



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

---

---

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

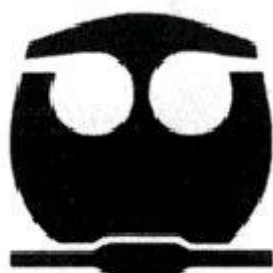
EFFECTO DEL OXÍGENO DISUELTO  
EN EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN  
DE LA PROTEÍNA APA 45/47 KDA  
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN  
*Streptomyces lividans*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Ramsés Adolfo Gamboa  
Suasnavart



Tutor: DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

México D.F., Octubre 2012



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio c-036 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, bajo la dirección del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán, con el apoyo de la beca CONACYT 316929.

Dedicada a la memoria de mi padre Jesús Gamboa Reyes, que siempre me acompaña y cada día me hace más fuerte.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto sus puertas y compartido de sus maravillas.

Al Dr. Mauricio Trujillo, por su apoyo en lo personal y académico y por su amistad a lo largo de este proyecto, esperando que vengan mejores. A la Dra. Adriana Valdez por su guía y consejos.

Al Dr. Luis Servín y a todo su laboratorio, en especial a la Dra. Laura E. Córdova, quien me instruyó en el arte de cultivar *Streptomyces lividans*. Al Dr. Leobardo Serrano por su orientación. A la Dra. Clara Espitia y a todo su grupo. Al Dr. Enrique Galindo y a su grupo por la ayuda técnica.

A mi mamá por todo su amor y por creer en lo que estoy haciendo. Verte feliz es mi mayor recompensa.

A la mujer que amo y admiro profundamente, mi compañera de vida, en la que veo todo la belleza del mundo. Gracias Sandy.

A mi hermano Suso, que siempre va adelante y me hace más fácil el camino. A mi hermana Vicky por apoyarme y cuidarme desde el kínder. Los amo a los dos.

A mi amigo Pedro, que me hizo enriquecedor y divertido este trayecto y siempre estuvo ahí para aligerar la carga.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su apoyo técnico y moral y que hicieron de cada día una delicia: Mafer, Trüby, DeisyLú, Lupita, Anbelo, Mariadelos, Andreititita, Monchis, Daniel San, el Hetor, Tocayo, Charly mondó, Arly, El Isui, La chabela. A todos los plantas habidos y por haber. A todos los que estuvieron ahí y compartieron un momento de la vida.

## Índice General

Índice de Figuras .....	4
Índice de Tablas .....	6
Resumen .....	7
1 Introducción .....	9
2 Antecedentes.....	12
2.1 La tuberculosis como problema de salud mundial .....	12
2.2 La glicoproteína APA de 45/47 kDa .....	14
2.3 <i>Streptomyces lividans</i> como alternativa para la producción de glicoproteínas de <i>M. tuberculosis</i> .....	18
2.4 O-glicosilación en procariontes .....	20
2.5 Cultivos sumergidos de <i>S.lividans</i> . .....	23
3. Hipótesis .....	27
4. Objetivos.....	27
4.2 Específicos .....	27
5. Materiales y Métodos .....	29
5.1 Generación de las cepas recombinantes, medio de cultivo y condiciones de crecimiento ..	29
5.2 Cultivos en Matraces .....	30
5.3 Cultivos En Biorreactor.....	31
5.4 Métodos analíticos .....	31
5.4.1 Determinación de biomasa.....	31
5.4.2 Detección de proteína .....	32
5.4.3 Análisis de Imágenes .....	32
5.4.4 Purificación de la proteína.....	33
5.4.5 Espectrometría de masas .....	34
6. Resultados y Discusión .....	35
6.1 Optimización del Inóculo .....	35
6.2 Análisis de la producción y O-manosilación de la proteína APA en tres diseños de matraz	39
6.3 Escalamiento de matraz a biorreactor con base en la potencia por unidad de volumen y su efecto en la morfología de agregación.....	51
6.4 Cálculo del oxígeno disuelto crítico con base al tamaño de agregado .....	60
6.5 Producción y O-manosilación de la proteína APA en cultivos a oxígeno disuelto constante	62
7. Conclusiones .....	73
8. Referencias .....	75
Apéndice 1.....	92
Apéndice 2.....	95
Apéndice 3.....	100

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Cambios en la proliferación de linfocitos T en cobayos inmunizados con: (1) <i>M. tuberculosis</i> filtrado del cultivo, (2) BCG, (3) APA nativa purificada de <i>M. tuberculosis</i> , (4) <i>M. bovis</i> , (5) rApa expresadas en <i>M. smegmatis</i> ::apa, (6) <i>E.coli</i> APA. El 100% corresponde al filtrado de <i>M. tuberculosis</i> . Adaptado de Horn <i>et al.</i> , (1999)..	17
<b>Figura 2</b> Agregado de <i>Streptomyces lividans</i> en cultivo sumergido en matraz convencional (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2012)	19
<b>Figura 3</b> Esquema general del proceso de O-glicosilación en <i>Streptomyces sp.</i>	22
<b>Figura 4</b> Algunas de los diseños de matraz típicas usadas para el cultivo de <i>Streptomyces sp.</i> (izquierda). Morfología representativa obtenida en cada diseño en cultivos en medio LB modificado a 30°C y 150m rpm.	25
<b>Figura 5</b> Cinética de crecimiento de la cepa monocopia expresada en Densidad Óptica a diferentes concentraciones de inóculo, tanto en medio mínimo (MM) como en Luria-Bertani (LB) en matraces con resorte de acero. LB 0.025, MM 0.025, LB 0.05, MM 0.05, LB 0.1, • MM 0.1	37
<b>Figura 6</b> Cinética de crecimiento de la cepa multicopia expresada en Densidad Óptica a diferentes concentraciones de inóculo, tanto en medio mínimo (mm) como en Luria-Bertani (LB) en matraces con resorte de acero inoxidable. LB 0.025, MM 0.025, LB 0.05, MM 0.05, LB 0.1, +	37
<b>Figura 7</b> Western Blot de la cinética de crecimiento 1. (1) Multicopia 60 h, (2) multicopia 48 h, (3) multicopia 24 h, (4) monocopia 60 h, (5) monocopia tiempo 48 h, (6) monocopia 24 h, (7) APAr de <i>E. coli</i> . Todos los ensayos se realizaron en medio LB y en matraz con resorte de acero.	39
<b>Figura 8</b> Diseño de los tres matraces utilizados en este trabajo para los cultivo de <i>S.lividans</i> , en la producción de rAPA (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011)	40
<b>Figura 9</b> Cinética de crecimiento en peso seco para los tres tipos de matraces. Inoculados a 0.025 unidades densidad óptica. (●) Convencional (▲) Bafleado (■) Resorte.	41
<b>Figura 10</b> Morfología representativa de los cultivos de <i>S. lividans</i> en medio LB modificado a 30°C y 150 rpm. Imágenes a 40X en A) Matraz Convencional, B) Matraz Bafleado C) Matraz con Resorte. La barra de referencia equivale a 0.250 mm (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011).	43
<b>Figura 11</b> Electroforesis para observar la producción volumétrica de la proteína APA, en cada diseño de matraz, en muestras tomadas a las 60 h de cultivo para: NF: matraces convencionales, BF: matraces bafleados y CF: matraces con resorte. (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011).	45
<b>Figura 12</b> Western Blot de la producción de la proteína APA, en cada diseño de matraz. Matraz convencional (NF) Matraz Bafleado (MB) y Matraz con resorte (CF) (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011)..	46

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

<b>Figura 13</b> Gel de las fracciones purificadas por afinidad a conA (Qiagen®, Glycoprotein, USA) de los cultivos en matraces. 1) Matraz con resorte, 2) Matraz bafleado y 3) Matraz convencional. ....	47
<b>Figura 14</b> Análisis de MALDI-TOF para el Péptido 8 generado de la digestión con Lys C (Roche®, Alemania) producido en: A) Matraz con resorte, B) Matraz bafleado y C) Matraz convencional. Los números arriba de los pesos moleculares indican la cantidad de manosas unidas al péptido (Gamboa-Suasnavart <i>et al.</i> , 2011). ....	49
<b>Figura 15</b> Relación entre la velocidad de agitación, potencia volumétrica gaseada y los diámetros de los agregados de <i>S.coelicolor</i> , según el trabajo de Tough <i>et al.</i> , 1996 .....	56
<b>Figura 16</b> Comparación de la cinética de crecimiento en matraz bafleado y biorreactor a 10% TOD. ....	57
<b>Figura 17</b> Morfología representativa de los cultivos de <i>S. lividans</i> en biorreactor a 10% TOD constante y 300 rpm. ....	57
<b>Figura 18</b> Cinética de crecimiento en biorreactor de 1 L (300 rpm, 30°C) para los cultivos a diferentes TOD. A) Crecimiento en escala lineal y en B) en escala logarítmica... ..	63
<b>Figura 19</b> Morfología representativa de los cultivos de <i>S. lividans</i> en biorreactor a 0.5, 10, 25 y 40% TOD y 300 rpm. ....	65
<b>Figura 20</b> Electroforesis de los cultivos en biorreactor a 10, 25 y 40% TOD. ....	66
<b>Figura 21</b> Western Blot del cultivo en biorreactor a 10, 25 y 40% TOD .....	66
<b>Figura 22</b> Western blot de los cultivos en biorreactor a 10%TOD.....	67
<b>Figura 23</b> Western Blot del cultivo en biorreactor a 25% de oxígeno disuelto. En carriles 1 y 2 APA nativa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , en 3, 4, 5 y 6 rAPA de <i>S. lividans</i> fracciones no pegadas a conA, en 7, 8 y 9 fracciones pegadas a conA.....	68
<b>Figura 24</b> Western Blot del cultivo en biorreactor a 40% de TOD. En carriles 1 y 2 rAPA de <i>S. Lividans</i> fracciones pegadas a conA, en 3 y 4 fracciones no pegadas.....	68
<b>Figura 25</b> Análisis de MALDI-TOF, para el péptido 8 (Tabla) correspondiente al carboxilo terminal de APA proveniente del cultivo a: A) 0.5% TOD, B) 10% TOD, C) 25% TOD. Los números junto a la letra M, indican la cantidad de manosas unidas al péptido. ....	71
<b>Figura 26</b> Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 10% TOD. Muestra de tiempo final 95	
<b>Figura 27</b> Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 25% TOD. Muestra de tiempo final.96	
<b>Figura 28</b> Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 40% >OD. Muestra de tiempo final.96	
<b>Figura 29</b> Figura 28. SDS-PAGE de las fracciones de mayor concentración de las purificaciones de los cultivos a diferentes TOD%.....	97
<b>Figura 30</b> Densitometría de las electroforesis de proteína total en carriles 1 y 2, en 3 marcador de peso, de los cultivos a 10% (arriba) y 40% (abajo). ....	98
<b>Figura 31</b> Gráficos de control de los cultivos a diferentes TOD. En línea verde el control de temperatura, en línea rosa el pH y en azul la TOD.....	100



**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Índice de Tablas**

Tabla 1 Principales antígenos candidatos para generar una vacuna o kit diagnóstico reportados para Tuberculosis.....	13
Tabla 2 Secuencia de la proteína APA ( Laqueyrierie <i>et al</i> , 1995), en itálicas se muestra la secuencia del péptido señal que es eliminado al ser secretada la proteína.....	15
Tabla 3 Análisis de identidad global de secuencias codificantes de la proteína APA de diferentes micobacterias (tomada de Gioffré <i>et al.</i> , 2009).....	15
Tabla 4 Cantidades totales de manosas en la proteína APA producida en diferentes microorganismos, adaptado de Horn <i>et al.</i> , (1999) .....	16
Tabla 5 Resultados del análisis estadístico aplicado a las imágenes de los agregados cultivados en diferentes diseños de matraz.....	42
Tabla 6 Biomasa final, Proteína total y Rendimiento $Y_{P/X}$ de los cultivos de <i>S. lividans</i> en los tres diseños de matraz .....	45
Tabla 7 Péptidos teóricos de la digestión de rAPA utilizando la enzima LysC (Roche®, Alemania).....	47
Tabla 8 Pesos observados (kDa) del Péptido 8 en los análisis de MALDI-TOF, los valores entre paréntesis indican las diferencias de peso respecto a la señal anterior .....	48
Tabla 9 Valores para el cálculo de la potencia y potencia gaseada en el sistema modelo (Tough <i>et al.</i> , 1996) y para el sistema utilizado en este trabajo.....	55
Tabla 10 Resultados del análisis de imágenes de los agregados producidos en biorreactor a Tensión de Oxígeno disuelto constante y 300 rpm y en matraces con resorte. ....	59
Tabla 11 Comparación de la producción de biomasa y velocidad de crecimiento a escala matraz y biorreactor .....	59
Tabla 12 Resultados del análisis de imágenes de los agregados producidos en biorreactor a Tensión de Oxígeno disuelto constante y a 300 rpm .....	64
Tabla 13 Comparación de la producción de proteína recombinante a escala matraz y biorreactor .....	69
Tabla 14 Pesos observados del Péptido 8 en los análisis de MALDI-TOF, los valores entre paréntesis indican las diferencias de peso respecto a la señal anterior. Todos los pesos están dados en Da .....	70
Tabla 15 Resultados de la densitometría de las electroforesis de la Figura 28 .....	99

## **Resumen**

La producción de proteínas recombinantes terapéuticas continúa siendo el mercado más exitoso de la biotecnología moderna, al año 2009 existían cerca de 165 proteínas aprobadas para uso humano y otras 500 se encontraban en pruebas, cerca del 70% de estas proteínas son glicosiladas. La glicoproteína APA de 45/47 kDa es un antígeno secretado por *Mycobacterium tuberculosis*, el cual ha sido reportado con alto nivel inmunogénico asociado a su patrón de glicosilación y es un candidato para generar una nueva vacuna y kit diagnóstico para esta enfermedad.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de cultivo, en especial, el diseño del matraz y el oxígeno disuelto en biorreactores, en la producción y glicosilación de la proteína APA, producida de forma recombinante en *Streptomyces lividans*, actinobacteria filamentosa, la cual ha sido reportada como buena productora de proteínas recombinantes con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales como O-manosilaciones.

