado; 30°C a 42°C; vel. 0.8°C/min	2.2 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2009
His-tag-hPPI	pUC	Alimentado; 30°C a 42°C; vel. 1.7°C/min	1.8 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2009
His-tag-hPPI	pUC	Alimentado; 30°C a 42°C; vel. 6.0°C/min	1.9 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2009
hPPI	pBM	Alimentado; 30°C a 42°C; vel. 0.4°C/min	3.8 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2013
hPPI	pBM	Alimentado; oscilaciones 37°C a 42°C; vel. 0.4°C/min	4.8 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2013
hPPI	pBM	Alimentado; oscilaciones 30°C a 42°C; vel. 0.4°C/min	5.8 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2013
Interferón α -2b	-	Lote; matraces agitados; 37°C a 42°C	27.7 mg/L	Mansey, <i>et al.</i> , 2014
Interferón α -2b	-	Lote; biorreactores; 37°C a 42°C	44.5. mg/L	Mansey, <i>et al.</i> , 2014
L-alanina	pPL-alaD	Alimentado; 28°C a 42°C	120.8 g/L	Zhou <i>et al.</i> , 2016
α -cetobutirato	pBV220-ilvA	Alimentado; 35°C (12 h) a 40°C	40.8 g/L	Zhang <i>et al.</i> , 2016

hFGF-2: Factor de crecimiento humano de fibroblastos 2; hPPI: Preproinsulina humana; IFN: Interferón.

El factor σ^{32} está codificado por el gen *rpoH*, el cual a temperaturas menores de 30°C se encuentra conformando una estructura secundaria en forma de horquilla que imposibilita su transcripción, manteniendo la HSR inactivada (Grossman *et al.*, 1987). Al comenzar a elevar la temperatura por arriba de los 34°C, la estructura secundaria se relaja permitiendo la transcripción del gen *rpoH*, que posteriormente se traduce como factor σ^{32} (Jensen & Carlsen, 1990; Yura & Nakahigashi, 1999). La activación de este factor de transcripción es muy importante para las células, no sólo porque regula la expresión de muchos genes involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica y metabólica de la célula (Nonaka *et al.*, 2006), sino también porque permite la síntesis de las proteínas de choque térmico que van a jugar un papel determinante en el rendimiento de obtención, solubilidad y actividad de la proteína recombinante de interés (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

En ausencia de estrés térmico se mantiene dentro de la célula un nivel basal del factor σ^{32} , el cual es regulado por algunas chaperonas como DnaK y DnaJ a través de un mecanismo de retroalimentación negativa que recibe el nombre de 'modelo de valoración de proteínas mal plegadas'. En este modelo, las proteínas mal plegadas compiten con σ^{32} por la unión a DnaK. De tal forma que, si las proteínas mal plegadas son pocas, DnaK interactúa con σ^{32} , ya sea limitando su unión a la RNA polimerasa, reprimiendo su traducción o activando su degradación por parte de la proteasa FtsH (Bukau, 1993; Tomoyasu *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1995; Blaszcak *et al.*, 1999; Guisbert *et al.*, 2004). Con el incremento de la temperatura, la cantidad de proteínas mal plegadas también aumenta, lo cual es censado y auxiliado por las chaperonas, dejando al factor σ^{32} disponible para desencadenar la síntesis de las proteínas de choque térmico (Bukau, 1993; Arsene *et al.*, 2000). Debido a esto, cuando la temperatura sube hasta 42°C, los niveles de σ^{32} incrementan rápidamente hasta 17 veces con respecto a su nivel basal durante los primeros minutos (Straus, 1987). Además, es posible que el incremento en la expresión del factor sigma se deba a una traducción mejorada del mRNA de σ^{32} a elevadas temperaturas (Nagai, *et al.*, 1991).

El estudio más reciente de Chakraborty y colaboradores (2014) propone que la sobre-expresión de σ^{32} a temperaturas elevadas podría darse por desestabilización del complejo σ^{32} -DnaK-DnaJ mediante un cambio conformacional en la estructura de σ^{32} (Figura 6).

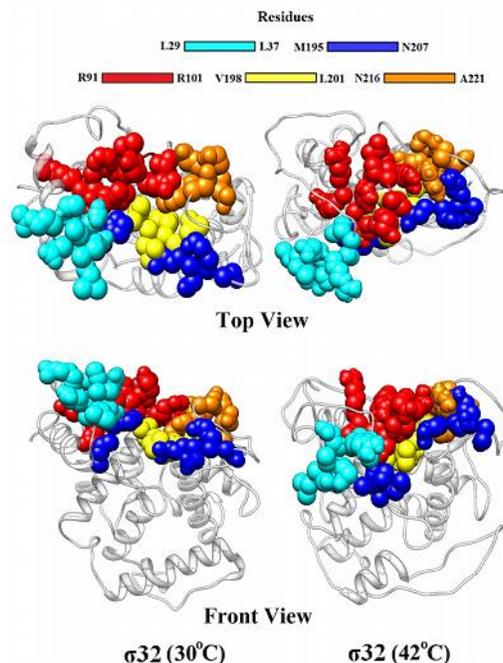


Figura 6. Simulación por dinámica molecular de la estructura del factor σ^{32} a 30°C y 42°C. Se observa accesibilidad reducida a la región de unión a DnaK (residuos 198-VLYL-201 en amarillo) bajo choque térmico (tomada de Chakraborty *et al.*, 2014).

Como se observa en la Figura 6, hay accesibilidad reducida a la región de unión a DnaK, que comprende desde la Valina 198 hasta la Leucina 201 (región en amarillo) después del choque térmico a 42°C, en comparación con la condición a 30°C. De esta forma, el factor sigma queda disponible y el inicio de la respuesta de choque térmico es más rápido (Chakraborty *et al.*, 2014).

2.2.1. Chaperonas moleculares: control de la calidad conformacional del proteoma

Bajo condiciones fisiológicas, las proteínas recombinantes muchas veces no alcanzan su conformación nativa quedando parcialmente plegadas o mal plegadas, lo que conduce a su agregación o degradación. Las células han conservado evolutivamente un grupo de proteínas de choque térmico (HSPs) encargadas de censar, reaccionar, controlar y reducir la cantidad de proteínas agregadas en el citoplasma de *E. coli* (Baneux & Mujacic, 2004). Aunque la mayoría de ellas son altamente conservadas entre especies, la regulación de la respuesta varía entre especies bacterianas (Rosen & Ron, 2002).

Dependiendo de su actividad, las HSPs se han clasificado en tres grupos como se muestra en la Figura 7. Primero están las HSPs o chaperonas de plegamiento que incluyen al factor desencadenante TF y a las chaperonas DnaK/J, GroEL/S; segundo están las HSPs estabilizadores en donde se encuentran las chaperonas pequeñas lbpA e lbpB así como Hsp31 y Hsp33; por último están las HSPs desagregadoras de la familia de ClpB (Baneux & Mujacic, 2004).

Las chaperonas moleculares son específicamente una clase de moduladores de plegamiento que juegan un papel central en el control de la calidad conformacional del proteoma, estabilizando y remodelando un amplio rango de polipéptidos. Las chaperonas pueden ser clasificadas con base en su mecanismo de acción. DnaK, DnaJ y el complejo GroEL/ES, se unen a los residuos hidrofóbicos de las cadenas polipeptídicas nacientes y trabajan cooperativamente para catalizar su plegamiento *de novo* a través de un cambio conformacional dependiente de hidrólisis de ATP (Gragerov *et al.*, 1992; Bhandari & Houry, 2015; Hayer-Hartl *et al.*, 2015).

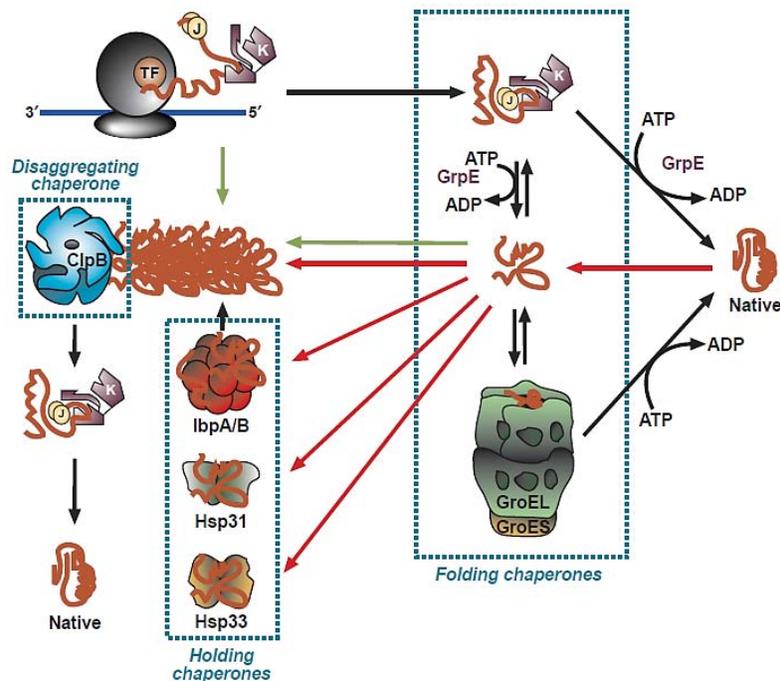


Figura 7. Mecanismos de acción de chaperonas moleculares en el citoplasma de *E. coli* (tomada de Baneux & Mujacic, 2004).

DnaK es una proteína de 70 kDa cuyo sustrato primario son cadenas nacientes grandes o proteínas recién sintetizadas de >60 kDa. El ciclo funcional de DnaK es dependiente de su cochaperona DnaJ y del factor intercambiador de nucleótidos, GrpE. DnaJ generalmente actúa para estimular la actividad ATPasa de DnaK y para transferirle sustratos (Szabo *et al.*, 1994). La hidrólisis de ATP permite la formación de un fuerte complejo entre DnaK-ADP y su sustrato. Después la hidrólisis de ADP catalizada por GrpE, facilita la liberación del sustrato. La proteína recién sintetizada puede alcanzar su conformación nativa después de varios ciclos con DnaK/DnaJ o puede ser enviada al sistema de GroEL/GroES que recibe aproximadamente el 10% de las proteínas recién sintetizadas (Ewalt *et al.*, 1997). GroEL es un oligómero de 800 kDa que forma dos anillos homoheptaméricos apilados, uno de los cuales siempre se une a la cochaperona GroES. Los sustratos son unidos por el anillo libre y pasan a través del canal central para plegarse durante varios ciclos en un proceso controlado por cambios conformacionales e hidrólisis de ATP (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

En el grupo de proteínas estabilizadoras están IbpA, IbpB, Hsp31 y Hsp33, que se unen temporalmente a la superficie de los intermediarios de proteína, manteniéndolos estables mientras la maquinaria de proteínas de plegamiento queda libre (Allen *et al.*, 1992; Graf & Jakob, 2002; Hoffmann *et al.*, 2004).

Por último está la familia de las desagregasas, entre ellas ClpB una ATPasa con forma de anillo que participa activamente en la solubilización de agregados de proteína (Lee *et al.*, 2003).

2.3. Convergencia de las respuestas de estrés asociadas a la producción de proteínas recombinantes

Las respuestas al estrés que generan los sistemas de expresión de proteínas recombinantes termoinducibles en las células no son eventos aislados, sino que se relacionan en algún punto. En la Figura 8 se presenta en el panel izquierdo el proceso inicial de la respuesta molecular tras el aumento de la temperatura y en el panel derecho lo que ocurre durante la termoinducción de las proteínas recombinantes (RP thermoinduction). A temperaturas superiores a los 37°C, la célula va a estar sometida no sólo al estrés térmico, sino además al estrés por la sobreproducción misma de las proteínas recombinantes. Las altas concentraciones de proteína que se alcanzan en este sistema pueden favorecer la formación de cuerpos de inclusión (Hoffmann & Rinas, 2004; Caspeta *et al.*, 2009). La acumulación de proteínas recombinantes desencadena una respuesta molecular controlada por σ^{32} , que incluye la sobre expresión de genes que codifican para proteínas de choque térmico, las cuales están implicadas precisamente en el plegamiento y degradación de la proteína de interés (Gill *et al.*, 2000; Jürgen *et al.*, 2000; Smith, 2007). Así, aunque ambas respuestas convergen en la activación de genes de choque térmico se han estudiado en contextos separados (Rosen & Ron, 2002 y Zhao *et al.*, 2005).

A nivel fisiológico, el estrés térmico y la sobre expresión de proteína heteróloga van a representar una carga metabólica extra para las células. Esta carga metabólica puede conducir a una disminución de la velocidad específica de crecimiento y a cambios en el metabolismo central de carbono, y al mismo tiempo puede alterar la calidad y cantidad de la proteína producida (Jensen & Carlsen, 1990; Gill *et al.*, 2000; Hoffmann & Rinas, 2004). La célula va a reajustar los flujos metabólicos y la síntesis de enzimas, aumentando la demanda energética y desviando la actividad celular hacia la acumulación de biomasa. Además, a parte de la respuesta de choque térmico, otras respuestas diferentes de estrés celular son inducidas, como la respuesta estricta y la respuesta SOS (Hoffmann & Rinas, 2004). Sumado a esto, como resultado del desorden metabólico pueden acumularse ácidos orgánicos (Wittmann *et al.*, 2007) y se puede modificar la relación lípido/proteína en las membranas (Mejía *et al.*, 1999; Nonaka *et al.*, 2006).

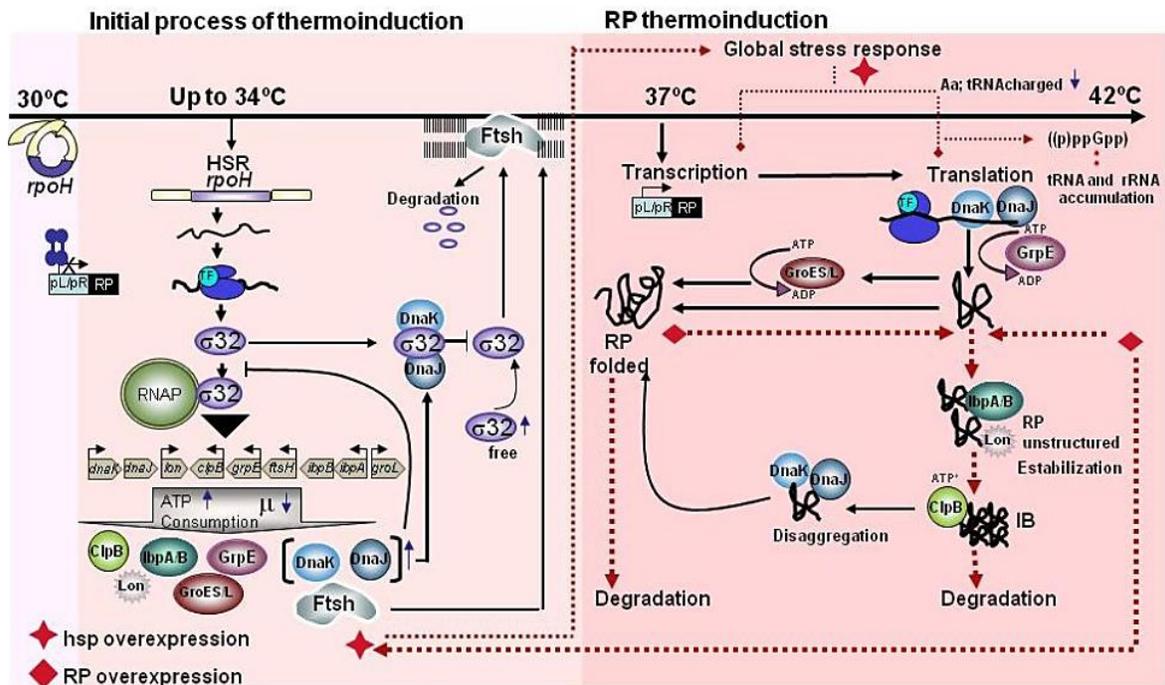


Figura 8. Sistema de termoinducción en *E. coli*: relación entre la Respuesta de Choque Térmico (HSR) y la producción de proteínas recombinantes (tomada de Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

A nivel molecular, Harcum y Haddadin en el 2006, describieron que cultivos recombinantes sometidos a estrés térmico y al estrés por la producción de proteína recombinante tienen una respuesta transcriptómica diferente a los cultivos probados con un único estrés. Por ejemplo, los genes que codifican para los tRNAs que facilitan la síntesis de proteínas vía traducción y los genes directamente relacionados con las HSP (chaperonas y proteasas) que promueven plegamiento de proteínas, fueron sobre expresados bajo inducción y calentamiento (Harcum & Haddadin, 2006). Esto puede indicar que bajo ambos tipos de estrés se activan genes que van contribuir a la producción de proteínas recombinantes.

Por otra parte, un análisis transcriptómico fue llevado a cabo por Caspeta y colaboradores en 2009, para entender la respuesta celular tras la producción de una proteína recombinante a diferentes velocidades de calentamiento usando un sistema termoinducido λ pL/cl857 en *E. coli*. Los niveles de mRNA de los genes de choque térmico incrementaron varias veces con el aumento de la temperatura, tanto a 38°C como a 42°C, con respecto a los niveles a 30°C. A velocidades extremas de calentamiento (muy rápido o muy lento), los niveles de mRNA de los genes de choque térmico no presentaron un aumento considerable. Por ejemplo, de todos los patrones de calentamiento analizados, el calentamiento a 38°C a la velocidad más lenta (6°C/min) mantuvo los niveles de mRNA de las proteínas DnaK, DnaJ y GroEL similares a los niveles a 30°C (Caspeta *et al.*, 2009).

El comportamiento de los genes de choque térmico y la expresión de la proteína recombinante, no sólo dependerán de las velocidades del calentamiento, sino también de los tiempos a los que ésta se lleve a cabo. Se ha observado, que en los primeros 5 minutos después de la inducción térmica incrementan varias veces los niveles de mRNA de DnaK, DnaJ y GroEL y después de 30-40 minutos, la expresión de proteínas chaperonas tiende a normalizarse. Antes de los 5 minutos de post-inducción, el aumento en mRNA es muy gradual, siendo apenas del doble o menos (Valdez-Cruz *et al.*, 2011).

Aunque algunos trabajos han descrito el comportamiento de los mRNAs de algunos genes de proteínas asociadas a choque térmico a través del tiempo en un sistema termoinducible, no se han realizado reportes del comportamiento de los niveles de proteína como tal.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento, hay pocos trabajos que describan cómo controlar las condiciones de cultivo y los parámetros de la termoinducción para aumentar o disminuir la expresión de proteínas que participan en la respuesta de choque térmico. Tampoco se ha descrito un mecanismo molecular que explique cómo dicha expresión se puede modular para obtener altos rendimientos de una proteína recombinante de interés, ni cómo evitar caídas dramáticas en el crecimiento debido al estrés por temperatura.

Con respecto a esto, nos planteamos la pregunta de ¿cómo se puede aumentar la producción de una proteína recombinante de interés en cultivos de *E. coli* usando las ventajas de un sistema termoinducible y cómo se ve afectado el crecimiento? Para responder a este interrogante, se empleó como proteína modelo el antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* y se llevó a cabo un análisis tanto a nivel de crecimiento celular como a nivel de producción de proteína en dos escalas de cultivo, matraces agitados y biorreactores.

En relación al crecimiento, se realizaron cinéticas del estado metabólico celular (biomasa, glucosa, acetato, oxígeno y pH) bajo diferentes temperaturas de inducción. Esto para identificar si hay otro tipo de estrés además del térmico que pueda contribuir a la disminución en el crecimiento y definir cuál condición permite obtener mayores rendimientos de biomasa. Con relación a la producción, se determinó la cantidad de proteína total y proteína recombinante obtenidas en las diferentes temperaturas de inducción y, al mismo tiempo, se evaluaron los cambios en la expresión de proteínas de choque térmico importantes como DnaK/J y GroEL/ES como una posible opción para modular la respuesta de choque térmico.

Finalmente, se espera no sólo acercarnos a entender el mecanismo molecular que regula el estrés celular generado en los sistemas inducidos por temperatura, sino también deducir algunos eventos metabólicos que ocurren en la células y así poder obtener la mayor cantidad posible de la proteína recombinante, ya sea de forma soluble o en cuerpos de inclusión.

4. HIPÓTESIS

El uso de un sistema termoinducible en *Escherichia coli* permite mejorar los rendimientos de producción heteróloga del antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* con respecto a un sistema inducido químicamente.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Analizar el sistema de producción del inmunógeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* y la expresión de chaperonas en un sistema termoinducible de *Escherichia coli* recombinante.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la cinética de crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en dos escalas de cultivo diferentes (matraces y biorreactores) usando dos temperaturas de inducción, 39°C y 42°C.
- Determinar la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 en matraces y biorreactores, tanto en la fracción soluble como en la insoluble (cuerpos de inclusión), bajo las diferentes temperaturas de inducción.
- Cuantificar el consumo de la fuente de carbono y la producción de ácidos orgánicos en el medio de cultivo durante la expresión de la proteína recombinante ESAT-6.
- Evaluar cambios en la expresión de algunas proteínas de choque térmico (DnaK/J y GroEL/ES) en matraces y biorreactores tras la termoinducción de ESAT-6.
- Definir características de resistencia a la desnaturalización y a la degradación proteolítica de los cuerpos de inclusión obtenidos al final de cada cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Cepa Bacteriana

Todos los experimentos se realizaron con la cepa *Escherichia coli* ATCC-53606, que expresa constitutivamente el represor termolábil cl857 y fue adquirida del banco de *Castellani & Chalmers* (USA). En el laboratorio de Biología Molecular de la Dra. Norma Adriana Valdez, *E. coli* ATCC-53606 fue transformada con el plásmido comercial pDeltaBlue (ATCC-77334) en un trabajo del estudiante de Doctorado Carlos Giroshi Bando. A partir de este trabajo se seleccionó la clona 4 (C₄) como mejor productora de la proteína ESAT-6 y fue donada generosamente para este proyecto.

6.1.2. Plásmido

La secuencia del gen *esxA* (ESAT-6) fue optimizada con los codones de uso frecuente en *E. coli* y se insertó en el plásmido comercial pDeltablue (ATCC-77334; Figura 9). Este plásmido se eligió porque cuenta con el promotor fuerte pL del bacteriófago lambda que contiene tres regiones operadoras: oL1, oL2 y oL3, necesarias para la unión del represor cl857 antes de la inducción térmica. Además, contiene el gen *ampR* que confiere resistencia a ampicilina. Este plásmido es de un mediano número de copias (5 a 20 copias por célula) y tiene un tamaño de 3814 pares de bases.

Para permitir la purificación de la proteína ESAT-6 se incluyeron en su secuencia seis residuos de histidina en el extremo C-terminal y además se colocaron sitios de reconocimiento y anclaje del factor Xa. Para la inserción del gen de ESAT-6 se usaron sitios de corte de las enzimas de NcoI en el extremo 5' y BamHI en el extremo 3'.

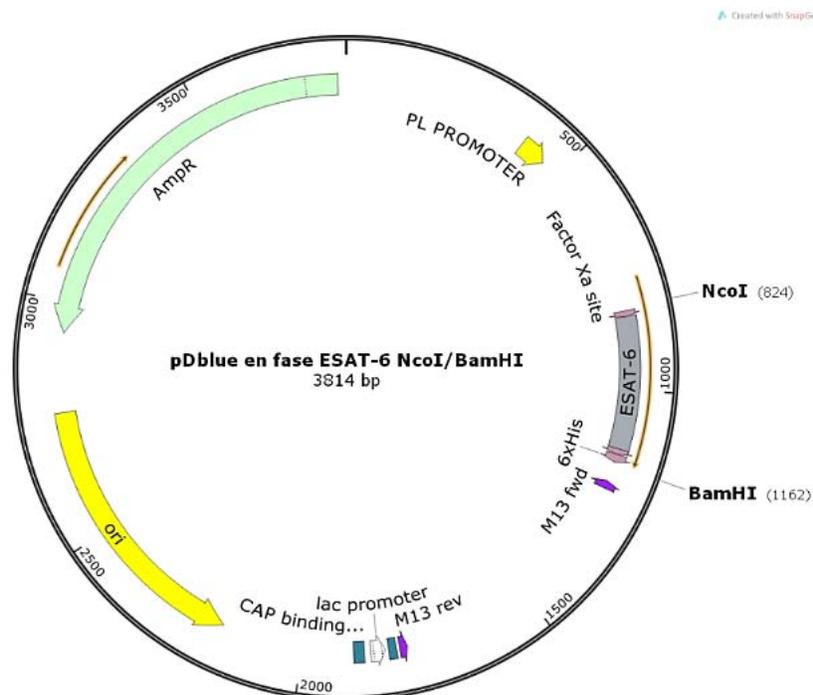


Figura 9. Construcción del plásmido pDeltaBlue en fase con el inserto de la secuencia que codifica para la proteína ESAT-6.

6.1.3. Medios de cultivo

6.1.3.1. Medio complejo

El medio de cultivo complejo empleado comúnmente para el crecimiento de *E. coli* es el Luria-Bertani (LB). Este medio contiene triptona, que resulta de la digestión enzimática de la caseína como fuente de aminoácidos y péptidos, extracto de levadura como fuente de ácidos nucleicos y lípidos y, además cloruro de sodio (Sezonov, *et al.*, 2007). La composición estándar para el medio LB se presenta en la tabla 4. Todas las preparaciones se ajustaron a un pH= 7.40 con NaOH 1M y se esterilizaron a 121°C y 22 psig por 30 minutos en un autoclave Tomy ES-215 de *Sterilizers*.

Tabla 4. Preparación medio de cultivo complejo Luria – Bertani.

Para 1 Litro	Medio líquido	Medio sólido
Bacto Triptona de <i>DIFCO</i> (g)	10	10
Extracto de Levadura de <i>BD</i> (g)	5	5
NaCl de <i>J.T. Baker</i> (g)	10	10
Agar (g)	-	15
Agua Destilada (L)	1	1

6.1.3.2. Medio definido

Los medios definidos se utilizan ampliamente en microbiología y biotecnología para obtener una caracterización precisa del crecimiento de un organismo, ya que se conoce su composición química exacta (Todar, 2003). Para el cultivo de la cepa recombinante se probaron dos medios definidos diferentes, con el fin de observar en cuál se obtenía mayor crecimiento. El primer medio probado fue el descrito por Lara (Lara *et al.*, 2006), que ha sido usado previamente en el laboratorio con otras cepas de *E. coli*. El segundo medio propuesto fue el de Caspeta (Caspeta *et al.*, 2013), en cuyo trabajo desarrolló un sistema termoinducido de *E. coli* recombinante en biorreactor, lo que puede servir como referencia directa para efectos de comparación de resultados. La formulación final de ambos medios se presenta en la Tabla 5, donde se describen los componentes de la solución base. La solución stock de elementos traza se preparó y esterilizó una única vez y se le adicionó a la solución base justo antes de inocular (1 ml/L). Así mismo se hizo con las soluciones de tiamina (1000X), ampicilina (1000X), MgSO₄ (400 g/L), glucosa (500 g/L) y casaminoácidos (500 g/L). Todas las preparaciones de ajustaron a un pH= 7.00 con NaOH 1M y se esterilizaron a 121°C y 22 psig por 30 minutos en un autoclave Tomy ES-215 de *Sterilizers*.

Tabla 5. Preparación medios de cultivo definidos.

Medio Mineral por Lara (2006) en g/L		Medio Mineral por Caspeta (2013) en g/L	
Na ₂ SO ₄	2.0	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0
(NH ₄)SO ₄	2.7	KH ₂ PO ₄	13.3
NH ₄ Cl	0.5	Ácido cítrico	1.7
K ₂ HPO ₄	14.6		
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	4.0		
Citrato de sodio	1.0		
Soluciones Stock			
MgSO ₄	0.24	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.2
Tiamina	0.01	Tiamina	0.045
Ampicilina	0.1	Ampicilina	0.1
Glucosa	10.0	Glucosa	17.5
*Casaminoácidos	3.0	*Casaminoácidos	3.0

*Casaminoácidos: No hacen parte de la formulación original de los medios.

Es preciso aclarar que aunque se hicieron cinéticas usando ambas formulaciones, elegimos el medio definido con la formulación de Caspeta (Caspeta *et al.*, 2013) para el resto del presente trabajo (ver resultados).

La idea de adicionar casaminoácidos a los medios se basó en algunos reportes que los proponen como una buena fuente de nitrógeno, proveen nutrientes y cofactores requeridos para el correcto crecimiento de las cepas recombinantes, además poseen un alto grado de digestión y una rápida asimilación por parte de las bacterias (Fishov *et al.*, 1995). Jung y colaboradores (2006) reportaron que al utilizar casaminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico a una concentración entre 3.0 y 3.2 g/L, se pueden obtener rendimientos de interferón- α recombinante de hasta 10 mg/g usando un reactor de 1 L en cultivos de *E. coli*.

6.1.4. Anticuerpos para Western Blot

Anticuerpos Primarios:

- Anticuerpo anti-His de QIAGEN con N° de catálogo 34610.
- Anticuerpo anti-ESAT-6 de Pierce (Thermo Scientific) con N° de catálogo PA1-19446.
- Anticuerpo anti-DnaK de Enzo Life Sciences con N° de catálogo ADI-SPA-880.
- Anticuerpo anti-DnaJ de Enzo Life Sciences con N° de catálogo ADI-SPA-410.
- Anticuerpo anti-GroEL de Enzo Life Sciences con N° de catálogo ADI-SPS-875.
- Anticuerpo anti-GroES de Enzo Life Sciences con N° de catálogo ADI-SPA-210.

Anticuerpos Secundarios:

- Anticuerpo anti-conejo de Sigma-Aldrich con N° de catálogo A3687.
- Anticuerpo anti-ratón de Sigma-Aldrich con N° de catálogo A3562.

6.2. Métodos

6.2.1. Preparación y transformación de células de *E. coli* ATCC 53606 quimiocompetentes

Para obtener células competentes de *E. coli* ATCC 53606 se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 mg/mL) a 37°C. La biomasa obtenida de la fase exponencial se centrifugó a 4°C/8,000 x g/10 min. El pellet se resuspendió en una solución de CaCl₂ (100 mM) y MgCl₂ (20 mM), incubando las células en hielo durante 2 h. Se centrifugaron nuevamente a 4°C/8,000 x g/10 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se puso en CaCl₂ (0.1 M) y se agregaron 88 μ L de DMSO por cada mL. La solución obtenida se alicuotó y almacenó en un congelador Revco a -75°C (Sambrook *et al.*, 1989).

Luego se tomaron 50 μ L de un criovial de la cepa de *E. coli* ATCC 53606 quimiocompetente y se le añadieron 5 μ L del plásmido purificado pDeltaBlue con el inserto del gen codificante para la proteína ESAT-6. La mezcla se agitó suavemente y se incubó en hielo por 30 min. Se puso en un baño de agua a 42°C durante 60 segundos, se regresó al hielo por 2 min y se le adicionaron 250 μ L de medio S.O.C (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) que permite obtener máxima eficiencia en la transformación (Inoue *et al.*, 1990). Se incubaron a 37°C durante 1 h en agitación a 225 rpm para permitir la recuperación de las bacterias.

6.2.2. Selección de las clonas transformantes

Se hicieron placas con 20 μ L de las células transformadas en cajas de Petri estériles conteniendo medio LB sólido y ampicilina a tres concentraciones finales diferentes: 100 μ g/mL, 200 μ g/mL y 300 μ g/mL. Las cajas se incubaron 1 día a temperatura ambiente y otro día más a 30°C. Después del crecimiento se seleccionaron las colonias que crecieron a la mayor concentración de antibiótico (300 μ g/mL de Amp) y se pusieron a crecer en tubos de ensayo de vidrio con 5 mL de medio LB a 30°C, 200 rpm, durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 200 μ L de estos cultivos y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio LB y 50 μ L de Amp, los cuales se pusieron en etapa crecimiento a 30°C y 200 rpm. Después de 6 horas se indujeron a 39°C. Los cultivos finales

se centrifugaron, se purificaron los cuerpos de inclusión y se hizo el análisis de expresión de la proteína ESAT-6 por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western Blot.

6.2.3. Generación del banco de trabajo de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6)

Se realizó un banco de trabajo celular con el fin de tener una colección de células homogéneas derivadas del liofilizado original. Se tomaron 200 μ L de un criovial del banco maestro de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6); se inocularon en una matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio LB y 50 μ L de Ampicilina (100 mg/mL). Se dejó en incubación a 30°C y 200 rpm en una incubadora *New Brunswick Scientific Classic C25*, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 1.62 unidades de absorbancia (u.a.) a 600 nm. Finalmente, para conservar las células se utilizó glicerol puro estéril a una concentración final del 20%, haciendo alícuotas de 1000 μ L en 30 crioviales y se almacenaron a -75°C.