Tres diseños de matraz (matraz con resorte de acero, bafleado y convencional), con diferentes condiciones de hidrodinámica y aeración, y cuatro tensiones de oxígeno disuelto en biorreactor (0.5%, 10%, 25% y 40%) fueron evaluadas. En los ensayos en matraces, donde los fenómenos de transferencia e hidrodinámica no se pueden estudiar de forma independiente, se encontró una relación entre morfología de agregación, producción y O-glicosilación. Los agregados más pequeños son formados en los matraces con resorte y bafleados ( $0.02 \pm 0.01$  y  $0.04 \pm 0.02$  mm<sup>2</sup>, respectivamente) produciéndose más proteína en ambos diseños ( $7.44 \pm 0.15$  g/L) y con mayor grado de glicosilación en el carboxilo terminal (5 manosas), comparando con los agregados formados en matraces convencionales ( $2.11 \pm 1.22$  mm<sup>2</sup>), con una producción de proteína total de  $4.02 \pm 0.08$  g/L y 2 manosas unidas al extremo carboxilo terminal. En los tres diseños de matraz la biomasa final obtenida fue de alrededor de 3.3 g/L.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Por otro lado, en biorreactores a diferentes TOD, la morfología de agregación no se vio modificada. Los valores de biomasa final ( $4.95 \pm 0.35$ ,  $4.3 \pm 0.24$ ,  $5.25 \pm 0.15$  g/L, para 10, 25 y 40 % TOD, respectivamente) y velocidad de crecimiento (0.087, 0.066 y  $0.064 \text{ h}^{-1}$ , correspondientemente), solo se vieron modificados en los cultivos microaerobios a 0.5% TOD ( $3.1 \text{ g/L}$  y  $0.03 \text{ h}^{-1}$ ), respecto a los demás cultivos. Sin embargo, la productividad si se vio afectada, encontrándose mejor producción de proteína total a 10% TOD ( $0.323 \text{ g/L} \pm 0.057$ ). La O-manosilación de los tres cultivos analizados (0.5, 10 y 25 % TOD) no se vio modificada, hallándose 3 manosas en el carboxilo terminal en todos los casos.

En conjunto, los resultados sugieren, que las condiciones de cultivo, en las que existe limitación de oxígeno, ya sea por problemas difusionales o por baja disponibilidad en el medio, modifican el estado metabólico de la bacteria, llevando a cambios en la productividad y en el perfil de O-glicosilación de la proteína recombinante APA.

## **1. Introducción**

La expresión de proteínas heterólogas en microorganismos utilizando la recombinación genética, continúa siendo la mayor área de desarrollo y comercialización de la biotecnología moderna. El reto para la producción de proteínas a la escala y calidad requeridas para experimentación, aplicaciones terapéuticas y comerciales ha dado lugar al desarrollo de un conjunto de diversos métodos para la producción de proteínas heterólogas. Esta variedad de métodos de expresión es una consecuencia de la diversidad bioquímica de las proteínas y la extensa variedad de modificaciones postraduccionales que presentan las proteínas, entre las principales encontramos la glicosilación, fosforilación y metilación (Yin *et al.*, 2006).

El método de cultivo es una combinación entre el hospedero elegido, la técnica de cultivo (lote, lote alimentado o cultivo continuo) y las condiciones ambientales en las que se llevará a cabo el proceso. La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína a producir (Gamboa-Suasnavart & Trujillo-Roldán, 2009). Los sistemas procariotes expresan proteínas solubles o en forma de agregados intracelulares o cuerpos de inclusión, sin plegamiento, lo que implica su estructuración *in-vitro* (Betton *et al.*, 2005, San *et al.*, 1994) y algunas bacterias, como los actinomicetos realizan O-glicosilaciones sencillas (Espitia *et al.*, 2010). Por otra parte, los sistemas eucariotes introducen modificaciones postraduccionales como glicosilaciones complejas, eliminación de la metionina inicial y ruptura proteolítica de un precursor, entre otros, asemejando las proteínas recombinantes a las endógenas (Gamboa-Suasnavart & Trujillo-Roldán, 2009).

Por otro lado, las principales condiciones ambientales a controlar en un bioproceso son: pH, temperatura, tensión de oxígeno disuelto (TOD), velocidad de agitación y composición del medio de cultivo, entre otros. El reto del bioingeniero consiste en

## **Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

proveer a los microorganismos de ambientes adecuados para su crecimiento y producción de metabolitos de interés mediante la manipulación de estas condiciones ambientales (Galindo *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que aspectos cualitativos y cuantitativos de la glicosilación de proteínas pueden verse modificados por el proceso de cultivo, incluyendo al hospedero (Goto *et al.*, 1988; Gooche, 1990; Sheeley *et al.*, 1997; Kagawa *et al.*, 1988), el método de cultivo (Jenkins & Curling, 1994; Gawlitzek *et al.*, 1995; Schewikart *et al.*, 1999) y las condiciones ambientales (Jenkins *et al.*, 1996; Reuter & Gabius, 1999; Kunkel *et al.*, 2003; Serrato *et al.*, 2004). Sin embargo, todos estos estudios se han realizado en sistemas eucariontes y no existen reportes de como afectan las condiciones ambientales en la glicosilación en células procariontes. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de cultivo, en especial de la TOD, en la producción y O-glicosilación de la proteína APA de 45/47 kDa, nativa de *Mycobacterium tuberculosis* producida en *Streptomyces lividans*, actinobacteria filamentosa, la cual ha sido reportada como buena productora de proteínas recombinantes (Manteca *et al.*, 2008) con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales como O-manosilaciones (Lara *et al.*, 2004; Espitia *et al.*, 2010).

En biorreactores, la manipulación y monitoreo de la TOD se puede realizar de manera sencilla. Sin embargo en matraces agitados, que continúan siendo el instrumento más utilizado para la caracterización de cultivos sumergidos (Büchs *et al.*, 2001), el monitoreo y la modificación de esta condición de cultivo no es sencilla y su repercusión en cultivos bacterianos ha sido escasamente estudiada. En matraces, la modificación de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, por sus siglas en inglés), siempre esta ligada a la alteración de la hidrodinámica del sistema, y esto se puede lograr principalmente por el incremento en la velocidad de agitación, la disminución de volumen de llenado y por la modificación del diseño del matraz (Büchs *et al.*, 2001; Yuan-Shuai *et al.*, 2006; Mehmood *et al.*, 2011).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

En el presente trabajo, se propone la modificación de las condiciones de aireación/agitación en matraces, mediante la modificación de su diseño, y la variación de la TOD en biorreactores y determinar su impacto en la producción y glicosilación de la proteína APA 45/47 kDa en *S. lividans*.

## 2 Antecedentes

### 2.1 La tuberculosis como problema de salud mundial

La tuberculosis (TB) es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, siendo esta bacteria el agente causal que presenta el mayor número de muertes en el mundo. Asimismo, se reporta que en 2010 se presentaron 8.9 millones de nuevos casos de TB en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), con mayores incidencias en India, China, Indonesia, Nigeria y Sudáfrica. De estos nuevos casos se reporta que aproximadamente el 15 % son VIH positivos (OMS, 2011). En la actualidad la principal vacuna contra esta enfermedad es la conocida como BCG que se fabrica con bacilos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis* (Calmette, 1927). En países desarrollados el uso de esta vacuna ha ido disminuyendo, ya que su eficacia es variable y solo brinda protección contra tuberculosis meníngea en niños y no contra tuberculosis pulmonar en adultos (Sable *et al.*, 2011). La misma OMS ha reconocido que la lucha en contra de esta enfermedad debe enfocarse en la generación de nuevas vacunas (OMS, 2011).

Por otro lado, es necesario también mejorar las técnicas de diagnóstico, ya que el cultivo bacilar, que es la técnica establecida para diagnosticar la enfermedad, es tardada y costosa (Trujillo-Roldán & Espitia 2009). La prueba rápida conocida como *Protein Purified Derivated* (PPD), obtenida de lisado de cultivo de *M. bovis*, contiene antígenos que son compartidos con otras micobacterias no patógenas para el ser humano y de la propia vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Por lo tanto, puede resultar positiva para pacientes que están infectados con *M. tuberculosis*, en estado de latencia, pacientes que han sido vacunados con BCG o han tenido contacto con otras micobacterias, dando por lo tanto falsos positivos. Se han desarrollado nuevas técnicas como la del Quantiferon® y diagnóstico por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), pero continúan siendo muy costosas. Todo esto lleva a tratamientos agresivos innecesarios y gastos en salud pública (Zellweger *et al.*, 2006).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Por todo lo mencionado, es necesario generar una vacuna que supere las limitaciones de la BCG, además de un sistema diagnóstico de mayor eficacia. Una opción es mediante antígenos proteicos que sean solo producidos por *M. tuberculosis*, en estado replicativo. Diversos antígenos han sido reportados como candidatos para vacuna y kit diagnóstico como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1** Principales antígenos candidatos para generar una vacuna o kit diagnóstico reportados para Tuberculosis

Antígeno	Peso Molecular (kDa)	Función	Referencia
Ag85 A	35.55	Unión a Fibronectina	McShane <i>et al.</i> , 2004, Sable <i>et al.</i> , 2005
Ag85 B	34.45	Unión a Fibronectina	Horwitz <i>et al.</i> , 2000, Hoft <i>et al.</i> , 2008, Abel B <i>et al.</i> , 2010
MPT-64	24.72	Desconocida	Kamath <i>et al.</i> , 1999 Sali <i>et al.</i> , 2010
Pst-S1	38.11	Transportador de fosfato	Castanon-Arreola <i>et al.</i> , 2005
APA	28.78	Invasividad/Unión a Fibronectina	Kumar <i>et al.</i> , 2003, Sable <i>et al.</i> , 2011
GroES	10.67	Chaperonina/ATPasa	Fattorini <i>et al.</i> , 2002
GroEL	56.70	Chaperonina	Okada <i>et al.</i> , 2009
DnaK	66.70	Chaperonina/ATPasa	Ferraz <i>et al.</i> , 2004
ESAT-6	6.00	Factor de virulencia	Kumar <i>et al.</i> , 2007
CFP-10	10.66	Desconocida/Miembro de la familia de ESAT-6	Wu Y <i>et al.</i> , 2008



El antígeno APA (Alanine and Proline rich Antigen), de 45/47 kDa, es una proteína glicosilada con alta respuesta inmunogénica, dada su capacidad de despertar una respuesta inmune celular y de respuesta retardada (Romain *et al.*, 1999, Horn *et al.*, 1999, Chanteau *et al.*, 2000, Lara *et al.*, 2004). Además esta proteína es reconocida por anticuerpos generados en animales previamente infectados con BCG viva, y no por aquellos infectados con la cepa BCG atenuada (Romain *et al.*, 1993). Esto convierte a esta proteína en potencial candidata a vacuna y kit diagnóstico para la enfermedad en estado activo, ya que evitaría los falsos positivos que actualmente se presentan con métodos de diagnóstico rápidos como PPD.

## **2.2 La glicoproteína APA de 45/47 kDa**

La proteína APA llamada así por contener regiones ricas en prolina y alanina (Romain *et al.*, 1993), fue descrita inicialmente como un antígeno de 50-55 kDa, mostrando afinidad por lectinas (Espitia & Mancilla, 1989).

La secuencia primaria de la proteína presenta 325 aminoácidos, con un péptido señal (Tabla 2) de 39 aminoácidos el cual es eliminado al ser secretada la proteína (Laqueyreire *et al.*, 1995). El alto contenido de prolina y alanina provoca que migre aberrantemente en geles de poliacrilamida y presente un peso molecular aparente de 45/47 kDa, cuando su peso teórico es de 28.78 Da, que corresponde al observado por espectrometría de masas (Dobos *et al.*, 1995). Es codificada por el gen *modD* de *M. tuberculosis* dentro de un operón de transporte de molibdeno (Lara *et al.*, 2004). Sin embargo, no existe evidencia de que esta proteína esté involucrada en dicho transporte (Gioffré *et al.*, 2009). En reportes anteriores se ha propuesto que APA media la interacción con fibronectina (Secott *et al.*, 2001). Así mismo, se ha descrito a esta glicoproteína como una adhesina, involucrada en la colonización de células blanco (Ragas *et al.*, 2007). Además, es una proteína altamente conservada en micobacterias,

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

ya que está presente en la mayoría de estas como se puede observar en la Tabla 3 (Gioffré *et al.*, 2009)

**Tabla 2** Secuencia de la proteína APA (Laqueyrie *et al.*, 1995), en itálicas se muestra la secuencia del péptido señal que es eliminado al ser secretada la proteína.

*MHQVDPNLTR RKGRLAALAI AAMASASLVT VAVPATADPE PAPPVPTTA ASPPSTAAA PPAPATPVAP  
 PPPAAANTPN AQPDPNAAAP PPADPNAPPP PVIAPNAPQP VRIDNPVGGF SFALPAGWVE SDAAHFDYGS  
 ALLSKTTGDP PFPQPPPVA NDTRIVLGRLL DQKLYASAEA TDSKAAARLG SDMGEFYMPY PGTRINQETV  
 SLDANGVSGS ASYYEVKFSK PSKPNGQIWT GVIGSPAANA PDAGPPQRWF VVWLGTANNP VDKGAAKALA  
 ESIRPLVAPP PAPAAPAEP APAPAPAGEV APTPTTPTPQ RTLPA*

Existe evidencia de la unión de APA con Concanavalina A, lo que comprobó su estado manosilado (Espitia *et al.*, 1989). Posteriormente, fueron identificados los sitios de glicosilación de la proteína (Dobos *et al.*, 1996). Se encuentran cuatro sitios de glicosilación, los residuos de treonina en las posiciones 10 y 18 están O-glicosiladas con dos  $\alpha$ -D-Man, mientras que la treonina 27 solo contiene una unidad, por último la treonina 277, en el extremo carboxilo terminal puede estar mono, di o tri O-manosilado (Dobos *et al.*, 1996)

**Tabla 3.** Análisis de identidad global de secuencias codificantes de la proteína APA de diferentes micobacterias (tomada de Gioffré *et al.*, 2009)

Cepa	Tamaño (aa)	Identidad (%)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1 <i>M. tuberculosis</i> H37 Rv	325	100												
2 <i>M. bovis</i> AF2122/97	325	94	100											
3 <i>M. avium</i> sub. paratuberculosis K10	368	64	64	100										
4 <i>M. avium</i> sub. avium 104	385	66	67	98	100									
5 <i>M. leprae</i> TN	287	69	69	63	63	100								
6 <i>M. ulcerans</i> Agy99	306	70	70	71	71	64	100							
7 <i>M. smegmatis</i> mc 155	353	52	59	49	50	48	56	100						
8 <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	338	48	49	51	51	45	53	68	100					
9 <i>M. sp.</i> KMS	333	50	51	52	53	48	56	73	68	100				
10 <i>M. sp.</i> JLS	333	50	51	52	52	49	57	73	68	99	100			

Se ha observado que la proteína APA de *M. tuberculosis*, como antígeno, es capaz de despertar una respuesta inmune medida como linfocitos T. Así mismo, se demostró que

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

esta respuesta inmune varió con diferentes O-glicofomas de la proteína producidas en diferentes hospederos (Horn *et al.*, 1999). Los autores reportan que la glicosilación variaba dependiendo del microorganismo productor, en la proteína producida en *M. tuberculosis* se encontraron aproximadamente 10 moles de manosas por mol de proteína y en otros como *M. bovis* se hallaron hasta 7 moles de manosas por mol de proteína (Tabla 4) y la respuesta inmune se veía afectada como se muestra en la Figura 1, donde los niveles de inducción de la respuesta inmune, medida como proliferación de linfocitos T, por parte de la proteína expresada en *M. smegmatis*, son cinco veces menores a los presentados por la proteína nativa de *M. tuberculosis*, mientras que los niveles de la proteína producida en *E. coli* son por debajo del 10% respecto a la respuesta para el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* (Horn *et al.*, 1999).

**Tabla 4** Cantidades totales de manosas en la proteína APA producida en diferentes microorganismos, adaptado de Horn *et al.*, (1999)

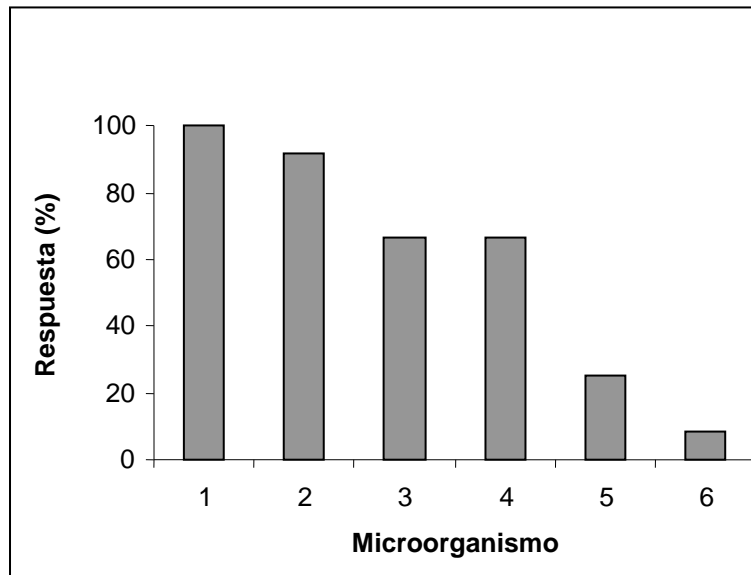
<b>Micoorganismo productor</b>	<b>Moles de manosa/ Moles de proteína</b>
<i>M. tuberculosis</i>	9.95 ± 1.60
<i>M. bovis</i> (AN5)	7.90 ± 1.10
<i>M. bovis</i> (BCG)	6.00 ± 1.00
<i>M. smegmatis</i> apa	8.65 ± 1.20

Cabe mencionar que en estos ensayos (Figura 1 y Tabla 4), el análisis de ESI-MS se realizó a la proteína completa, sin definir los sitios de glicosilación de cada una de las APA producidas en cada microorganismo señalado en la Tabla 4 (Horn *et al.*, 1999), por lo que los cambios en proliferación de linfocitos T (Figura 1), puede deberse también a este factor (Lara *et al.*, 2004).

Por otro lado, los cultivos de micobacterias, presentan una velocidad de crecimiento lenta comparadas con otras bacterias como *E. coli* y *Streptomyces sp.* (Lambrecht *et al.*, 1988), lo cual dificulta su cultivo para la producción de proteínas. En el caso de la generación de antígenos para posibles vacunas y kits diagnóstico para Tuberculosis, el cultivo de *M. tuberculosis* además de tener crecimiento lento, presenta la dificultad de ser una bacteria patógena para el humano, lo cual representa un riesgo para la salud y

## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

encarece los costos de producción, respecto a otros sistemas de expresión no patógenos que no requieren laboratorios de bioseguridad Nivel III (OMS, 2004).



**Figura 1** Cambios en la proliferación de linfocitos T en cobayos inmunizados con: (1) *M. tuberculosis* filtrado del cultivo, (2) BCG, (3) APA nativa purificada de *M. tuberculosis*, (4) *M. bovis*, (5) rApa expresadas en *M. smegmatis::apa*, (6) *E. coli* APA. El 100% corresponde al filtrado de *M. tuberculosis*. Adaptado de Horn *et al.*, (1999).

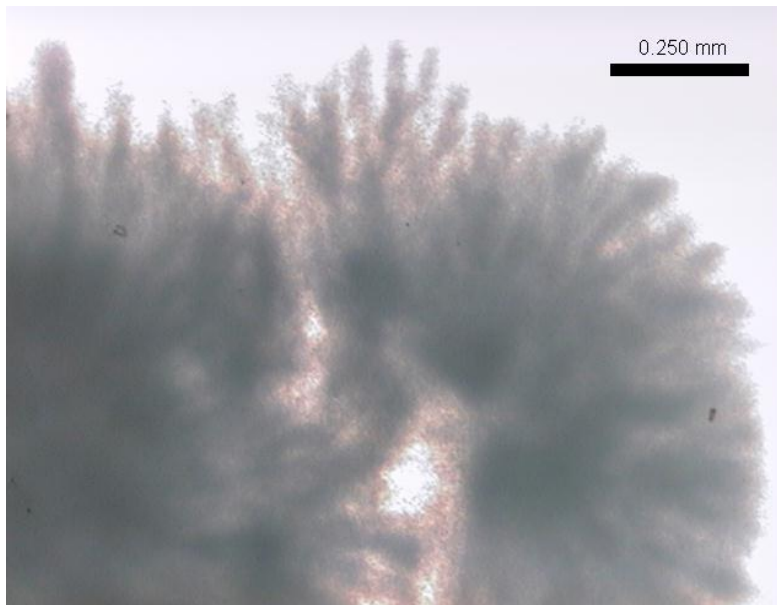
En trabajos anteriores (Horn *et al.*, 1999) con el antígeno de 45/47 kDa producida de manera recombinante, se ha reconocido la necesidad de conocer no solo si las cantidades de manosas unidas a la proteína son similares a las de la proteína nativa, sino también conocer si estos carbohidratos están unidos en las mismas posiciones en la cadena peptídica (Lara *et al.*, 2004) ya que se han observado variaciones en la respuesta inmune, cuando la proteína se produce en diferentes hospederos y existe la posibilidad de que estos cambios no sean debidos a las cantidades de manosa unidas a la cadena peptídica, si no a las posiciones en las que estos azúcares estén unidos.

Por todo lo anterior, se decidió producir la proteína APA en un hospedero no patógeno, con mayor velocidad de crecimiento y que pudiera modificar postraduccionalmente la proteína de manera similar a *M. tuberculosis* (Lara *et al.*, 2004).

### **2.3 *Streptomyces lividans* como alternativa para la producción de glicoproteínas de *M. tuberculosis***

*Streptomyces lividans* es una bacteria filamentosa (Figura 2) gram positiva del género de las actinobacterias, que habita generalmente en suelos. Ha sido ampliamente utilizada en la industria por su capacidad para producir numerosos antibióticos, también ha sido reportada como un buen hospedero para la expresión de proteínas recombinantes (MacLeod *et al.*, 1992, Lara *et al.*, 2004, Manteca *et al.*, 2007). Además, *S. lividans* presenta la particularidad de realizar modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones e hidroxilaciones (Espitia *et al.*, 2010). Así mismo, esta bacteria presenta importantes sistemas de secreción, los cuales facilitan la producción de proteínas heterólogas directamente al medio de cultivo, plegadas de manera similar a la nativa a diferencia de sistemas de producción como *E. coli*, en donde el plegamiento incorrecto representa un gran problema (Anné *et al.*, 2011). Sin embargo, también tiene algunas desventajas, como la de producir además de las proteínas de interés, diversas proteasas que pueden degradar el producto de interés. Dentro de todo esto, entre las variedades del género *Streptomyces sp*, *S. lividans*, es la que menor número de proteasas secretadas presenta (Butler *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 2006). Por lo anterior, *Streptomyces lividans* representa una opción atractiva para la producción de proteínas recombinantes.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 2** Agregado de *Streptomyces lividans* en cultivo sumergido en matraz convencional (Este trabajo).

Tanto *S. lividans* como *M. tuberculosis* pertenecen a la clase de las actinobacterias y estudios recientes en genética y biología celular han demostrado notables analogías en desarrollo y morfología entre ambas especies (Scherr *et al.*, 2009). Una de las principales similitudes entre ambas bacterias es la de contener alto contenido genómico de G-C. Esto le permite a *S. lividans* utilizar señales de expresión de genes de micobacterias, lo cual fue probado por Kieser *et al.*, (1986), demostrando que *S. lividans* utiliza eficientemente la mayoría de los promotores de *M. bovis*. Por tanto, producir una proteína nativa de *M. tuberculosis* en *S. lividans*, se presenta como una buena alternativa.

Lara *et al.*, (2004), reportó la clonación y expresión el gen codificante para la proteína APA de 45/47 kDa de *M. tuberculosis* en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004) con los plásmidos pIJ6021 y pRT802 que presentan el promotor tipA. La proteína expresada en *S. lividans* fue analizada por MALDI-TOF, revelando que, como en la proteína nativa de *M. tuberculosis*, tanto el extremo carboxilo como el amino terminal, están modificados post-traduccionalmente con O-glicosilaciones, pero encontrándose una manosa más en la Treonina<sub>277</sub>, respecto a lo reportado para la proteína nativa (Lara *et al.*, 2004). Esta proteína fue evaluada a nivel inmunológico y se determinó que al realizar un

tratamiento con manosidasas, el efecto de respuesta inmunológica fue disminuida a la mitad (Lara *et al.*, 2004), confirmando que la actividad inmunogénica de la proteína, esta relacionada a la glicosilación de la proteína.

La respuesta inmune celular esta mediada por células presentadoras de antígeno, las cuales procesan y presentan en sus membranas antígenos producidos por los microorganismos captados por macrófagos. Los péptidos en la superficie de estas células son reconocidos por los Linfocitos T, los cuales proliferarán si este antígeno es reconocido como foráneo. Se ha observado la importancia de los carbohidratos unidos a los péptidos, en el reconocimiento de los Linfocitos T, estos presentan receptores a antígenos, los cuales son dependientes de la estructura química del glicano, así como de su posición en el péptido (Haurum *et al.*, 1994). En el caso específico de la glicoproteína APA, se demostró la importancia del patrón de glicosilación de proteínas recombinantes producidas en diferentes hospederos donde el patrón de manosilación es variable, sobre la proliferación de Linfocitos T (Horn *et al.*, 1999).

## **2.4 O-glicosilación en procariontes**

La glicosilación es una modificación postraduccional de las proteínas que consiste en la adición de monosacaridos (se han identificado hasta 13 monosacaridos, Lommel *et al.*, 2009) de manera covalente a ciertos residuos de aminoácidos de las proteínas (Córdova-Dávalos, 2009). Hasta hace algunos años, se creía que las bacterias no eran capaces de glicosilar proteínas, ya que no cuentan con los organelos con los que los eucariontes realizan esta modificación. Sin embargo, cada vez son mas los reportes de la presencia de glicoproteínas en bacterias como *Clostridium sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Streptococcus sp.* (Moens *et al.*, 1997, Benz *et al.*, 2002, Abu-Qarn *et al.*, 2008, Lommel *et al.*, 2009).

Se han descrito diferentes tipos de glicosilación, dependiendo del aminoácido al que se unan los monosacaridos, así, tenemos que la *N*-glicosilación es aquella, en la cual los

## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

azúcares se unen al grupo  $\gamma$ -amido de la asparagina. En particular la O-glicosilación consiste en la adición de azúcares en el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de aminoácidos como tirosina, serina, treonina, hidroxilisina e hidroxiprolina (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). *M. tuberculosis* lleva a cabo la O-glicosilación de la proteína APA, añadiendo manosas a residuos de treonina en las posiciones 10, 18, 27 y 277 (Dobos *et al.*, 1996).