6.2.4. Preparación de los pre-inóculos

Para empezar todos los cultivos con una misma densidad óptica (0.1 u.a.), se usó un matraz como pre-inóculo antes de comenzar cada cultivo. El pre-inóculo se preparó con 200 μ L de un criovial del banco de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) más 50 μ L de ampicilina (100 mg/mL) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio. El matraz se dejó durante toda la noche a 30°C y 200 rpm (*New Brunswick Scientific Classic C25*). Después de 24 horas se midió la densidad óptica (DO) y se calculó el volumen que debía tomarse para alcanzar la concentración deseada, usando la ecuación [1]:

$$(C1*V1)=(C2*V2) \quad [1]$$

donde C1 es el valor de la DO, C2 es 0.1 u.a., V2 es el volumen final del cultivo y V1 el volumen que debe tomarse desde el pre-inóculo para inocular el cultivo.

Todos los pre-inóculos, tanto para matraz como para biorreactor, se realizaron de la misma manera y se prepararon utilizando el mismo medio en el que se iba a poner el cultivo, para evitar cualquier tipo de variación metabólica por adaptación a un medio nuevo (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003). En cada caso, después de inocular se midió la DO (muestra del tiempo cero), para verificar que se comenzaba con valores de 0.1 u.a. o cercanos.

6.2.5. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados

Se hizo el seguimiento del crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados con los diferentes medios de cultivo. Se utilizaron matraces Erlenmeyer convencionales de 250 mL cada uno con 50 mL del medio correspondiente (medio complejo LB o medio definido Lara/Caspeta) como se muestra en la Figura 10. A cada matraz con medio complejo LB se le pusieron 50 μ L de ampicilina (100 mg/mL) y 200 μ L de un criovial del banco de trabajo. Para los matraces con medio definido, se agregaron los componentes especificados en la Tabla 5 y la cantidad de pre-inóculo según la ecuación [1].

Los matraces se incubaron a 30°C y 200 rpm (*New Brunswick Scientific Classic C25*) tomando muestra cada hora o cada dos horas, para medir espectrofotométricamente la densidad óptica. También se tomaron muestras para medir el pH (*Corning, pH meter 430, USA*). Cuando los cultivos alcanzaron la fase pre-estacionaria (DO de aproximadamente 1.0 u.a. para medio LB y 3.0 u.a. para medio mineral), se hizo la inducción subiendo la temperatura hasta 39°C o 42°C y manteniendo la agitación constante. El cultivo final se guardó para su procesamiento y análisis de la expresión de la proteína. La cinética se dio por terminada cuando los valores de la DO se mantuvieron estables. Todas las cinéticas se realizaron por duplicado.



Figura 10. Matracas Erlenmeyer convencionales de 250 mL con 50 mL de medio definido Lara y Caspeta (A) o con medio LB (B).

6.2.6. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores

Se realizaron cultivos en lote para analizar el crecimiento de la cepa recombinante en un biorreactor de 1.2 L (*Applikon, Netherlands*) con un volumen de operación de 1.0 L (Figura 11). Todos los cultivos se iniciaron a una DO de 0.1 u.a. usando como pre-inóculo matracas con el medio correspondiente (ver metodología 6.2.4.).



Figura 11. Biorreactor de 1.2 L conectado al sistema biocontrolador ADI 1010 (*Applikon, Netherlands*).

Los biorreactores se instrumentaron con sensores de pH, oxígeno disuelto y temperatura, haciendo un seguimiento en línea con el programa de adquisición de datos BioXpert® de *Applikon, Netherlands*. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue controlada a 35% con respecto a la saturación del aire, usando cascada de agitación entre 100-1000 rpm y aireación de 1.0 vvm mediante una estrategia de control proporcional-integral-derivativo (PID). El pH del medio durante la cinética fue mantenido en 7.4 ± 0.8 (para medio LB) y 7.0 ± 0.8 (para medio mineral), mediante la adición on-off de NaOH o HCl 3M y la temperatura fue controlada por PID con una chaqueta de calentamiento.

Para el control del nivel de espuma se adicionaron 100 μ L de un agente antiespumante estéril dos veces durante el cultivo.

Los cultivos en biorreactor se dejaron en crecimiento a 30°C hasta alcanzar la fase pre-estacionaria (3 horas para medio LB y 6 horas para medio mineral). En este punto, fueron sometidos a inducción, aumentando la temperatura desde 30°C hasta 39°C o 42°C. Se mantuvo la misma aireación y se continuó con el control de TOD. Las muestras se tomaron por duplicado cada hora o dos horas para medir cambios en la densidad óptica; el cultivo final se guardó para su procesamiento y análisis de la expresión de la proteína recombinante.

6.2.7. Medición de la absorbancia del cultivo

El crecimiento del cultivo de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys™ 5 (Thermo, USA). Las muestras se midieron directamente en el equipo hasta concentraciones de 0.7-0.9 unidades de absorbancia (u.a.). Por encima de estos valores se hicieron diluciones (1:10 o 1:20) con el mismo medio de cultivo para que la absorbancia medida estuviera dentro del intervalo de respuesta lineal del equipo, según la ley de Beer-Lambert (Koch, 1970; Toennies & Gallant, 1949; Myers *et al.*, 2013).

6.2.8. Determinación de la biomasa como peso seco

Se recolectaron muestras de 10 mL de una cinética a 30°C en matraces agitados con medio mineral. Se centrifugaron a 4°C/14,000 x g/20 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se llevó a secar a 90°C en un horno Precision (Equipar) por ~60 h. La biomasa se pesó en una balanza analítica Sartorius CP225D hasta obtener un peso constante. La concentración de la biomasa se calculó como la diferencia entre el peso de los tubos vacíos y los tubos con la biomasa seca, teniendo en cuenta el volumen de muestra. Finalmente se hizo una correlación lineal entre peso seco y densidad óptica a 600 nm, para encontrar un factor de equivalencia entre ambas medidas (Lawrence & Maier, 1977; Toennies & Gallant, 1949). La correlación se presenta en el anexo 1 (Figura A1).

6.2.9. Medición de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en matraces agitados

La medición de la TOD en matraces se hizo en línea usando el medidor óptico de oxígeno disuelto 'Fibox 3' acoplado al sensor PSt3 (PreSens, Germany). El sensor se dispuso en el fondo de cada matraz de 250 mL a una distancia de 19 mm del centro del matraz para evitar pérdida de contacto entre el dispositivo y la fase líquida (Gupta *et al.*, 2003; Wittmann *et al.*, 2003). El sensor óptico fue calibrado a 0% de TOD con una solución de Na₂SO₃ (0.3 M) y CoCl₂ ($\leq 5 \times 10^{-7}$ M), mientras que el 100% de TOD se logró agitando el matraz hasta que la lectura alcanzó saturación, por indicaciones del proveedor. Las mediciones fueron tomadas cada 5 minutos durante todo el cultivo y analizadas con el software OxyView PST3v602 (PreSens, Germany). El tiempo de respuesta del sensor óptico es lo suficientemente pequeño (~3 segundos) para considerarse despreciable durante las mediciones de los perfiles de oxígeno disuelto de los cultivos de *E. coli*, donde los cambios de la concentración de oxígeno son observables después de varios minutos (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016).

Es preciso aclarar que en matraces no se usan los sensores polarográficos empleados en los biorreactores, porque sus grandes dimensiones dificultan la manipulación en compartimentos pequeños y aumentan los riesgos de contaminación. El parche que actúa como sensor óptico por el contrario es un método no invasivo, diseñado especialmente para pequeñas escalas (Nota técnica de Pre-Sens: "Non-invasive oxygen sensors").

6.2.10. Cuantificación de glucosa

Se tomó 1 mL de los cultivos realizados con medio definido y se centrifugó a 4°C/14,000 x g/20 min. Las muestras del sobrenadante se usaron para medir la glucosa en un equipo Biochemistry Analyzer YSI 2900D, realizando una calibración previa del equipo antes de cada medición. Se usó el buffer

de fosfatos YSI N°2357, la membrana de glucosa oxidasa YSI N°2365 y una solución calibradora con 2.5 g/L de glucosa preparada en buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 40g/L y Na_2HPO_4 10 g/L).

La medición que realiza este analizador bioquímico está basada en un proceso enzimático acoplado a un proceso electroquímico, en el cual la enzima (glucosa oxidasa) se inmoviliza en una membrana que se encuentra entre dos películas, una de policarbonato y otra de acetato de celulosa. El sustrato es oxidado al pasar por la membrana de la oxidasa inmovilizada, produciendo peróxido de hidrógeno, el cual a su vez pasa a través de la membrana de acetato de celulosa para interactuar con el ánodo de platino, generando electrones. El flujo de electrones es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y, por tanto, a la concentración de sustrato (YSI Life Sciences, USA).

6.2.11. Cuantificación de ácidos orgánicos

La concentración de ácidos orgánicos se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC", por sus siglas en inglés). Se empleó un equipo *Shimadzu*® compuesto de una unidad de bombas LC-20AT, un detector UV a 210 nm SPD-20A y un regulador de temperatura por circulación de aire CTO-104. Los sobrenadantes provenientes de cada cultivo se filtraron y se inyectaron 20 μL de muestra en el equipo. La separación se llevó a cabo usando una columna cromatográfica Aminex® HPX-87H (300 x 7.8 mm) de *BIO-RAD* y para la cuantificación de los metabolitos se empleó una solución estándar comercial (No. catálogo 125-0586 *BIO-RAD*), cuyos tiempos de elución típicos para los metabolitos detectados (oxalato, citrato, malato, succinato, formato, acetato) se muestran en la Figura 12. Como fase móvil se usó H_2SO_4 0.008N a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y 30°C. Los datos obtenidos fueron procesados en el software "LC Solution".

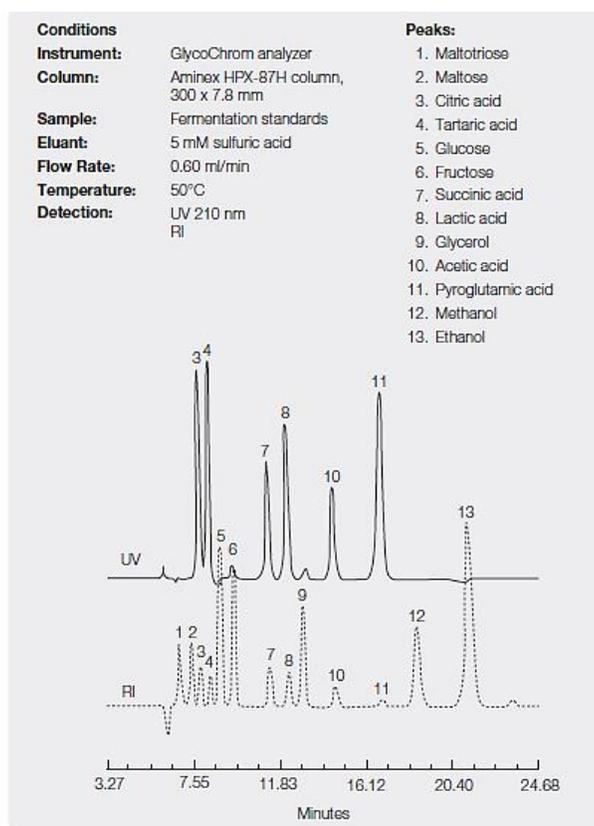


Figura 12. Cromatograma estándar para la cuantificación de ácidos orgánicos en una columna Aminex® HPX-87H (tomado del boletín "Chromatography Aminex HPLC columns" N°63333 - 2012 de *BIO-RAD*).

6.2.1. Recuperación y purificación de los cuerpos de inclusión

6.2.1.1. Método de recuperación y purificación de cuerpos de inclusión por sonicación y uso de detergentes

Los cultivos obtenidos tras la inducción térmica fueron sometidos a centrifugación a 4°C/14,000 x g/20 min. El sobrenadante se descartó, mientras que el pellet se resuspendió en Buffer de lisis celular a pH= 8.0 (Tris-HCl 50mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM e inhibidor de proteasas 1mM). La suspensión celular fue sonicada en un equipo Soniprep150 (*SANYO-GallenKamp, UK*) a 10 micrones de amplitud por 1 minuto en 5 pasos, dejándola en frío (4°C) entre cada ciclo. El lisado se centrifugó a 4°C/11,000 x g/5 min, pero en este caso se recuperó tanto el sobrenadante, que contiene la proteína total soluble (PTS) como el pellet celular correspondiente, que contiene los cuerpos de inclusión (CI).

Los CI se lavaron con Buffer de Tritón X-100 al 0.5 % por 1 hora a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 4°C/11,000 x g/5 min, descartando el sobrenadante. El precipitado resultante se puso en Buffer de Lavado a pH= 7.5 (NaCl 100mM, Tris 50 mM, EDTA 1mM) y se incubó a 4°C por 30 minutos. Nuevamente, se centrifugó a 4°C/11,000 x g/5 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet tres veces consecutivas con agua desionizada de baja conductividad (con pH superior a 7.0), centrifugando entre cada lavado. Después de la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y almacenó el pellet a -20°C. Para determinar la composición de los CI, el pellet final se disuelve en un agente desnaturizante, IEF (buffer para isoelectroenfoque) o SDS (dodecilsulfato sódico) al 2.5%, en una proporción 1:4 (Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

6.2.1.2. Método de recuperación y purificación de cuerpos de inclusión con el agente "BugBuster™"

El agente BugBuster™ (*Novagen*) es una solución de detergentes utilizada para el rompimiento suave de la pared celular de *E. coli*, permitiendo liberar proteínas activas. Es una alternativa simple, rápida y de bajo costo frente a los métodos mecánicos para extraer proteína intracelular. La formulación de este agente consiste en una mezcla de detergentes no-iónicos que son capaces de perforar la pared celular sin desnaturizar la proteína. Además, se puede obtener proteína tanto de la fracción soluble como de la insoluble (BugBuster™ Protein Extraction Reagent Brochure, Code N° TB24509/00, *Novagen*, Madison, WI, USA).

Para la extracción de la proteína ESAT-6 con este agente, se centrifugó el cultivo celular a 4°C/10,000 x g/10 min. Se determinó el peso húmedo del pellet de cultivo obtenido y, luego, se puso el pellet con el agente BugBuster™ agitando suavemente (5 mL de reactivo por cada gramo de pellet celular húmedo). A la suspensión celular se le adicionaron 25 unidades benzonasa (1 µl por cada mL de BugBuster™) e inhibidores de proteasas. La suspensión se incubó manteniendo agitación suave durante 10 a 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4°C/16,000 x g/20 min a 4° C. El sobrenadante correspondía a la proteína total soluble (PTS) y el pellet a la fracción insoluble.

Este último pellet se resuspendió con el mismo volumen de BugBuster™ utilizado al inicio para la biomasa proveniente del cultivo. En este paso se aseguró una mezcla completa de los componentes con el fin de solubilizar y remover todas las proteínas contaminantes y así, obtener una suspensión limpia y homogénea. Se adicionó lisozima (*Sigma-Aldrich, USA*) a una concentración final de 200 µg/mL y se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después se adicionaron 6 volúmenes del agente diluido con agua desionizada (1:10) y se centrifugó a 4°C/16,000 x g/15 min, descartando el sobrenadante. Los cuerpos de inclusión obtenidos se disolvieron en la mitad del volumen de BugBuster™ diluido y se centrifugaron a 4°C/16,000 x g/15 min, repitiendo dos veces. Finalmente, se lavaron con agua desionizada y se centrifugaron a 4°C/16,000 x g/15 min. El pellet final se puso en agua desionizada para la posterior purificación de la proteína y la otra fracción en un agente desnaturizante IEF o SDS al 2.5 %, para analizar la expresión de la misma en geles. En cualquier caso, las muestras se guardaron a -20° C.

6.2.2. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó por el método estándar de Bradford (N° 5000006 de *BIO-RAD*), que se basa en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas (Bradford, 1976). Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (BSA N°BAC65 de *Equitech-Bio*), en un intervalo de concentración de 8 a 500 µg/mL. Como las muestras se solubilizaron en IEF, para hacer la curva se probaron diferentes diluciones (1:5; 1:10; 1:15 y 1:20), arrojando que la de mejor ajuste fue la de IEF 1:5. Placas de 96 pozos de fondo plano se usaron para medir la absorbancia a 600 nm en el lector Stat Fax 4200 de *Awareness Technology, Inc.* Tanto las muestras como los estándares se prepararon por duplicado.

6.2.3. Análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para confirmar la expresión de la proteína de interés y obtener información sobre su tamaño molecular y pureza, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (Sambrook *et al.*, 1989). El gel separador se preparó al 18% de poliacrilamida y fue precedido por un gel concentrador al 4%. La cantidad de la muestra cargada a cada pozo fue variable dependiendo de la concentración de proteína medida (entre 15-25 µg de proteína total). Para la corrida del gel se utilizó una cámara de electroforesis (*Hoefler Inc.*), a corriente constante (80-100 voltios).

6.2.4. Tinción de las proteínas del gel de poliacrilamida

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche y posteriormente el exceso de colorante se retiró con una solución de desteñido que contenía 10 % de ácido acético, 50 % de metanol y el resto de agua. Las imágenes del gel se digitalizaron en un equipo Gel Doc™ EZ Imager (*BIO-RAD*), utilizando el programa *Image Lab 3.0*.

6.2.5. Transferencia e Inmunodetección de ESAT-6 por Western Blot

Un gel de electroforesis SDS-PAGE fue colocado sobre una membrana de PVDF (*Immobilon™* de *Millipore*) previamente activada con metanol puro. Se transfirió en semi-húmedo con buffer de transferencia (Tris-Glicina 1X; Metanol 20%) durante 40 minutos a 23 voltios usando el equipo Transblot de *BIO-RAD*.

Luego de la transferencia del gel a la membrana, se realizó un bloqueo de 40 min en agitación suave a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5 % disuelta en Buffer Tris Salino (TBS). Después del bloqueo, se hicieron dos lavados consecutivos de la membrana con una solución de lavado (TBS + Tween 20 al 0.06%) durante 10 min cada uno y luego se incubó durante 50 min con el primer anticuerpo anti-ESAT-6 (N° PA1-19446 de *Pierce, Thermo Scientific, USA*), preparado a una dilución de 1:1000 con buffer TBS. Se hicieron tres lavados consecutivos de 10 min cada uno y se incubó durante 50 min con el anticuerpo secundario anti-conejo (N° A3687 de *Sigma-Aldrich, USA*), preparado a una dilución de 1:1000 con buffer TBS. Finalmente, se hicieron dos lavados más y la membrana se trató con luminol acoplado a peroxidasa (Kit Supersignal West PICO N°34080+ FEMTO N°34095/Chemiluminescent Substrate de *Pierce, Thermo-Scientific*). El revelado se hizo por quimioluminiscencia en un equipo *C-Digit* acoplado al programa *Image Studio Digits 3.1*.

6.2.6. Inmunodetección de chaperonas moleculares de *E. coli* por Western Blot

A cada membrana transferida se le realizó un bloqueo de 40 min en agitación suave a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5 % disuelta en TBS. Después del bloqueo, se hicieron dos lavados consecutivos de la membrana con una solución de lavado (TBS + Tween 20 al 0.06%) durante 10 min cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo primario respectivo (anti-chaperona) preparado a la concentración indicada en la Tabla 6. La membrana se lavó tres veces y se incubó con el anticuerpo secundario respectivo durante el mismo tiempo que el primario.

Finalmente, se hicieron dos lavados más y la membrana se trató con luminol acoplado a peroxidasa (Kit Supersignal West PICO N°34080+ FEMTO N°34095/Chemiluminescent Substrate de *Pierce, Thermo-Scientific*). El revelado se hizo por quimioluminiscencia en un equipo *C-Digit* acoplado al programa *Image Studio Digits 3.1*. Se usó un marcador de quimioluminiscencia que es visible en las imágenes.

Tabla 6. Anticuerpos anti-chaperonas de *E. coli* usados para realizar Western blot de cultivos termoinducidos.

Anticuerpo 1°	Concentración (en TBS 1X)	Tiempo de incubación	Anticuerpo 2°
Anti-DnaK de <i>Enzo Life Sciences</i> N°ADI-SPA-880	1:7,500	50 min	Anti-ratón de <i>Sigma-Aldrich</i> N°A3562
Anti-DnaJ de <i>Enzo Life Sciences</i> N°ADI-SPA-410.	1:1,500	1.5 h	Anti-conejo de <i>Sigma-Aldrich</i> N°A3687.
Anti-GroEL de <i>Enzo Life Sciences</i> N°ADI-SPS-875.	1:7,500	50 min	Anti-conejo de <i>Sigma-Aldrich</i> N°A3687.
Anti-GroES de <i>Enzo Life Sciences</i> N°ADI-SPA-210.	1:7,500	50 min	Anti-conejo de <i>Sigma-Aldrich</i> N°A3687.

6.2.7. Caracterización de los cuerpos de inclusión

6.2.7.1. Digestión proteolítica de los cuerpos de inclusión con *Proteínasa K*

Los cuerpos de inclusión conteniendo ESAT-6 recombinante que se obtuvieron a partir de cultivos en matraces y biorreactores, bajo diferentes estrategias de termoinducción, fueron digeridos usando *Proteínasa K* a una concentración final de 12 µg/mL. La digestión se llevó a cabo con 50 µg/mL de proteína de CI purificados, que fueron diluidos en amortiguador (50 mM de Tris-HCl y 150 mM de NaCl a pH de 8.0) para un volumen final de 1 mL. Los cambios en la absorbancia se monitorearon a 350 nm durante 100 min en un espectrofotómetro UV/Vis DU®730 *Beckman coulter*, USA (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Upadhyay *et al.*, 2012; De Groot & Ventura, 2006; Morell *et al.*, 2008).

6.2.7.2. Solubilización de los cuerpos de inclusión con *Cloruro de Guanidinio (GuHCl)*

Se solubilizaron CI conteniendo ESAT-6 en presencia de diferentes concentraciones de *GuHCl* (0, 2, 4, 6 M) preparado en buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5, durante 24 h a temperatura ambiente en agitación. La concentración final de proteína en las soluciones de desnaturizante fue de 0.25 mg/mL para un volumen de 100 µL. La suspensión fue centrifugada a 8000 g durante 10 min y el sobrenadante conteniendo la proteína solubilizada se cuantificó por Bradford (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; De Groot & Ventura, 2006; Espargaro, *et al.*, 2008).

7. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo. De manera resumida, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo y en biorreactores de 1.2 L con 1 L de volumen de trabajo. Se probaron diferentes formulaciones de medio de cultivo. El seguimiento del crecimiento se hizo midiendo espectrofotométricamente la densidad óptica (DO) a 600 nm. Además se cuantificaron los ácidos orgánicos por HPLC y la glucosa con el analizador bioquímico YSI-2900. Se obtuvieron cuerpos de inclusión utilizando dos métodos de purificación, uno basado en sonicación y detergentes y el otro con el agente BugBuster. La expresión de la proteína recombinante ESAT-6 y de algunas proteínas de choque térmico (DnaK/J y GroEL/ES) se determinó por SDS-PAGE y Western Blot. Finalmente se caracterizaron los cuerpos de inclusión de ESAT-6 mediante desnaturalización con cloruro de guanidinio y degradación enzimática con proteínasa K.

7.1. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio de cultivo LB usando un sistema termoinducido

Se realizó la cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB a 200 rpm y dos temperaturas de inducción, 39°C y 42°C. Se graficó la variación de la densidad óptica (DO) contra el tiempo tanto en escala lineal como en escala logarítmica (Figura 13).

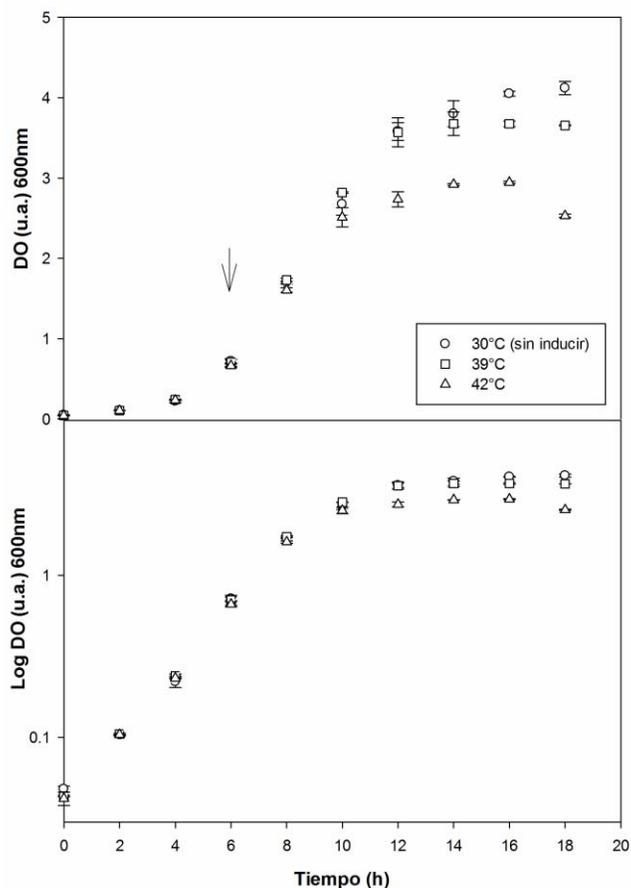


Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio LB a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 0.6-0.7 u.a. (6 h) como indica la flecha.

La gráfica logarítmica permite ver los cambios de duplicación, determinar el punto de inducción y obtener la velocidad específica de crecimiento (Zwietering *et al.*, 1990). Después de 6 horas de crecimiento (DO_{600} de 0.6-0.7 u.a.) se hizo la inducción a 39°C y 42°C en los matraces. En este punto las células se encontraban en la fase pre-estacionaria del crecimiento, donde no se han desencadenado en la célula respuestas asociadas al estrés general (mediado por el factor RpoS) que puede ocurrir durante la fase estacionaria en *E. coli*, ya sea por escasez de nutrientes o por presencia de metabolitos secundarios, entre otros (Craig & Gross, 1991; Hengge-Aronis, 1993).

Como se observa en la Figura 13, al inicio todos los cultivos tuvieron la misma tendencia en el crecimiento, pero después de la hora 10 disminuyó la DO de los cultivos termoinducidos en comparación con el cultivo sin inducir. La cepa recombinante en matraces agitados con medio LB a 30°C alcanzó una DO máxima de 4.12 ± 0.08 u.a. con una velocidad específica de crecimiento hasta la hora 6 (μ_s) de 0.44 ± 0.01 h⁻¹ y una velocidad específica de crecimiento después de la hora 6 (μ_i) de 0.26 ± 0.01 h⁻¹. Para el cultivo inducido a 39°C, la DO máxima fue de 3.68 ± 0.03 u.a con $\mu_s = 0.46 \pm 0.01$ h⁻¹ y una μ_i de 0.27 ± 0.00 h⁻¹. Para el cultivo inducido a 42°C, DO máxima fue de 2.95 ± 0.02 u.a con $\mu_s = 0.45 \pm 0.01$ h⁻¹ y una μ_i de 0.24 ± 0.00 h⁻¹. La μ_s para todos los cultivos se calculó tomando los primeros 4 puntos de la cinética (desde la hora cero hasta la hora donde se llevó a cabo la inducción). La μ_i se calculó también con 4 puntos, incluyendo la hora de inducción hasta los siguientes 3 puntos.

Luego se realizó la cinética de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con 1.0 L de medio LB cuyos resultados se presentan en la Figura 14.

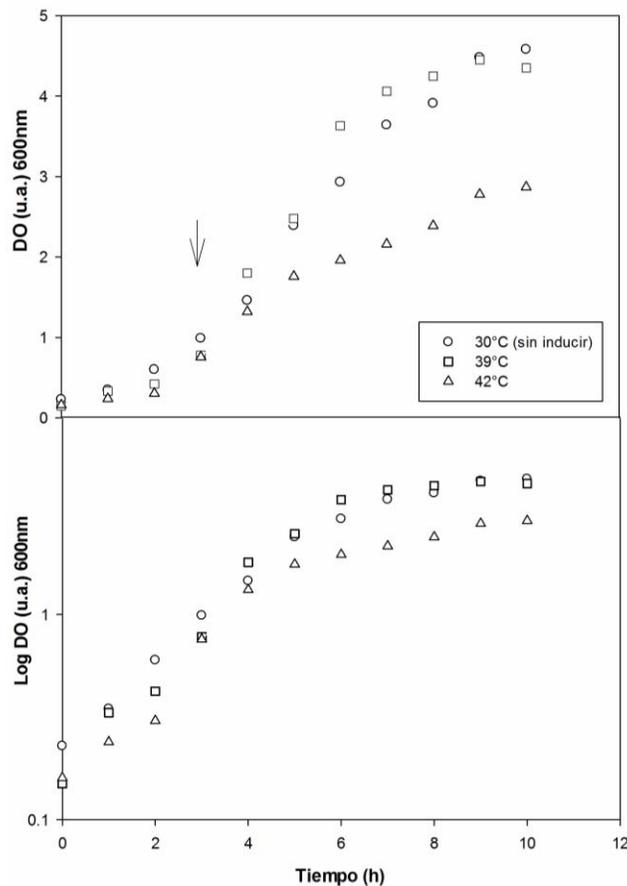


Figura 14. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con medio LB a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ). La inducción se realizó a una DO_{600} de 0.7-0.8 u.a. (3 h) como indica la flecha.

En los biorreactores se mantuvo el control de TOD $\geq 35\%$ y el pH en 7.4. Las células se mantuvieron a 30°C y después de 3 horas (DO₆₀₀ de 0.7-0.8 u.a.) se sometieron a inducción a 39°C y a 42°C. En este punto las células se encontraban en la fase pre-estacionaria del crecimiento, a diferencia de los matraces que fue a las 6 horas. Ningún cultivo en biorreactor con LB se hizo por duplicado, por eso en la Figura 14 no se reportaron las desviaciones estándar.

Las velocidades específicas de crecimiento se calcularon antes y después de la hora de inducción. Se encontró que la μ_s a 30°C en biorreactor con medio LB fue de 0.49 h⁻¹ y μ_i fue de 0.38 h⁻¹; se alcanzó una DO máxima de 4.58 u.a. Para el biorreactor inducido a 39°C el cambio en la temperatura tardó 18 minutos, que corresponde a una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min. La μ_s a 39°C fue de 0.52 h⁻¹ y μ_i fue de 0.49 h⁻¹; se alcanzó una DO máxima de 4.45 u.a. Así mismo, para el biorreactor inducido a 42°C con medio LB, el cambio en la temperatura tardó 24 minutos, que indica una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min, igual a la de 39°C. La μ_s a 42°C fue de 0.49 h⁻¹ y μ_i fue de 0.31 h⁻¹; se alcanzó una densidad óptica máxima de 2.87 u.a.

7.2. Comparación del crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados a 30°C usando diferentes medios de cultivo definidos

Con el objetivo de hacer un análisis metabólico en cuanto a la producción de ácidos orgánicos y consumo de la fuente de carbono en un sistema termoinducido, se propuso evaluar el desempeño cinético de la cepa recombinante usando un medio de cultivo definido.

Los medios definidos, también llamados medios minerales o mínimos, son de gran valor para el estudio de los requerimientos nutricionales de las bacterias, para determinar cambios fisiológicos y para conocer productos finales del metabolismo (Christos *et al.*, 2014). Como se conoce su composición exacta son comúnmente utilizados en bioprocesos porque garantizan reproducibilidad y seguridad, características requeridas en la producción de proteínas farmacéuticas (Hoffmann *et al.*, 2004). En contraste, los medios complejos como el Luria-Bertani (LB) generan dispersión o interfieren en las lecturas de los equipos por la gran cantidad de compuestos presentes y, además, no es posible hacer balances de materia y la dificultad de cálculos estequiométricos es más evidente.

En este sentido, se realizaron cinéticas de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio. Se propusieron diferentes formulaciones de medio definido (ver sección 6.1.3.2.) que se denominaron: Medio Lara, Medio Lara + casaminoácidos, Medio Caspeta y Medio Caspeta + casaminoácidos. A la par se realizó un cultivo en medio LB como control. Todo se hizo a las mismas condiciones de agitación (200 rpm), manteniendo la temperatura a 30°C y se comenzó con un tamaño de inóculo de 0.1 u.a.

Es importante mencionar que no se llevó a cabo inducción térmica ya que se pretendía evaluar el crecimiento de la cepa en las formulaciones y elegir el medio que permitiera obtener mayores densidades ópticas para los posteriores experimentos. Se tomaron muestras cada hora durante las primeras 10 horas de cultivo y luego se tomó una muestra al final de todo el cultivo (24 h) para la medición de los cambios en la DO. Cada experimento se realizó por duplicado.