En *Streptomyces sp.*, el mecanismo de O-glicosilación (Figura 3), se asemeja al realizado por eucariontes así como también en algunas levaduras (Wehmeier *et al.*, 2009). La síntesis del GDP-Man, donador inicial del azúcar en el proceso de manosilación, se da a partir del intermediario de glicólisis Fructosa 6-P, por medio de la Manosa Fosfato Isomerasa (PMI), HexoQuinasa (HK), FosfoManoMutasa (PMM) y la GDP Manosa PiroFosfatasa (GMPP) (Lochlainn *et al.*, 2009).

Se ha encontrado que en *Streptomyces coelicolor* hay dos proteínas principales involucradas en llevar a cabo la O-glicosilación: Ppm1 (polyprenol phosphate mannose synthase) involucrada en la formación de un intermediario lipídico al cual se le adiciona manosa a partir de GDP-Manosa, y Pmt (protein O-mannosyltransferase) que es la encargada de manosilar a la proteína blanco (Figura 3), (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). A la fecha no existen reportes de cómo podrían estar reguladas estas enzimas en *Streptomyces sp.* En eucariontes, como en *Drosophila sp.* se ha encontrado evidencia de que la actividad de la proteína Pmt es regulada a nivel de la estructura secundaria de la proteína, donde cambios en la secuencia de aminoácidos llevarían a una mayor exposición de los residuos de Ser y Thr propensos a ser glicosilados (Manya *et al.*, 2007). Sin embargo, esto no explicaría las variaciones en el patrón de glicosilación de proteínas con la misma secuencia producidas en el mismo organismo, por lo que las condiciones ambientales (entre ellas el oxígeno disuelto) son un campo de estudio atractivo para poder explicar estas variaciones.



Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

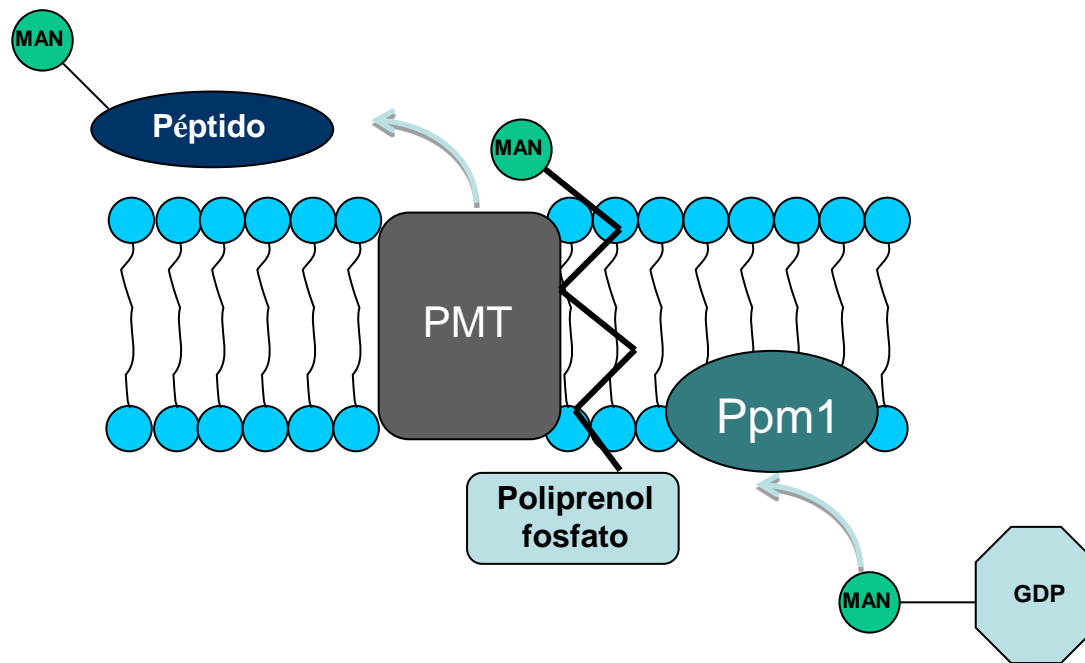


Figura 3. Esquema general del proceso de O-glicosilación en *Streptomyces sp.*

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto de variaciones en la concentración del oxígeno disuelto en el metabolismo y producción de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos, pero, hasta nuestro conocimiento, no existen reportes para el caso específico de la O-manosilación. Por ejemplo en *E. coli*, se ha reportado que variaciones en los niveles de oxígeno disuelto, llevan a acumulación de bioproductos, disminución de la productividad y de la velocidad de crecimiento (Sandoval-Basurto *et al.*, 2005, Lara *et al.*, 2006). Las modificaciones en el metabolismo bacteriano podrían causar variaciones en la calidad de la proteína producida, refiriéndonos a esta como la O-glicosilación. Particularmente, en el caso de *S. lividans* el efecto de la variación de la concentración de oxígeno disuelto, así como su efecto en el metabolismo y la calidad de las proteínas producidas no han sido estudiadas. De hecho, algo similar se ha estudiado en hibridomas, trabajos en los que se ha demostrado que cambios en la tensión de oxígeno disuelto afectan los perfiles de N-glicosilación (Serrato *et al.*, 2004).

## 2.5 Cultivos sumergidos de *S. lividans*.

Los matraces agitados han sido ampliamente usados en la academia y la bioindustria para el desarrollo y monitoreo de procesos que requieren un alto número de experimentos, por ejemplo optimización de medios de cultivo (Büchs, 2001). Un matraz agitado puede definirse como un biorreactor mecánicamente sencillo, donde la problemática radica en que los volúmenes que pueden ser usados son bajos y la velocidad de transferencia de oxígeno es pobre y en cultivos con alta demanda puede llegar a ser insuficiente (McDaniel *et al.*, 1964). Para solucionar este problema se han empleado matraces con baffles o indentaciones, los cuales han sido reportados con algunas desventajas, como la de generar turbulencias que provoquen que el tapón estéril se humedezca y se pierda la esterilidad del cultivo (Henzler and Schedel, 1991). Así mismo los resultados de los cultivos llevados a cabo en matraces bafleados presentan altas desviaciones estadísticas comparados con cultivos en matraces convencionales (Peter *et al.*, 2006). Sin embargo, cada vez son mas los reportes de cultivos de microorganismos en matraces bafleados (Galindo *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Serrano-Carreón *et al.*, 1995; Bushell *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 1997; Dekker and Barbosa, 2001; Katzer *et al.*, 2001; Bermek *et al.*, 2004; Galindo *et al.*, 2004).

Los cultivos sumergidos de *S. coelicolor* y *S. lividans* presentan una morfología que va de micelio disperso hasta pellets, esta última es la más utilizada en fermentaciones industriales (Tucker *et al.*, 1992). Para el cultivo de *Streptomyces sp.* en matraces, se ha recomendado utilizar baffles en los matraces para lograr dispersar el micelio, o introducir un resorte de acero inoxidable en el fondo del matraz a manera de baffles (Hopwood, 1994).

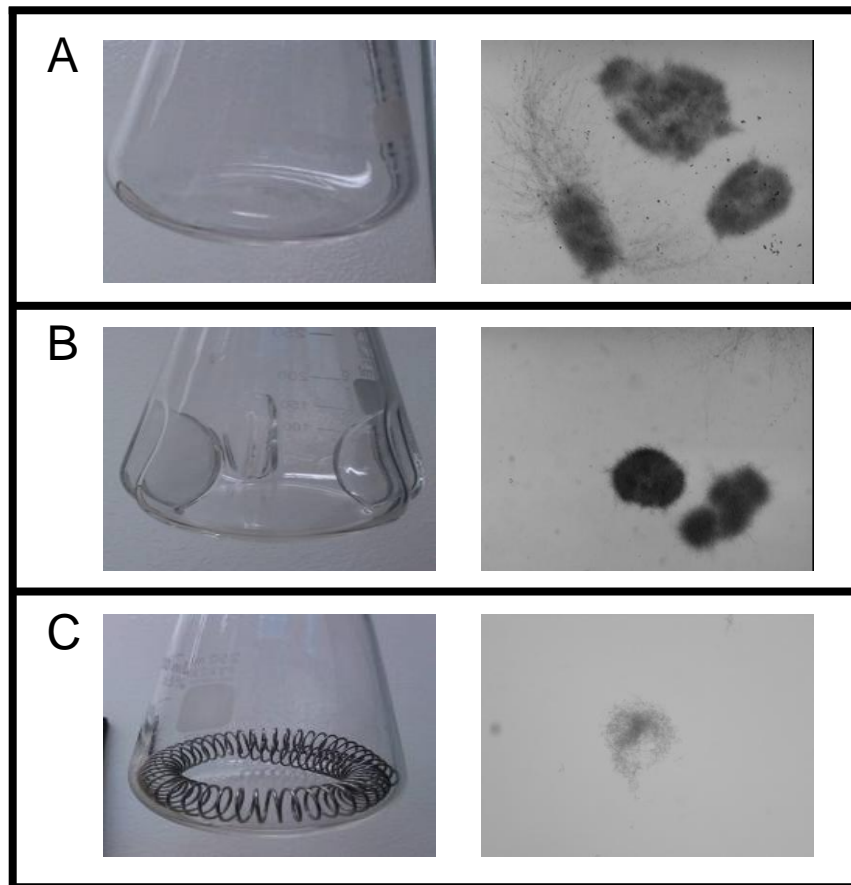
En la literatura se pueden encontrar trabajos con *Streptomyces sp.*, utilizando los tres diseños de matraz mostrados en la Figura 4 (Yun *et al.*, 2001; Manteca *et al.*, 2008; McDaniel *et al.*, 1969; Mehmood *et al.*, 2011). La morfología de agregación que presenten los cultivos depende en gran medida de las condiciones hidrodinámicas del sistema, entre los parámetros críticos a considerar está la potencia por unidad de volumen (Justen *et al.*, 2008).

Cada una de los diseños mencionados (matraces convencionales, matraces convencionales con resorte de acero y matraces bafleados), proveen de condiciones hidrodinámicas diferentes. Se han propuesto modelos para calcular la potencia por unidad de volumen entregada al sistema para matraces bafleados y matraces convencionales (Peter *et al.*, 2006; Büchs *et al.*, 2000). Sin embargo, para los matraces con resorte de acero no se cuenta con alguna correlación que permita determinar el valor de potencia en este diseño.

El tipo de crecimiento que se presenta en un cultivo (micelio disperso o pellets) tendrá influencia en la transferencia de masa y las características reológicas del medio (viscosidad). En los cultivos con pellets, normalmente la viscosidad no se ve modificada y por tanto el mezclado y la transferencia de masa se mantienen a lo largo del cultivo, por lo que esta morfología se busca en muchos cultivos industriales (Tucker *et al.*, 1992).

Se han descrito dos tipos de formación de pellets (Takahashi and Yamada, 1959). La formación coagulativa es aquella en la que varias esporas coagulan, dando paso a la formación de un pellet. *Aspergillus niger* pertenece a esta categoría. Por otro lado, la formación no coagulativa es cuando una sola espora da lugar a un pellet, *Streptomyces sp.* se encuentra dentro de este tipo (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1989).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 4.** Algunas de los diseños de matraz típicos usadas para el cultivo de *Streptomyces sp.* (izquierda). Morfología representativa obtenida en cada diseño en cultivos en medio LB modificado a 30°C y 150 rpm (Este trabajo).

La morfología de los agregados es una característica física determinante de la fisiología y procesos bioquímicos que suceden dentro de los microorganismos (Krull *et al.*, 2011), Entre sus principales efectos está la disminución de la difusión de oxígeno al interior de los agregados (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1989), donde se reporta que al aumentar el tamaño del partícula disminuye la respiración celular, lo que puede verse reflejado en la productividad (Bermek *et al.*, 2004). Así mismo, el tamaño de estos agregados influye en la difusión de nutrientes hacia el interior. La variación en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, puede afectar el metabolismo lo que a su vez, en bacterias que glicosilan podría modificar estos procesos, viéndose alterada la calidad de la proteína producida. Por lo tanto, en cultivos sumergidos de *S. lividans* es importante considerar los niveles de oxígeno disuelto en el medio en conjunto con la morfología de

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

agregación para poder determinar los valores que no afecten la O-glicosilación de la proteína recombinante APA.

Se ha reportado que la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo tiene un efecto en el patrón de N-glicosilación de las proteínas recombinantes producidas en hibridomas (Serrato *et al.*, 2004). La variación en el oxígeno disuelto afecta directamente el consumo de fuentes de carbono, como glucosa y glutamina, y la secreción de metabolitos tóxicos como lactato, también en células de mamífero (Miller, *et al.*, 1987, Ozturk *et al.*, 1990). En trabajos con bacterias y levaduras se han reportado efectos en la productividad y calidad del producto como consecuencia de variaciones en los niveles de oxígeno disuelto (Trujillo-Roldán *et al.*, 2001; Yuan-Shuai *et al.*, 2005; Restelli *et al.*, 2006).

La disponibilidad de oxígeno en cultivos sumergidos de *S. lividans*, no solo está determinada por la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, sino también por la morfología de agregación, la cual a su vez, está regida por las condiciones hidrodinámicas del cultivo. A la fecha, no hay estudios del efecto del oxígeno disuelto y aireación/hidrodinámica en la producción de glicoproteínas recombinantes en bacterias filamentosas. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar dichos efectos en la producción de la proteína APA de 45/47 kDa de *M. tuberculosis* en *S. lividans*.

### 3. Hipótesis

El patrón de O-glicosilación y la productividad de la proteína recombinante de *Mycobacterium tuberculosis* APA de 45/47 kDa producida por la bacteria filamentosa *Streptomyces lividans* están determinados por las condiciones de cultivo, en especial por la concentración de oxígeno disuelto.

### 4. Objetivos

#### 4.1 General

Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo, en especial la tensión de oxígeno disuelto (TOD) sobre la producción y el patrón de O-glicosilación de la proteína recombinante de *M. tuberculosis* APA de 45/47 kDa, producida por *S. lividans*.

#### 4.2 Específicos

4.2.1 Evaluar diferentes metodologías de propagación de *S. lividans* con la finalidad de encontrar el tamaño mínimo de inóculo, sin afectar su crecimiento en cultivos en matraces bafleados, convencionales y convencionales con resorte de acero inoxidable.

4.2.2 Analizar el efecto del diseño de los matraces (convencionales, bafleados y con resorte) sobre el crecimiento y morfología filamentosa de *S. lividans*, la producción y el patrón de glicosilación de la proteína recombinante de *M. tuberculosis* APA de 45/47 kDa.

4.2.3 Escalar el proceso a nivel biorreactor de 1.0 L, en base a los resultados obtenidos a nivel matraz para morfología de agregación y producción de la proteína recombinante de *M. tuberculosis* APA de 45/47 kDa.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

4.2.4 Analizar la influencia de la tensión de oxígeno disuelto, en cultivos en biorreactor agitado de 1.0 L, sobre el crecimiento y morfología de *S. lividans*, la producción y el patrón de glicosilación de la proteína recombinante de *M. tuberculosis* APA de 45/47 kDa, bajo condiciones constantes de agitación, pH y temperatura.

4.2.5 Establecer una metodología de purificación que permita recuperar tanto la proteína recombinante APA de 45/47 kDa glicosilada como aquella que no O-glicosilada en los cultivos.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Generación de las cepas recombinantes, medio de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa silvestre de *S. lividans* 66 1326 fue transformada con los plásmidos pRT802MT-45 (en adelante Monocopia), y pIJ6021MT-45 (en adelante Multicopia) donadas por el laboratorio del Dr. Luis Servin, IIB-UNAM, que contienen el gen que codifica para la proteína de 45/47 kDa bajo el promotor inducible por tiosstreptón, previamente descrito por Lara *et al.*, (2004) y Murakami *et al.*, (1989).

La transformación de estas cepas se llevó a cabo generando protoplastos de *S. lividans* y siguiendo el protocolo descrito en Hopwood (1985). Posteriormente, las cajas se incubaron a 30°C por 24 horas y se adiciono kanamicina para verificar la resistencia y seleccionar las colonias para realizar el banco de trabajo.

Las esporas de *S. lividans* utilizadas como banco de trabajo se obtuvieron de la siguiente manera: Se tomó una colonia bien definida de un banco de esporas transformadas en medio R2 suplementado y se disgregó en 1.0 mL de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L y cloruro de sodio 10 g/L) y se inoculó en una placa con medio MS (manitol 20 g/L, harina de soya 20 g/L y agar al 1.5%), suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Se incubó durante 7 días a 30°C. Una vez que se observó un crecimiento abundante de esporas, se adicionaron 5 mL de agua estéril y se cosecharon las esporas. Se conservaron en una solución de glicerol al 20% a -20 °C. Este es considerando el banco de trabajo.

Por otra parte se utilizó una cepa recombinante de *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen®) para la producción de la proteína APA bajo el plásmido de expresión pET15b (Novagen®). Se utilizó esta cepa como control de los cultivos, principalmente para



verificar los cambios en peso molecular y efecto inmune (en colaboración con el laboratorio de la Dra. Clara Espitia, IIB-UNAM) debido a la O-glicosilación. Este vector proporciona una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas y a continuación la proteína de interés. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por su crecimiento en medio Luria Bertani (LB) con carbenixilina y cloranfenicol. Se realizaron bancos maestros y de trabajo de estas cepas y se conservaron a -80°C en glicerol al 40%. Los cultivos de inoculación se realizan en matraces convencionales de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo LB.

## **5.2 Cultivos en matraces**

Para inocular los matraces, se centrifugaron las esporas a 3500 rpm (Centrifuga TJ-6, Beckman, USA) por 10 min, se lavaron con agua estéril, se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm (Centrifuga TJ-6, Beckman, USA) por 10 min y se resuspendieron en 1.0 mL de medio YT (Tryptona 16 g/L, Extracto de levadura 10 g/L y Cloruro de Sodio 5 g/L). Posteriormente, se inoculó un matraz con 19 mL del mismo medio y se incubó a 37°C durante 6 horas para pregerminar las esporas.

Las esporas pre-germinadas fueron centrifugadas y se resuspendieron en 1.0 mL de medio LB modificado (Apéndice 1). De esta suspensión se inocularon los matraces con 50 mL de medio LB modificado (pH 7.2) para producción, ajustando la densidad óptica a 0.025 u.a. Los matraces inoculados se incubaron a 30°C y 150 rpm, a las doce horas de cultivo se indujo con Thiostrepton 10 µg/mL (Ali *et al.*, 2002).

Para los ensayos de cinética de crecimiento, se tomó una muestra cada 12 hrs, y una muestra del tiempo final para verificar la producción de proteína. El volumen final se

filtró a través de una membrana de PVDF (Millipore, USA) de 0.22  $\mu\text{m}$  para determinación de peso seco.

### **5.3 Cultivos en biorreactor**

Los cultivos en biorreactor se llevaron a cabo en un biorreactor de 1.5 L de volumen nominal (Applikon USA), dos impulsores tipo Rushton de 4.5 cm de diámetro, y un volumen de trabajo de 1.0 L de medio de cultivo LB modificado. Se utilizó un controlador Applikon® ADI 1030. La inoculación del biorreactor fue mediante un cultivo de esporas pre-germinadas (12 horas, 150 rpm y 37°C) provenientes de un matraz con 50 mL de medio de cultivo con 1 mL de banco de esporas.

En estos ensayos se controló la tensión de oxígeno disuelto a 4 diferentes valores: 0.5%, 10%, 25% y 40% de TOD, mediante el enriquecimiento en el flujo de aire de nitrógeno u oxígeno según fuera necesario con un flujo total de aireación de 0.5 vvm. En general, los cultivos tuvieron una duración de 60 h (Lara *et al.*, 2004), tomando muestras cada 12 horas para determinación de proteína y densidad óptica. Valores de entre 25% y 40% de TOD han sido reportados (Payne *et al.*, 1990, Eunki *et al.*, 1998) para la producción de proteínas recombinantes en *S. lividans*. Para determinar la TOD crítica a la cual el oxígeno difundirá adecuadamente al interior del pellet, se aplicó un modelo experimental siguiendo el trabajo de Tought *et al.*, (1996) y Cui *et al.*, 1907.

### **5.4 Métodos analíticos**

#### **5.4.1 Determinación de biomasa**

Para la determinación de biomasa se utilizó el método del peso seco, los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm (Centrifuga TJ-6, Beckman, USA) durante 10 min, el sobrenadante fue recuperado para posteriores análisis de proteína O-glicosilación. La biomasa se resuspendió en 10 mL de agua estéril y se filtró por una membrana de

PVDF (Millipore USA) de 0.45  $\mu\text{m}$  previamente llevada a peso constante. Las membranas con la biomasa se dejaron secar a 50°C durante 24 hrs. La determinación de densidad óptica se realizó a 600 nm con diluciones 1:2 de las muestras, esto con el fin de tener una lectura por debajo de 1.0 unidad de densidad óptica.

#### **5.4.2 Detección de proteína**

Los geles para monitorear la presencia de la proteína se realizaron al 10% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, bajo la técnica estándar (Towbin, 1979). Para obtener la proteína total de 3 mL de cada cultivo, se precipitó por la adición de 12 mL de metanol y 3 mL de cloroformo, esta mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm (Centrifuga RC-5 Sorvall, UK), el precipitado obtenido fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de un buffer de fosfatos, 50  $\mu\text{L}$  de esta solución fueron mezclados con Loading Buffer 2x y se cargaron en los geles de acrilamida. Para obtener los Western Blot, los geles fueron transferidos a una membrana de PVDF (Millipore USA), previamente activada con metanol. La unión inespecífica es bloqueada con solución de leche en polvo al 5% durante 1 hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (ACH6A3) dilución 1:1000 en TBS mas leche en polvo al 5%, por 24 horas en agitación a 4°C, se lavó dos veces con Buffer TBS + Tween por 5 minutos, para después ser incubado con el anticuerpo secundario (antimouse IgG) preparado en TBS mas leche en polvo al 5%, dilución 1:5000, se lavó nuevamente con TBS y finalmente se reveló con fosfatasa alcalina permitiendo la reacción durante 10 min.

#### **5.4.3 Análisis de imágenes**

Para cuantificar los cambios en la morfología de agregación de la bacteria, se tomaron muestras de cada cultivo y 20  $\mu\text{l}$  de estas fueron fijadas con una solución de formalina (10% v/v) para evitar la pérdida de la morfología. Las muestras fueron colocadas en un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos. Al menos 100 imágenes fueron analizadas y al menos 3 muestras fueron analizadas para cada cultivo. Las imágenes

en 2 dimensiones fueron capturadas con una cámara CCD (Nikon Color, KP-D50) acoplada a un microscopio (Nikon Optiphot-2) y las imágenes estereoscópicas fueron captadas con una cámara CCD (Nikon KP-160) acoplado a un estéreomicroscopio (Olympus SZ40). Ambos sistemas conectados a una computadora con el programa de análisis (Image Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, SilverSpring, MD). El programa arrojó el diámetro promedio y la redondez como resultados principales. El diámetro promedio se define como el diámetro de un círculo perfecto, teniendo la misma área que el objeto a medir. La redondez describe la desviación de la partículas de micelio, respecto a un círculo perfecto, con un valor designado de 1. Para los agregados mas grandes, las imágenes fueron transformadas primero a monocromático y después a escala de grises, así las imágenes fueron procesadas utilizando un algoritmo especial para agregados (Peña *et al.*, 2002). Se realizó un análisis simple de la varianza (One-way ANOVA) para muestras independientes y para comparación en pares la prueba de Tukey HSD (post-ANOVA), así se evaluaron las diferencias estadísticas de los agregados formados en cada diseño de matraz. Los análisis fueron realizados en Excel® (2007) y el programa VassarStats: Website for Statistical Computation” disponible en línea en la página de Vassar College, NY-USA (<http://faculty.vassar.edu/lowry/anova1u.html>, Diciembre 2011).

#### **5.4.4 Purificación de la proteína**

El medio de cultivo agotado conteniendo la proteína APA, se centrifugó a 3500 rpm (Centrifuga TJ-6, Beckman, USA) durante 15 min para retirar el micelio presente. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm (Millipore, USA). Al filtrado se le adicionó sulfato de amonio 73% para la precipitación de las proteínas, se recuperaron por centrifugación, se dializaron contra PBS 1x pH 7.4 por 24 h, para posteriormente ser dializadas por 12 h contra buffer de acetatos pH 5 para precipitar diferencialmente proteínas. Se recuperó el sobrenadante y se dializó contra buffer de unión a Concanavalina A (Sigma, USA) por 12 h. Posteriormente se cargó en una columna

previamente empacada con 1.0 mL de concanavalina A, se recuperaron las fracciones por gravedad y se adicionó a la columna el buffer de elución, para coleccionar las fracciones donde se encuentra la proteína APA. De estas fracciones se verificó la absorbancia a 260 nm.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y se verificó la purificación de la proteína mediante Western-Blot, de la misma manera descrita en 5.4.2.

#### **5.4.5 Espectrometría de masas**

Las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida (de purificación en el caso de matraces y de proteína total en biorreactores), correspondientes al peso observado de la proteína APA (45/47 kDa), fueron cortadas, lavadas con agua ultrapura, desteñidas con una solución de buffer de carbonatos (100 mM) y metanol al 50%, deshidratadas con acetonitrilo y rehidratadas con buffer de carbonatos (25 mM) y la enzima LysC (Roche, No. Cat. 11047825001, Alemania) en concentración 1:1000, permitiendo la digestión durante 12 h.

Para la determinación de los sitios de glicosilación en el péptido 8 de la proteína recombinante APA, se recurrió a la espectrometría de masas por MALDI-TOF. Las masas se determinaron en un equipo Bruker del Instituto de Química de la UNAM, (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) equipado con un láser de nitrógeno de 20 Hz a  $\lambda = 337$  nm. El espectro fue detectado en modo lineal positivo para el rango de masas entre 3800 a 6000 Da. 1.0 mL de solución de la proteína obtenida en cada digestión, se mezcló con 5 mL de acetonitrilo al 30% y TFA 0,1%, y se saturó con ácido sinapínico. Posteriormente, 1.0  $\mu$ L de esta solución se deposita en la placa de MALDI-TOF y se deja secar a temperatura ambiente para su posterior lectura.

## 6. Resultados y discusión

Para cumplir con los objetivos de este trabajo, los experimentos se dividieron en dos etapas: matraces y biorreactores.

En la primera etapa se realizó un breve estudio de la concentración del inoculo, con la intención de economizar esporas y poder trabajar con el mismo lote en todos los experimentos. Así mismo, como consecuencia de expresar la proteína en un organismo filamentoso, fue necesario evaluar la morfología de agregación en los tres diseños matraz propuestas, ya que esta influye en la difusión de oxígeno. Conociendo el impacto del diseño del matraz en la morfología y sabiendo que las condiciones de hidrodinámica/aireación serían diferentes, se procedió a evaluar el efecto en la producción y además en la O-glicosilación de la proteína. Estos resultados fueron publicados (Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Córdova-Dávalos LE, Martínez-Sotelo JA, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA, **The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flask**, *Microbial Cell Factories* 2011, **10**:110), siendo el primer reporte indicando como afectan las condiciones de cultivo en la O-glicosilación de proteínas recombinantes en bacteria (Apéndice 3).