En la curva de crecimiento (Figura 15) se puede ver claramente que la adición de casaminoácidos a un medio definido permite a las células crecer de manera semejante que cuando se usa un medio complejo, reflejando la importancia de la fuente de carbono para *E. coli*. Además, a pesar de que ambos medios definidos utilizan concentraciones diferentes de glucosa: Lara (10 g/L) y Caspeta (17.5 g/L), el comportamiento cinético de la cepa recombinante en ambos fue muy similar, incluso las DO máximas son comparables.

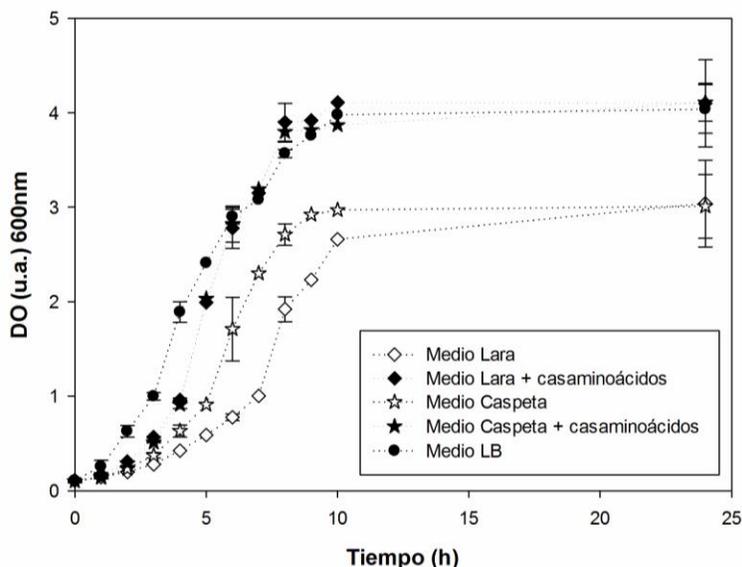


Figura 15. Cinética de crecimiento de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados usando diferentes medios de cultivo. Todas las cinéticas se llevaron a cabo a 30°C. Cultivo en Medio Lara (◇); Medio Lara + casaminoácidos (◆); Medio Caspeta (☆); Medio Caspeta + casaminoácidos (★); Medio LB (●).

En la Tabla 7 se comparan los parámetros de crecimiento obtenidos para la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6). Se observa que al suplementar los Medios Lara y Caspeta con casaminoácidos a una concentración de 3 g/L, se alcanzan mayores DO y velocidades específicas de crecimiento en comparación con los medios sin casaminoácidos. Además como no presentaron diferencia significativa entre ellos y basándonos en el referente directo donde se usó un sistema termoinducido, se tomó la decisión de utilizar el Medio Caspeta + casaminoácidos para los siguientes experimentos.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando diferentes medios definidos en matraces agitados a 30°C.

Parámetro	Medio Lara	Medio Lara + casaminoácidos	Medio Caspeta	Medio Caspeta + casaminoácidos	Medio LB
μ (h ⁻¹)	0.34 ± 0.04	0.55 ± 0.09	0.47 ± 0.06	0.59 ± 0.01	0.53 ± 0.02
DO máx (u.a.)	3.50 ± 0.06	4.56 ± 0.06	3.35 ± 0.03	4.34 ± 0.20	4.29 ± 0.25

7.3. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces y biorreactores con medio de cultivo definido usando un sistema termoinducido

Se hicieron cultivos de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en un sistema de matraces agitados de 250 mL con 50 mL del Medio Caspeta + casaminoácidos. Todos los cultivos estuvieron a una agitación constante de 200 rpm y se probaron tres condiciones de temperatura: 30°C (sin inducir), inducción a 39°C e inducción a 42°C. La inducción se realizó a las 5 horas (DO₆₀₀ entre 1.4-1.7 u.a.), donde las células estaban en fase pre-estacionaria (ver escala logarítmica, Figura 16).

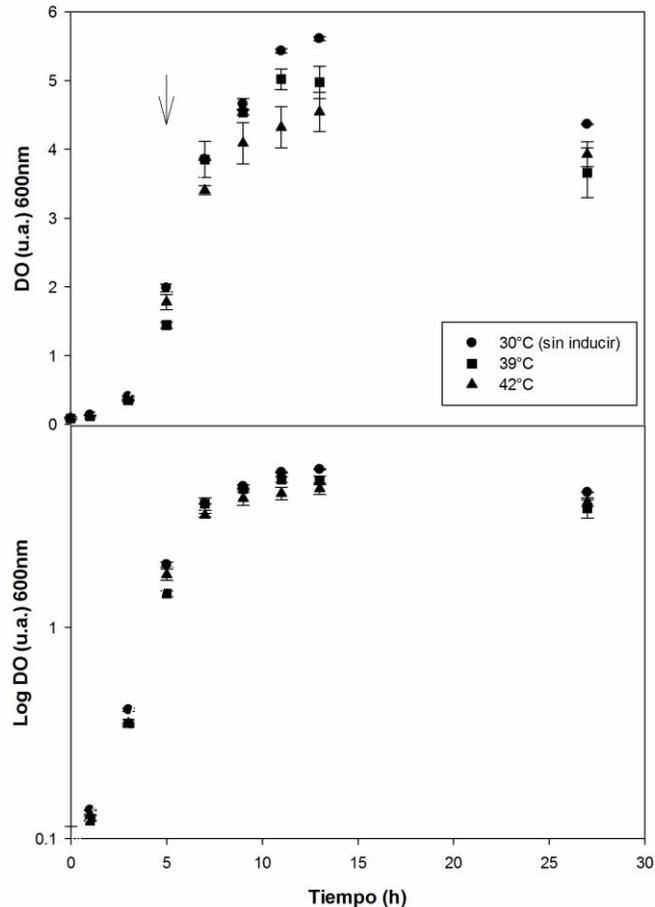


Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido, a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 1.4-1.7 u.a. (5 h) como indica la flecha.

Los cultivos en matraces con medio definido cuando son inducidos por temperatura, alcanzan una biomasa máxima menor comparada con la del cultivo que permanece a 30°C (Figura 16). Se observa una DO máxima de 5.61 ± 0.03 u.a. para el cultivo sin inducir, contra una DO máxima de 4.98 ± 0.24 u.a. para la inducción a 39°C y de 4.54 ± 0.29 u.a. para la inducción a 42°C. Los resultados obtenidos con el medio definido en matraces (Figura 16) muestran una tendencia similar a lo observado en las cinéticas de crecimiento de la cepa recombinante en medio complejo (Figura 13), ya que al final del cultivo hay una caída en la densidad óptica.

También se calcularon las velocidades específicas de crecimiento para los tres cultivos. A 30°C en matraces agitados usando medio definido, la velocidad de crecimiento antes de las 5 h (μ_s) fue de 0.62 ± 0.01 h⁻¹ y después de las 5 h (μ_i) fue de 0.16 ± 0.01 h⁻¹; para el cultivo inducido a 39°C, la μ_s fue de 0.57 ± 0.00 h⁻¹ y μ_i de 0.19 ± 0.00 h⁻¹. Finalmente para el cultivo inducido a 42°C, μ_s fue de 0.58 ± 0.01 h⁻¹ y la μ_i de 0.14 ± 0.00 h⁻¹. La μ_s se calculó para todos los cultivos tomando los primeros 4 puntos de la cinética, antes del cambio de temperatura y la μ_i se calculó con 4 puntos después de la inducción.

En los cultivos de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando biorreactores de 1.2 L con 1.0 L de medio definido, se controló la TOD por encima del 35% y el pH se mantuvo cercano a 7.0. Todos los cultivos se iniciaron con un tamaño de inóculo de 0.1 u.a. y las células se sometieron a termoinducción a las 6 horas (3.0-4.0 u.a.), justo antes de entrar en la fase estacionaria (ver escala logarítmica, Figura 17). La velocidad de calentamiento para la termoinducción fue de 0.5°C/min.

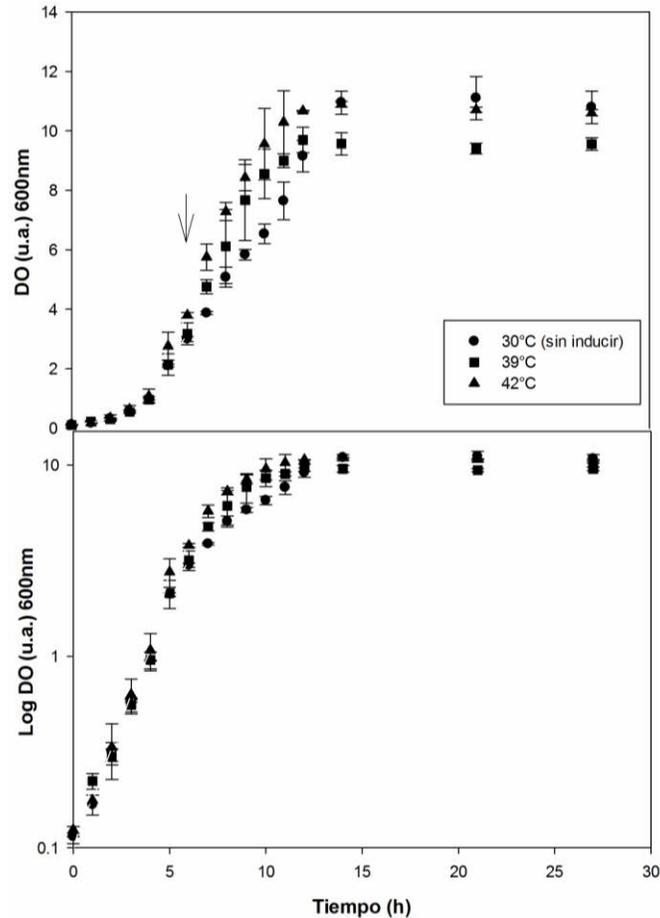


Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con 1.0 L medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 3.0-4.0 u.a. (6 h) como indica la flecha.

Los biorreactores que permanecieron a 30°C alcanzaron una DO máxima de 10.80 ± 0.55 u.a. con una velocidad específica de crecimiento antes de las 6 h (μ_s) de 0.54 ± 0.02 h⁻¹ y una velocidad específica de crecimiento después de las 6 h (μ_i) de 0.18 ± 0.01 h⁻¹. Mientras que el cultivo inducido a 39°C alcanzó una DO de 9.56 ± 0.22 u.a. con una μ_s de 0.59 ± 0.01 h⁻¹ y una μ_i de 0.18 ± 0.01 h⁻¹. Finalmente, el cultivo inducido a 42°C llegó a una DO de 10.61 ± 0.11 u.a. con una μ_s de 0.60 ± 0.02 h⁻¹ y una μ_i de 0.16 ± 0.02 h⁻¹ (Figura 17). Las velocidades de crecimiento se calcularon con 7 puntos, tanto para antes de la inducción (μ_s) como para después de la inducción (μ_i). Esto demuestra que después del tiempo de inducción, las μ para las tres temperaturas no varían significativamente en los cultivos en biorreactores.

También se observó una correlación lineal entre la densidad óptica y la biomasa en peso seco (g/L) para las cinéticas llevadas a cabo con medio definido (Figura 18). Se obtuvo que para la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) empleada en este trabajo, 1 unidad de DO (600 nm) es equivalente a 0.31 ± 0.05 g/L de peso seco celular. Muchas investigaciones han reportado valores cercanos para otras cepas de *E. coli* modificadas. Para *E. coli* W3110 recombinante, 1 DO (600 nm) corresponde a 0.32 g/L (Sandoval-Basaruto, *et al.*, 2004); para *E. coli* BL21 (DE3) recombinante se ha reportado que 1 DO (600 nm) corresponde a 0.39 g/L (Glazyrina *et al.*, 2010) y para una cepa ATCC 10798 derivada de *E. coli* K-12 usada en un sistema termoinducible se encontró que 1 DO (600 nm) es equivalente a 0.28 g/L (Mansey, *et al.*, 2014).

Con base en la correlación encontrada entre la DO y la biomasa, se tiene que en matraces agitados con medio definido a 30°C se alcanza una biomasa máxima ($X_{m\acute{a}x}$) de 1.74 ± 0.01 g/L, mientras que en los cultivos inducidos a 39°C y 42°C se alcanzan $X_{m\acute{a}x}$ de 1.54 ± 0.07 g/L y de 1.41 ± 0.09 g/L, respectivamente (Figura 18A). Por su parte, la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando biorreactores con medio definido (Figura 18B), alcanza una $X_{m\acute{a}x}$ de 3.35 ± 0.17 g/L a 30°C, una $X_{m\acute{a}x}$ de 2.96 ± 0.03 g/L bajo inducción a 39°C y una $X_{m\acute{a}x}$ de 3.29 ± 0.07 g/L bajo inducción a 42°C.

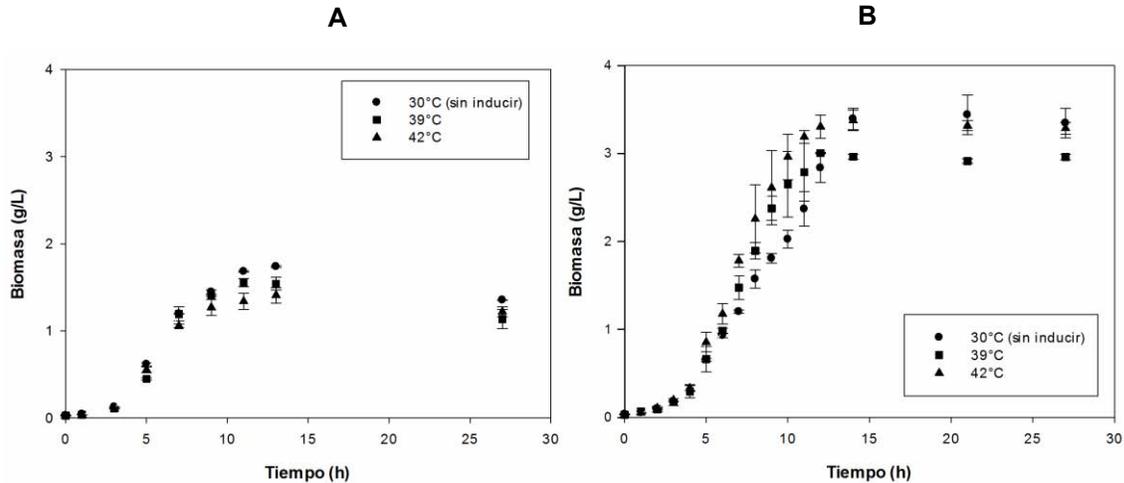


Figura 18. Cinética de crecimiento de biomasa para la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados (A) y biorreactores (B) con medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

7.3.1. Consumo de glucosa

En la Figura 19, se observa la cinética de consumo de glucosa de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados con medio definido, bajo diferentes temperaturas de inducción.

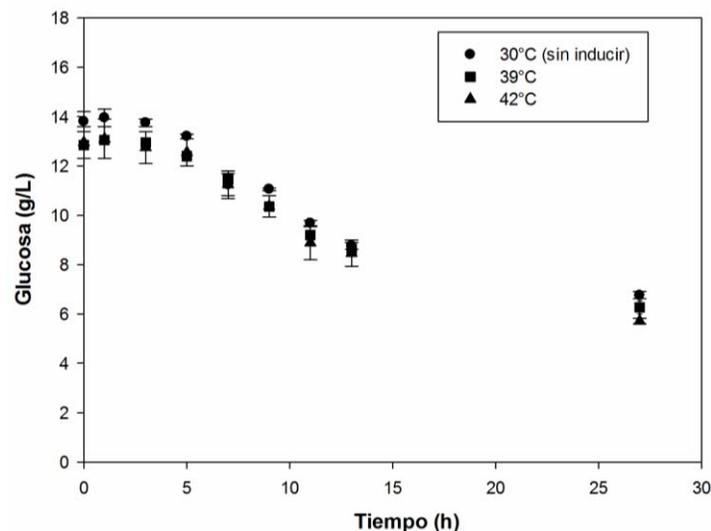


Figura 19. Consumo de glucosa de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados con medio definido usando un sistema termoinducible. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Los resultados indican que la glucosa no se termina de consumir en ninguno de los casos, alcanzando concentraciones finales de 6.27 ± 0.27 g/L a 39°C y 5.71 ± 0.11 g/L a 42°C . El cultivo sin inducir alcanzó una concentración de glucosa residual de 6.76 ± 0.15 g/L (Figura 19), que es ligeramente mayor a los valores obtenidos en cultivos termoinducidos.

A partir de estos datos, se calcularon parámetros cinéticos como el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato (Y_{XS}), el cual para los cultivos sin inducir fue de 0.16 ± 0.01 g células/g gluc, mientras que en los cultivos inducidos se alcanzaron valores de 0.14 ± 0.02 g células/g gluc a 39°C y 0.12 ± 0.01 g células/g gluc a 42°C . Se puede ver que con el aumento de la temperatura hay una tendencia del rendimiento de biomasa con respecto a la glucosa consumida a disminuir. Las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_S) fueron de 1.00 ± 0.00 g gluc/g células.h a 30°C , 1.36 ± 0.01 g gluc/g células.h a 39°C y 1.20 ± 0.01 g gluc/g células.h a 42°C , indicando que la inducción por temperatura incrementa la velocidad de consumo de la fuente de carbono por unidad de biomasa. Las q_S se calcularon con la velocidad específica de crecimiento antes de inducir (μ_i).

También se graficó el consumo de la glucosa en los cultivos en biorreactor (Figura 20). La glucosa en los cultivos termoinducidos fue consumida en su totalidad un poco después de que las células entran a la fase estacionaria (a las 13 horas del cultivo), mientras que en la condición sin inducir la glucosa queda disponible por más tiempo, siendo consumida totalmente luego de las 20 horas. En este caso, las concentraciones finales de glucosa fueron de 0.02 ± 0.00 g/L a 39°C , 0.03 ± 0.00 g/L a 42°C y para el cultivo sin inducir fue de 0.02 ± 0.01 g/L. En biorreactores, las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_S) también aumentaron con la temperatura. Para el cultivo sin inducir, q_S fue de 0.95 ± 0.02 g gluc/g células.h, para la inducción a 39°C fue de 1.10 ± 0.01 g gluc/g células.h y para la inducción a 42°C fue de 0.99 ± 0.01 g gluc/g células.h.

Por su parte, Y_{XS} fue de 0.19 ± 0.06 g células/g gluc a 30°C , de 0.17 ± 0.03 g células/g gluc a 39°C y de 0.18 ± 0.04 g células/g gluc a 42°C , lo que demuestra que en biorreactores la biomasa generada a partir del sustrato tiende a disminuir con el aumento de la temperatura.

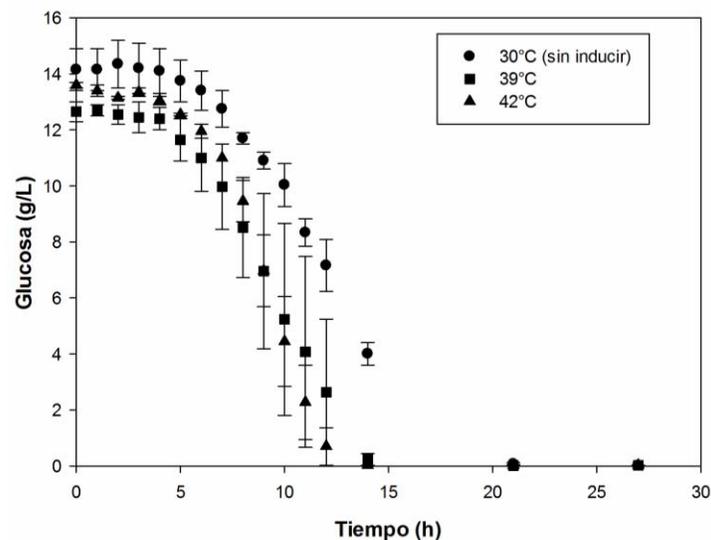


Figura 20. Consumo de glucosa de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con medio definido usando un sistema termoinducible. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

7.3.2. Producción de acetato

Se cuantificó en el medio de cultivo la formación de ácidos orgánicos usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En la Figura 21, se observa que en los matraces agitados sometidos a termoinducción hay un leve aumento en la producción de acetato al compararlos con los matraces sin inducir. A medida que aumenta la temperatura de inducción, incrementa la concentración final de acetato en el medio: a 30°C fue de 4.99 ± 0.04 g/L, para el cultivo inducido a 39°C fue de 5.30 ± 0.30 g/L y a 42°C fue de 6.08 ± 0.67 g/L. También se cuantificaron otros ácidos como oxalato, malato, succinato, formato y citrato, que se presentan en el Anexo 2 (Figura A2).

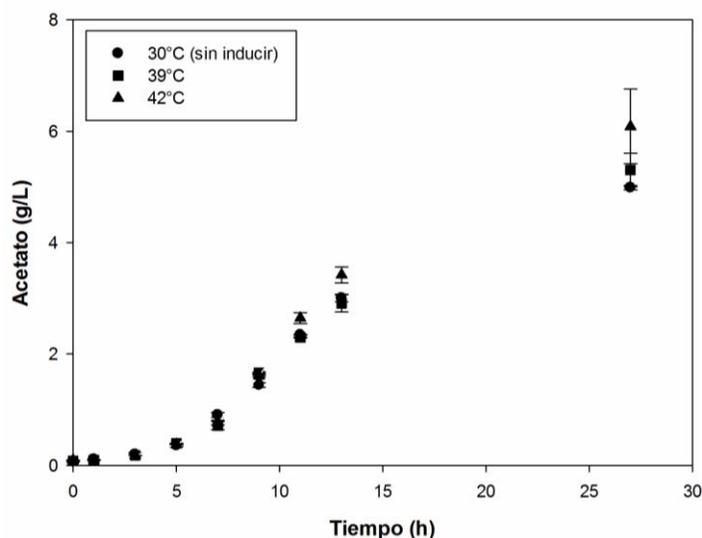


Figura 21. Producción de acetato de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados usando medio definido. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

En la Figura 22 se presenta la cinética de producción de acetato en los biorreactores. En la condición sin inducir, hay acumulación de acetato a lo largo del tiempo de cultivo, alcanzando una concentración final de 3.54 ± 0.47 g/L. Mientras que en los cultivos termoinducidos, la producción de acetato es en forma de campana, es decir, que comienza a aumentar hasta alcanzar un punto máximo y luego disminuye la concentración a partir de las 18-20 h de cultivo (fase estacionaria). Para el cultivo inducido a 39°C se alcanza una concentración máxima de acetato de 3.57 ± 0.27 g/L (14 h), pero al final del cultivo es de 2.04 ± 0.46 g/L. Mientras que para el cultivo inducido a 42°C la concentración máxima de acetato es de 6.63 ± 1.10 g/L (11 h) y al final del cultivo es de 1.82 ± 0.54 g/L.

Algunos estudios han demostrado que cepas derivadas de *E. coli* K12 a altas concentraciones de fuente de carbono (glucosa entre 20–40 g/L), pueden acumular concentraciones de acetato de hasta 7.5 g/L, comparadas con otras cepas como *E. coli* BL21 que sólo acumula 2.5 g/L a las mismas condiciones. La acumulación de acetato por encima de 2.0 g/L en el medio de cultivo de *E. coli* puede disminuir el crecimiento, frenar la acumulación de biomasa e inhibir la biosíntesis de proteína recombinante (Shiloach & Fass, 2005).

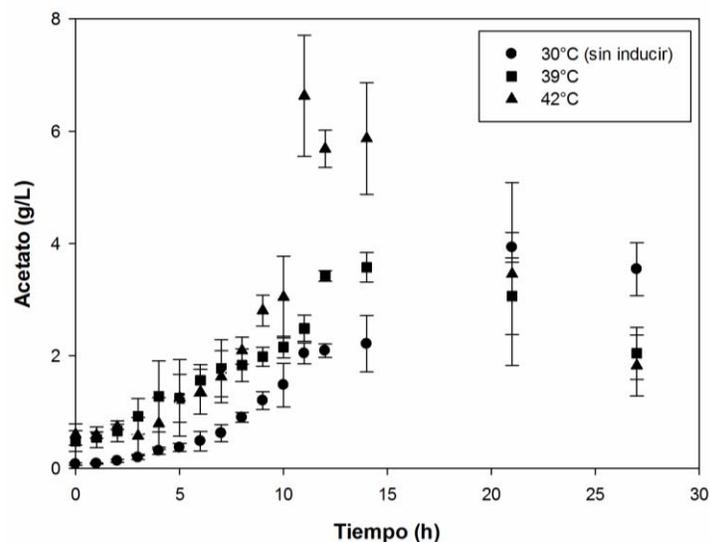


Figura 22. Producción de acetato de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L usando medio definido. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Según los resultados obtenidos hasta ahora, en matraces no hay limitación de glucosa, pero hay una caída en la biomasa posiblemente por la acumulación de acetato y la limitación de otro nutriente, que puede ser el oxígeno disuelto en el medio. Mientras que en biorreactores donde se controló el oxígeno, no se presentó esta caída. Para comprobar este supuesto, se procedió a la medición del oxígeno en los matraces y se graficaron los perfiles obtenidos para ambas escalas de cultivo.

7.3.3. Perfiles de oxígeno disuelto (TOD)

Como en matraces no hay limitación por fuente de carbono, planteamos la hipótesis de que el crecimiento además de verse limitado por sobre flujo metabólico, también presenta escasez de otro sustrato indispensable para crecer: el oxígeno disuelto. Se hicieron mediciones en línea de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en matraces agitados usando un sensor óptico. Los resultados demostraron que hay limitación de oxígeno desde las 4-5 h de cultivo hasta las 10-12 h, que coincide con el momento en el que se detiene el crecimiento y comienza la fase estacionaria (Figura 23). Se observa que los perfiles de la TOD tanto del cultivo sin inducir como de los inducidos térmicamente, presentan la misma tendencia y permanecen el mismo tiempo bajo limitación de oxígeno.

En la Figura 24 puede observarse que en el caso de los biorreactores el oxígeno disuelto en el medio nunca llegó a cero. Debido al control del sistema por agitación, los valores de la TOD siempre estuvieron oscilando alrededor del "set point" de 35%, manteniendo el oxígeno en un rango entre 60-20% de saturación de aire. Aunque el control no fue estricto, puede decirse que en los biorreactores no hubo la limitación de oxígeno que fue evidente en los matraces agitados.

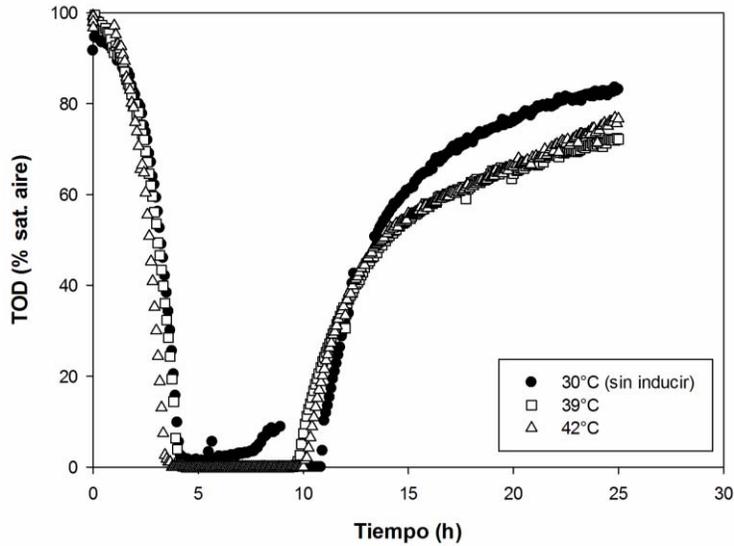


Figura 23. Perfil de TOD de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido a diferentes temperaturas de inducción. La medición se hizo online con el equipo FIBOX 3 usando el sensor PSt3 (PreSens). Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

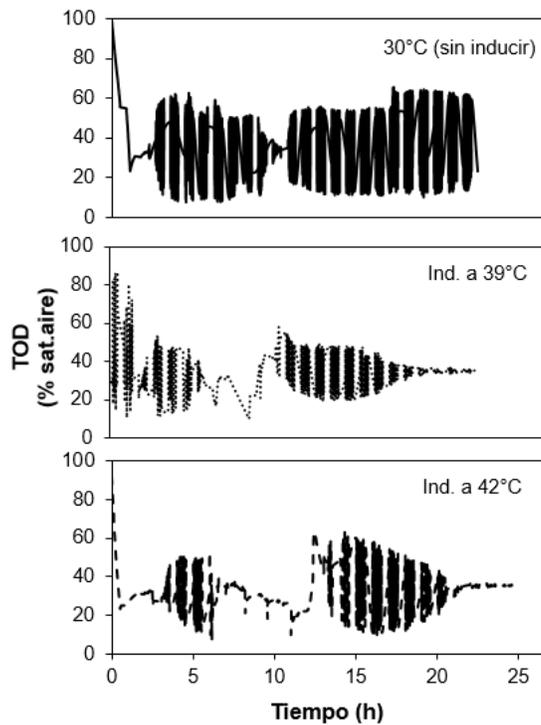


Figura 24. Perfiles de TOD de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactor de 1.2 L con 1L de medio definido a diferentes temperaturas de inducción. Línea sólida (—): cultivo sin inducción a 30°C; línea punteada (···): cultivo con inducción a 39°C y línea segmentada (---): cultivo inducción a 42°C. La inducción se realizó a una DO_{600} de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

7.3.4. Perfiles de pH

Se hicieron mediciones del pH durante los cultivos en matraz y biorreactor. El pH en los matraces agitados disminuyó en todos los casos (Figura 25). A 30°C el pH final fue de 5.46 ± 0.02 , bajo inducción a 39°C fue de 5.13 ± 0.00 y bajo inducción a 42°C el pH final fue de 4.96 ± 0.01 . Esto va de la mano con la acumulación de acetato que fue mayor tras la inducción a 39°C y 42°C, lo que indica que a mayor temperatura del cultivo se acumula más acetato y por eso se alcanza un pH más bajo.

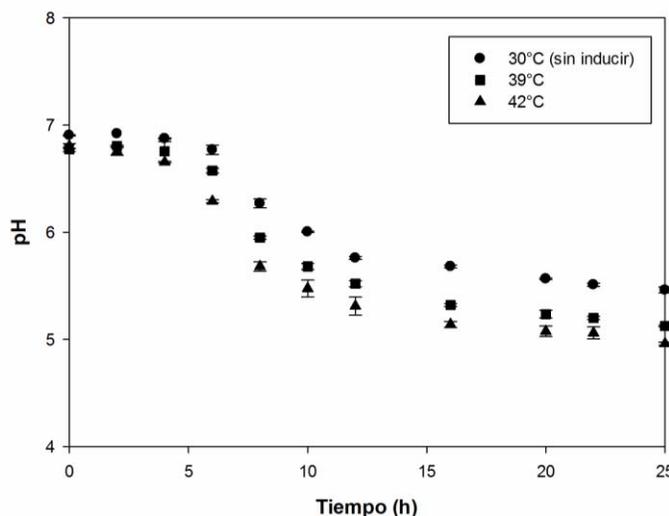


Figura 25. Perfil de pH de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados de 250 mL con 50 mL de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲). La inducción se realizó a una DO_{600} de 1.4-1.7 u.a. (5 h).

Para los biorreactores el pH se mantuvo entre 6.45 y 7.35 debido nuevamente al control del sistema por inyección de NaOH o HCL (Figura 26).

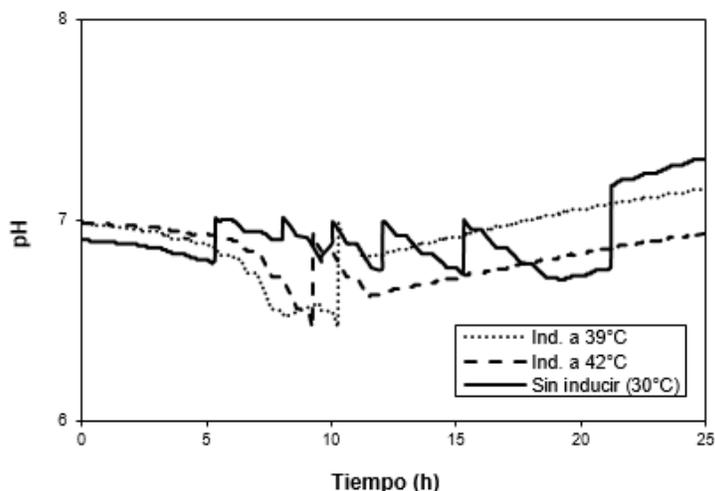


Figura 26. Perfil de pH de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en biorreactores de 1.2 L con 1 L de medio de medio definido bajo diferentes temperaturas de inducción. Línea sólida (—): cultivo sin inducción a 30°C; línea punteada (---): cultivo con inducción a 39°C y línea segmentada (---): cultivo inducción a 42°C. La inducción se realizó a una DO_{600} de 3.0-4.0 u.a. (6 h).