Para llegar a la segunda etapa, se requirió escalar el proceso de matraces a biorreactores. Se propuso un novedoso criterio de escalamiento con base a la morfología de agregación. Posteriormente se desarrollaron cultivos en biorreactor a TOD constante, evaluando de manera independiente el efecto de la disponibilidad de oxígeno en la producción y O-glicosilación de la proteína APA. Como en el caso de los matraces, en esta etapa también fue necesario determinar la morfología de agregación.

### 6.1 Optimización del inóculo

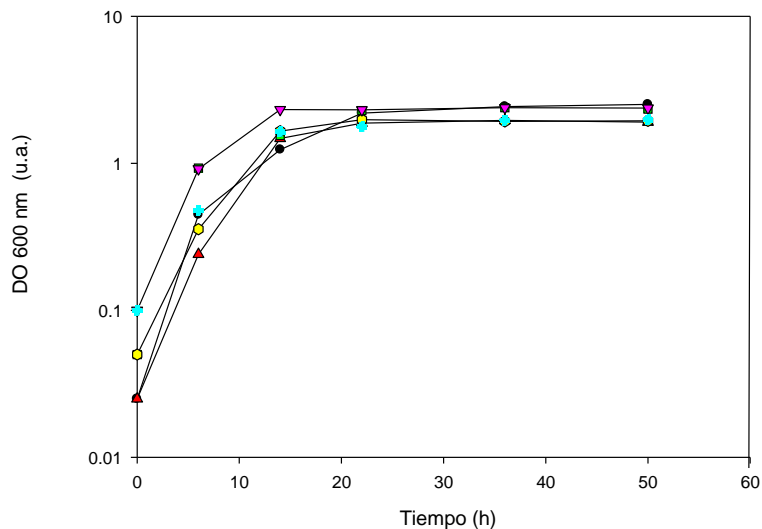
**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Se realizó un primer ensayo para evaluar la cinética de crecimiento para ambas cepas de *S. lividans* a diferentes concentraciones de inóculo y en dos diferentes medios de cultivo, medio mínimo y medio LB, tanto para la cepa multicopia como para la monocopia, conteniendo los plásmidos pIJ6021 y pRT8045 respectivamente. Se utilizaron para los primeros ensayos matraces convencionales con resorte de acero. En este ensayo se evaluó la concentración mínima de inóculo que no afectara significativamente el crecimiento y la producción de proteína así como el efecto de cada medio en el crecimiento de *S. lividans*.

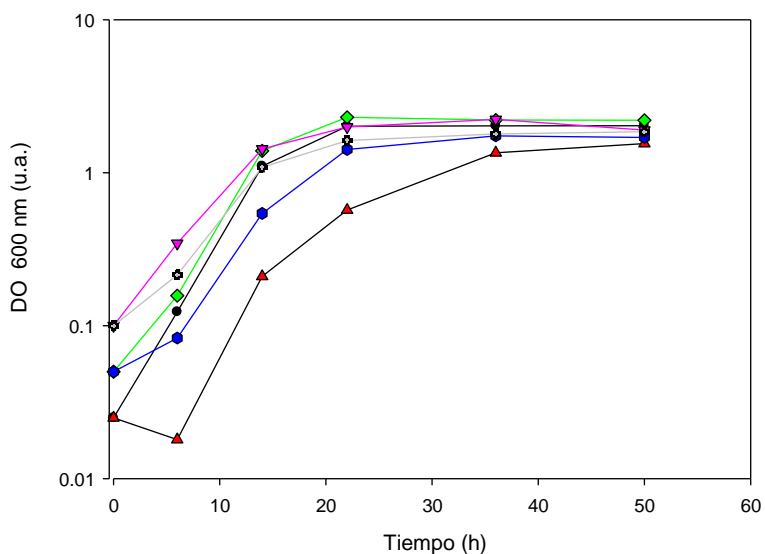
En las Figuras 5 y 6 se puede observar que no hay diferencia en la biomasa final, en los cultivos inoculados a diferentes densidades ópticas. Sin embargo, si las hay entre los matraces crecidos en medio LB modificado y medio mínimo. Por lo anterior, podemos mencionar que la concentración de inóculo inicial, no afecta a la biomasa final, medida como densidad óptica.

Para monitorear la producción de la proteína comparando las cepas monocopia y multicopia se realizó un Western Blot, en el cual se puede observar mayor producción de proteína de la cepa multicopia a las 60 h de cultivo (Figura 6). Este ensayo se realizó para el medio acondicionado de los matraces con resorte de acero inoculados a 0.1 unidades de densidad óptica.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de la cepa monocopia con el plásmido pRT8045 expresada en densidad óptica a diferentes concentraciones de inóculo, tanto en medio mínimo (MM) como en Luria-Bertani (LB) en matraces con resorte de acero (●) LB 0.025 u.a., (▲) MM 0.025 u.a., (■) LB 0.05 u.a., (○) MM 0.05 u.a., (▼) LB 0.1 u.a., (+) MM 0.1 u.a.

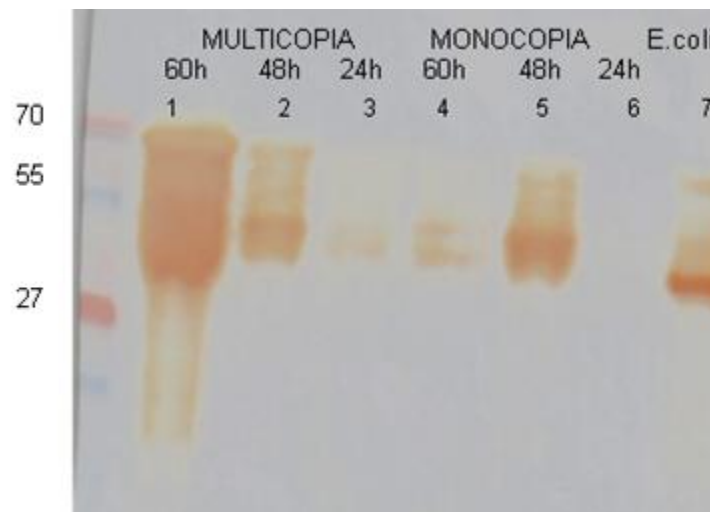


**Figura 6.** Cinética de crecimiento de la cepa multicopia con el plásmido pIJ6021 expresada en densidad óptica a diferentes concentraciones de inóculo (u.a.), tanto en medio mínimo (MM) como en Luria-Bertani (LB) en matraces con resorte de acero inoxidable. (●) LB 0.025 u.a., (▲) MM 0.025 u.a., (◆) LB 0.05 u.a., (●) MM 0.05 u.a., (▼) LB 0.1 u.a., (+) MM 0.1 u.a. Este ensayo se realizó para el medio acondicionado de los matraces con resorte de acero inoculados a 0.1 unidades de densidad óptica.



## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

A su vez, se llevó a cabo un cultivo usando la cepa de *E. coli* productora de rAPA, la proteína resultante de la purificación se puede observar en el carril 7 de la Figura 7, donde el peso molecular es menor ya que esta no está glicosilada. Sin embargo, el anticuerpo fue capaz de reconocerla, ya que actúa sobre la parte proteica.



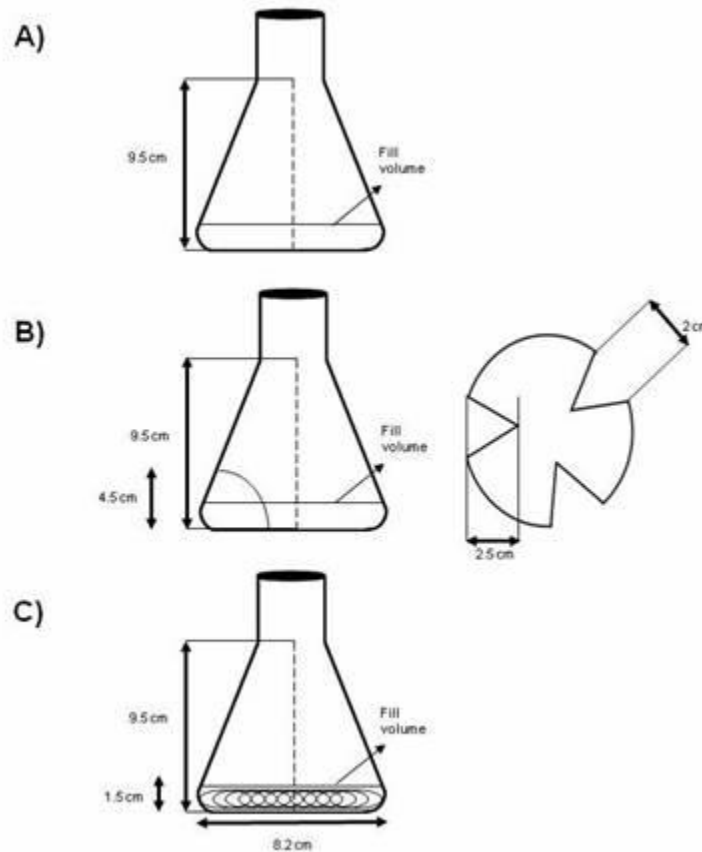
**Figura 7.** Western blot de la cinética de crecimiento mostrada en la Figura 1. (1) Multicopia 60 h, (2) multicopia 48 h, (3) multicopia 24 h, (4) monocopia 60 h, (5) monocopia tiempo 48 h, (6) monocopia 24 h, (7) APAr de *E. coli*. Todos los ensayos se realizaron en medio LB modificado y en matraz con resorte de acero.

En resumen, no se observó un efecto del tamaño de inóculo en el crecimiento. Existe influencia del medio de cultivo en crecimiento y producción de proteína recombinante, y la cepa monocopia y multicopia crecieron de manera similar. Sin embargo, como era esperado, la cepa multicopia presentó mayor producción de proteína recombinante. Debido a que en este trabajo, se pretende evaluar el impacto de las condiciones de cultivo en la O-manosilación de la proteína APA, se decidió trabajar en adelante con la cepa multicopia, con el objetivo de tener suficiente proteína para los análisis de O-manosilación.

## 6.2 Análisis de la producción y O-manosilación de la proteína APA en tres diseños de matraz.

El efecto de tres condiciones de estrés hidrodinámico y de oxigenación en el crecimiento de *S. lividans*, morfología, producción de proteína y O-glicosilación de la proteína rAPA, fue evaluado usando matraces con resorte de acero, convencionales, y bafleados (Figura 8). Los matraces bafleados son matraces Erlenmeyer convencionales, a los que se les han añadido indentaciones de las dimensiones mostradas en la Figura 6B. Un resorte de acero inoxidable calibre 19, de 1.5 cm de ancho por 25 cm de largo fue introducido a matraces convencionales para obtener el diseño mostrado en la Figura 6C. La cinética de crecimiento bacteriano se muestra en la Figura 9. La concentración de la biomasa final (medida como peso seco) no se vio afectada de manera significativa, siendo alrededor de 3.3 g / L de peso seco, en promedio. Específicamente  $3.5 \pm 0.2$  g/L para matraces con resorte y  $3.3 \pm 0.1$  g/L en matraces convencionales y bafleados.

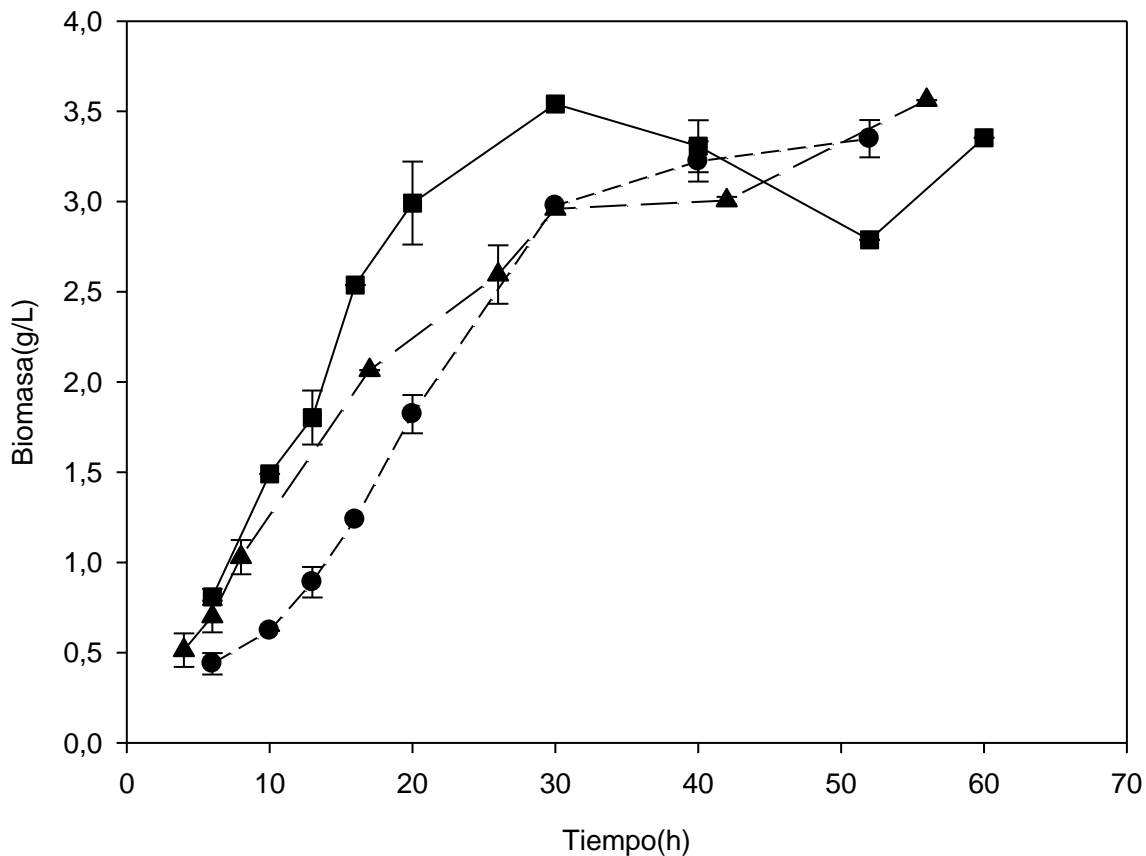
**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 8.** Diseño de los tres matraces utilizados en este trabajo para los cultivo de *S. lividans*, en la producción de rAPA (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011)

Por otra parte, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) no fue diferente significativamente: para matraces con resorte  $0.12 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , en los matraces bafleados  $0.11 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ , y en matraces convencionales  $0.10 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ . Se realizó una prueba de Tuckey ( $p=0.005$ ), y se encontró que no existe diferencia significativa entre las velocidades específicas de crecimiento. En trabajos anteriores se han reportado diferencias en velocidad de crecimiento en estos tres diseños de matraz (Yun *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio detallado de este reporte se puede observar la presencia de una fase lag en matraces bafleados y convencionales, y si se comparan solamente las pendientes de la fase de crecimiento, se encuentran velocidades de crecimiento similares. Esto puede deberse a una desfasamiento en el tiempo de pregerminado en los matraces convencionales, llevando a que el crecimiento vegetativo comience posteriormente que en los otros diseños de matraz.

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 9.** Cinética de crecimiento en peso seco para los tres tipos de matraces. Inoculados a 0.025 unidades densidad óptica. (●) Convencional (▲) Bafleado (■) Resorte.

Con el objetivo de evaluar las características morfológicas de los agregados formados en cada uno de los diseños de matraz, las muestras fueron tomadas aproximadamente a las 60 h en cada uno de los cultivos. Las muestras fueron analizadas por microscopía (Figura 10) utilizando la metodología previamente descrita, y se obtuvieron los valores para diámetro, área, perímetro y redondez (Tabla 5). Los pellets más grandes y redondos se forman en los matraces convencionales, siendo de alrededor de  $1.56 \pm 0.41$  mm de diámetro; los agregados mas pequeños fueron encontrados en matraces bafleados y con resorte de acero, con diámetros alrededor de  $0.22 \pm 0.06$  y  $0.16 \pm 0.05$  mm, respectivamente. Estas diferencias pueden ser atribuidas a una mayor entrega de potencia por unidad de volumen (P/V) en los matraces bafleados y con

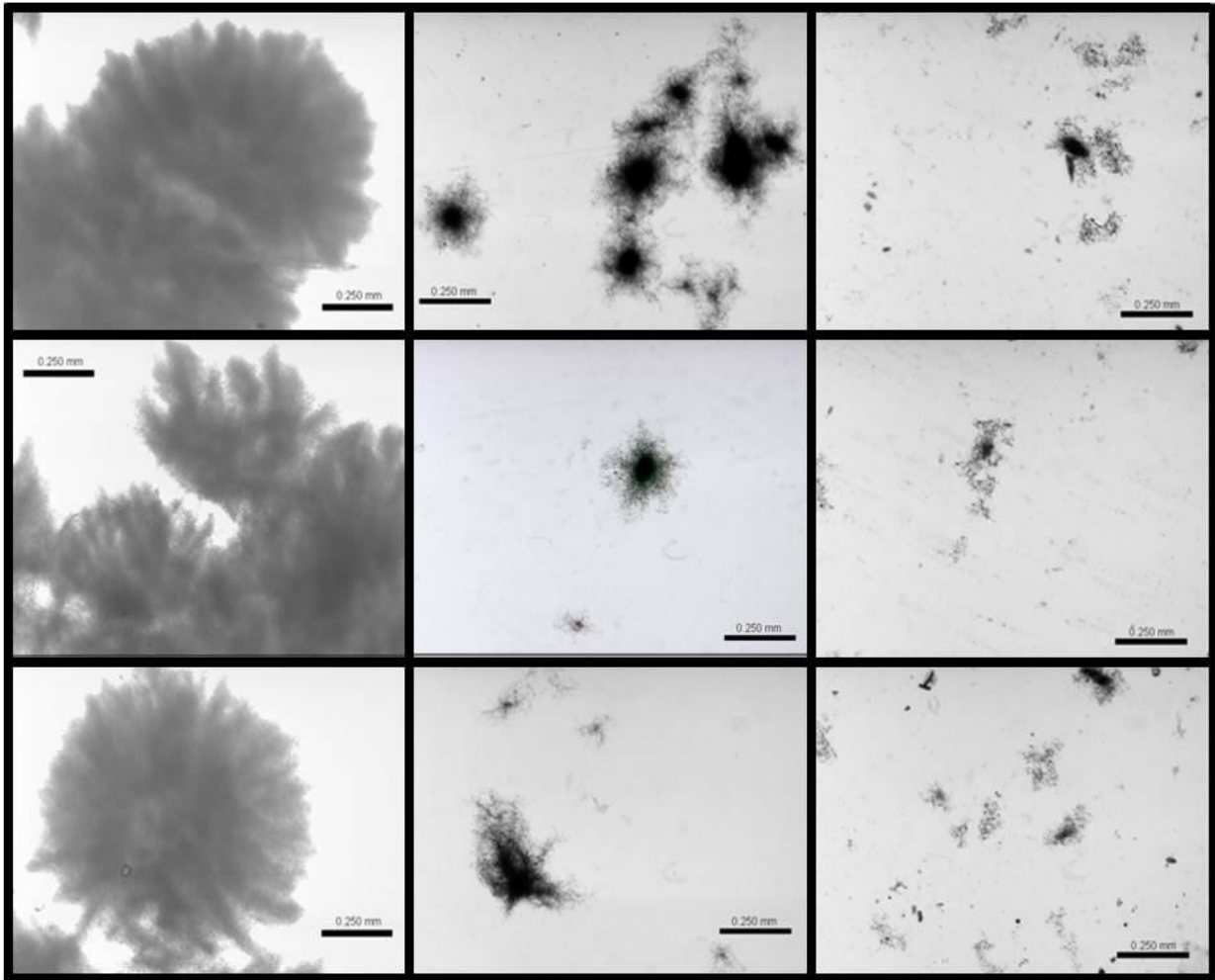
**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

resorte. De acuerdo a las ecuaciones propuestas por Büchs *et al.*, (2000) la P/V en matraces convencionales (150 rpm, 50 ml volumen de llenado), sería alrededor de 0.22 W/L, y la P/V para los matraces bafleados sería cinco veces mayor bajo las mismas condiciones (Peter *et al.*, 2006). Actualmente, no existen ecuaciones propuestas para calcular P/V en matraces con resorte. Sin embargo, dado que las diferencias en cuanto a morfología de agregación entre matraces bafleados y con resorte no son significativas, se puede asumir que la potencias entregadas a ambos sistemas (bafleados y con resorte) será similar en ambos diseños (Pamboukian *et al.*, 2005) Cabe mencionar que la velocidad de transferencia de oxígeno esta directamente relacionada con la P/V. Con base a los datos de morfología podemos asumir que las condiciones de estrés hidrodinámico y de oxigenación son mayores en matraces bafleados y con resorte que en los matraces convencionales.

**Tabla 5** Resultados del análisis estadístico aplicado a las imágenes de los agregados cultivados en diferentes diseños de matraz. Los valores con los mismos superíndices no presentan diferencias significativas por prueba HSD Tukey ( $p = 0.01$ ).

<b>Matraz</b>	<b>Área promedio(mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Diametro promedio (mm)</b>	<b>Perímetro promedio (mm)</b>	<b>Redondez (-)</b>
<b>Convencional</b>	<b>2.11 ± 1.22</b>	<b>1.56 ± 0.41</b>	<b>6.14 ± 2.32</b>	<b>1.51 ± 0.48</b>
<b>Bafleado</b>	<b>0.04 ± 0.02<sup>a</sup></b>	<b>0.22 ± 0.06<sup>b</sup></b>	<b>1.01 ± 0.35<sup>c</sup></b>	<b>2.10 ± 0.67</b>
<b>Resorte</b>	<b>0.02 ± 0.01<sup>a</sup></b>	<b>0.16 ± 0.05<sup>b</sup></b>	<b>0.77 ± 0.30<sup>c</sup></b>	<b>2.66 ± 0.98</b>

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 10.** Morfología representativa de los cultivos de *S. lividans* en medio LB modificado a 30°C y 150 rpm. Imágenes a 40X en A) Matraz convencional , B) Matraz bafleado C) Matraz con resorte. La barra de referencia equivale a 0.250 mm (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos (Tabla 5) fueron sometidos a la prueba estadística de HSD-Tukey ( $p=0.01$ ), la cual nos permite comparar entre las medias de diferentes grupos, cuyos datos fueron obtenidos de manera independiente. La prueba indicó que no hay diferencia en área, diámetro y perímetro entre matraces bafleados y matraces con resorte, y ambos presentan diferencias en los tres parámetros con los matraces convencionales. Los tres diseños tuvieron diferencias significativas en cuanto a redondez. Esto puede deberse a que existan similitudes en los valores de potencia por unidad de volumen en matraces bafleados y con resorte, pero que los patrones de flujo formados en cada uno de los matraces sean diferentes entre si.

Por otro lado, los pellets encontrados en matraces convencionales, son más redondos, y aunque no se realizaron mediciones de porosidad, se puede observar que estos agregados son compactos, lo que aunado a su mayor tamaño, podría estar causando que existan problemas difusionales al interior del agregado. Sin embargo, tomando en cuenta lo observado en la cinética de crecimiento, estos problemas no son lo suficientemente críticos como para afectar el crecimiento. Se ha reportado que las limitaciones difusionales en pellets fúngicos de hasta 2.0 mm, no afectan el crecimiento de manera significativa (Yun *et al.*, 2001). Sin embargo, en los agregados de *S. lividans* encontrados en este trabajo, se podrían tener problemas difusionales en términos del inductor y de la secreción de proteínas, así como de los mecanismos involucrados en la glicosilación de proteínas (Pacis *et al.*, 2001; Clincke *et al.*, 2011).

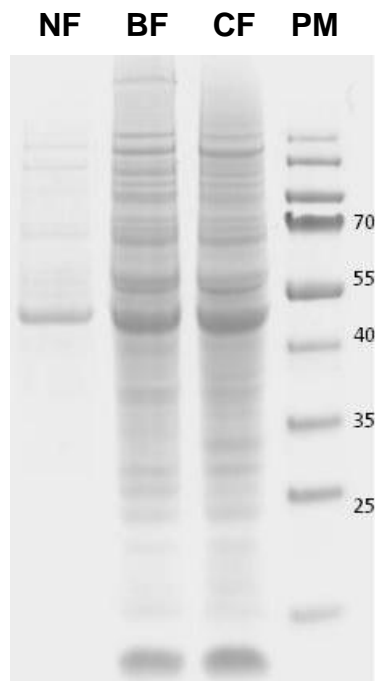
La producción de proteína total fue evaluada mediante SDS-PAGE (Figura 11), demostrando que la proteína rAPA, fue producida, pero en diferentes concentraciones. La densitometría muestra que la producción tanto de proteína total como de rAPA, es mayor en los matraces bafleados y con resorte. Esto además fue confirmado mediante un análisis de detección de proteína por BCA (bicinchoninic acid, Thermo Scientific, USA), obteniendo  $4.02 \pm 0.08$  g/L en matraces convencionales y  $7.44 \pm 0.15$  g/L en matraces bafleados y con resorte. Las dos bandas características para esta proteína a 45 y 47 kDa se observaron en los geles de acrilamida, tal como se reporta por Lara *et al.*, (2004) y Vallin *et al.*, (2006). Estos resultados de producción de proteína total y específica correlacionan con la morfología de agregación: en agregados mas pequeños, la producción aumenta, mientras que en pellets mas grandes disminuye.

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

**Tabla 6** Biomasa final, proteína total y rendimiento  $Y_{P/X}$  de los cultivos de *S. lividans* en los tres diseños de matraz

Matraz	Biomasa (g/L)	Prot Total (mg/mL)	Rendimiento $Y_{P/X}$ (mg/gX)
Convencional	3.3 ± 0.10	4.20 ± 0.08	1.31
Bafleado	3.3 ± 0.01	7.44 ± 0.15	2.25
Resorte	3.5 ± 0.02	7.51 ± 0.01	2.14

Considerando que no existen cambios en la biomasa final producida, las diferencias en producción de proteína total y específica pueden ser atribuidos a los cambios morfológicos observados, probablemente debidos a condiciones disímiles entre los cultivos. Por ejemplo hidrodinámica y transferencia de oxígeno y nutrientes, afectando la secreción de proteínas al medio o induciendo un estado metabólico que no priorice la utilización de nutrientes para la síntesis de proteína recombinante.



**Figura 11.** Electroforesis para observar la producción volumétrica de la proteína APA, en cada diseño de matraz, en muestras tomadas a las 60 h de cultivo para: NF: matraces convencionales, BF: matraces bafleados y CF: matraces con resorte (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).



## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

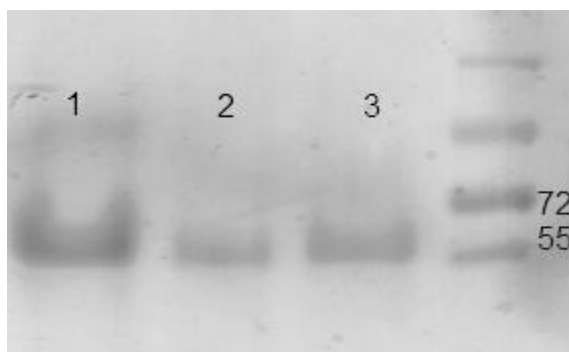
Se realizó un Western Blot de las electroforesis obtenidas (Figura 12), para corroborar la presencia de la proteína, utilizando un anticuerpo (mAb6A3) específico contra la fracción proteica, lo que permitiría detectar tanto la proteína glicosilada como aquella sin la modificación postraducciona. Como se puede observar en la Figura 11, la presencia de APA es mayor en los cultivos en matraces con resorte y bafleados disminuye en convencionales. Se ha reportado que la proteína APA puede migrar en geles de poliacrilamida a 55 kDa, incluso la primera referencia a este antígeno es con referencia a este peso. Interesantemente, en la Figura 12, en los cultivos en NF, se observa mayoritariamente una banda inferior (que correspondería a la fracción de 45 kDa). Se ha sugerido que esta fracción puede ser de menor peso, debido a la carencia de glicosilación o tener truncado el extremo carboxilo terminal (Laqueyrie *et al.*, 1995).