Finalmente, en la Tabla 8 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos calculados en este trabajo para un sistema termoinducido usando *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio definido.

Tabla 8. Parámetros cinéticos representativos de los cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio definido.

PARÁMETROS CINÉTICOS	MATRACES			BIORREACTORES		
	30°C	39°C	42°C	30°C	39°C	42°C
μ_s (h ⁻¹)	0.62 ± 0.01	0.57 ± 0.00	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.02
μ_i (h ⁻¹)	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.02
X máx (g/L)	1.74 ± 0.01	1.54 ± 0.07	1.41 ± 0.09	3.35 ± 0.17	2.96 ± 0.03	3.29 ± 0.07
Y _{xs} (g _{células} /g _{glc})	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.06	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.04
q _S (g _{glc} /g _{células} .h)	1.00 ± 0.00	1.36 ± 0.01	1.20 ± 0.01	0.95 ± 0.02	1.10 ± 0.01	0.99 ± 0.01

Se muestra la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Las velocidades específicas de crecimiento se calcularon antes (μ_s) y después de inducir (μ_i).

Las velocidades específicas de consumo de glucosa (q_S) se calcularon con la μ_i .

7.4. Evaluación de la expresión de la proteína ESAT-6 producida por *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados con medio LB

Para evaluar el efecto de la estrategia de termoinducción sobre la expresión y el estado de plegamiento de la proteína ESAT-6, se comparó la presencia de ésta en la fracción soluble y en los cuerpos de inclusión. Todas las muestras fueron recolectadas al final de cada cultivo. La proteína soluble fue obtenida a partir del lisado celular y los CI fueron obtenidos por dos protocolos diferentes, como se especificó en la metodología. Las proteínas recuperadas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida. En todos los casos se utilizó como control negativo la cepa *E. coli* ATCC 53606 sin transformar.

Es preciso aclarar que en los resultados en matraces agitados con medio LB sólo se presenta la inducción a 39°C, ya que posteriormente se tomó la decisión de seguir los experimentos usando únicamente medio definido.

7.4.1. Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes

En la Figura 27A, se observa la separación de proteínas en gel de poliacrilamida tras el cultivo de la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces con medio LB. Se distingue una banda entre los 10 y 17 kDa en la fracción de los CI inducidos a 39°C (carril 6). Esta banda puede corresponder a la proteína de interés ESAT-6, que con la marca de histidina tiene un peso aparente de ~11.64 kDa. Interesantemente, en el carril de la proteína total soluble (PTS) a 42°C no se observa una banda a esta altura (carril 5), lo que sugiere que toda la proteína recombinante se agrega bajo el uso de un sistema inducido por temperatura.

Para comprobar la presencia de ESAT-6, se realizó un Western Blot usando el anticuerpo anti-ESAT-6. En la Figura 27B, se puede ver la detección de una banda entre 10 y 17 kDa en los CI de cultivos inducidos a 39°C (carril 6), confirmando la presencia de la proteína recombinante ESAT-6.

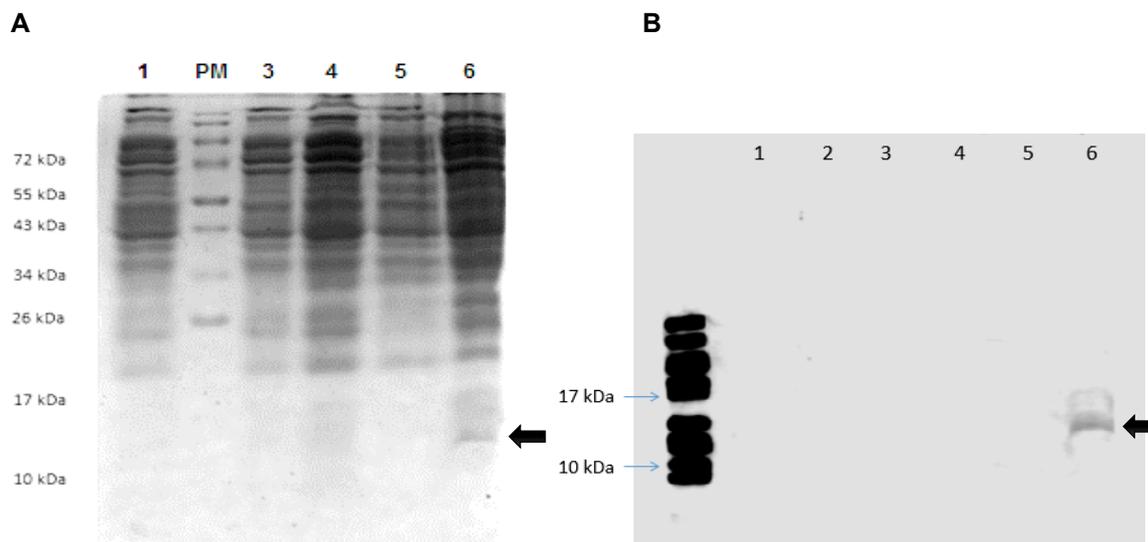


Figura 27. Expresión de ESAT-6 (~11.64 kDa) en un sistema termoinducido usando matraces agitados con medio LB. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % teñido con azul de Coomassie (A) y se hizo el Western Blot de ESAT-6 empleando anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 2: Marcador de peso molecular; carril 3 y 4: Cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) sin inducir; carril 5: Proteína total soluble (PTS) de cultivos de la cepa transformada inducida a 42°C y carril 6: CI a 39°C. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

7.4.2. Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster

Se analizó la presencia de la proteína ESAT-6 en los CI purificados con el agente BugBuster™. Como se mencionó en la metodología, este reactivo sirve para extraer de forma activa las proteínas de *E. coli* evitando las técnicas mecánicas, pues la lisis celular se logra enzimáticamente con una mezcla de detergentes no iónicos y, en teoría, se obtienen cuerpos de inclusión más puros (BugBuster™ Protein Extraction Reagent Brochure, Code N° TB24509/00, Novagen, Madison, WI, USA; De Mey *et al.*, 2008).

El rendimiento obtenido de los cuerpos de inclusión con respecto a la biomasa total en peso húmedo estuvo entre el 14 y el 16 %, usando este agente. Mientras que usando el método de sonicación y lavados con detergentes, el rendimiento estuvo entre el 10 y 12%. Esto se obtuvo relacionando el peso de los pellets correspondientes a la biomasa antes de romper y el peso de los CI purificados.

La presencia de la proteína de interés tanto soluble como insoluble tras el tratamiento con BugBuster™ se evaluó en un gel de poliacrilamida al 16 % (Figura 28A). En este gel se incluyeron muestras de la clona de trabajo C₄ y de la clona A que se obtuvo en otros intentos de transformación, con el objetivo de comparar la expresión. Se observa una banda tenue a la altura de 14-15 kDa en el carril 5 que corresponde a los CI de la clona A, así como una banda más oscura a la misma altura en los CI de la clona C₄ (carriles 8, 9 y 10), indicando la posible presencia de ESAT-6 en dichas fracciones.

Para comprobar si esta banda del gel corresponde a la presencia de la proteína de interés ESAT-6 se realizó un Western Blot usando el anticuerpo anti-ESAT-6. En la Figura 28B, se puede ver la presencia de una banda de tamaño significativo en las fracciones de proteína insoluble (carriles 5 y

9) a una altura entre 10 y 15 kDa, que corrobora la expresión de ESAT-6 en los CI. También hubo reconocimiento en la fracción de la proteína total soluble de la clona C₄ (carril 7).

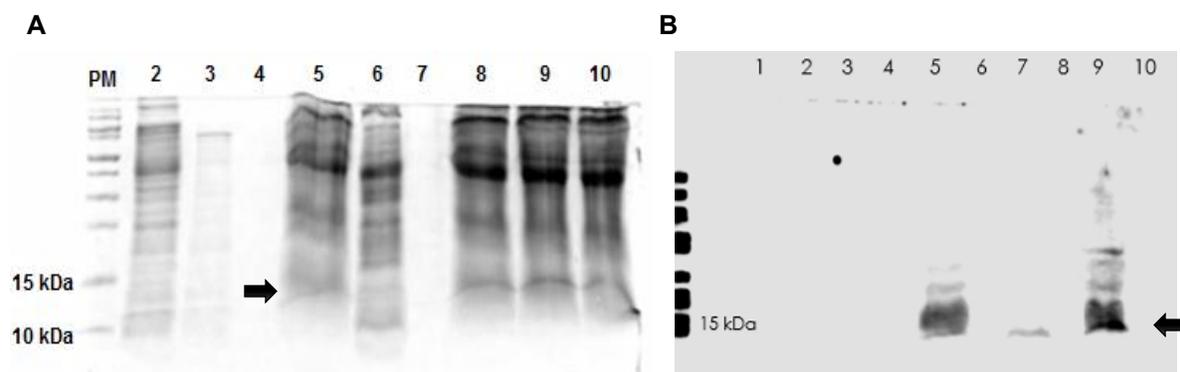


Figura 28. Expresión de ESAT-6 (~11.64 kDa) en un sistema termoinducido usando matraces agitados con medio LB. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 16% teñido con azul de Coomassie **(A)** y se hizo el Western Blot de ESAT-6 empleando anti-ESAT-6 **(B)**. En el **gel**, carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: Lisado celular total de *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 4: Vacío; carril 5: CI a 39°C de la clona A; carril 6: PTS clona A; carril 7: Vacío; carriles 8, 9 y 10: CI de la clona C₄. En el **Western blot**, carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2 y 3: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 4: Vacío; carril 5: CI a 39°C de la clona A; carril 6: Vacío; carril 7: PTS de la clona C₄; carril 8: vacío y carril 9: CI a 39°C de la clona C₄ y carril 10: vacío. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

Después de los resultados anteriores se concluyó que bajo el uso del sistema termoinducido a 39°C en matraces agitados con medio LB, se obtiene la proteína recombinante ESAT-6 mayoritariamente en la fracción insoluble.

Para complementar esta información, se cuantificó la proteína total en las fracciones insolubles usando un equipo NanoDrop Lite de *ThermoScientific*. Luego se determinó el porcentaje correspondiente a la proteína ESAT-6 por densitometría usando el programa Image Lab (Versión 5.2 de *BIO-RAD*) y se calcularon los rendimientos de producto respecto a biomasa. Los resultados se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9. Rendimientos de ESAT-6 recombinante en los CI de cultivos termoinducidos a 39°C usando matraces agitados de 250 mL con medio complejo LB. Se comparan los CI purificados por dos métodos diferentes: sonicación y agente BugBuster.

Método de purificación	Proteína total insoluble (g/L)	Banda ESAT-6 (%)	ESAT-6 en los CI (g/L)	Y _{P/X} (g _{Ptotal} /g _{células})	Y _{ESAT-6/X} (g _{ESAT-6} /g _{células})
Sonicación y detergentes	51.7	1.17*	0.60	45.35	0.53
BugBuster™	11.92	11.74**	1.40	10.45	1.23

En matraces con LB inducidos a 39°C, $\mu = 0.46 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y biomasa máxima = $1.14 \pm 0.05 \text{ g/L}$.

*Densitometría del carril 6, fig. 27.

**Promedio densitometría de los carriles 8, 9 y 10, fig. 28.

7.5. Evaluación de la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados con medio definido

Se recuperó la fracción soluble y los cuerpos de inclusión de matraces agitados y biorreactores conteniendo medio definido por dos metodologías diferentes, sonicación y BugBuster™. En este caso, se probaron las dos estrategias de termoinducción: 39°C y 42°C. Todas las muestras fueron recolectadas al final de cada cultivo y las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 53606 sin transformar y como control positivo, se usaron los cuerpos de inclusión aislados del cultivo inducido a 39°C en matraz con medio LB.

7.5.1. Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes

Los CI purificados por sonicación y uso de detergentes tras cultivos termoinducidos en matraces agitados conteniendo medio definido se analizaron en un gel de poliacrilamida al 18% (Figura 29). Como se observa en la Figura 29A, hay una banda en las fracciones solubles termoinducidas (carriles 6 y 8) entre los 10 y los 15 kDa, pero no en los CI a 39°C y 42°C. Podríamos pensar que se trata de ESAT-6 produciéndose en forma soluble.

Sin embargo, cuando se realizó el Western Blot correspondiente usando el anticuerpo anti-ESAT-6 (Figura 29B) no hubo reconocimiento en ninguna fracción, exceptuando el control positivo. Esto demuestra que la banda del gel no es ESAT-6, aunque se encuentre a la misma altura, y que usando el método de sonicación y detergentes no se logró la detección de la proteína recombinante.

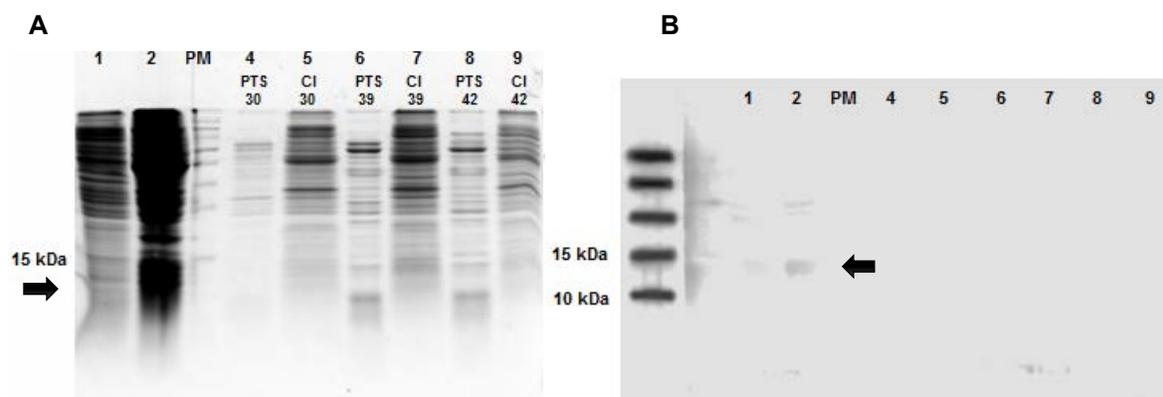


Figura 29. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC-53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en matraces agitados con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 2: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 3: Marcador de peso molecular; carriles 4 y 5: PTS y CI de la sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 6 y 7: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 8 y 9: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

7.5.2. Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster

Las muestras de matraces agitados con medio definido se cargaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (Figura 30A). En los carriles 5, 7 y 9 que corresponden a la proteína total soluble (PTS) de todas las condiciones se ve una banda entre 11 y 12 kDa, pero en los carriles 6, 8 y 10 que contienen la proteína producida en los CI, también se ve otra banda más arriba entre 13 y 14 kDa. Siendo congruentes con los resultados obtenidos hasta el momento, la proteína recombinante ESAT-6

tiende a producirse en forma insoluble cuando se usa medio de cultivo LB, por eso se realizó un Western Blot para comprobar en qué fracción se produjo la proteína.

Vale la pena destacar que en los CI obtenidos bajo termoinducción a 39°C muchas más proteínas endógenas celulares se están produciendo, mientras que en los CI obtenidos a 42°C en matraces con medio definido es menor la intensidad de las bandas (Figura 30A).

En el Western Blot usando el anticuerpo específico anti-ESAT-6 (Figura 30B), se puede ver la presencia de una banda en la fracción de la proteína insoluble del cultivo inducido a 39°C (carril 6) a una altura aproximada de 12-13 kDa, así como en los CI obtenidos de cultivos termoinducidos a 42°C (carril 10), mientras que en las fracciones solubles no hubo reconocimiento. Este resultado señala que con el método de BugBuster™ es posible la determinación de la proteína heteróloga. En los matraces con el medio definido sí se está produciendo ESAT-6 pero su visualización en los geles y en las inmunodetecciones depende del método de purificación de los CI. Además, se comprueba que la proteína recombinante a nivel de matraces agitados se produce en cuerpos de inclusión usando un sistema inducido por temperatura.

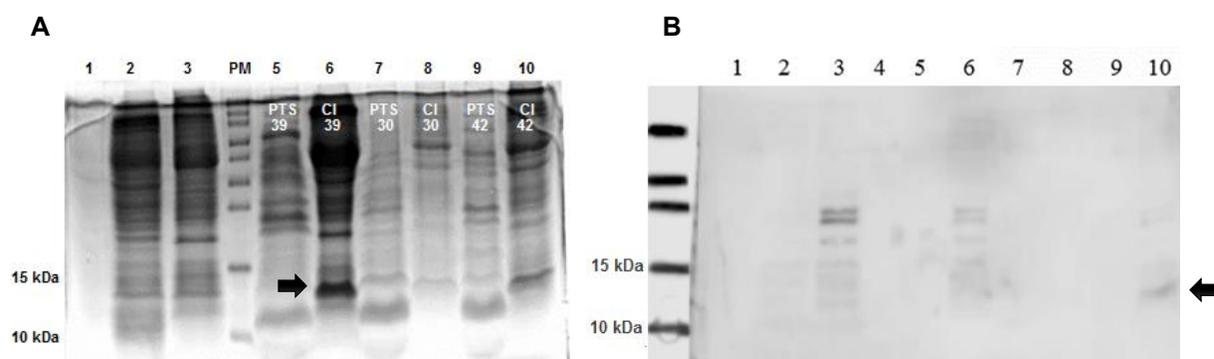


Figura 30. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC-53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en matraces agitados con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular; carriles 5 y 6: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 7 y 8: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 9 y 10: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

7.6. Evaluación de la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en biorreactores de 1.2 L con medio definido

Después de realizar los cultivos termoinducidos en biorreactores usando medio definido, las muestras finales se trataron con dos metodologías diferentes para obtener tanto la fracción soluble como la insoluble. Se cargaron geles de poliacrilamida al 18% con las muestras y se pusieron además los dos controles, uno negativo que es la cepa *E. coli* ATCC 53606 sin transformar, y uno positivo, que son los cuerpos de inclusión aislados de un cultivo inducido a 39°C en matraz con medio LB.

7.6.1. Cuerpos de inclusión obtenidos por sonicación y uso de detergentes

En la Figura 31A se observa el gel de poliacrilamida de las muestras obtenidas por sonicación y uso de detergentes tras cultivos en biorreactores con medio definido. Inesperadamente no se distingue una banda intensa a la altura de los 15 kDa en ninguna de las fracciones; sólo se distingue una banda en la muestra de los CI obtenidos de matraces termoinducidos a 39°C con medio LB (carril

2), que este caso sería el control positivo. El Western Blot con el anticuerpo anti-ESAT-6 sólo demostró la presencia de la proteína heteróloga en el control positivo, pero no se observó en la proteína soluble ni en los CI de los biorreactores con medio definido (Figura 31B).

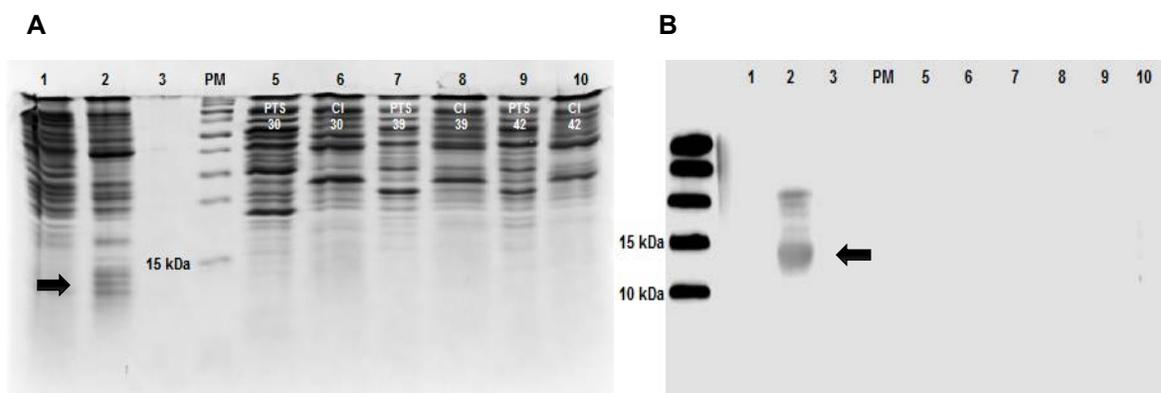


Figura 31. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en biorreactor de 1.2 L con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 2: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 3: vacío; carril 4 Marcador de peso molecular; carril 5 y 6: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 7 y 8: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 9 y 10: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente. Los CI se obtuvieron por sonicación y uso de detergentes.

7.6.2. Cuerpos de inclusión obtenidos con el reactivo BugBuster

Las fracciones de ESAT-6 purificadas con BugBuster™ provenientes de cultivos en biorreactores con medio definido se observan en la Figura 32. En las muestras correspondientes a la proteína soluble (carriles 4, 6 y 8) se ve una banda entre 11 y 12 kDa, tanto a 30°C como a 39°C y 42°C (Figura 32A). Mientras que en los cuerpos de inclusión del cultivo inducido a 39°C en reactor (carril 7) se pueden ver dos bandas, una a los 14 kDa y otra a los 13 kDa. Dichas bandas también se ven en el carril 9 que corresponde a los cuerpos de inclusión del cultivo en biorreactor inducido a 42°C, siendo más intensas a 42°C que a 39°C. Suponemos que estas bandas corresponden a la proteína recombinante ESAT-6, pero con el objetivo de confirmar en cuáles fracciones se está expresando se realizó el respectivo Western Blot.

En la Figura 32B se presenta el Western Blot contra la proteína ESAT-6. Se observa una banda a la altura aproximada de 12-13 kDa en los carriles 5, 7 y 9 que corresponden a los CI obtenidos en medio definido a 30°C, 39°C y 42°C, respectivamente, indicando que en las fracciones insolubles hubo acumulación de ESAT-6 y descartando su presencia en las fracciones solubles. A pesar de que en el gel no se veía proteína recombinante a 30°C, de manera interesante en el Western Blot hubo reconocimiento en la fracción insoluble sin inducir (carril 5). Esto podría indicar que a baja temperatura (30°C) no hay una represión completa de la expresión del gen recombinante, o tal vez podría ser por la inespecificidad del anticuerpo.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis por densitometría usando el programa Image Lab (Versión 5.2 de BIO-RAD) con el objetivo de cuantificar los niveles de expresión de la proteína recombinante. No se hicieron densitometrías de los geles correspondientes a los CI purificados por el método de sonicación y detergentes de cultivos en matraces y biorreactores (Figuras 29A y 31A), porque en las inmunodetecciones no se ve la presencia de la proteína recombinante. Se tuvieron en cuenta únicamente las bandas correspondientes a ESAT-6 de las fracciones insolubles purificadas con el método de BugBuster, en los geles de matraces y biorreactores (Figuras 30A y 32A).

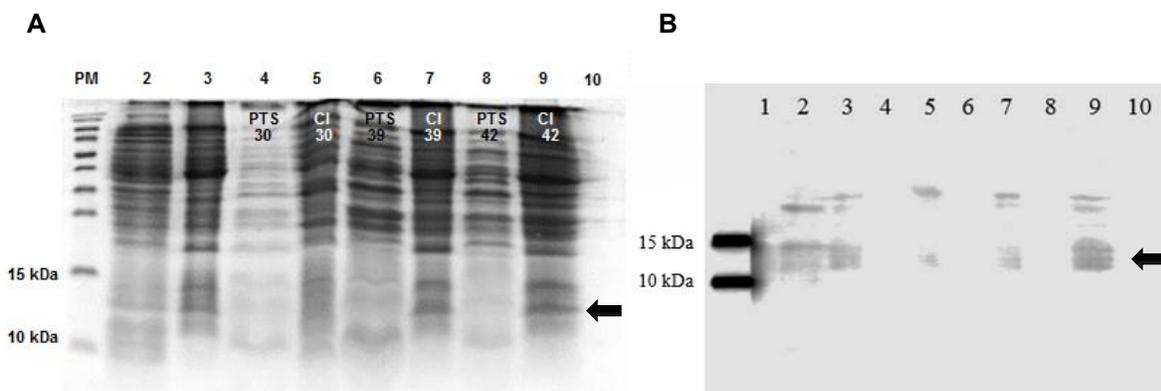


Figura 32. Expresión de ESAT-6 en *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema inducido térmicamente en biorreactor de 1.2 L con medio definido. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 18 % (A) y se hizo el Western Blot empleando el anticuerpo anti-ESAT-6 (B). Los carriles de ambas figuras corresponden a las mismas muestras. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *E. coli* ATCC 53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4 y 5: PTS y CI de la cepa sin inducir a 30°C respectivamente; carriles 6 y 7: PTS y CI de la cepa inducida a 39°C respectivamente; carriles 8 y 9: PTS y CI de la cepa inducida a 42°C respectivamente; carril 10: vacío. Los CI se obtuvieron con la solución BugBuster™.

En la Tabla 10 se presentan las concentraciones de proteína dentro de los CI cuantificadas por Bradford, así mismo la concentración correspondiente a la proteína recombinante ESAT-6 y el rendimiento de ESAT-6 con respecto a la biomasa máxima obtenida en cada sistema-

Tabla 10. Rendimientos de ESAT-6 recombinante en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido a 39°C y 42°C en matraces agitados de 250 mL y biorreactores de 1.2 L con medio definido. Los CI se purificaron usando el agente BugBuster.

RENDIMIENTO	MATRACES		BIORREACTORES	
	Inducción a 39°C	Inducción a 42°C	Inducción a 39°C	Inducción a 42°C
Proteína total insoluble (g/L)	1.14 ± 0.01	1.27 ± 0.04	2.50 ± 0.07	1.36 ± 0.30
Banda ESAT-6 (%)	15.90 ± 0.02	16.10 ± 0.04	10.54 ± 0.01	17.85 ± 0.03
ESAT-6 en CI (g/L)	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.24 ± 0.04
Y_{ESAT-6/X} (g _{ESAT-6} /g _{células})	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01

7.7. Expresión de chaperonas moleculares en cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactor

Interesados en analizar la expresión diferencial de las principales chaperonas moleculares de *E. coli* bajo las dos estrategias de termoinducción: 39°C y 42°C, se realizaron detecciones con anticuerpos específicos contra DnaK, DnaJ, GroEL y GroES en la fracción soluble y en los cuerpos de inclusión de cultivos realizados en matraces y en biorreactores. Se usaron las mismas membranas empleadas para la detección de la proteína recombinante ESAT-6.

Como se observa en la Figura 33, la chaperona DnaK que tiene un peso molecular aproximado de 70 kDa (Bardwell & Craig, 1984), se encuentra expresada preferencialmente en la fracción soluble de las células tanto en matraces como en biorreactores. Se encontró que en matraces con medio definido usando un sistema termoinducido a 39°C y a 42°C, DnaK se encuentra sólo en la fracción de la proteína total soluble (PTS) y está ausente de los agregados (Figura 33A). Para los biorreactores usando el mismo medio, esta chaperona está en la parte soluble de las células inducidas a 39°C y a 42°C, pero también en los cuerpos de inclusión (CI) obtenidos a 30°C y a 42°C (Figura 33B).

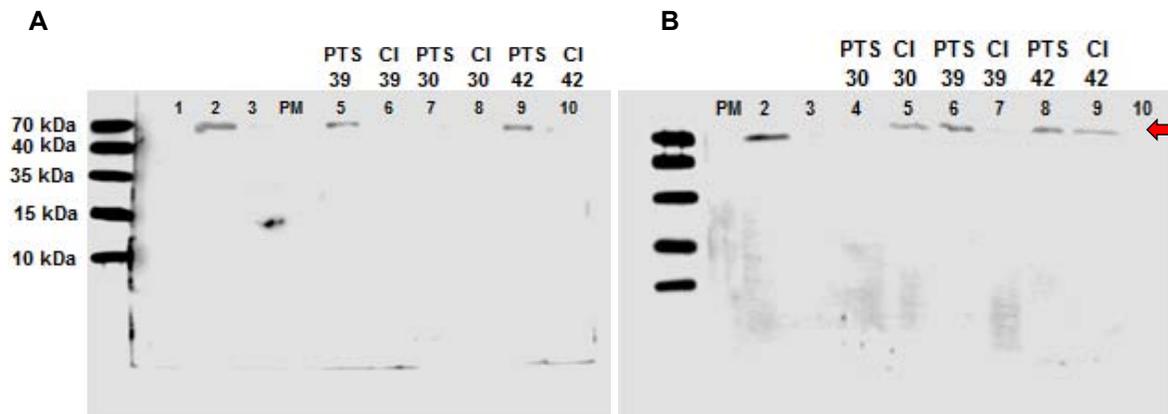


Figura 33. Inmunodetección de DnaK en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL con 50 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L con 1.0 L (**B**) de medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaK a ~70 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

La chaperona DnaJ se puede observar como una banda a la altura de aproximadamente 41 kDa (Bardwell *et al.*, 1986; Ohki *et al.*, 1986) en la Figura 34. En los matraces se expresó únicamente en la forma agregada, usando tanto medio LB inducido a 39°C (Figura 34A, carril 3) como usando medio definido pero inducido a 42°C (Figura 34A, carril 10).

Curiosamente en los biorreactores DnaJ se expresó indistintamente en ambas fracciones: en los CI obtenidos de cultivos inducidos a 39°C con medio LB y definido (Figura 34B, carriles 3 y 7 respectivamente), en los CI de cultivos sin inducir a 30°C (Figura 34B, carril 5) y en las fracciones solubles a 39°C y a 42°C (Figura 34B, carriles 6 y 8 respectivamente), pero no en los CI de cultivos inducidos a 42°C (Figura 34B, carril 9).

Al parecer el cambio de escala de matraces a biorreactores genera una respuesta molecular tal que esta chaperona pasa de estar ausente en las fracciones solubles a estar enriquecida en ellas sin dejar de aparecer en los agregados, excepto por los CI a 42°C.

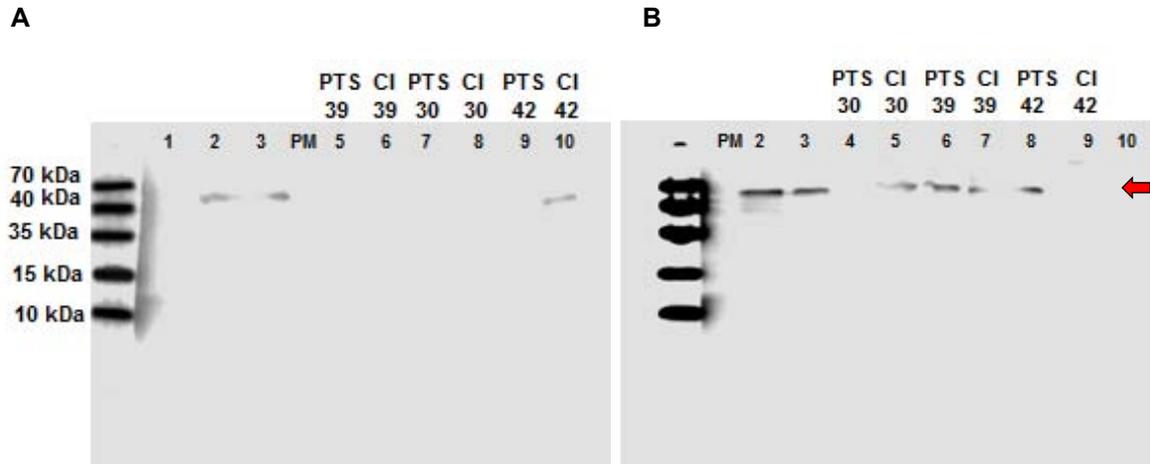


Figura 34. Inmunodetección de DnaJ en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaJ a ~41 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

GroEL es una chaperona molecular de *E. coli* que forma un complejo cilíndrico (Hohn *et al.*, 1979) cuyo peso molecular es de aproximadamente 60 kDa (Georgopoulos & Hohn, 1978; Hendrix & Tsui, 1978). De manera interesante, se observó una banda a esta altura en todos los carriles de la Figura 37, indicando que GroEL se expresó bajo todas las condiciones evaluadas, independientemente de la fracción, del medio, de la temperatura o de la escala de cultivo. Lo que indica la importancia de esta chaperona durante la producción de una proteína recombinante usando un sistema termoinducido.

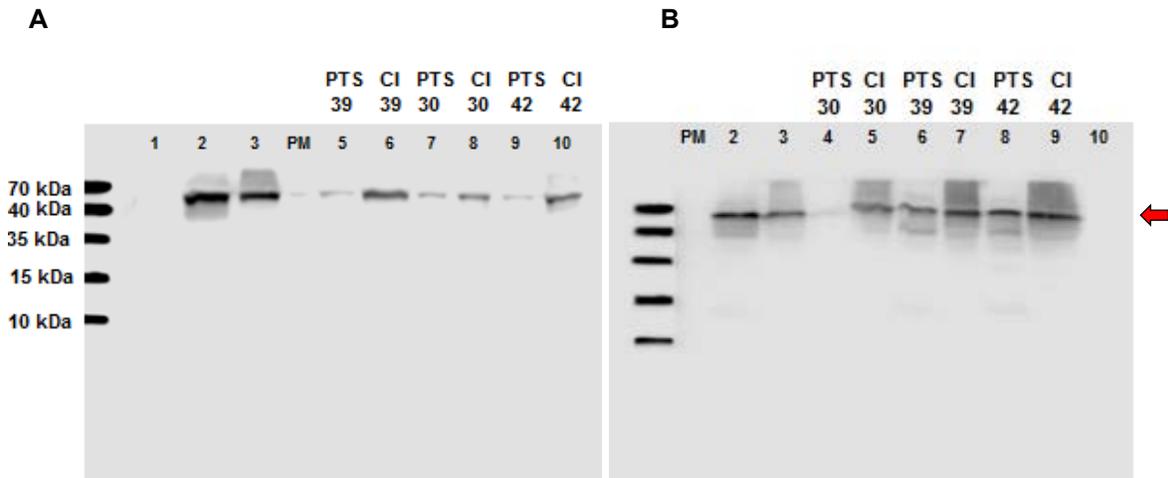


Figura 35. Inmunodetección de GroEL en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroEL ~60 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

En matraces se vio una banda de mayor intensidad correspondiente a GroEL en las fracciones de los CI obtenidos a partir de cultivos termoinducidos (Figura 35A, carriles 6 y 10), mientras que la banda fue más tenue en las PTS. Para los biorreactores se obtuvo el mismo comportamiento que en matraces, con un enriquecimiento de GroEL en los agregados a 39°C y a 42°C (Figura 35B, carriles 7 y 9) en comparación con la porción soluble.

En la Figura 36 se presenta la detección de una banda correspondiente a la chaperona GroES de *E. coli*, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa (Chandrasekhar *et al.*, 1986). Su expresión en matraces no fue notable, ya que la aparición de esta chaperona sólo se observó en el carril de la cepa sin transformar y en los cuerpos de inclusión del cultivo inducido a 42°C (Figura 36A, carriles 2 y 10). Pero en el caso de los biorreactores se obtuvieron bandas de mayor intensidad en las fracciones solubles (PTS) de los cultivos termoinducidos (Figura 36B, carriles 6 y 8).

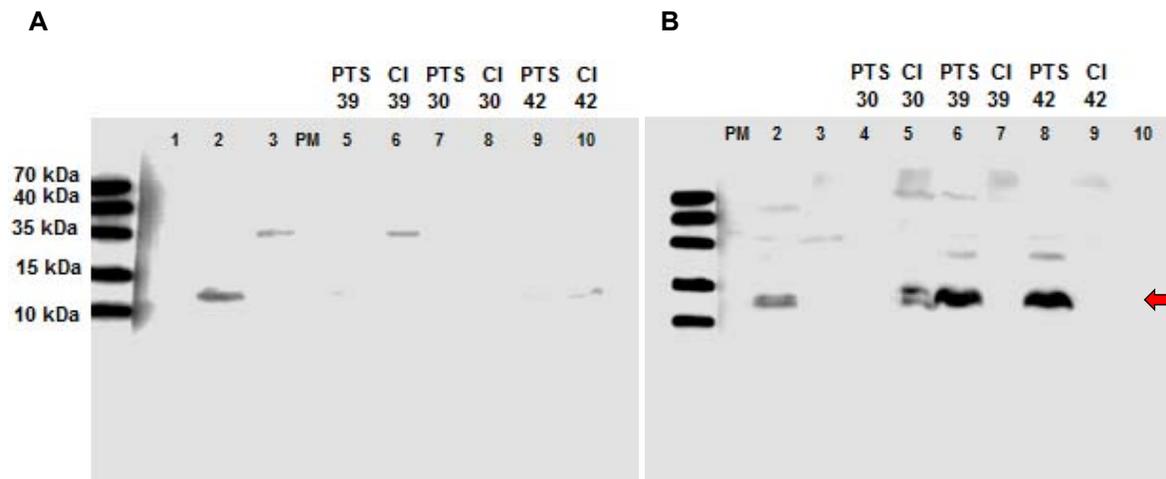


Figura 36. Inmunodetección de GroES en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroES ~10 kDa (Enzo Life Sciences®). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

Es importante resaltar que en la muestra de la cepa *E. coli* 53606 sin transformar se detectó la expresión de todas las chaperonas evaluadas en ambas escalas de cultivos. Esta muestra proviene de todo el lisado celular de las células, como se ve en la Tabla 11.

Tabla 11. Resumen de las inmunodetecciones para las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES en las fracciones soluble (PTS) e insoluble (CI) de cultivos termoinducidos de *E. coli*.

	MATRACES				BIORREACTORES					
	<i>E. coli</i> 53606 s/t	PTS 39	CI 39	PTS 42	CI 42	<i>E. coli</i> 53606 s/t	PTS 39	CI 39	PTS 42	CI 42
DnaK	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓
DnaJ	✓				✓	✓	✓	✓	✓	
GroEL	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GroES	✓				✓	✓			✓	

**E. coli* 53606 s/t: Cepa silvestre sin transformar.

*✓: Indica que hubo reconocimiento del anticuerpo específico para cada chaperona.

7.8. Caracterización de los CI de ESAT-6 obtenidos en un sistema termoinducido

7.8.1. Resistencia de los CI de ESAT-6 a la degradación por proteínasa K

Debido a su actividad distintiva frente a la estructura de tipo fibrilar y a las estructuras desordenadas de las proteínas, la proteínasa K permite evaluar la estabilidad y resistencia a la proteólisis de los agregados. Mientras menos estructura amiloide tenga un 'core' de proteína, será menos resistente a la proteínasa K y se verá una disminución en la absorbancia.

De esta manera, para entender el efecto de las diferentes temperaturas de inducción en la organización molecular de los cuerpos de inclusión de ESAT-6, se realizó una cinética de degradación proteolítica usando proteínasa K. Se midió la turbidez a 350 nm a lo largo del tiempo para determinar la actividad de la enzima sobre los CI. Se presenta el valor medio de dos réplicas con sus desviaciones estándar. Todos los experimentos comenzaron con la misma cantidad de proteína total (50 µg/mL) y se normalizaron las absorbancias obtenidas.

En la Figura 37 se observa que los CI de ESAT-6 provenientes de matraces inducidos a 39°C son más propensos al ataque proteolítico que los CI de cultivos inducidos a 42°C, ya que presentan una pendiente más pronunciada ante la digestión con proteínasa K.

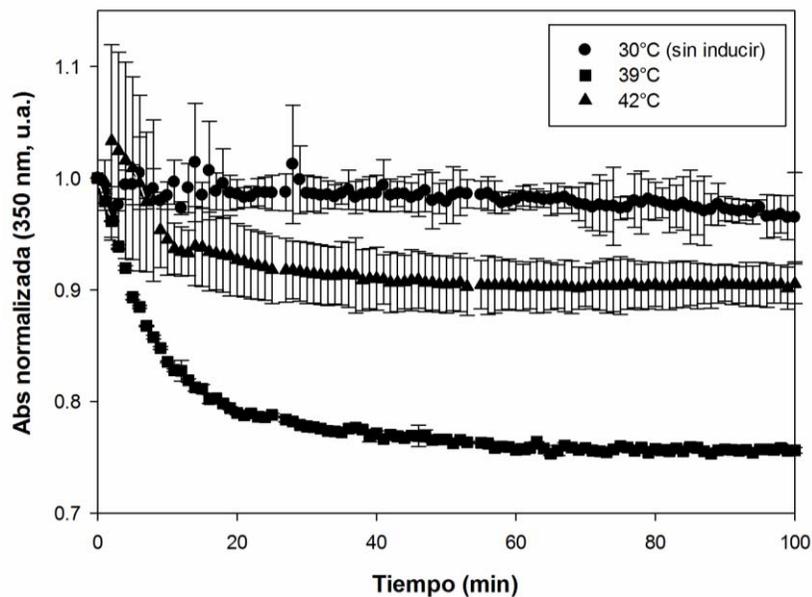


Figura 37. Cinética de degradación proteolítica de 50 µg/mL de CI de ESAT-6 cosechados a las 25 h a partir de cultivos en matraces a diferentes temperaturas de inducción. Para la degradación se empleó proteínasa K a una concentración final de 12 µg/mL. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

El mismo comportamiento fue observado en los CI de ESAT-6 cultivados en biorreactores (Figura 38), donde la inducción a 39°C resultó en CI con mayor tendencia a la degradación proteolítica que los CI de 42°C.

Si comparamos los CI obtenidos en matraces contra los de biorreactores (Figura 37 y 38), se observa que los agregados provenientes de matraces fueron más propensos al ataque proteolítico, pues la turbidez disminuyó rápidamente y la reacción de la proteínasa K finalizó antes de los primeros 30 minutos de incubación. Además, los porcentajes de desintegración al final de la reacción (100 minutos) fueron de 24 y 9 % para los matraces inducidos a 39°C y 42°C, respectivamente. Mientras que para los CI inducidos a 39°C y 42°C en biorreactores fueron menores, de 13 y 6 %, respectivamente.

Los CI obtenidos a 30°C presentaron la mayor resistencia a la proteólisis con un porcentaje de desintegración de tan sólo 4% en matraces y de 6% para biorreactores. Es posible observar que los CI de biorreactores termoinducidos a 42°C presentaron la misma tendencia de degradación que los CI no inducidos. Y en ambos casos los más sensibles a la acción de la proteínasa K fueron los CI de cultivos inducidos a 39°C, con absorbancias finales de 0.76 u.a. en matraces y 0.87 u.a. en biorreactores.

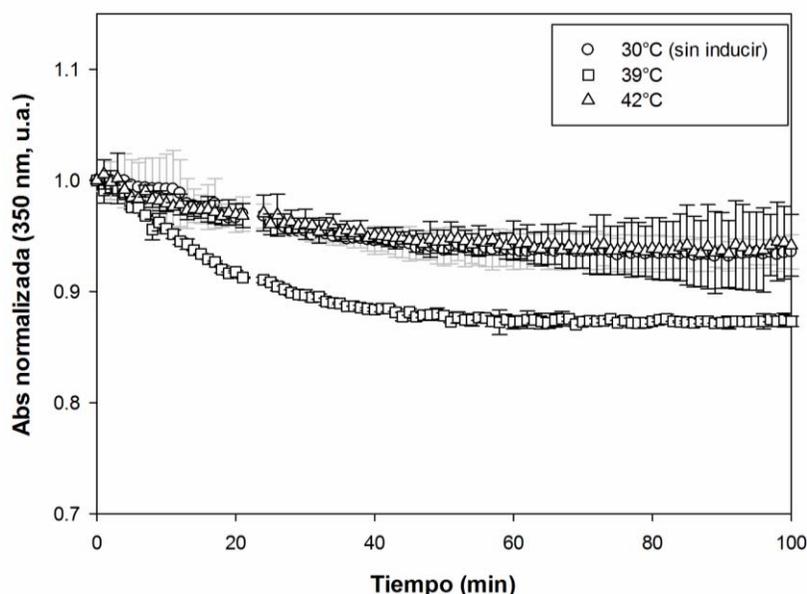


Figura 38. Cinética de degradación proteolítica de 50 µg/mL de CI de ESAT-6 cosechados a las 25 h a partir de cultivos en biorreactores a diferentes temperaturas de inducción. Para la degradación se empleó proteínasa K a una concentración final de 12 µg/mL. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (△).

7.8.2. Solubilización de los CI de ESAT-6 con cloruro de guanidinio

El cloruro de guanidinio (GuHCl) es un agente caotrópico fuerte que causa la desnaturalización de proteínas globulares y se usa frecuentemente para estudiar la resistencia a la solubilización y la estabilidad conformacional de cuerpos de inclusión formados por diferentes proteínas (Del Vecchio *et al.*, 2002; Rinas *et al.*, 2007; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

Para evaluar las diferencias en la estructura y composición de los agregados, se determinaron los perfiles de solubilización de los CI de ESAT-6 de matraces y biorreactores a las diferentes temperaturas de inducción. Se analizó el efecto de concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio (0-6 M), iniciando con la misma cantidad de proteína total en los CI. Cada ensayo se hizo por duplicado con sus respectivas desviaciones estándar.

En el perfil de disolución de los CI de ESAT-6 obtenidos en matraces agitados (Figura 39) se observa una tendencia similar para las tres condiciones evaluadas, donde a mayor concentración del agente caotrópico mayor proteína soluble se libera, indicando que todos son sensibles a la solubilización

química. Se puede notar que aquellos CI producidos a 39°C y 42°C son más susceptibles comparados con los obtenidos a 30°C. A 6 M de GuHCl los CI producidos en los cultivos sin termoinducción presentan un bajo grado de solubilización, siendo más difícil obtener proteína soluble a partir de éstos aunque se usen altas concentraciones del agente caotrópico.

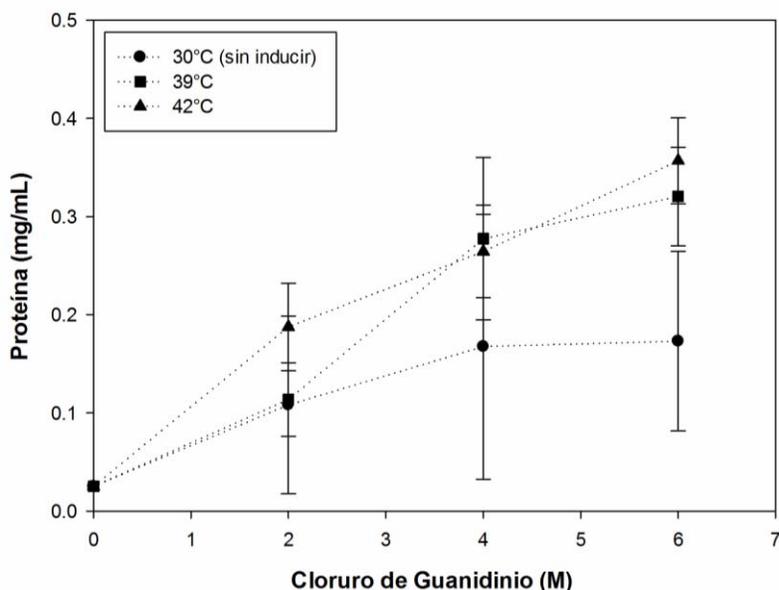


Figura 39. Perfil de solubilización de CI de ESAT-6 cosechados al tiempo final de cultivos en matraces agitados termoinducidos usando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína solubilizada después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h, cuantificada por Bradford. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

Si asumimos que en matraces termoinducidos a 42°C usando una concentración 6 M del agente caotrópico se solubilizó el 100% de la proteína agregada, entonces a la misma concentración el 89% de los CI termoinducidos a 39°C fueron solubilizados y sólo el 48% de los CI producidos en cultivos sin inducir (30%) se obtienen solubles (Figura 39).

En el caso de los biorreactores el nivel de desnaturalización para las condiciones termoinducidas y la condición sin inducir fue similar considerando las desviaciones estándar. El perfil de solubilización por agentes caotrópicos indica que no hay diferencias significativas en la estabilidad a la desnaturalización de los CI de ESAT-6 obtenidos a partir cultivos inducidos a distintas temperaturas (Figura 40). También se aprecia que a 6M de GuHCl el porcentaje de proteína solubilizada de los CI está por encima del 80% en todas las condiciones de inducción.

Si comparamos las dos escalas de cultivo, se observa que en biorreactores la mayor concentración de proteína total soluble fue de 0.38 ± 0.11 mg/mL en los CI a 30°C, semejante a la mayor concentración de proteína en matraces que fue de 0.36 ± 0.04 mg/mL en los CI a 42°C. Esto puede ser importante si se tiene en cuenta que a la misma concentración (6M) de agente caotrópico puede solubilizarse la misma cantidad de proteína de los CI de matraces y biorreactores.

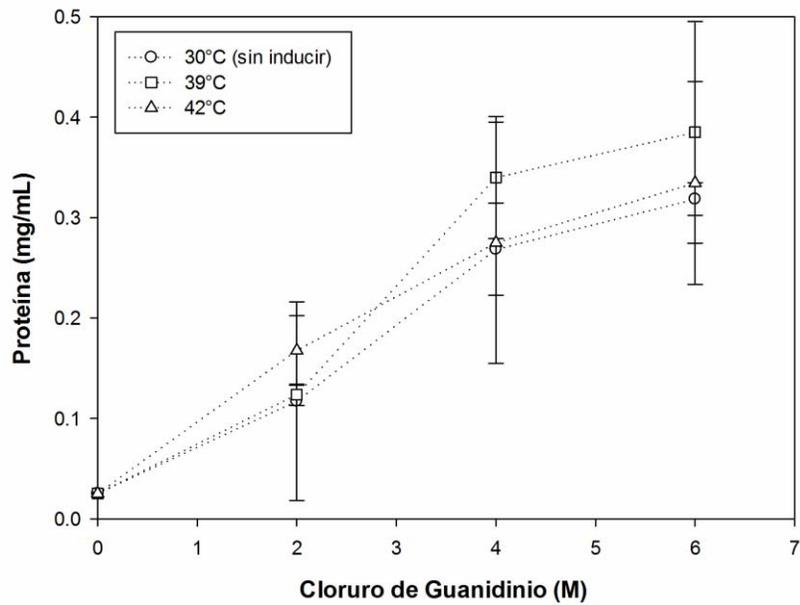


Figura 40. Perfil de solubilización de CI de ESAT-6 cosechados al tiempo final de cultivos en biorreactores termoinducidos usando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína solubilizada después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h, cuantificada por Bradford. Cultivo sin inducción a 30°C (○); cultivo con inducción a 39°C (□) y cultivo con inducción a 42°C (Δ).

8. DISCUSIÓN

8.1. Cinética de crecimiento de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores bajo diferentes temperaturas de inducción

Con el objetivo de caracterizar a nivel de crecimiento y metabolismo la cepa recombinante *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6), se hizo el seguimiento espectrofotométrico de los cambios en la densidad óptica celular a través del tiempo. Se aplicaron diferentes temperaturas de inducción tanto en matraces como en biorreactores y se probó inicialmente un medio de cultivo complejo (LB) para más tarde proponer un medio de cultivo definido (Caspeta *et al.* 2013 enriquecido con casaminoácidos 3 g/L).

Según los resultados obtenidos tanto en matraces agitados (Figuras 13, 16 y 18A) como en biorreactores (Figuras 14, 17 y 18B), la inducción por temperatura afectó negativamente el crecimiento celular. Independientemente del medio de cultivo, a mayor temperatura de inducción, menor fue la concentración de biomasa máxima obtenida. Mientras que en ausencia de inducción y de estrés térmico, como en el caso de los cultivos mantenidos a 30°C, se obtuvo más biomasa y se mantuvo constante hacia el final de los cultivos.

En primer lugar, este comportamiento puede ser atribuido al estrés característico de las cepas recombinantes, conocido como “carga metabólica”, que indica la cantidad de recursos que deben ser redireccionados desde el crecimiento del hospedero hacia el mantenimiento y expresión de una proteína heteróloga (Hoffmann & Rinas, 2004). Dicha perturbación en el metabolismo atribuida principalmente a la expresión de genes contenidos en un plásmido y a la cantidad de energía que consume la síntesis de proteína, se ve reflejada en la disminución de las velocidades específicas de crecimiento y en los bajos rendimientos en cuanto a biomasa (Bentley *et al.*, 1990; Hoffmann & Rinas, 2001; Jensen & Carlsen, 1990).

Sumado a esto, en los sistemas termoinducidos hay un incremento en la demanda energética no sólo asociada al crecimiento, sino a la producción de la proteína recombinante y a la síntesis de proteínas de choque térmico (Wittmann *et al.*, 2007; Hoffmann & Rinas, 2004). Hoffmann y colaboradores (2002) publicaron dos trabajos sucesivos donde usaron biorreactores de 50 L para estudiar el cambio en las enzimas y flujos metabólicos, que ocurre tras la inducción por temperatura (30 a 42°C) de la proteína recombinante hFGF-2 en *E. coli* TG1 usando un medio definido. Los autores encontraron que durante el proceso de producción, el crecimiento se ve afectado debido al incremento en los flujos catabólicos para la generación de energía, lo que reduce al mismo tiempo la cantidad de material celular disponible para crecimiento celular (Hoffmann *et al.*, 2002). Luego, los recursos son dirigidos desde la formación de biomasa hacia el reajuste de las actividades metabólicas de acuerdo a los requerimientos energéticos de las células (Hoffmann *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002).

Por otra parte, Harcum y Haddadin (2006) describieron los perfiles transcriptómicos de cultivos recombinantes sometidos a choque térmico de 50°C, cultivos inducidos con IPTG y cultivos sometidos a ambos tipos de estrés. Los cultivos sin estrés (a 37°C) alcanzaron una DO final de 16.4 u.a., mientras que los cultivos sometidos a doble estrés alcanzaron una DO de 11.2 u.a. Los autores sustentaron que las velocidades de crecimiento reducidas bajo el doble estrés se deben a una alteración transcripcional en las células por el choque térmico y la síntesis proteica. Más del 25% de genes asociados al metabolismo estuvieron afectados. Por ejemplo, 13 de 42 genes de la glucólisis fueron significativamente sobre expresados en los cultivos con doble estrés, mientras que 8 de los 27 genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) fueron sobre expresados. Esta respuesta del metabolismo central del carbono indica una alteración de la utilización del carbono que explica la reducción en la biomasa (Harcum & Haddadin, 2006).

De manera interesante, en nuestros resultados los cultivos inducidos a 42°C en matraces presentaron una caída en la DO del 16.2 % en medio LB (Figura 13) y del 13.4 % (Figura 16) en

medio definido durante las últimas horas de la cinética. Lo que indica que a temperaturas de inducción superiores a 39°C puede ocurrir muerte celular cuando se utilizan matraces agitados. Según nuestros resultados, en matraces hay una limitación significativa del oxígeno, la cual puede afectar el crecimiento celular (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016). Además, la exposición a altas temperaturas por largos períodos de tiempo puede generar desnaturalización de proteínas de membrana, aumentar la fluidez membranal y poner en riesgo la viabilidad celular (Mejía, 1999). La cantidad de ribosomas también puede verse comprometida acompañada de relajación del DNA (López-García & Forterre, 2000).

A pesar de que en los biorreactores se observó también un efecto adverso del aumento de temperatura sobre la biomasa máxima de los cultivos (Figuras 14, 17 y 18B), no hubo un descenso en la DO a los 42°C como se vio en los matraces. Al parecer, las células intentan mantener la biomasa constante o por lo menos evitar la muerte celular en las horas finales del cultivo. Además, las velocidades específicas de crecimiento antes de la hora de inducción (μ_s) no presentaron diferencias significativas, ya que todos los cultivos se mantuvieron a 30°C (Tabla 8). Pero cuando se comparan las velocidades específicas de crecimiento que incluyen el tiempo de inducción (μ_i) hubo una disminución para los cultivos inducidos a 42°C en matraces agitados. Mientras que en los biorreactores parece que no hay un efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento, pues se mantiene en 0.18 h⁻¹ aún luego de la termoinducción.

En los biorreactores, donde el control de la TOD permite que no haya limitaciones de oxígeno como ocurre en los matraces, la cantidad de biomasa es casi dos veces mayor que en matraces (Figura 18), la fuente de carbono es agotada y a su vez, hay re-asimilación del acetato como segunda fuente de carbono (Figura 22), todo esto para sobrevivir al estrés y mantener el crecimiento. Además, en los biorreactores se alcanzaron velocidades de calentamiento de 0.5°C/min, cercanas a las velocidades reportadas por Caspeta y colaboradores (2009), quienes encontraron que en cultivos recombinantes termoinducidos a una velocidad de 0.4°C/min, los niveles de mRNA de genes de choque térmico no cambian significativamente en comparación a velocidades altas de calentamiento (0.8, 1.7 y 6.0 °C/min). Además, la velocidad de calentamiento baja (0.4°C/min) favorece la expresión de algunos genes de la maquinaria celular de transcripción y traducción (Caspeta *et al.*, 2009), lo que puede ser útil para la optimización de un bioproceso sometido a termoinducción, en cuanto a la disponibilidad de maquinaria celular para el procesamiento de la proteínas recombinante.

8.2. Consumo de glucosa en cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido

El nivel de expresión de la proteína heteróloga es regulado no sólo por el sistema de expresión y estabilidad del plásmido, sino también por las condiciones de cultivo y la composición del medio. Los medios de cultivo para *E. coli* incluyen principalmente glucosa como fuente de carbono y energía, la cual usan para crecer, producir proteína recombinante y otros subproductos como ácidos orgánicos (Mansey *et al.*, 2014).

Se realizaron cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) en matraces agitados y biorreactores con medio definido, usando glucosa como única fuente de carbono. Se observó que los rendimientos de biomasa con respecto al sustrato (Y_{XS}) disminuyen a medida que aumenta la temperatura de inducción, mientras que las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_S) aumentan (Tabla 8). Esto puede deberse a que las bacterias sometidas a termoinducción utilizan la mayor parte de la energía obtenida a partir del sustrato para la producción ya sea de proteína heteróloga o de proteínas de estrés. En estudios anteriores usando sistemas termoinducidos se encontró que hay un aumento de hasta seis veces en la demanda energética, asociado no sólo al crecimiento sino también a la producción de proteína recombinante y a la síntesis de proteínas chaperonas y proteasas (Hoffmann & Rinas, 2004; Wittmann *et al.*, 2007). Por lo tanto, las células deben redirigir el uso del carbono hacia el abatimiento del estrés y el mantenimiento de la homeostasis celular, más que a la acumulación de biomasa (Weber *et al.*, 2002; Hoffmann & Rinas, 2001).

Schmidt y colaboradores (1999) realizaron cultivos de alta densidad de *E. coli* BL21 usando un sistema alimentado inducido por temperatura para la producción de proteínas de fusión de insulina. Los autores encontraron que la carga metabólica impuesta en las células durante la producción de una proteína recombinante en los cultivos de alta densidad celular termoinducidos, es reflejada en una reducción del coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a la glucosa. Esta disminución del coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto a glucosa, de 0.48 g/g a 0.15 g/g después de la inducción a 42°C, confirma que la síntesis de proteínas inducida por temperatura es un proceso que resulta en una utilización poco eficiente del sustrato para la generación de biomasa. Mientras que una fracción más alta de sustrato parece ser requerida en otras rutas con el propósito de abastecer la demanda de energía (Schmidt *et al.*, 1999).

En nuestros resultados, al comparar la glucosa residual en ambas escalas de cultivo se observó que en matraces queda un remanente de aproximadamente 6 g/L tanto a 39°C como a 42°C (Figura 19). Aun así, se detiene el aumento de la biomasa, lo que indica que la glucosa como sustrato no es el factor limitante en los matraces, sino muy posiblemente la acumulación de acetato (Figura 21), la disminución en el pH del medio (Figura 25) o la limitación de oxígeno (Figura 23), o quizás un efecto sinérgico de estos factores. Aunque *E. coli* es un organismo facultativo, la disponibilidad de altas concentraciones de glucosa y la capacidad limitada del sistema de cubrir las necesidades de oxígeno en los matraces, favorece la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos, lo que conlleva a que la capacidad del sistema respiratorio y el ciclo de TCA no puedan procesar toda la glucosa que hay en la célula (Vasala *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999).

Además en matraces, como las células se crecieron sin control de pH, se observó una disminución en el pH del cultivo bajo todas las temperaturas, desde 7.0 hasta valores entre 4.90 y 5.50 (Figura 25). Se ha establecido que en condiciones levemente ácidas (pH 4.0–5.7) como en este caso, *E. coli* responde al estrés ácido con cambios fisiológicos como modificaciones de la membrana citoplasmática; cambios metabólicos como respuestas de estrés oxidativo y activación de sistemas consumidores de protones (Kanjee & Houry, 2013).

Negrete & Shiloach (2015) realizaron cultivos de alta densidad celular de *E. coli* K-12, manteniendo el pH en 7.0 al inicio y fue ajustado a 5.0 por 2 horas en la mitad de la fase exponencial. Los autores encontraron que bajo el estrés ácido el crecimiento bacteriano disminuyó considerablemente, así como los niveles de RNA pequeños de enzimas asociadas al estrés por pH bajo (Negrete & Shiloach, 2015). Esta inhibición en el crecimiento puede ser causada por las concentraciones altas de acetato disociado (CH_3COO^-) y no disociado (CH_3COOH) en el medio, que resultan tóxicas para las células (Russell, 1992). A bajos pHs la sensibilidad al acetato incrementa debido un aumento en la concentración de especies protonadas (Takahashi *et al.*, 1999).

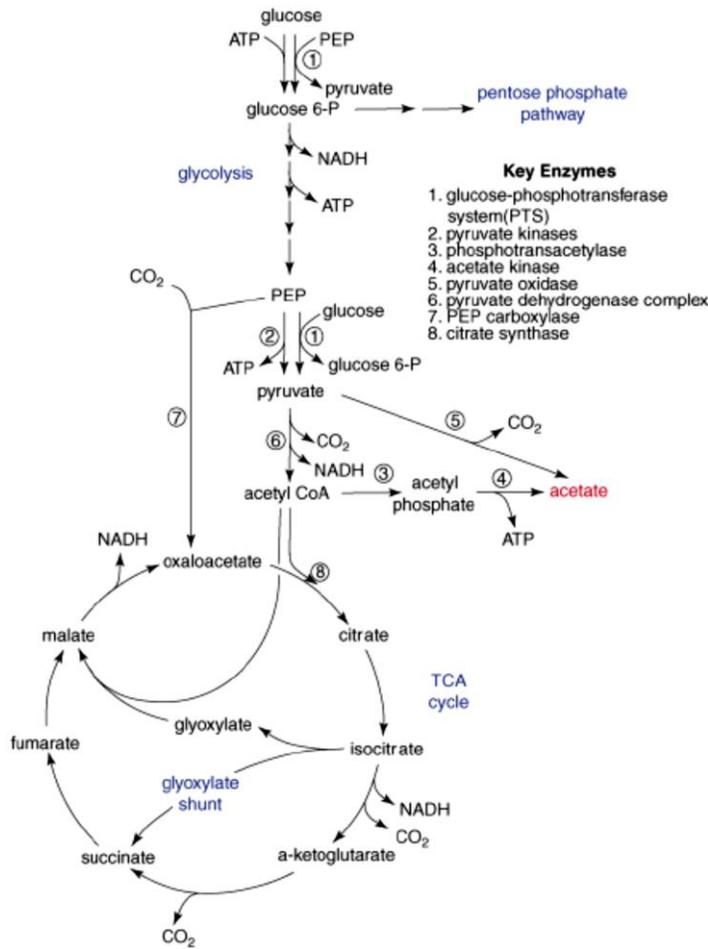
Por el contrario, a nivel de biorreactores la fuente de carbono se consume totalmente antes de que termine el cultivo y existe una relación con el inicio de la fase estacionaria (Figura 20). Como en los biorreactores se puede controlar la concentración de oxígeno disuelto en el medio, la limitación en este caso está asociada a la fuente de carbono y a la producción de ácidos orgánicos. Mansey y colaboradores (2014) realizaron cultivos termoinducidos de *E. coli* recombinante en matraces y biorreactores con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (0-30 g/L) para producir interferón α -2b. De manera semejante a nuestros resultados, reportaron que cuando las concentraciones iniciales de glucosa son superiores a 20 g/L, ésta no se termina de consumir después de 8 horas de cultivo en matraces. Mientras que en biorreactor conteniendo la misma concentración inicial (20 g/L), la glucosa se agota a lo largo de la cinética (Mansey *et al.*, 2014). El uso de la fuente de carbono constituye una limitante importante en los biorreactores “batch”, ya que los nutrientes son progresivamente consumidos y sus concentraciones no son controladas (Yamané & Shimizu, 1984), muchas veces inhibiendo el crecimiento o la producción de una proteína recombinante.

De esta manera, proponemos que en un sistema termoinducido el crecimiento y el consumo de la fuente de carbono no sólo serán afectados por el estrés térmico y el estrés de la expresión de la proteína recombinante, sino también por un estrés nutricional debido a la limitación de la fuente de carbono en los biorreactores y por un estrés debido a la limitación de oxígeno en los matraces.

8.3. Producción de acetato en cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido

Tanto en matraces como en biorreactores usando un sistema termoinducido se observó producción de acetato en el medio. A nivel metabólico, la acumulación de acetato puede ocurrir por dos motivos: sobre flujo metabólico o por limitación de oxígeno disuelto.

En el primer caso, cuando hay exceso de la fuente de carbono que está entrando a la glucólisis y no es utilizada para síntesis de producto o para crecimiento celular, se genera un sobre flujo metabólico (Schmidt *et al.*, 1999; Caspeta *et al.*, 2013). Como se presenta en la Figura 41, el sobre flujo metabólico provoca que la glucólisis se ramifique hacia la producción de acetato, principalmente por la vía de la fosfotransacetilasa y la acetato cinasa, que a pesar de no contribuir a la regeneración de NAD⁺, le permite a la célula continuar la producción de ATP y favorecer un crecimiento rápido (Shiloach & Fass, 2005; Lara *et al.*, 2008; Lara, 2011).



TRENDS in Biotechnology

Figura 41. Principales rutas metabólicas de *E. coli* involucradas en el consumo aerobio de glucosa, síntesis de acetato y dióxido de carbono (CO₂). El consumo de glucosa se realiza principalmente mediante la vía del sistema fosfotransferasa (PTS), que genera de forma simultánea piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP). El acetato se forma a partir de piruvato por acción de la piruvato oxidasa y de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa. La PEP carboxilasa es la vía anaplerótica necesaria para el reabastecimiento de los intermediarios del ciclo del TCA consumidos para la formación de biomasa (tomado de Eiteman & Altman, 2006).

Durante el sobre flujo metabólico, la producción de acetato es consecuencia de que la velocidad de acumulación de acetil-CoA supera la velocidad para alimentarlo al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Esto ya sea porque algunas enzimas del ciclo no están disponibles en cantidad suficiente, o porque la cadena respiratoria no puede operar a la velocidad adecuada para oxidar el NADH adicional producido por el TCA (Xu *et al.*, 1999b; Eiteman & Altman, 2006; Lara, 2011; Bettenbrock *et al.*, 2014).

En el segundo caso, en un metabolismo aerobio el ciclo de Krebs se utiliza para la generación de NADH, que servirá finalmente para la formación de ATP. Pero en un metabolismo con limitación de oxígeno, el NADH comienza acumularse y debe ser regenerado. Para ello las células utilizan la estrategia de ramificar la glucólisis hacia la producción de diferentes ácidos orgánicos donde puede entrar el NADH a oxidarse a NAD⁺ y así continuar creciendo; si no se regenera el NADH se frena el flujo metabólico y disminuye el crecimiento (Neidhardt *et al.*, 1996).

En los matraces agitados, la disminución en la velocidad de crecimiento y la entrada a la fase estacionaria (entre 8-10 h de cultivo) coinciden con el aumento en las concentraciones de acetato (Figura 21) y con la limitación de oxígeno (Figura 23), aunque las células aún tengan glucosa disponible para consumir (Figura 21). Así, la acumulación de acetato en matraces se debe principalmente a la limitación de oxígeno y al fenómeno de sobre flujo metabólico. Reynoso-Cereceda y colaboradores (2016) realizaron cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) productora de esfingomielinasa recombinante con medio definido. De manera similar a este trabajo, encontraron que en matraces agitados la desaceleración del crecimiento y el comienzo de la fase estacionaria no están relacionados directamente a la limitación de glucosa, pero sí a la acumulación de acetato y a la limitación de oxígeno (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016).

Lo que se observó para los biorreactores es que el inicio de la fase estacionaria está asociado al momento en el que el acetato alcanza sus concentraciones máximas (Figura 22) y se agota completamente la glucosa (Figura 20). Es decir, que la producción de acetato en biorreactores se atribuye no sólo al sobre flujo metabólico, sino también a la limitación de la fuente de carbono.

Harcum y Haddadin vieron que en cultivos fed-batch de 4 L sometidos a doble estrés por choque térmico e inducción química, algunos genes implicados en la síntesis de acetato, pertenecientes a la familia *aldH* (aldehído deshidrogenasa) son sobre expresados entre 2.1 y 3.8 veces comparados con cultivos sin estrés (Harcum & Haddadin, 2006). Esto indica que efectivamente el choque térmico generado en las células durante un cultivo termoinducido también contribuye al aumento en la acumulación de acetato.

De manera interesante, en los biorreactores termoinducidos se vio una re-asimilación del acetato durante la fase estacionaria (Figura 22). Para mantener la homeostasis celular y sobrevivir a diferentes niveles de estrés, *E. coli* acumula acetato para usarlo posteriormente como fuente de carbono (Phue & Shiloach, 2004; Shiloach, *et al.*, 2010). Wolfe (2005) describió el fenómeno como el “switch” del acetato, y lo define fisiológicamente como el momento en el que las células pasan de un rápido crecimiento que produce y excreta acetato (desasimilación) a un crecimiento más lento facilitado por el importe y utilización del acetato (asimilación). El “switch” se caracteriza experimentalmente por un pico de acumulación de acetato, el cual ocurre justo cuando las células comienzan la transición a la fase estacionaria y está acompañado de un cambio molecular que activa la maquinaria responsable de la asimilación del acetato (Wolfe, 2005), tal como se vio en este trabajo.

El acetato acumulado puede ser convertido de regreso en acetil-CoA por dos enzimas: la acetil-CoA sintasa (Acs) o por la vía reversible de la fosfotransacetilasa-acetato cinasa (Pta-AckA). Luego el acetil-CoA puede metabolizarse a través del ciclo de TCA y la ruta alterna del glioxilato por la isocitrato liasa (ICL) y la malato sintasa (MalS) como se observa en la Figura 42 (El-Mansi & Holms, 1989; Kornberg, 1966). Los estudios de Phue y Shiloach revelaron que en *E. coli* K12, la transcripción de los genes de la isocitrato liasa (*aceA*) y la malato sintasa (*aceB*) no es tan activa como en *E. coli* BL21 y por eso acumula más acetato (Phue & Shiloach, 2004).

Ya se ha reportado que bajo termoinducción hay un incremento en el flujo del ciclo del TCA (Hoffmann *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2007) y consecuentemente debería esperarse un aumento en el flujo glucolítico y en la producción de acetato, que fue lo observado durante la fase de inducción de este trabajo. En sistemas termoinducidos usando *E. coli* BL21 se han alcanzado concentraciones finales de acetato hasta de 4.0 g/L en biorreactores alimentados (Caspeta *et al.*, 2009; Caspeta *et al.*, 2013).

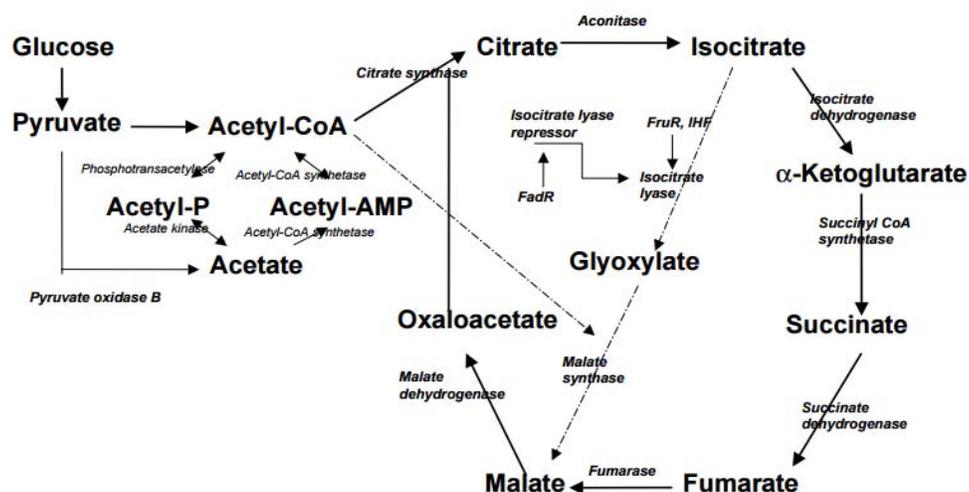


Figura 42. Ciclo de TCA y ruta alternativa del glioxilato en *E. coli* (tomada de Phue & Shiloach, 2004).

Es importante mencionar que la producción de acetato no es un evento deseable en cultivos bacterianos, ya que representa un derroche de esqueletos carbonados, afecta el pH, el gradiente de protones transmembranal y se ha asociado a otros efectos como la drástica disminución en el contenido de plásmido de células de *E. coli* (Lara, 2011). Y como ya se mencionó anteriormente, las concentraciones de acetato mayores a 2.0 g/L pueden generar disminución en la velocidad de crecimiento e inhibir la producción de proteína en cepas recombinantes (Åkesson *et al.*, 1999; Shiloach & Fass, 2005; Eiteman & Altman, 2006).

8.4. Perfiles de oxígeno disuelto (TOD) en cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactores con medio definido

Durante la fase exponencial del crecimiento de *E. coli* usando matraces agitados se presenta limitación de oxígeno tanto en los cultivos sin inducir como en los inducidos a 39°C y 42°C (Figura 23). Esta limitación duró aproximadamente 6 horas en todas las condiciones y está relacionada con el momento de la cinética donde hay una disminución notable en el pH del medio (Figura 25) y una acumulación de acetato (Figura 21). Esta limitación de oxígeno en cultivos de *E. coli* usando matraces agitados orbitalmente se ha reportado cuando el proceso de aireación no satisface el requerimiento de oxígeno del cultivo. Dichas condiciones limitadas de oxígeno se han relacionado con grandes cambios en el metabolismo, principalmente con disminución en velocidad de crecimiento, cambios en la estabilidad del plásmido y en la producción de proteína recombinante (Hewitt *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1992).

Durante el crecimiento aerobio de *E. coli*, el oxígeno constituye uno de los nutrientes esenciales, ya que actúa como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria, mediante la cual se genera la energía requerida para el crecimiento, mantenimiento celular y formación de producto. Debido a la baja solubilidad del oxígeno (alrededor de 8 mg/L en agua) debe suministrarse continuamente desde la fase gaseosa a la fase líquida, donde es consumido por los microorganismos. Pero durante su transferencia, el oxígeno debe superar algunas resistencias desde la burbuja de gas hasta llegar a los sitios de reacción al interior de las células, lo que causa diferencias en la disponibilidad de oxígeno

durante el cultivo (García-Ochoa & Gómez, 2009; García-Ochoa *et al.*, 2010). Tales diferencias pueden generar efectos indeseables como disminución del metabolismo, desarrollo parcial o total de metabolismo anaerobio, baja producción de metabolitos de interés y diferentes respuestas de estrés (Smith & Neidhardt, 1983; Enfors *et al.*, 2001). Por este motivo, el suministro insuficiente de oxígeno es una limitación importante cuando se tienen cultivos aerobios en matraces agitados (Büchs, 2001; Tolosa *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2006; Klöckner & Büchs, 2011; Klöckner & Büchs, 2012). Además, en cultivos alimentados de *E. coli*, las condiciones anaerobias pueden incrementar hasta dos veces los niveles de mRNA de genes de estrés, que responden a exceso de glucosa o agotamiento de oxígeno (Schweder *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 2006b).

Los perfiles de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) junto con los de TOD brindan información relevante acerca de lo que está ocurriendo en el sistema. En la Figura 43 se representa el desarrollo ideal de un cultivo aerobio de acuerdo a la OTR y la TOD, cuando el oxígeno transferido al medio es suficiente para satisfacer las necesidades celulares (Figura 43A). Mientras que cuando existe un período de limitación por oxígeno (Figura 43B), la OTR es igual a la $OTR_{m\acute{a}x}$, es decir a la máxima velocidad que el sistema es capaz de suministrar, por lo tanto no puede compensar la demanda de consumo del microorganismo manteniendo el oxígeno disuelto en cero. Cuando la respiración se detiene al final del cultivo, la OTR disminuye y la TOD se incrementa nuevamente (Maier & Büchs, 2001), como se observó en la figura 24 después de las 10-11 h.

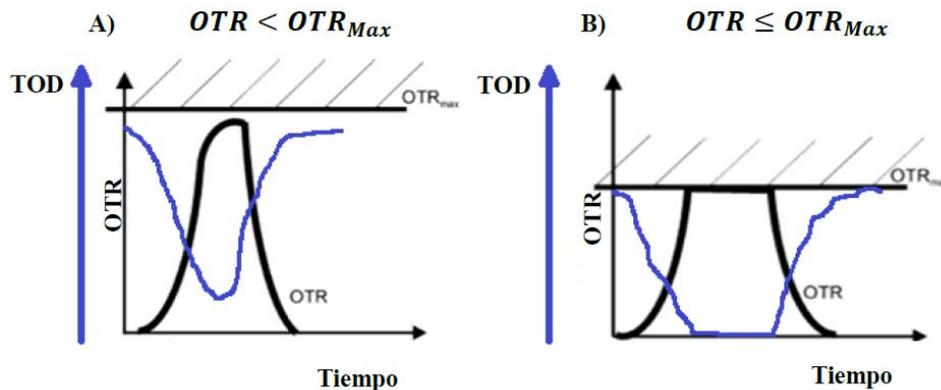


Figura 43. Representación del desarrollo de los perfiles de OTR (negro) y TOD (azul) en cultivos aerobios. Cuando el oxígeno suministrado no es consumido en su totalidad, el sistema opera siempre por debajo de la $OTR_{m\acute{a}x}$ y la TOD permanece superior a cero (A). La OTR se incrementa con la respiración de los microorganismos hasta alcanzar el límite que el sistema es capaz de proveer bajo condiciones específicas de operación (B) (modificado de Maier & Büchs, 2001).

En los biorreactores aunque no hay limitación de oxígeno (Figura 24) también se genera acetato (Figura 22), lo que indica que la producción de este metabolito no va necesariamente unida a la disponibilidad de oxígeno. Muchas veces el incremento en la concentración de acetato y la consecuente caída de pH, comienzan y se mantienen cuando aún hay oxígeno disponible (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016). Lo cual quiere decir que aunque el suministro de oxígeno dentro del biorreactor sea rápido, *E. coli* únicamente puede consumirlo a una velocidad limitada (Eiteman & Altman, 2006). Durante el sobre flujo metabólico, a pesar de las condiciones aerobias, la formación de acetato se relaciona con la velocidad de consumo de oxígeno pero no es dependiente de su disponibilidad (Bettenbrock *et al.*, 2014).

Interesantemente, en los sistemas termoinducidos el efecto del oxígeno sobre los cultivos de *E. coli* ha sido poco estudiado. Según los resultados obtenidos, la termoinducción no tuvo un efecto significativo al menos a nivel de la TOD, ya que bajo las diferentes temperaturas de inducción los perfiles de oxígeno presentaron la misma tendencia (Figuras 23 y 24). Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan entender el fenómeno de la transferencia de oxígeno en este sistema.

Schmidt y colaboradores (1999) reportaron que después de inducir por temperatura la síntesis de proteínas recombinantes, la relación entre la cantidad de dióxido de carbono producido y la cantidad de oxígeno consumido, conocida como coeficiente respiratorio, disminuyó durante la etapa de alimentación. Lo que indica que en sistemas termoinducidos menos glucosa es usada en la ruta para generación de biomasa, y se emplea en otras rutas (Schmidt *et al.*, 1999). En otras investigaciones, se ha encontrado que la producción de proteína recombinante usando termoinducción va de la mano con un incremento en la actividad respiratoria de las células (Caspeta *et al.*, 2013). La activación acelerada de rutas catabólicas, como el ciclo del TCA, permiten obtener energía adicional para la síntesis de proteína recombinante y proteínas de estrés elevando la velocidad de consumo de oxígeno en detrimento del crecimiento (Hoffmann *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2002).

8.5. Evaluación de la expresión de la proteína ESAT-6 producida por *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando un sistema termoinducido en matraces agitados y biorreactores.

La cantidad y calidad de una proteína recombinante dependen en gran parte de la concentración de biomasa y de las condiciones de cultivo del bioproceso (Strandberg & Enfors, 1991). Estudios recientes sobre agregación y formación de cuerpos de inclusión sugieren que algunas condiciones de cultivo como cambios en la temperatura o pH, favorecen el estado soluble o agregado de una proteína heteróloga (González-Montalbán *et al.*, 2007; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Caspeta *et al.*, 2009).

Con el propósito de determinar si la proteína recombinante ESAT-6 se estaba produciendo en la cepa de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando el sistema termoinducido, se hicieron geles SDS-PAGE. Se utilizaron muestras provenientes de diferentes escalas de cultivo, diferentes composiciones del medio, diferentes temperaturas de inducción y diferentes fracciones celulares, para comparar las productividades obtenidas en este sistema.

Según los resultados obtenidos por SDS-PAGE y Western Blot, la proteína recombinante ESAT-6 se expresó exclusivamente en la fracción de los cuerpos de inclusión (Figuras 29, 30, 31 y 32), en ambas escalas de cultivo (matraces y biorreactores), tanto a 39°C como a 42°C.

Se ha reportado extensamente que el sólo hecho de sobre expresar una proteína recombinante en *E. coli* puede provocar la formación de agregados de proteína (Kane & Hartley, 1988; Fink, 1998). Esto ocurre porque la rápida producción de proteína heteróloga puede exceder la capacidad de la maquinaria encargada de mantener el control de la calidad del proteoma, o algunas proteínas mal plegadas se escapan de estos mecanismos de control para interactuar con moléculas vecinas no plegadas y formar agregados moleculares (Rosen *et al.*, 2002; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

En un sistema termoinducido dicha sobreexpresión de proteína recombinante sumada al incremento en la temperatura pueden alterar el proceso de plegamiento de las proteínas, lo cual favorece su agregación y acumulación en cuerpos de inclusión (Schmidt *et al.*, 1999; Babu *et al.*, 2000; Vallejo *et al.*, 2002; Caspeta *et al.*, 2013).

Vale la pena mencionar que el antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* no se había producido antes en un sistema inducido por temperatura. Sin embargo en algunos trabajos previos usando inducción química también encontraron que ESAT-6 se expresa en *E. coli* preferencialmente en forma de cuerpos de inclusión (Wang *et al.*, 2005; Meher *et al.*, 2006; Vutla *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2016), lo que concuerda con lo obtenido durante este trabajo.

Si comparamos los rendimientos de producción de la proteína recombinante ESAT-6 con respecto a la biomasa en ambos medios de cultivo, encontramos que en matraces termoinducidos a 39°C con medio complejo, $Y_{ESAT-6/X}$ fue de 1.23 g_{ESAT-6}/g_{células}, mientras que en matraces termoinducidos a 39°C con medio definido, $Y_{ESAT-6/X}$ fue de 0.12 g_{ESAT-6}/g_{células}. Esta gran diferencia en los rendimientos, de hasta 10 veces más en medio LB, demuestra que la composición del medio influye en la producción de proteína recombinante.

Algunas investigaciones han reportado que el medio complejo puede reducir la degradación de producto por proteasas del medio que se inducen cuando hay limitación de nutrientes (Harcum *et al.*, 1992), pero también puede reducir la estabilidad del plásmido (Shu & Shuler, 1992). Los medios complejos pueden compensar el agotamiento de componentes cuando se produce una proteína recombinante en un medio mineral simple, alcanzando rendimientos (Ramírez & Bentley, 1993). Sin embargo, sólo los medios definidos son aceptables para garantizar reproducibilidad y seguridad en la producción de biofármacos, por lo que son más utilizados en los procesos a gran escala.

Un trabajo interesante realizado por Hoffmann y colaboradores (2004) reporta la influencia del medio en la producción y prevención de la agregación *in vivo* de dos proteínas recombinantes. Los autores encontraron que la concentración de proteína inducida a 42°C en matraces agitados con medio definido fue considerablemente más alta que en medio complejo LB, pero el crecimiento celular fue más lento. Además, más del 40% de la proteína se acumuló en cuerpos de inclusión en medio definido, comparado con menos del 5% agregado en medio LB. Mientras que para la otra proteína, la composición del medio no redujo la formación de cuerpos de inclusión aún a 30°C. Ellos concluyen que dependiendo de la proteína recombinante, el medio de cultivo puede afectar diferencialmente su producción y puede ser una estrategia para optimizar los bioprocesos (Hoffmann *et al.*, 2004).

En nuestro trabajo, encontramos únicamente ESAT-6 en la fracción soluble cuando se hicieron cultivos inducidos a 39°C en matraces con medio LB (Figura 28), mientras que en todas las condiciones usando medio definido, sólo hubo expresión en los cuerpos de inclusión (Figuras 29-32).

Por otro lado, aunque en la literatura las proteínas son extraídas principalmente usando lisis celular con detergentes y sonicación, hay diferentes métodos que pueden variar en rendimiento y confiabilidad. En este trabajo elegimos dos métodos que permitieran separar las fracciones soluble e insoluble de un cultivo de *E. coli*. El primer método es el clásico de sonicación y detergentes descrito en un trabajo previo por Mendoza-Castellanos y colaboradores (2014), y el segundo método se basa en el reactivo BugBuster™ (Novagen) que consiste en lavados con una mezcla de detergentes no iónicos y centrifugaciones sucesivas.

Según los resultados para matraces termoinducidos a 39°C conteniendo medio complejo LB, se obtienen diferentes rendimientos de producto dependiendo del método de purificación utilizado para los CI (Tabla 9). Con la sonicación y el uso de detergentes, el rendimiento de la proteína recombinante ESAT-6 en los CI fue de 0.53 g_{ESAT-6}/g_{células}, mientras que al usar el BugBuster™ hubo un incremento del 57% en el rendimiento (1.23 g_{ESAT-6}/g_{células}). Inesperadamente en las fracciones purificadas por sonicación provenientes de cultivos con medio definido no se detectó la proteína recombinante ESAT-6 en ninguna de las dos escalas de cultivo, matraces y biorreactores (Figuras 29 y 31). Pero cuando se utilizó el método de BugBuster™, la expresión de ESAT-6 fue evidente tanto en matraces como en biorreactores (Figuras 30 y 32).

De Mey y colaboradores (2008) llevaron a cabo una comparación de varios métodos de extracción para diferentes proteínas recombinantes obtenidas en cultivos de *E. coli*. Estos autores demostraron que el método más confiable es la extracción de proteína con BugBuster™ y luego le sigue la sonicación. Si para un quimiostato el contenido de proteína producido por *E. coli* es de aproximadamente el 70%, usando dicho agente se puede obtener hasta 69% de proteína, que equivale a un 100% de recuperación. Mientras que con sonicación el rendimiento es de aproximadamente el 90% y con otros métodos de extracción como el SDS/Cloroformo o tolueno los rendimientos son menores al 40% (De Mey *et al.*, 2008).

Aunque no hay muchas publicaciones al respecto, y sin restarle valor al método de sonicación, proponemos que tal vez se requiera un protocolo más agresivo, que permita obtener cuerpos de inclusión de ESAT6 más “limpios” o enriquecidos de proteína heteróloga como el BugBuster™.

En matraces agitados con medio definido inducidos a 39°C se obtienen 0.18 ± 0.01 g/L de ESAT-6 en la fracción insoluble, mientras que a 42°C se obtienen 0.20 ± 0.01 g/L. En biorreactores con medio definido inducidos a 39°C, se producen 0.26 ± 0.00 g/L de ESAT-6 en la fracción insoluble y 0.24 ± 0.14 g/L a 42°C (Tabla 10). Esto muestra que no hay diferencias significativas en la concentración de ESAT-6 dentro de los CI si se compara la inducción a 39°C y a 42°C, es decir, que en un sistema termoinducido, al parecer la cantidad de proteína que se agrega no está determinada por la temperatura, sino más bien por la estrategia de inducción como la duración, las velocidades u oscilaciones en el calentamiento.

Caspeta y colaboradores (2009) compararon los niveles de mRNA del gen heterólogo y de algunas chaperonas en un sistema termoinducido a 38°C y 42°C para diferentes velocidades de calentamiento. A velocidades rápidas de calentamiento (6°C/min, 1.7°C/min, 0.88°C/min), los niveles del gen de la proteína recombinante incrementan significativamente a 42°C en comparación con 38°C, pero no a velocidades más bajas como 0.4°C/min. Es decir, que las células expuestas a incrementos rápidos de temperatura muestran una transcripción acelerada del gen heterólogo y de genes de proteínas de choque térmico como respuesta al estrés por el calor (Caspeta *et al.*, 2009). En nuestro trabajo se alcanzó una velocidad de calentamiento de 0.5°C/min que es considerada lenta y posiblemente por eso no observamos cambios grandes en los niveles de proteína recombinante en concordancia con lo reportado a nivel transcripcional.

Si se compara la producción entre ambos sistemas de cultivo, puede decirse que hay mayor producción de proteína recombinante en los cultivos termoinducidos en biorreactor que en los matraces agitados. Se obtuvo una concentración de ESAT-6 en la fracción insoluble 44% mayor a 39°C y 20% mayor a 42°C en biorreactores que en matraces (Tabla 10). Los sistemas de biorreactor permiten un mejor mezclado (aireación/agitación) comparado con los matraces, además puede controlarse la concentración de oxígeno disuelto y el pH, factores que podrían estar implicados en una mejor respuesta metabólica y en una mayor producción de la proteína recombinante (Mansey *et al.*, 2014; Enfors *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2004).

Otra observación importante es el cambio en la expresión de proteínas endógenas celulares tanto en las fracciones solubles como insolubles, la cual va aumentando con el aumento de la temperatura. Esto puede deberse a que a 30°C la producción de proteínas propias está asociada al metabolismo para la generación de biomasa y al mantenimiento celular, pero a 39°C y a 42°C las células están sometidas no sólo al estrés por el incremento en la temperatura, sino al estrés por la producción de proteína recombinante, teniendo que activar los mecanismos de traducción del gen de interés y aumentar la expresión de diferentes proteínas asociadas a las respuesta de estrés, como factores σ^{70} y σ^{32} (Han & Lee, 2006).

Finalmente, los resultados sugieren que los rendimientos de la proteína recombinante obtenidos en nuestro trabajo usando un sistema termoinducido en matraces y biorreactores (Tabla 10) son superiores en comparación con los rendimientos reportados en otras investigaciones (Tabla 12), aunque vale la pena aclarar que en estos trabajos se obtuvo el rendimiento del antígeno purificado.

Tabla 12. Algunos rendimientos de la proteína ESAT-6 producida en cepas recombinantes de *E. coli* usando diferentes estrategias de cultivo.

RENDIMIENTOS DE ESAT-6	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
12 mg/L (urea) 0.62 mg/L (GuHCL)	CI; Biorreactores a 37°C; IPTG; medio LB	Wang <i>et al.</i> , 2005
3-3.5 mg/L	CI; Tubos de ensayo a 37°C; IPTG	Vutla <i>et al.</i> , 2011
2.67 mg/L	Soluble; Matraces agitados a 28°C; IPTG; medio LB	Pimienta <i>et al.</i> , 2012

En biorreactores termoinducidos a 39°C y 42°C se obtuvieron en promedio 250 mg/L de ESAT-6 contra 12 mg/L obtenidos por Wang y colaboradores (2005), es decir, 20 veces más proteína heteróloga en los CI. Diferentes reportes mencionan que una de las ventajas de los sistemas inducidos por temperatura es que hay un incremento en los rendimientos de la proteína recombinante debido a los altos niveles de chaperonas (Harcum & Haddadin, 2006; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Valdez-Cruz *et al.*, 2011).

Podemos concluir que en un sistema inducido por temperatura tanto en matraces agitados como en biorreactores, se produce la proteína recombinante ESAT-6 en forma de cuerpos de inclusión. A nivel de biorreactor se obtiene mayor cantidad de proteína recombinante dentro de la fracción insoluble y la temperatura de inducción 39°C o 42°C no tiene un efecto notable en la cantidad de proteína que se produce. En trabajos futuros, será necesario evaluar otras estrategias de calentamiento que incluyan oscilaciones de temperatura a diferentes velocidades, determinando la concentración de proteína en cada una; así como mejorar el método de purificación por sonicación y detergentes de los CI obtenidos en un sistema termoinducido.

8.6. Expresión de chaperonas moleculares en cultivos termoinducidos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) usando matraces agitados y biorreactor.

La respuesta al estrés térmico que se genera en un sistema inducido por temperatura está controlada por el factor sigma 32 (σ^{32}), que se encarga de la expresión de un grupo de proteínas de choque térmico (HSP), dentro de las cuales se encuentran las chaperonas (Grossman *et al.*, 1987). El rol de las chaperonas es esencial para ayudar al correcto plegamiento de las proteínas, controlar la formación de agregados y mantener la homeostasis celular (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Por eso muchos estudios se han centrado en conocer los niveles de mRNA de las chaperonas en este sistema, pero poco se conoce sobre cómo cambian sus niveles a nivel de proteína.

Con el objetivo de hacer un aporte sobre la expresión de cuatro chaperonas esenciales de *E. coli*: DnaK, DnaJ, GroEL y GroES usando un sistema termoinducido, se hicieron detecciones con anticuerpos específicos en muestras provenientes de cultivos finales en matraces y biorreactores. Las fracciones soluble e insoluble fueron obtenidas por el método de BugBuster y se usaron las mismas membranas que se usaron para detectar la proteína recombinante ESAT-6.

En primer lugar, se observó que en las muestras de la cepa *E. coli* 53606 sin transformar las cuatro chaperonas evaluadas estuvieron presentes (Figuras 35, 36, 37 y 38, carril 2; Tabla 11). Lo que indica que se están produciendo de manera basal en las células. En *E. coli* las chaperonas constituyen un mecanismo ampliamente conservado para favorecer o corregir el plegamiento de proteínas (Baneyx & Mujacic, 2004). Por eso aún bajo condiciones de crecimiento balanceadas las células se encuentran expresándolas constitutivamente, aunque muchas son sobre expresadas después de un choque térmico o tras la producción de proteínas recombinantes (Hoffmann & Rinas, 2002).

La chaperona DnaK se detectó mayoritariamente en las fracciones de la proteína soluble de cultivos termoinducidos tanto en matraces como en biorreactores (Figura 35; Tabla 11). DnaK es una de las primeras chaperonas que actúan en *E. coli*, recibiendo cadenas polipeptídicas recién sintetizadas a partir del ribosoma para que alcancen una conformación nativa, de lo contrario las transfiere al complejo GroEL/ES (Szabo *et al.*, 1994; Calloni *et al.*, 2012). Esta tendencia de DnaK a quedar en la fracción soluble puede atribuirse a su papel como chaperona primaria, ya que está actuando durante las etapas iniciales del plegamiento de las proteínas, donde posiblemente todavía están solubles en el citoplasma o no se han generado agregados grandes.

Otra explicación se puede encontrar en el trabajo de Carrió y Villaverde (2005), quienes realizaron una inmunodetección *in situ* de DnaK en cuerpos de inclusión de la proteína VP1LAC en *E. coli*. Reportaron que la chaperona DnaK fue mayoritariamente localizada en la superficie de los agregados y en pocas cantidades en el citoplasma, pero nunca se vio al interior de los agregados. Por el contrario, GroEL está ausente de la superficie de los CI y queda preferentemente dentro de los CI o

repartida en citoplasma (Carrió & Villaverde, 2005). Esto sustenta que tras la separación de las fracciones es más probable que DnaK quede en la parte soluble y no en los CI como se observó en nuestros resultados (Figura 35; Tabla 11). Además explica por qué GroEL se acumula principalmente en los agregados más que en las fracciones solubles (Figura 37; Tabla 10). Así mismo, Schrödel y de Marco (2005) confirmaron que DnaK se recupera *in vitro* de pequeños agregados recién formados durante centrifugación por densidad de sacarosa, mientras que GroEL es recuperada de agregados más grandes y compactos (Schrödel & de Marco, 2005).

La importancia de DnaK para el crecimiento de las células a altas temperaturas ya se ha reportado. Bajo condiciones de estrés como choque térmico a 42°C, mutantes de *E. coli* que no contienen el gen de DnaK son más sensibles a la temperatura y no pueden crecer, debido a una rápida inhibición de la síntesis de ADN y RNA y a un bloqueo en la división celular (Bukau & Walker, 1989; Paek *et al.*, 1987). Lo que coincide con el hecho de que DnaK se esté expresando en este sistema a las dos temperaturas de inducción: 39°C y 42°C, manteniendo viable el crecimiento celular y la expresión de la proteína recombinante.

En el caso de la chaperona GroEL, hubo expresión tanto en la fracción soluble como en la insoluble bajo las dos temperaturas de inducción y en las dos escalas de cultivo, pero interesantemente hubo mayor reconocimiento en los cuerpos de inclusión obtenidos tras la termoinducción (Figura 37).

La aparición de GroEL en todas las condiciones hace pensar que es un regulador central durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Dentro de los 5 primeros minutos tras un cambio de 30°C a 42°C, los niveles de mRNA de GroEL pueden incrementar entre 3.2 y 9.9 veces (Yamamori *et al.*, 1978; Caspeta *et al.*, 2009; Valdez-Cruz *et al.*, 2011). Este incremento acelerado se atribuye a que GroEL debe estar disponible rápidamente para recibir a casi el 10% de proteínas citosólicas que han pasado por el sistema de DnaK/J y no lograron alcanzar su conformación nativa (Fujiwara *et al.*, 2010). Incluso existen proteínas esenciales de *E. coli* que pueden ser absolutamente dependientes de esta chaperona para su plegamiento bajo condiciones normales (Azia *et al.*, 2012).

Chapman y colaboradores (2006) identificaron características de agregación de una cepa de *E. coli* deficiente de GroEL/S. Encontraron a través de análisis proteómicos que luego de un cambio de temperatura de 20°C a 37°C, la mayoría de proteínas se incorporaron en cuerpos de inclusión (Chapman *et al.*, 2006). De ahí que la sobreproducción de GroEL/S y no otras chaperonas, se haya empleado en diferentes trabajos para restaurar el crecimiento de células deficientes en DnaK (Vorderwülbecke *et al.*, 2004) o también para disminuir la tendencia a formar agregados en mutantes de sigma 32 (Gragerov *et al.*, 1992).

Cabe destacar que GroEL se expresó no sólo a las temperaturas de inducción (39°C y 42°C) sino también en todas las fracciones a 30°C (Figura 37). En contraste con DnaK que únicamente se observó en las fracciones solubles de los cultivos termoinducidos (Figura 33). Algunos estudios han reportado que aunque GroEL se sobre expresa bajo choque térmico también se requiere para el crecimiento celular en un rango amplio de temperaturas, desde 17°C hasta 42°C. A diferencia de la chaperona DnaK que es requerida preferencialmente a altas temperaturas (Fayet *et al.*, 1989; Kusukawa & Yura, 1988).

Por otra parte, DnaJ y GroES no aparecen en las fracciones solubles de los cultivos termoinducidos en matraces, mientras que en biorreactores sí (Figuras 36 y 38, Tabla 11). Especialmente GroES presenta un reconocimiento considerable en las fracciones PTS de cultivos inducidos a 39°C y a 42°C en biorreactores (Figura 38B). Los resultados llevan a especular que estas dos co-chaperonas son influenciadas por las condiciones diferenciales entre matraces y biorreactores para definir su acumulación en las fracciones soluble o insoluble durante un sistema inducido por temperatura, lo que no pasó con GroEL y DnaK. Nosotros proponemos que debido a que DnaJ y GroES son chaperonas secundarias, algunos cambios en el medio de cultivo como pH u oxígeno, pueden alterar su expresión; entonces el control de los parámetros en los biorreactores puede favorecer su acumulación en la parte soluble y además su aparición tanto a 39°C como a 42°C (Tabla 11).

Hasta el momento el papel de las chaperonas en la formación de los CI de un sistema termoinducido no ha sido completamente entendido. El único trabajo hasta ahora donde hacen proteómica de la anatomía de los CI producidos durante la síntesis termoinducida de una proteína recombinante es el de Rinas y colaboradores (2007). Sus resultados demostraron que la presencia de las chaperonas dentro de los CI puede ser variable y que esto depende de la actividad específica de cada chaperona y de su interacción con la proteína heteróloga. También examinaron el rol de las chaperonas durante el ensamble o desagregación de los CI, concluyendo que el sistema GroEL/S tiene un rol como mediador entre los estados soluble y agregado de la proteína, mientras que el sistema de DnaK/J cumple un papel de reversión, más que de prevención en la agregación (Rinas *et al.*, 2007).

En otro acercamiento, Harcum & Haddadin (2006) estudiaron la respuesta global del transcriptoma de *E. coli* bajo estrés térmico y bajo el doble estrés generado por la inducción de la expresión de una proteína recombinante. Encontraron que la mayoría de genes de la respuesta de choque térmico fueron significativamente sobre regulados para cultivos doblemente estresados, lo que mejoró la productividad de la proteína. Los genes de chaperonas clásicas como *dnaK/J*, *mopA/B* (GroEL/GroES) no estuvieron afectados en los cultivos únicamente inducidos por IPTG, sin embargo, en los cultivos con choque térmico o con doble estrés los niveles de mRNA de las mismas chaperonas aumentaron (Harcum & Haddadin, 2006).

Finalmente, podemos decir que la expresión de las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES a las distintas temperaturas de inducción confirma que las células emplean estos complejos proteínicos para aliviar el estrés asociado a la producción de la proteína heteróloga y al choque térmico. Independientemente de la temperatura de inducción, todas las chaperonas se vieron en al menos una fracción del cultivo. Además, quedaron incorporadas diferencialmente en las fracciones solubles o en los cuerpos de inclusión, tal vez como un reflejo de su actividad durante el proceso de plegamiento. En general, pudo verse que en los biorreactores hubo mayor presencia de las chaperonas con respecto a los matraces, lo que podría dar un indicio de que la escala de cultivo también mejora su expresión.

Para un trabajo posterior se propone cuantificar los niveles de expresión de las chaperonas con el fin de facilitar la comparación; así como probar otras estrategias de calentamiento bajo las cuales la sobre expresión de las chaperonas se traduzca en un mejor rendimiento de proteína recombinante. También podría ser interesante, siguiendo la línea de este trabajo, hacer inmunodetecciones en las fracciones provenientes del medio complejo LB para definir la influencia de la composición del medio en la producción de las chaperonas y, además, estudiar el efecto del oxígeno disuelto en sistemas termoinducidos.

8.7. Caracterización de los CI de ESAT-6 obtenidos en un sistema termoinducido

8.7.1. Resistencia de los CI de ESAT-6 a la degradación por proteínasa K

La proteínasa K es una serín proteasa utilizada ampliamente para el mapeo de estructuras amiloides, debido a que es activa contra dominios globulares o regiones desordenadas de las proteínas y presenta baja actividad contra fibrillas amiloides o conformaciones β -laminares densamente empaquetadas (Sabaté *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2015). La explicación a esto es que la proteínasa K corta selectivamente el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de aminoácidos alifáticos y aromáticos localizados en dominios enriquecidos con asas y hélices α que se encuentren accesibles al corte, dejando intactos los enlaces peptídicos cercanos o embebidos en láminas y giros β (Kraus & Femfert, 1976; Hubbard *et al.*, 1998). La presencia de éstas láminas β constituyen el principal patrón estructural de las fibrillas amiloides (Chiti & Dobson, 2006).

La expresión heteróloga de ESAT-6 en *E. coli* usando un sistema termoinducido resultó en CI con características estructuralmente diferentes dependiendo de la temperatura de inducción. Los CI obtenidos en matraces y biorreactores inducidos a 39°C presentaron más proteína extraíble por proteínasa K que los CI cultivados bajo inducción a 42°C (Figuras 39 y 40). Estos últimos exhibieron una sensibilidad a la proteólisis similar a los CI obtenidos a 30°C.

De manera interesante, esto sugiere que en un sistema termoinducido a una temperatura de 42°C se obtienen proteínas con mayor estructuración del tipo amiloide dentro de los CI y, por tanto, son más resistentes a la actividad proteolítica. Mientras que en los cultivos inducidos a 39°C, la estructura de los CI presenta poca conformación de láminas β y las fuerzas de estabilización entre los centros de nucleación son débiles e inestables, permitiendo que la proteínasa K corte con mayor facilidad.

Ya se ha descrito en estudios anteriores con priones y proteínas relacionadas con ciertas enfermedades neurodegenerativas, que la resistencia a la proteólisis por proteínasa K está asociada a regiones de la secuencia potencialmente involucradas en formar núcleos fibrilares, organizados y compactos (Vázquez-Fernández *et al.*, 2012; Miake *et al.*, 2002), lo que podría indicar que los CI obtenidos a 42°C se han compactado lo suficiente y son altamente estructurados como los CI que no fueron sometidos a termoinducción.

Desde un punto de vista termodinámico, la aplicación de calor afecta la estabilidad de las interacciones no-covalentes en la estructura terciaria de las proteínas, pues se eleva la entalpía y se rompen enlaces que mantienen el equilibrio molecular. Los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas por naturaleza ocurren mediante procesos exotérmicos, lo que ocasiona que se desestabilicen a altas temperaturas. Las interacciones hidrofóbicas, por el contrario, son endotérmicas y se estabilizan a altas temperaturas, favoreciendo la agregación (Jaenicke, 1991; Dergal *et al.*, 1981; Somero, 1995). Por otro lado, bajo estrés térmico la proteína mantiene su estabilidad energética ocultando los sitios expuestos sensibles a hidrólisis y las estructuras polipeptídicas tienden a volverse más compactas a medida que aumenta la temperatura (Privalov, 1992; Fernández-Velasco, 1995).

Evidentemente no hay un único mecanismo que explique el comportamiento de los CI a altas temperaturas, ya que pueden estar interviniendo muchos factores tanto fuera como dentro de las células, que van a afectar el grado de compactación, la resistencia a las enzimas y en general, las características estructurales de los agregados.

Una propuesta es que dentro de los CI obtenidos con inducción a 42°C, la proteína recombinante ESAT-6 presenta más interacciones de tipo hidrofóbico que los CI a 39°C, aumentando su compactación y, por tanto, volviéndose más resistente a la proteólisis por proteínasa K. Tal vez, en un proceso termoinducido las interacciones hidrofóbicas y la compactación estructural se refuerzan conforme se eleva la temperatura, y como consecuencia aumenta también la estabilidad frente a la proteólisis.

Es importante mencionar que los CI obtenidos en matraces son menos estructurados que los CI de biorreactores, lo que los hace más sensibles a la proteólisis con proteínasa K (Figuras 39 y 40). Esto se comprobó con el cálculo de la velocidad media de degradación por proteínasa K a los 20 minutos de la reacción, la cual fue de 0.010 u.a./min para los matraces contra la de biorreactores que fue de 0.004 u.a./min, es decir 2.5 veces más lenta.

Posiblemente el control de condiciones de oxígeno, pH y temperatura de un cultivo en biorreactor permiten una mayor compactación de la proteína recombinante dentro los CI al compararse con la de matraces agitados. Sin embargo, bajo ninguna estrategia de termoinducción se solubilizaron completamente los CI demostrando el alto nivel de estabilidad y estructuración de los agregados obtenidos con el sistema termoinducido. Esto puede deberse a que bajo condiciones de estrés, las células tienden a generar proteína recombinante insoluble. Esta forma agregada muchas veces resulta ser más estable y resistente que la estructura nativa, actuando como una red cinética y termodinámicamente equilibrada que protege a los polipéptidos de la desnaturalización y proteólisis (Jahn, *et al.*, 2005).

8.7.2. Solubilización de los cuerpos de inclusión de ESAT-6 con cloruro de guanidinio

La naturaleza iónica del cloruro de guanidinio le permite interactuar con grupos polares de las cadenas polipeptídicas, provocando su desnaturalización y pérdida de estructura secundaria (Patra *et al.*, 2000). Además, a altas concentraciones impide la formación de puentes de hidrógeno y estabiliza regiones hidrofóbicas que favorecen la exposición de las proteínas al solvente (Ferreira *et al.*, 2001). Por lo tanto, este agente caotrópico es empleado comúnmente para evaluar características de estabilidad de cuerpos de inclusión.

Después de incubar los CI de la proteína ESAT-6 provenientes de matraces y biorreactores con diferentes concentraciones de GuHCl, se encontró que los CI formados en matraces termoinducidos a 39°C y 42°C fueron más sensibles frente a la desnaturalización química que aquellos CI de cultivos no inducidos (Figura 41). Mientras que los CI termoinducidos en biorreactores presentaron el mismo nivel de estabilidad que los no inducidos, ya que no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de proteína solubilizada (Figura 42).

En primer lugar, podríamos decir que las condiciones de cultivo determinan la fuerza de las interacciones y por tanto la estructuración de los cuerpos de inclusión. Muy probablemente el hecho de tener controlado el pH y el oxígeno disuelto en los biorreactores provoca que los CI que se forman bajo inducción térmica sean igual de estables que los obtenidos en cultivos no inducidos. Mientras que los CI formados en matraces pueden estar sujetos a variaciones estructurales por otro tipo de factores como cambios en el oxígeno y en el pH del medio. Castellanos-Mendoza y colaboradores (2014) reportaron que el pH es uno de los factores de cultivo que pueden influir sobre la formación de los cuerpos de inclusión. Los CI derivados de cultivos de *E. coli* usando biorreactores sin control de pH pueden solubilizarse completamente, mientras que los CI obtenidos en cultivos a pH controlado de 7.5 son más resistentes a la desnaturalización por GuHCl (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014).

En segundo lugar, siguiendo los resultados obtenidos en el ensayo de digestión con proteínasa K, los CI de matraces se degradaron en menor tiempo que los de biorreactores. Es posible que esta mayor sensibilidad a la proteólisis de los CI termoinducidos de matraces, sumado a limitaciones en oxígeno y disminución en el pH, se reflejen también en las diferencias frente a la desnaturalización química de los CI termoinducidos con los no inducidos.

Dentro de los pocos antecedentes sobre cuerpos de inclusión obtenidos en un sistema termoinducido, se encuentra el trabajo de Rinas y colaboradores (2007). Los autores compararon el efecto del GuHCl sobre los cuerpos de inclusión de la proteína hFGF-2 obtenidos en cultivos de alta densidad de *E. coli* inducidos térmicamente contra agregados producidos *in vitro* al someter a la proteína pura a calentamiento a 70°C y también contra la proteína nativa. Notaron que a pesar de la composición heterogénea de los CI termoinducidos y de los agregados obtenidos *in vitro*, ambos presentaron el mismo perfil de disolución, y que las concentraciones de GuHCl requeridas para la desnaturalización de los agregados fueron mayores que para la proteína nativa (Rinas *et al.*, 2007). Lo anterior es congruente con nuestros resultados, donde en biorreactores bajo diferentes temperaturas de inducción, el perfil de desnaturalización de los CI de ESAT-6 fue similar y aunque no se comparó con la proteína nativa, se observó que en todos los casos se necesitaron concentraciones mayores a 2 M para disolver los agregados.

El hecho de que a altas concentraciones de GuHCl, los CI pierdan su estabilidad y se solubilizan las proteínas se debe a la capacidad de los iones guanidinio (Gdm⁺) de formar interacciones directas con grupos polares y no polares de la superficie de las proteínas (Graziano, 2011). Dichas interacciones bloquean la agregación y las cadenas laterales de las proteínas quedan expuestas al solvente acuoso, induciendo un estado no plegado (Li & Mu, 2011).

De manera interesante, el trabajo de De Groot y Ventura (2006) revela resultados contrarios a los obtenidos en esta investigación. Ellos prueban el efecto de diferentes temperaturas (25°C, 37°C y 42°C) sobre la actividad y estabilidad de los CI formados por un péptido A β 42 del Alzheimer en

cultivos de *E. coli*, concluyendo que los CI llegan a ser más estables a la desnaturalización con GuHCl cuando la temperatura aumenta (De Groot & Ventura, 2006). Mientras que en nuestro caso los CI formados a 30°C no sólo fueron más estables a la acción del agente caotrópico (en el caso de matraces; Figura 41) sino también más resistentes a la degradación por proteínasa K (Figuras 39 y 40) que los obtenidos de cultivos termoinducidos a 39°C y 42°C. La gran diferencia es que ellos no usan un sistema termoinducido, sino que inducen con IPTG y luego elevan la temperatura de los cultivos, además no se especifica en qué escala se realizaron los cultivos. Precisamente el sistema termoinducido puede hacer la diferencia, debido a la cantidad de chaperonas que se sobre expresan y que permiten que la proteína recombinante que queda dentro de los CI termoinducidos sea más fácil de extraer.

Finalmente, a pesar de que los CI producidos a 30°C (sin inducir) presentaron mayor resistencia a la proteínasa K tanto en matraces como en biorreactores, cuando analizamos la estabilidad frente a la disolución química, las desviaciones estándar demuestran que los CI producidos sin inducir y en el sistema termoinducido a 39°C y 42°C, liberan concentraciones similares de proteína, es decir, que al parecer la temperatura no tiene efecto en ese sentido. Podríamos proponer que los CI de ESAT-6 producidos tanto en matraces agitados como en biorreactores usando un sistema inducido por temperatura presentan características de tipo “no clásicos”, ya que son sensibles a la degradación enzimática y liberan proteína soluble cuando se usan agentes caotrópicos como el GuHCl (Peternel *et al.*, 2008).

Esto puede ser importante desde el punto de vista biotecnológico, ya que cuando se quiere extraer una proteína recombinante de uso farmacéutico desde los CI es necesario pasar por una etapa de solubilización en agentes caotrópicos (Singh & Panda 2005). Por eso, la caracterización de los CI cultivados a diferentes condiciones de cultivo ofrece la ventaja de optimizar el proceso de obtención de la proteína recombinante.

9. CONCLUSIONES

- ❖ Los cultivos inducidos térmicamente a 39°C y 42°C en matraces y en biorreactores alcanzan densidades ópticas menores que los cultivos sin inducir (30°C), tanto en medio complejo como en medio definido.
- ❖ En los cultivos inducidos a 39°C y 42°C en matraces agitados con medio mínimo hay acumulación de acetato, pero en biorreactores bajo las mismas condiciones la cepa recombinante lo asimila durante la fase estacionaria como una segunda fuente de carbono.
- ❖ En los cultivos termoinducidos además del estrés térmico y el estrés por la expresión de la proteína recombinante, se presenta un estrés nutricional representado por la limitación de la fuente de carbono en biorreactores y por el sobre flujo metabólico y la limitación del oxígeno disuelto en los matraces.
- ❖ Empleando un sistema inducido por temperatura a 39°C y 42°C se produce la proteína recombinante ESAT-6 en forma de cuerpos de inclusión independientemente del medio de cultivo empleado.
- ❖ Con el uso de un sistema termoinducible en *E. coli* se mejoran alrededor de 20 veces los rendimientos de la producción heteróloga de ESAT-6 obtenida en forma de cuerpos de inclusión, con respecto a un sistema inducido químicamente. En promedio, se alcanzan concentraciones de la proteína ESAT-6 insoluble (no purificada) de 190 mg/L en matraces agitados y de 250 mg/L en biorreactores.
- ❖ En matraces y biorreactores inducidos a 39°C se consiguen concentraciones de 0.18 y 0.26 g/L de ESAT-6 recombinante dentro de los cuerpos de inclusión y concentraciones de 0.20 y 0.24 g/L en matraces y biorreactores inducidos a 42°C, respectivamente, indicando que la temperatura de inducción no define la cantidad proteína heteróloga dentro de los CI.
- ❖ Las chaperonas DnaK, DnaJ, GroEL y GroES se asocian diferencialmente a la fracción soluble y a los CI de la proteína recombinante durante un sistema termoinducido, tal vez como un reflejo de su actividad durante el proceso de plegamiento. DnaK se detectó en las fracciones de la proteína soluble, mientras que GroEL se acumuló principalmente en los CI.
- ❖ Los CI de ESAT-6 obtenidos en matraces y biorreactores inducidos a 39°C presentan mayor sensibilidad a la proteólisis por proteínasa K que los cultivados bajo inducción a 42°C. Pero presentan una sensibilidad similar a la solubilización por GuHCL bajo ambas temperaturas, comparados con aquellos formados a 30°C.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar la expresión de la proteína recombinante usando otras estrategias de termoinducción:
 - Cultivos sometidos a un único pico de calentamiento desde 30°C a 42°C y posterior enfriamiento hasta 30°C.
 - Cultivos con inducción oscilatoria de 30°C a 42°C a una velocidad rápida (8.0°C/min).
 - Cultivos con inducción oscilatoria de 30°C a 42°C a una velocidad lenta (0.4°C/min).
- ❖ Estudiar el efecto del oxígeno disuelto en sistemas termoinducidos - calcular k_{La} y potencia volumétrica en matraces y biorreactores termoinducidos.
- ❖ Cuantificar los niveles de expresión de las chaperonas en las diferentes condiciones de estudio.
- ❖ Utilizar otras técnicas de caracterización de los cuerpos de inclusión como unión a colores amiloidogénicos, FTIR y microscopía.

11. LITERATURA CITADA

Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Gutiérrez-Pabello J.A., McNair J., Andersen P., Suárez-Güemes F., Pollock J., Espitia C., Cataldi A. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med* **2010**, 96:161-169.

Abdallah M. Abdallah, Nicolaas C. Gey van Pittius, Patricia A. DiGiuseppe, Jeffery Cox, Joen Luirink, Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, Ben J. Appelmelk, Wilbert Bitter. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **2007**, 5: 883-891.

Andersen P., Andersen A. B., Sorensen A. L., Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* **1995**, 154: 3359-3372.

Allen S., Polazzi J., Gierse J., Easton A. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1992**, 174(21), 6938-47.

Araujo Z., Acosta M., Escobar H., Baños R., Fernández C., Rivas-Santiago B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Invest Clin* **2008**, 49: 411-441.

Arsène, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **2000**, 55(1), 3-9.

Aucoin M.G., McMurray-Beaulieu V., Poulin F., Boivin E.B., Chen J., Ardelean F.M., Cloutier M., Choi Y.J., Miguez C.B., Jolicoeur M. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microb Cell Fact* **2006**, 5 (27): 1-13.

Azia A., Unger R., Horovitz A. What distinguishes GroEL substrates from other *Escherichia coli* proteins? *FEBS J* **2012**, 279(4): 543-550.

Babu K.R., Swaminathan S., Marten S., Khanna N., Rinas U. Production of interferon- α in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biot* **2000**, 53:655-660.

Baig F., Fernando L., Salazar M-A., Powell R., Bruce T., Harcum S. Dynamic Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Inclusion Body Formation. *Biotechnol Bioeng* **2014**, 9999: 1-20.

Bettenbrock K., Bai H., Ederer M., Green J., Hellingwerf K.J., Holcombe M., Sharma P. Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **2014**, 64: 65-114.

Bhandari V., Houry, W.A. Substrate Interaction Networks of the *Escherichia coli* Chaperones: Trigger Factor, DnaK and GroEL. In *Prokaryotic Systems Biology* (pp. 271-294). Springer **2015**. Vol. 883: 271-294.

Baneyx F., Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **2004**, 22: 1399-1408.

Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **1999**, 10: 411-421.

Bentley W.E., Mirjalili N., Andersen D.C., Davis R.H., Kompala D.S. Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng* **1990**, 35(7), 668-681.

Bernard H.U., Remaut E., Hershfield M.V., Das H.K., Helinski D.R., Yanofsky C., Franklin N. Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from the bacteriophage lambda pL promoter. *Gene* **1979**, 5(1): 59-76.

Berthet F., Rasmussen P., Rosenkrands I., Andersen P., Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiol* **1998**, 144: 3195-3203.

Blaszczak A., Georgopoulos C., Liberek K. On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the s32 transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of the DnaK chaperone machine. *Mol Microbiol* **1999**, 31: 157–166.

Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnol* **1991**, 9: 725–730.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* **1976**, 72: 248-254.

Brock I., Munk M.E., Kok-Jensen A., Andersen P. Performance of whole blood IFN test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung D* **2001**, 5: 462-467.

Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S., Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* **2004**, 12: 500-508.

Bukau B. & Walker G.C. Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* dnaK gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J Bacteriol* **1989**, 171(5): 2337-2346.

Bukau B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* **1993**, 9:671-680.

Burgess R. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. *Method Enzymol* **2009**, 463: 259-279.

Calloni G., Chen T., Schermann S.M., Chang H.C., Genevaux P., Agostini F., Hartl F.U. DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. *Cell* **2012**, 1(3): 251-264.

Carrió M.M., Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* **2002**, 96: 3–12.

Carrió M.M., Villaverde A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* **2003**, 537: 215-221.

Carrió M., González-Montalbán N., Vera A., Villaverde A., Ventura S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol* **2005**, 347(5): 1025-1037.

Caspeta L., Flores N., Pérez N.O., Bolívar F., Ramírez O.T. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: A scale-down study. *Biotechnol Bioeng* **2009**, 102 (2): 468–482.

Caspeta L., Lara A., Pérez N., Flores N., Bolívar F., Ramírez O. Enhancing thermo-induced recombinant protein production in *Escherichia coli* by temperature oscillations and post-induction nutrient feeding strategies. *J Biotechnol* **2013**, 167: 47– 55.

Castellanos-Mendoza A., Castro-Acosta R.M., Olvera A., Zavala G., Mendoza-Vera M., García-Hernández E., Valdez-Cruz N.A. Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2014**, 13(1): 137.

Caulcott, C. A., Rhodes, M. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *Trends Biotechnol* **1986**, 4(6), 142-146.

Chapman E., Farr G.W., Usaite R., Furtak K., Fenton W.A., Chaudhuri T.K., Hondorp E.R., Matthews R.G., Wolf S.G., Yates J.R. Global aggregation of newly translated proteins in an *Escherichia coli* strain deficient of the chaperonin GroEL. *PNAS* **2006** 103: 15800–15805.

Chen R., Yap W.M., Postma P.W., Bailey, J. E. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: metabolism and energetics. *Biotechnol Bioeng* **1997**, (56), 583-590.

Chen S., Parlane N., Lee J., Wedlock D., Buddle B., Rehm B. New skin test for detection of bovine tuberculosis based on antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **2014**, 80(8): 2526–2535.

Cheng Y.S.E., Kwoh D.Y., Kwoh T.J., Soltvedt B.C., Zipser D. Stabilization of a degradable protein by its overexpression in *Escherichia coli*. *Gene* **1981**, 14(1-2): 121-130.

Chiti F. & Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annu Rev Biochem* **2006**, 75: 333-366.

Craig E.A., Gross C.A. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci* **1991**, 16: 135-140.

Da Silva P., Palomino J. Molecular basis and mechanisms of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemoth* **2011**, 66:1417-1430.

De Groot N.S. & Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* **2006**, 580(27): 6471-6476.

Del Vecchio P., Graziano G., Granata V., Barone G., Mandrich L., Rossi M., Manco G. Denaturing action of urea and guanidine hydrochloride towards two thermophilic esterases. *Biochem J* **2002**, 367(3): 857-863.

Dergal S.B., Rodríguez H.B., Morales A.A. Química de los alimentos. Cuarta edición *PEARSON EDUCACIÓN*, México, **2006**: 167-170.

Dillon D.C., Alderson M.R., Day C.H., Bement T., Campos Neto A., Skeiky Y.A.W. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, and immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis*-BCG. *J Clin Microbiol* **2000**, 38: 3285-90.

Dodd I.B., Perkins A.J., Tsemitsidis D., Egan J.B. Octamerization of lambda CI repressor is needed for effective repression of P (RM) and efficient switching from lysogeny. *Gene Dev* **2001**, 15(22): 3013-3022.

Dodd I.B., Shearwin K.E., Perkins A. J., Burr T., Hochschild A., Egan J. B. Cooperativity in long-range gene regulation by the λ CI repressor. *Gene Dev* **2004**, 18(3): 344-354.

Eiteman M.A., Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol* **2006**, 24 (11): 530–536.

El-Mansi E.M.T., Holms W.H. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol* **1989**, 135(11): 2875-2883.

Espitia C., Cervera I., Gonzales R., Mancilla R. A 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serological evaluation. *Clin Exp Immunol* **1989**, 77: 373-7.

- Ewalt K.L., Hendrick J.P., Houry W.A., Hartl, F. U. In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **1997**, 90(3): 491-500.
- Fayet O. Ziegelhoffer T., Georgopoulos C. The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **1989**, 171(3): 1379-1385.
- Fernández-Velasco D.A. El plegamiento de proteínas. *Boletín de Educación Bioquímica*, México, **1995**, 5-10.
- Ferrer-Miralles N., Domingo-Espín J., Corchero J.L., Vázquez E., Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* **2009**, 8(1), 17.
- Fink A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* **1998**, 3(1): R9-R23.
- Fishov I., Zaritsky A., Grover N.B. On microbial states of growth. *Mol Microbiol* **1995**, 15(5): 789-794.
- Fujiwara K., Ishihama Y., Nakahigashi K., Soga T., Taguchi H. A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates. *EMBO J* **2010**, 29(9): 1552-1564.
- García-Fruitós E., Arís A., Villaverde A. Localization of Functional Polypeptides in Bacterial Inclusion Bodies. *Appl Environ Microbiol* **2007**, 73: 289–294.
- García-Fruitós E. Inclusion bodies: a new concept. *Microb Cell Fact* **2010**, 9:80.
- Gatti-Lafranconi P., Natalello A., Ami D., Doglia S.M., Lotti M. Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *FEBS J* **2011**, 278(14): 2408-2418.
- Gill R.T., Valdes J.J., Bentley W.E. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **2000**, 2(3): 178-189.
- Glazyrina, J., Materne, E. M., Dreher, T., Storm, D., Junne, S., Adams, T., Neubauer, P. Research High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microb Cell Fact* **2010**, 9: 42.
- Gorocica P., Jimenez-Martinez M.C., Garfias Y., Sada I., Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* **2005**, 18(2): 142-153.
- Graf P.C.F., Jakob U. Redox-regulated molecular chaperones. *Cell Mol Life Sci* **2002**, 59(10): 1624-1631.
- Gragerov A., Nudler E., Komissarova N., Gaitanaris G.A., Gottesman M.E., Nikiforov V. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *PNAS* **1992**, 89(21): 10341-10344.
- Graumann K., Andreas P. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *J Biotechnol* **2006**: 164-186.
- Graziano G. Contrasting the denaturing effect of guanidinium chloride with the stabilizing effect of guanidinium sulfate. *PCCP* **2011**, 13(25): 12008-12014.

Grossman A.D., Straus D.B., Walter W.A., Gross C.A. Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **1987**, 1: 179-184.

Guisbert E., Herman C., Lu C.Z., Gross C.A. A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev* **2004**, 18(22): 2812-2821.

Gupta, G. Rao, A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor, *Biotechnol Bioeng* **2003**, 84 (3): 351–358.

Han M.J., Lee S.Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol R* **2006**, 70(2): 362-439.

Hanif S., Al-Attayah R., Mustafa A. Species-specific antigenic *Mycobacterium tuberculosis* proteins tested by delayed-type hypersensitivity response. *Int J Tuberc Lung Dis* **2010**, 14(4): 489–494.

Harcum S., Haddadin F. Global transcriptome response of recombinant *Escherichia coli* to heat-shock and dual heat-shock recombinant protein induction. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, 33(10): 801-814.

Harcum S.W., Ramirez D.M., Bentley W.E. Optimal nutrient feed policies for heterologous protein production. *Appl Biochem Biotechnol* **1992**, (34/35): 161–73.

Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **2002**, 295(5561): 1852-1858.

Hayer-Hartl M., Bracher A., Hartl F.U. The GroEL–GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. *Trends Biochem Sci* **2015**, 41(1): 62-76.

Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **1993**, 72(2): 165-168.

Herman C., Thevenet D., D'Ari R., Bouloc P. Degradation of σ_{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli* is governed by HflB. *PNAS* **1995**, 92(8): 3516-3520.

Hewitt C.J., Nebe-Von Caron G., Axelsson B., McFarlane C.M., Nienow A.W. Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration, *Biotechnol Bioeng* **2000**, 70 (4): 381–390.

Hoffmann F., Rinas U. On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng* **2001**, 76 (4), 333-340.

Hoffmann F., Weber J., Rinas U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng* **2002**, 80(3), 313-319.

Hoffmann F., Rinas U. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biot* **2004**, 89: 73–92.

Hoffmann J.H., Linke K., Graf P.C., Lili, H., Jakob U. Identification of a redox-regulated chaperone network. *EMBO J* **2004**, 23 (1), 160-168.

Hoffmann F., van den Heuvel J., Zidek N., Rinas U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microb Tech* **2004**, 34(3): 235-241.

- Hubbard S.J., Beynon R.J., Thornton J.M. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Protein Eng* **1998**, 11:349–359.
- Jaenicke R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* **1991**, 202: 715-28.
- Jahn T.R. & Radford S.E. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* **2005**, 272(23): 5962-5970.
- Jensen E.B., Carlsen S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol Bioeng* **1990**, 36 (1): 1–11.
- Jung K.H. Continuous production of recombinant interferon- α in *Escherichia coli* via the derepression of *trp* promoter using casamino acid. *Process Biochem* **2006**, 41(4): 809-814.
- Jürgen B., Lin H.Y., Riemschneider S., Scharf C., Neubauer P., Schmid R., Hecker M., Schweder T. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* **2000**, 70(2):217-224.
- Jürgen B., Breitenstein A., Urlacher V., Büttner K., Lin H., Hecker M., Schweder T., Neubauer P. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **2010**, 9:41.
- Kane J.F., Hartley D.L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **1988**, 6: 95–101.
- Kanjee U., Houry W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **2013**, 67: 65-81.
- Khalilzadeh R., Mohammadian-Mosaabadi J., Bahrami A., Nazak-Tabbar A., Nasiri-Khalili M.A., Amouheidari, A. Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biot* **2008** 35(12), 1643-1650.
- Kleinnijenhuis J., Oosting M., Joosten Leo., Netea M., Van Crevel Reinout. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol* **2011**; 2011:405310.
- Koch A.L. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Anal Biochem* **1970**, 38(1): 252-259.
- Kochi A., Vareldzis B., Styblo K. Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Res Microbiol* **1993**, 144: 104–10.
- Kornberg H.L. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J* **1966**, 99(1): 1–11.
- Kraus E. & Femfert U. Proteinase K from the mold *Tritirachium album* Limber: specificity and mode of action. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1976**, 357: 937–947.
- Kusukawa N. & Yura T. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Gene Dev* **1988**, 2(7): 874-882.
- Lara A.R., Vazquez-Limón C., Gosset G., Bolívar F., López-Munguía A., Ramírez O.T. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* **2006**, 94(6): 1164-1175.

Lara A.R., Leal L., Flores N., Gosset G., Bolivar F., Ramírez O.T. Transcriptional and metabolic response of *recombinant Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scaledown system. *Biotechnol Bioeng* **2006b** 93:372–385.

Lara A.R. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Rev Mex Ing Quim* **2011**, 209-223.

Lawrence J.V., Maier S. Correction for the inherent error in optical density readings. *Appl Env Microbiol* **1977**, 33(2): 482-484.

Lee S., Sowa M.E., Watanabe Y.H., Sigle P.B., Chiu W., Yoshida M., Tsai F.T. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **2003**, 115(2), 229-240.

Leemans R., Remaut E., Fiers W. A broad-host-range expression vector based on the pL promoter of coliphage I: regulated synthesis of human interleukin 2 in *Erwinia* and *Serratia* species. *J Bacteriol* **1987**, 169: 1899-1904.

Li X., Robbins J.W., Taylor K.B. Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains, *J Ind Microbiol* **1992**, 9: 10-1.

Li W. & Mu Y. Dissociation of hydrophobic and charged nano particles in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: A molecular dynamics study. *Nanoscale* **2012**, 4(4): 1154-1159.

Lieb M. Studies of heat-inducible lambda bacteriophage, I. Order of genetics sites and properties of mutant prophages. *J Mol Biol* **1966**, 16:149-163.

Lieb M. A fine structure map of spontaneous and induced mutations in the lambda repressor gene, including insertions of IS elements. *Mol Gen Genet* **1981**, 184(3): 364-371.

Lim H.K., Jung K.H. Improvement of heterologous productivity by controlling postinductive specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* under control of the PL promoter. *Biotechnol Prog* **1998**, 14: 548-553.

Macedo B., Sant'Anna R., Navarro S., Cordeiro Y., Ventura, S. Mammalian prion protein (PrP) forms conformationally different amyloid intracellular aggregates in bacteria. *Microb Cell Fact* **2015**, 14(1), 1.

Mahairas G.G., Sabo P.J., Hickey M.J., Devinder C., Stover C.K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **1996**, 178: 1274-1282.

Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **1996**, 60(3):512-538.

Maniatis T., Patshne M. Multiple repressor binding at the operators in bacteriophage lambda. *PNAS* **1973**, 70:1531-1535.

Mansey M.S., Ghareeb K.A., Moghazy A.N., Tawfick M.M., Fouda M.M., El Marzugi N., El Enshasy H. A. Glucose concentration affects recombinant interferon α -2b production in *Escherichia coli* using thermo-induction system. *J Applied Pharm Sci* **2014**, 4(05): 001-005.

Margreiter G., Messner P., Caldwell K., Bayer K. Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *J Biotechnol* **2008**, 138: 67–73.

Meher A.K., Bal N.C., Chary K.V., Arora A. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6–CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS J* **2006**, 273(7): 1445-1462.

Mejía R., Gómez-Eichelmann M.C., Fernández M.S. Fatty acid profile of *Escherichia coli* during the heat-shock response. *Biochem Mol Biol Int* **1999**, 47(5): 835-844.

Menart V., Jevševar S., Vilar M., Trobiš A., Pavko A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR/PL promoters from phage lambda. *Biotechnol Bioeng* **2003**, 83 (2): 181–190.

Miake H., Mizusawa H., Iwatsubo T., Hasegawa M. Biochemical characterization of the core structure of α -synuclein filaments. *J Biol Chem* **2002**, 277(21): 19213-19219.

Mitraki, A., King, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Nat Biotechnol* **1989**, 7(7): 690-697.

Müller B., Dürr S., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C., Parsons S. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* **2013**, 19 (6): 899-908.

Mustafa A.S., Al-Attiyah R., Hanif S.N., Shaban F.A. Efficient testing of large pools of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells. *Clin Vaccine Immunol* **2008**, 15: 916–24.

Myers J.A., Curtis B.S., Curtis W.R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC biophysics* **2013**, 6 (4): 1-16.

Nagai H., Yuzawa H., Yura T. Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of sigma 32 synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *PNAS* **1991**, 88(23): 10515-10519.

Nauta A., Van den Burg B., Karsens H., Venema G., Kok J. Design of thermolabile bacteriophage repressor mutants by comparative. *Nat Biotechnol* **1997**, 15: 980-983.

Negrete A., Shiloach J. Constitutive expression of the sRNA GadY decreases acetate production and improves *E. coli* growth. *Microb Cell Fact* **2015**, 14 (148): 1-10.

Neubauer P., Winter J. Expression and Fermentation Strategies for Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. In Recombinant Protein Production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology. *Springer Netherlands* 2001, 195-258.

Nonaka G., Blankschien M., Herman C., Gross C.A., Rhodius V. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Gene Dev* **2006**, 20(13): 1776-1789.

Ocampo M., Patarroyo M.A., Vanegas M., Alba M.P., Patarroyo M.E. Functional, biochemical and 3D studies of *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides for an effective anti-tuberculosis vaccine. *Crit Rev Microbiol* **2013**, 40(2): 117-145.

Oettinger T., Jørgensen M., Ladefoged A., Hasløv K., Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle Lung Dis* **1999**, 79(4): 243–250.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Reporte Global de Tuberculosis. **2013**. Suiza.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Reporte Global de Tuberculosis. **2014**. Suiza

Paek K.H. & Walker G.C. *Escherichia coli* dnaK null mutants are inviable at high temperature. *J Bacteriol* **1987**, 169: 283-290.

Palma-Nicolás J., Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol* **2007**, 43(4): 225-32.

Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramirez O.T. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Method Mol Biol* **2004**, 267: 15-52.

Papaneophytou C.P., Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expres Purif* **2014**, 94: 22-32.

Patra A.K., Mukhopadhyay R., Mukhija R., Krishnan, Garg L.C., Panda, A.K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expres Purif* **2000**, 18(2): 182–92.

Peng X., Jiang G., Liu W., Zhang Q., Qian W., Sun J. Characterization of differential pore-forming activities of ESAT-6 proteins from *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*. *FEBS Lett* **2016**, 590(4): 509-19.

Peternel Š., Grdadolnik J., Gaberc-Porekar V., Komel R. Engineering inclusion bodies for non-denaturing extraction of functional proteins. *Microb Cell Fact* **2008a**, 7(1), 34: 1-9.

Peternel Š., Jevševar S., Bele M., Gaberc-Porekar V., Menart V. New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* **2008b**, 49(4): 239-246.

Phue J.N., Shiloach J. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J Biotechnol* **2004**, 109: 21–30.

Pimienta-Rodríguez E., Rodríguez-Valdés C., Sarzo-Gómez M., Vallín-Plou C. Producción de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium tuberculosis* y evaluación de sus potencialidades en el serodiagnóstico de la tuberculosis activa en una población cubana. *Rev CENIC - Ciencias Biológicas* **2012**, 43 (2): 1-8.

Pollock J.M., Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* **1997**, 65: 2587–92.

Privalov P.L. Protein folding. *Microcalorimetry of Macromolecules: The Physical Basis of Biological Structures* **1992**: 225-247.

Przybycien T.M., Dunn J.P., Valax P., Georgiou G. Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. *Protein Eng* **1994**, 7(1): 131-136.

Ptashne M., Jeffrey A., Johnson A.D., Maurer R., Meyer B.J., Pabo C.O., Roberts T.M., Sauer R.T. How the lambda repressor and *cro* work. *Cell* **1980**, 19(1):1-11.

Ramirez D.M., Bentley W.E. Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnol Bioeng* **1993**, 41: 557–65.

Ravn P., Demissie A., Andersen P. Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **1999**, 179: 637–45.

Remaut E., Stanssens P., Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene* **1981**, 15(1): 81-93.

Reynoso-Cereceda G.I., Garcia-Cabrera R. I., Valdez-Cruz N. A., Trujillo-Roldán M. A. Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient kLa characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem Eng J* **2016**, 105: 379-390.

Rinas U., Bailey J.E. Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **1992**, 37:609-614.

Rinas U., Hoffmann F., Betiku E., Estapé D., Marten S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2007**, 127(2): 244-257.

Rodríguez-Carmona E., Cano-Garrido O., Seras-Franzoso J., Villaverde A., García-Fruitós E. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microb Cell Fact* **2010**, 9(1): 71: 1-9.

Rodrigues L.C., Smith P.G. Tuberculosis in developing countries and methods for its control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1990**, 84 (5): 739-744.

Ron E.Z., Segal G., Sirkis R., Robinson M., Graur D. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Ann NY Acad Sci* **2000**, 649-655.

Rosen R., Ron E.Z. Proteome analysis in the study of the bacterial heat shock response. *Mass Spectrom Rev* **2002**, 21(4): 244-265.

Rosen R., Biran E. Gur, D. Becher, M. Hecker, E. Z. Ron. Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS Microbiol Lett* **2002**, 207: 9–12.

Russell J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J App Bacteriol* **1992**, 73(5): 363-370.

Sabaté R., Espargaró A., de Groot N.S., Valle-Delgado J.J., Fernández-Busquets X., Ventura, S. The role of protein sequence and amino acid composition in amyloid formation: scrambling and backward reading of IAPP amyloid fibrils. *J Mol Biol* **2010**, 404(2): 337-352.

Sada E, Ferguson L, Daniel TM. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000 dalton native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **1990**, 162: 928-31.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. Molecular cloning. 2da Edition. Cold Spring Harbor Lab Press NY **1989**, 2: 9-14.

Sandoval-Basurto E.A., Gosset G., Bolívar F., Ramirez O.T. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* **2005**, 89(4): 453-463.

Saraswat M., Musante L., Ravidá A., Shortt B., Byrne B., Holthofer H. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. *BioMed Res Int* **2013**, (2013): 1-19.

Schmidt M., Babu K.R., Khanna N., Marten S., Rinas U. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **1999**, 68(1): 71-83.

Schweder T., Kruger E., Xu B., Jurgen B. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnol Bioeng* **1999**, 65: 151–159.

Seghrouchni F., Contini S., Markova R. Design of immunogenic peptides from *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed during macrophage infection. *Tuberculosis* **2009**, 89: 210–7.

Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **2007**, 189(23): 8746-8749.

- Sharma S. K., Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* **2004**, 120: 316-353.
- Shiloach J., Kaufman J., Guillard A.S., Fass R. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol Bioeng* **1996**, 49: 421-428.
- Shiloach J., Reshamwala S., Noronha S.B., Negrete A. Analyzing metabolic variations in different bacterial strains, historical perspectives and current trends—example *E. coli*. *Curr Opin Biotech* **2010**, 21(1): 21-26.
- Shiloach J. & Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* **2005**, 23(5): 345-357.
- Shu J., Shuler M.L. Amino acid supplementation decreases plasmid retention in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **1992**, 40: 1197– 202.
- Silva VMC, Kanaujia G, Gennaro ML, Menzies D. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14kDa in patients with a spectrum of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, 7: 478-84.
- Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **2005**, 99 (4): 303-310.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SINAVE. *Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México* **2012**. Ciudad de México, México.
- Smith H.E. The transcriptional response of *Escherichia coli* to recombinant protein insolubility. *J Struct Funct Genomics* **2007**, 8(1): 27-35.
- Somero G.N. Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol* **1995**, 57(1): 43-68.
- Sørensen A., Nagai S., Houen G., Andersen P., Andersen A. Purification and characterization of low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **1995**, 63(5): 1710.
- Strandberg L., Enfors S.O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *App Environ Microbiol* **1991**, 57(6): 1669-1674.
- Straus D.B., Walter W.A., Gross C.A. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ_{32} . *Nature* **1987**, 329: 348 – 351.
- Szabo A., Langer T., Schröder H., Flanagan J., Bukau B., Hartl F.U. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *PNAS* **1994**, 91(22): 10345-10349.
- Takahashi C.M., Takahashi D.F., Carvalhal M.L., Alterthum F. Effects of acetate on the growth and fermentation performance of *Escherichia coli* KO11. *App Biochem Biotech* **1999**, 81(3): 193-203.
- Taylor G., Hoare M., Gray D.R., Marston F.A.O. Size and density of protein inclusion bodies. *Nat Biotechnol* **1986**, 4(6): 553-557.
- Teutschbein J., Schumann G., Möllmann U., Grabley S., Cole S.T., Munder T. A protein linkage map of the ESAT-6 secretion system 1 (ESX-1) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Res* **2009**, 164: 253–259.

Thomas J.G., Baneyx F. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells Overexpressing heat-shock proteins. *J Biol Chem* **1996**, 271 (19): 11141–11147.

Todar K. Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison, **2003**.

Toennies G., Gallant D.L. The relation between photometric turbidity and bacterial concentration. *Growth* **1949**, 13(1): 7-20.

Tomoyasu T., Gamerl J. *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ 32. *EMBO J* **1995**, 14 (11): 2551-2560.

Torabi A., Tahmoorespur M., Vahedi F., Mosavari N., Nassiri M. Quantiation of IL-4, IL-10 and IFN- γ genes expression after immunization of mice with CFP-10 and ESAT-6 containing vectors. *Iranian J Immunol* **2013**, 10(4): 205-215.

Trujillo-Roldán M.A., Peña C., Galindo E. Components in the inoculum determine the kinetics of *Azotobacter vinelandii* cultures and the molecular weight of its alginate. *Biotechnol Lett* **2003**, 25(15): 1251-1254.

Trunz B., Fine P., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of costeffectiveness. *Lancet* **2006**, 367 (9517): 1173-1180.

Uma Devi K.R., Ramalingam B., Raja A. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* and 16kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2003**, 46: 205-9.

Upadhyay A.K., Murmu A., Singh A., Panda A.K. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **2012**, 7(3), e33951.

Valdez-Cruz N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact* **2010**, 9:18.

Valdez-Cruz N.A., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. Heat shock molecular responses caused by the production of recombinant proteins in the heat inducible expression system: *E. coli* with lambda phage pL and/or pR promoters. *Bioeng Bugs* **2011**, 2: 2.

Vallejo L.F., Brokelmann M., Marten S., Trappe S., Cabrera-Crespo J., Hoffmann A., Rinas U. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2002**, 94(2): 185-194.

Van Pinxteren L.A.H., Ravn P., Agger E.M., Pollock J., Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immun* **2000**, 7 (2): 155-160.

Vasala A., Panula J., Bollók M., Illmann L., Hälsig C., Neubauer P. A new wireless system for decentralised measurement of physiological parameters from shake flasks. *Microb Cell Fact* **2006**, 5(1), 8.

Vázquez-Fernández E., Alonso J., Pastrana M.A., Ramos A., Stitz L., Vidal E., Requena J.R. Structural organization of mammalian prions as probed by limited proteolysis. *PLOS ONE* **2012**, 7(11), e50111.

Villaverde A., Benito A., Viaplana E., Cubarsi R. Fine regulation of cl857- controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Appl Environ Microbiol* **1993**, 59(10): 3485-3487.

Vorderwülbecke S., Kramer G., Merz F., Kurz T.A., Rauch T., Zachmann-Brand B., Deuerling E. Low temperature or GroEL/ES overproduction permits growth of *Escherichia coli* cells lacking trigger factor and DnaK. *FEBS Lett* **2004**, 559(1): 181-187.

Vutla J., Chandran D. Cloning, expression and purification of ESAT-6 and CFP-10 and their use in the detection of IFN- γ responses in tuberculosis infected cattle. *Biotechnol Bioinf Bioeng* **2011**, 1(2): 255-264.

Wang B.L., Xu Y., Wu C.Q., Xu Y.M., Wang H.H. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expres Purif* **2005**, 39(2): 184-188.

Wang L. Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. *Prion* **2009**, 3(3): 139-45.
Waters W.R., Palmer M.V., Buddle B.M., Vordermeier H.M. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* **2012**, 30:2611-2622.

Weber, J., Hoffmann, F., Rinas, U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol Bioeng* **2002**, 80(3), 320-330.

Welding K., Rosenkrands I., Okkels L.M., Doherty T.M., Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* **2005**, 43: 57-65.

Wick L., Egli T. Molecular components of physiological stress responses in *E. coli*. *Adv Biochem Eng Biot*, 89: 1-45.

Wittmann C., Min-Kim H., Gernot John G., Heinzle E. Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnol Lett* **2003**, 25:3 77-380.

Wittmann C., Weber J., Betiku E., Krömer J., Böhm D., Rinas U. Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2007**, 132: 375-384.

Xu B., Jahic M., Blomsten G., Enfors S.O. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotech* **1999**, 51(5): 564-571.

Yoakum G.H., Yeung A.T., Mattes W.B., Grossman L. Amplification of the *uvrA* gene product of *Escherichia coli* to 7% of cellular protein by linkage to the pL promoter of pKC30. *PNAS* **1982**, 79: 1766-1770.

Yura T., Nakahigashi K. Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* **1999**, 2:153-158.

Zhao K., Liu M., Burgess R.R. The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced sigma 32 protein involves sigma 32 regulon activation followed by inactivation and degradation of sigma 32 in vivo. *J Biol Chem* **2005**, 280(18):17758-17768.

Zhou L., Deng C., Cui W.J., Liu Z.M., Zhou Z.M. Efficient L-Alanine Production by a Thermo-Regulated Switch in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotech* **2016**, 178(2): 324-337.

Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Env Microbiol* **1990**, 56(6), 1875-1881.

ANEXOS

ANEXO 1: Correlación de entre peso seco y densidad óptica de la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6)

Se hizo un cultivo por duplicado de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) a 30°C en matraces agitados usando medio mineral. Se tomaron muestras para determinar la correlación entre la biomasa en peso seco y la DO. En la figura 30, se muestra la curva estándar en la que se ajustaron los datos obtenidos con una línea recta, cuyo coeficiente de correlación fue de 0.9982. Se encontró que para la cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6): 1 unidad de DO (600 nm) es equivalente a 0.31 ± 0.05 g/L de peso seco celular.

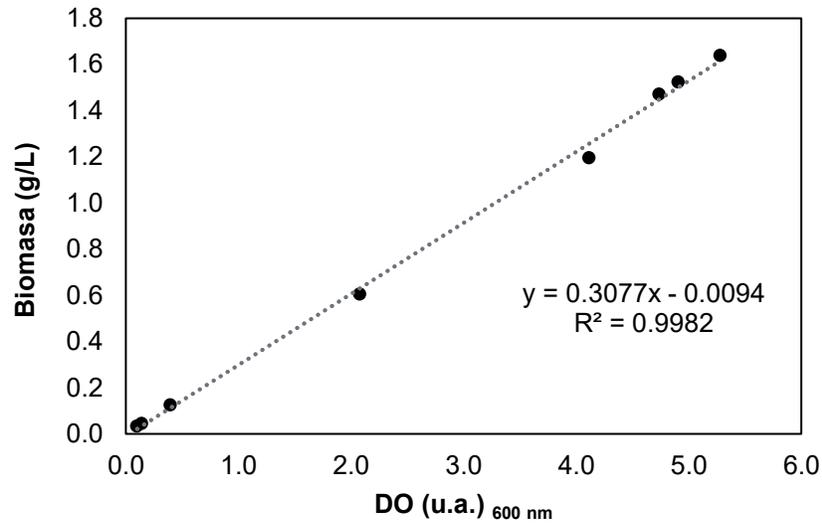


Figura A1. Correlación entre la concentración de biomasa en peso seco (g/L) y la densidad óptica (u.a.) a 600 nm para *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6).

ANEXO 2: Acumulación de ácidos orgánicos en el medio de cultivo

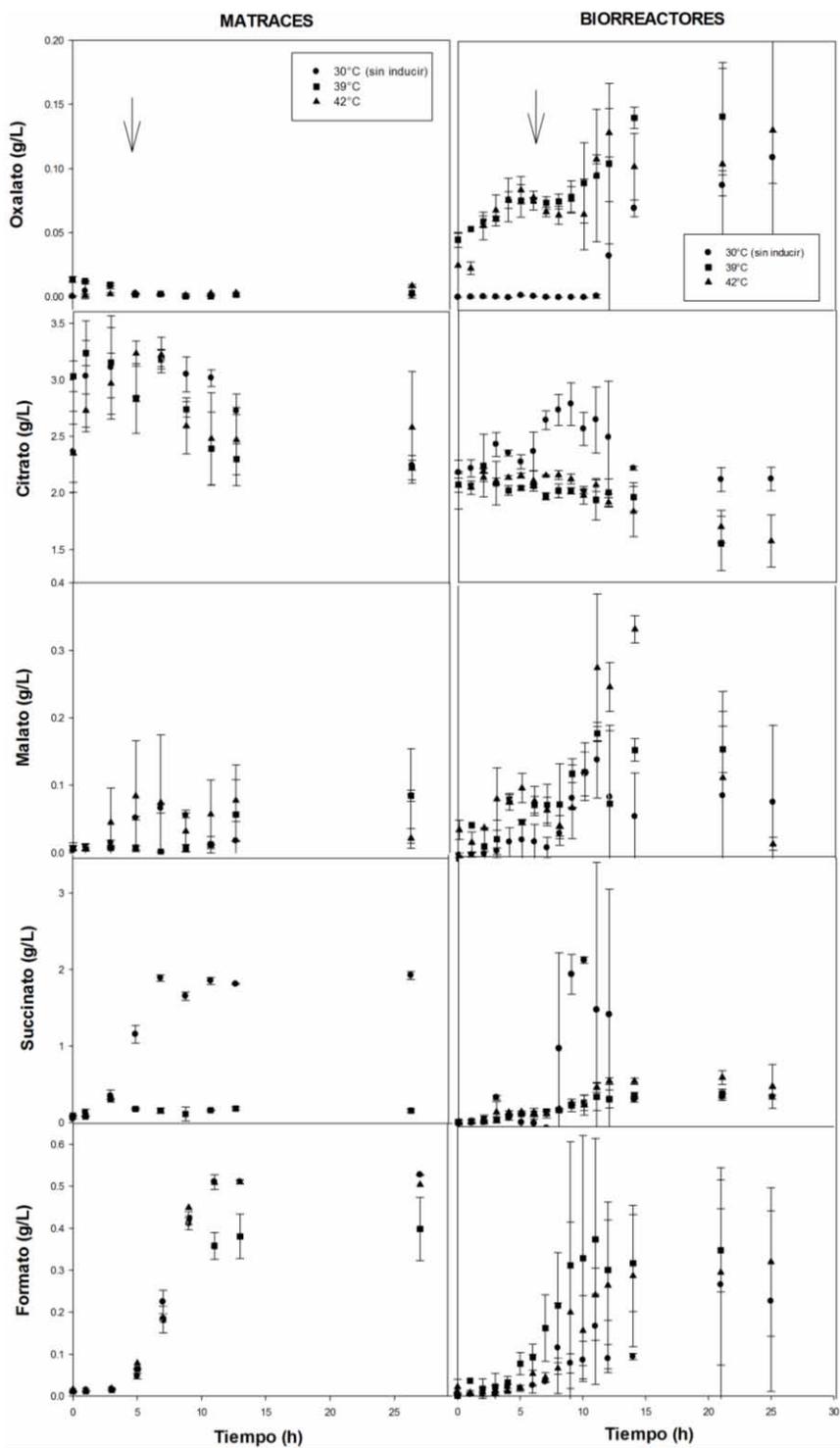


Figura A2. Cuantificación de ácidos orgánicos mediante HPLC durante el cultivo de cepa *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) a diferentes temperaturas de inducción. Cultivo sin inducción a 30°C (●); cultivo con inducción a 39°C (■) y cultivo con inducción a 42°C (▲).

ANEXO 3: Réplicas de las inmunodetecciones para chaperonas de *E. coli* en un sistema termoinducido

A3.1. Réplica del Western blot para DnaK de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) cultivada en matraces y biorreactores termoinducidos

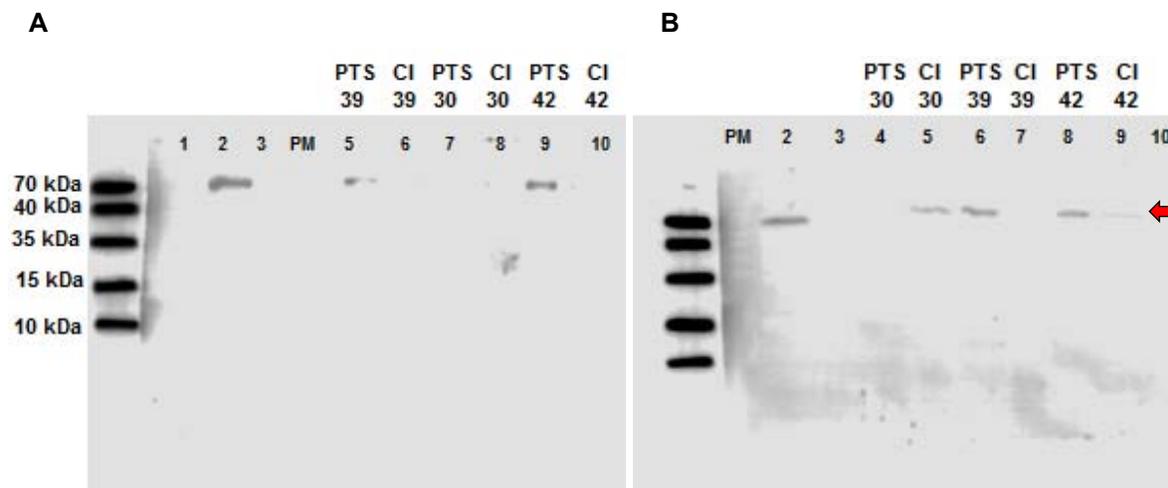


Figura A3.1. Réplica de la inmunodetección de DnaK en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaK a ~70 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

A3.2. Réplica del Western blot para DnaJ de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) cultivada en matraces y biorreactores termoinducidos

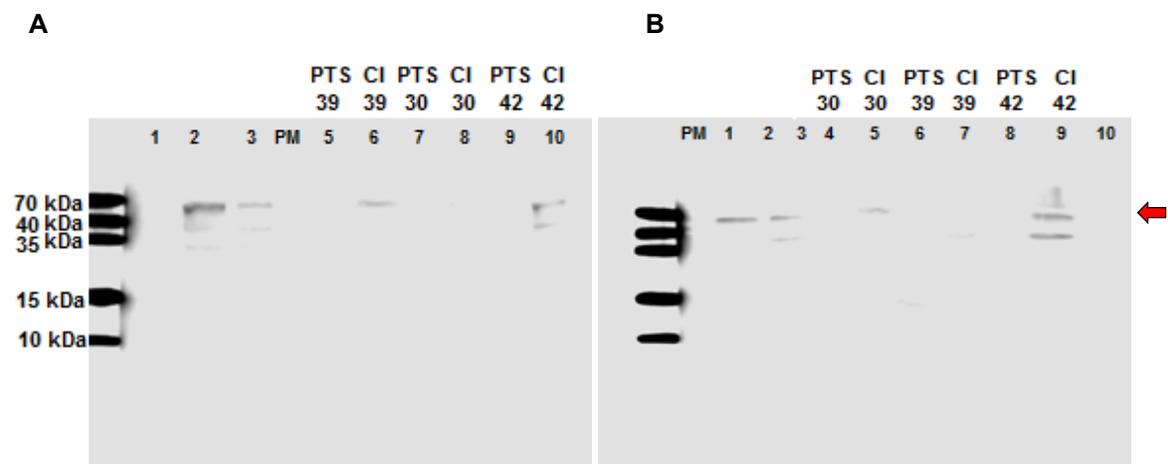


Figura A3.2. Réplica de la inmunodetección de DnaJ en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-DnaJ a ~41 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

A3.3. Réplica del Western blot para GroEL de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) cultivada en matraces y biorreactores termoinducidos

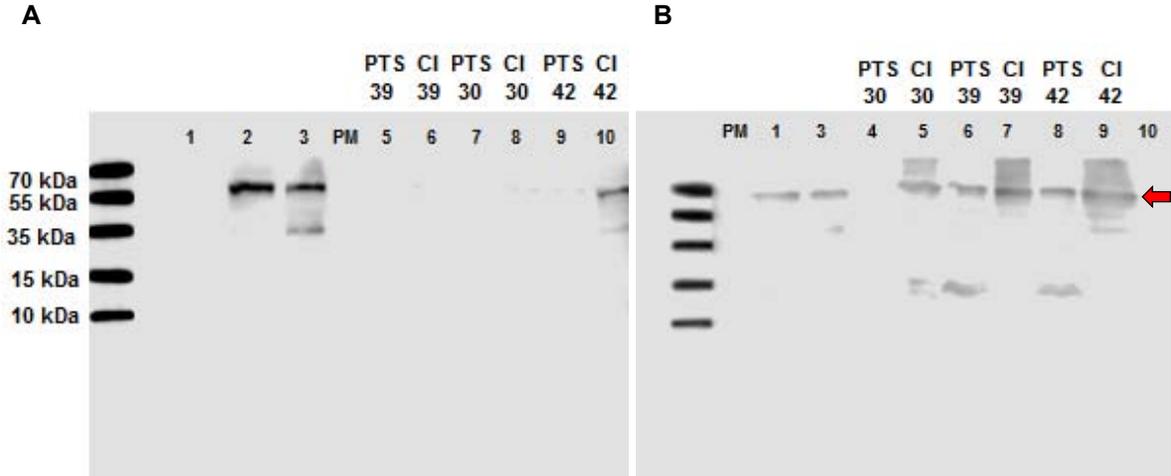


Figura A3.3. Réplica de la inmunodetección de GroEL en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroEL ~60 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.

A3.4. Réplica del Western blot para GroES de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) cultivada en matraces y biorreactores termoinducidos

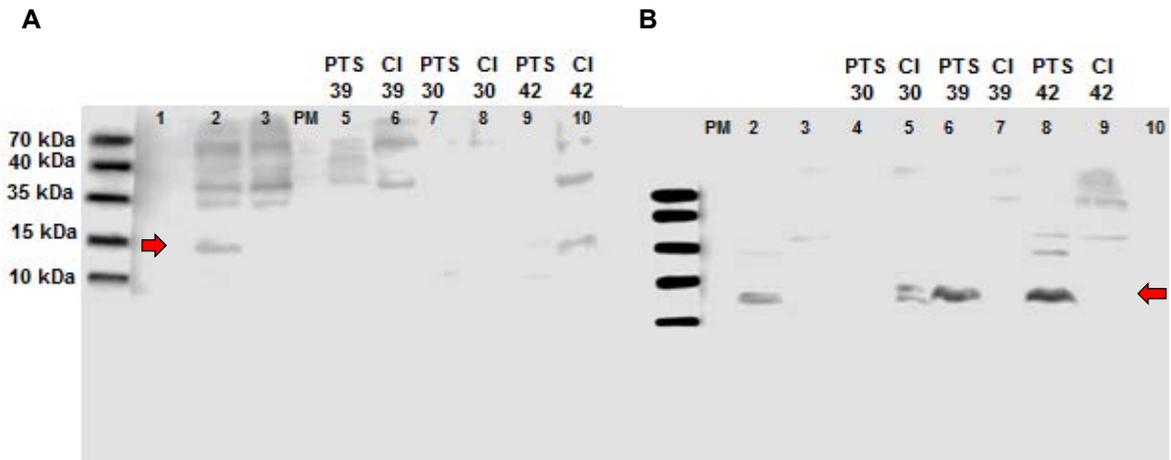


Figura A3.4. Réplica de la inmunodetección de GroES en cultivos de *E. coli* ATCC 53606 (pDB+ESAT-6) expresando ESAT-6 recombinante en matraces de 250 mL (**A**) y biorreactores de 1.2 L (**B**) con medio mínimo bajo diferentes temperaturas de inducción. La detección se hizo con el anticuerpo Anti-GroES ~10 kDa (Enzo Life Sciences©). **A.** Carril 1: Vacío; carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 4: Marcador de peso molecular (PM). **B.** Carril 1: Marcador de peso molecular (PM); carril 2: *E. coli* ATCC-53606 sin transformar; carril 3: CI de cultivos a 39°C en medio LB; carril 10: Vacío. El resto de carriles que no se especifican en el texto, se presentan rotulados en la figura.