**Figura 12.** Western Blot de la producción de la proteína APA, en cada diseño de matraz. Matraz convencional (NF) Matraz bafleado (MB) y Matraz con resorte (CF) (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).

Las O-glicosilaciones en el carboxilo terminal de la proteína rAPA fueron caracterizados por medio de MALDI-TOF. La proteína fue purificada utilizando un kit comercial (Qiagen® Glycoprotein, USA) de afinidad a conA. El resultante de la purificación se muestra en la Figura 13. Estas bandas fueron utilizadas para la digestión con Lys C (Roche®, Alemania) para el posterior análisis por MALDI-TOF, generándose al menos 8 péptidos teóricos indicados en la Tabla 7. La Treonina<sub>277</sub> se ubica el péptido 8 resultante de esta digestión.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 13.** Gel de las fracciones purificadas por afinidad a conA (Qiagen®, Glycoprotein, USA) de los cultivos en matraces. 1) Matraz con resorte, 2) Matraz bafleado y 3) Matraz convencional.

Para la proteína recombinante producida en *S. lividans* se han reportado hasta 4 manosas unidas a la Treonina<sub>277</sub>, en cultivos realizados en matraces convencionales de 1.0 L con 250 mL de volumen de llenado (Lara *et al.*, 2004)

**Tabla 7** Péptidos teóricos de la digestión de rAPA utilizando la enzima LysC (Roche®, Alemania)

Péptido	Posición de corte	Tamaño del péptido (aa)	Secuencia	Masa (Da)
P1	106	106	DPEPAPPVPTTAASPPSTAA APPAPATPVAPPPAAANTP NAQPGDPNAAPPADPNAP PPVIAPNAPQPVRIDNPVGG FSFALPAGWVESDAAHFDYG SALLSK	10310.43
P2	134	28	TTGDPPFPQGPPPVANDTRI VLGRLDQK	2987.36
P3	145	11	LYASAEATDSK	1155.22
P4	188	43	AAARLGSDMGEFYMPYPGTR INQETVSLDANGVSGSASY EVK	4604.05
P5	194	6	FSDPSK	679.72
P6	234	40	PNGQIWTGVIGSPAANAPDA GPPQRWFVWLGTANNPVDK	4199.69
P7	238	4	GAAK	345.39
P8	286	48	ALAESIRPLVAPPPAPAPAP AEPAPAPAPAGEVAPTPTTP TPQRTLPA	4624.31

En la Figura 14 y en la Tabla 8, se puede observar que en todos los casos se encontró una señal correspondiente al péptido 8 sin glicosilar, con un peso teórico de 4624 Da, y en los tres análisis el peso observado de este péptido es cercano a este valor. La unión

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

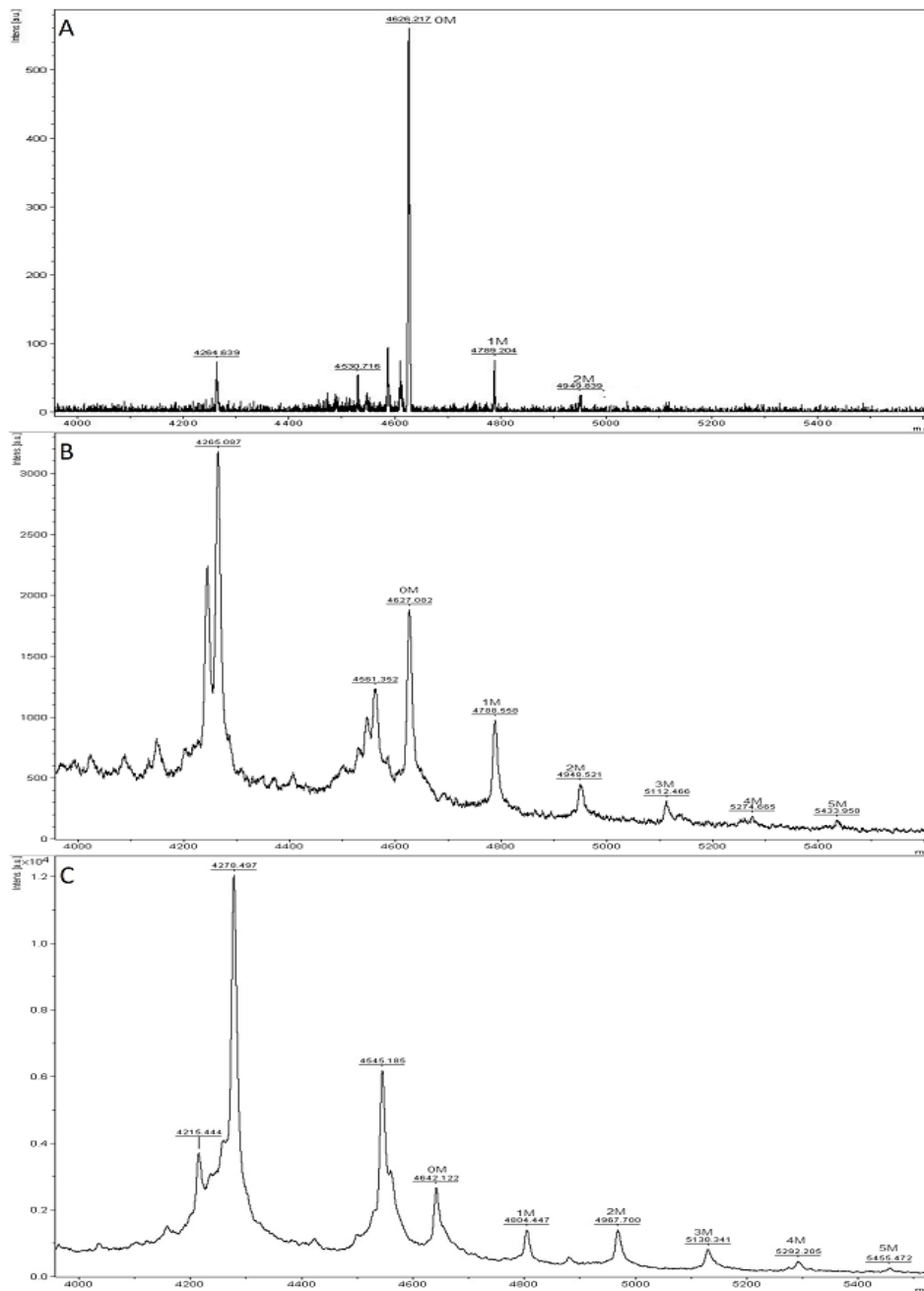
de una hexosa a una cadena péptidica, se caracteriza por el incremento en el peso molecular de 163 Da. Esta diferencia fue encontrada en 2 señales posteriores a la del péptido sin glicosilar en el caso de los matraces convencionales, y en 5 señales posteriores para matraces bafleados y con resorte. Estas cantidades de manosa (2 y 5 unidades) unidas al carboxilo terminal de la proteína APA, no habían sido previamente reportadas, ni para la proteína nativa (Dobos *et al.*, 1996), ni para la recombinante producida en *S. lividans* (Lara *et al.*, 2004)

**Tabla 8** Pesos observados (kDa) del péptido 8 en los análisis de MALDI-TOF, los valores entre paréntesis indican las diferencias de peso respecto a la señal anterior

Matraz	Peso teórico (Da)	Peso observado					
		Manosas					
		0	1	2	3	4	5
Convencional	4624	4626	4789 (162)	4949 (160)			
Bafleado	4624	4627	4788 (161)	4948 (159)	5112 (163)	5274 (162)	5433 (159)
Resorte	4624	4645	4804 (159)	4967 (163)	5130 (162)	5292 (161)	5455 (163)

Las variaciones en las condiciones de aireación/agitación podrían estar afectando a diversos niveles la producción de proteínas recombinantes: aumentando el metabolismo celular, generando la secreción de proteínas mal procesadas, afectando la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de glicosilación, tales como Pmt o Ppm1, o propiciando cambios en el metabolismo que generen que los monosacaridos sean utilizados en otras rutas metabólicas (Kunkel *et al.*, 1998). Sin embargo, no existen reportes precisos acerca de cómo afectan estos aspectos a la glicosilación (Butler, 2005).

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 14.** Análisis de MALDI-TOF para el Péptido 8 generado de la digestión con Lys C (Roche®, Alemania) producido en: A) Matraz convencional, B) Matraz bafleado y C) Matraz con resorte. Los números arriba de los pesos moleculares indican la cantidad de manosas unidas al péptido (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).

A partir de los datos de la Figura 14 se demuestra que las condiciones de cultivo, en este caso aportadas por tres diseños de matraz, afectan la O-Manosilación de la proteína rAPA producida en *S.lividans*. Al menos fueron encontrados dos grados de glicosilación, y ambos son diferentes de los reportados para la proteína nativa, en la cual se encontraron 3 manosas (Dobos *et al.*, 1996) y para la proteína recombinante producida en *S. lividans* con 4 manosas (Lara *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta los resultados previos, se puede asumir que bajo otras condiciones de cultivo, pueden obtenerse diferentes grados de glicosilación. Desde el punto de vista tecnológico, esto podría representar una ventaja, ya que se estaría en posibilidad de producir proteínas recombinantes glicosiladas en bacterias, con diferentes grados de O-glicosilación, y como en este caso en específico, repercutir en la actividad inmunológica, ya que ha reportado que diferencias en el patrón de glicosilación de la proteína rAPA, producida en diferentes hospederos, afecta la respuesta inmunogénica, medida como proliferación de linfocitos T *in vivo* (Horn *et al.*, 1999), por lo que sería interesante evaluar las diferentes O-glicofomas producidas en el mismo hospedero (*S. lividans*), utilizando diferentes condiciones de cultivo (ya sea en matraces agitados o en biorreactores), y compararlos con la respuesta en la proteína nativa.

La relación entre esfuerzo de corte y morfología en *Streptomyces sp.* ha sido ampliamente estudiada (Tamura *et al.*, 1997, Tough *et al.*, 1999, Pamboukian *et al.*, 2005). En este trabajo dicha relación fue corroborada para *S. lividans*, para la producción de una glicoproteína recombinante. Además fueron evaluados los cambios en producción y grado de O-glicosilación en la proteína, ambos relacionados a la morfología de agregación.

### 6.3 Escalamiento de matraz a biorreactor con base en la potencia por unidad de volumen y su efecto en la morfología de agregación

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

Se han propuesto diversos criterios para el escalamiento ascendente de procesos biotecnológicos, enfocados primordialmente en mantener el suministro de oxígeno en los cultivos (García-Ochoa *et al.*, 2009; Juárez & Orejas 2001; Arjunwadka *et al.*, 1998) y en cultivos filamentosos, se ha prestado poca atención en el escalamiento y a la morfología de agregación relacionada con la hidrodinámica del sistema.

En los cultivos sumergidos de *S. lividans*, la morfología de agregación juega un papel importante en la producción, secreción y modificación postraduccional de proteínas recombinantes (Tamura *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 2001; Dobson *et al.*, 2008; Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011). La relación entre frecuencia de agitación y morfología de agregación en *Streptomyces sp.* ha sido ampliamente estudiada y se han propuesto modelos matemáticos para describir esta relación (Pamboukian *et al.*, 2005; Tough *et al.*, 1996).

La morfología de agregación que se busque en un cultivo sumergido de microorganismos filamentosos, depende del producto de interés, así, tenemos que para

la producción de antibióticos por *Penicillium chrysogenum* se recomienda el uso de micelio disperso (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1989), mientras que para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, se requiere la formación de pellets (Gómez *et al.*, 1987). En el caso específico de la glicoproteína APA de 45/47 kDa nativa de *Mycobacterium tuberculosis* producida en *S. lividans*, se ha demostrado que en cultivos con micelio disperso, se mejora la producción y el grado de glicosilación aumenta (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011). Este antígeno es candidato para generar una nueva vacuna contra Tuberculosis (Sable *et al.*, 2011) ya que ha sido reportado con alta respuesta inmune, asociada a su patrón de glicosilación (Dobos *et al.*, 1996). Para poder continuar con los estudios inmunológicos, es necesario producir esta proteína en biorreactores, en condiciones de cultivo que permitan su correcta glicosilación y mantener en biorreactores la misma morfología de agregación que la reportada en matraces es una opción (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se utilizaron los datos del trabajo de Tough *et al.*, 1996, en el cual un modelo matemático fue verificado experimentalmente en cultivos de *S. coelicolor* para predecir el tamaño de los agregados. Los datos de velocidad de agitación de este reporte, fueron empleados para calcular la potencia por unidad de volumen y así poder ser reproducida en los biorreactores con los que cuenta nuestro grupo de investigación, con esto se pretende obtener la morfología de agregación celular reportada en matraces (Gamboa-Suasnavart *et al.*, 2011) con la intención de mantener la productividad y grado de O-glicosilación de APA. La potencia se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$P = N_p D_i^5 p n^3 \quad (1)$$

Donde:

P=Potencia (W/L)

D<sub>i</sub>=Diámetro del impulsor (0.045 m)

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

n= Velocidad de agitación (1/s)

Np= Número de potencia (5.5, calculado para turbina Rushton en régimen turbulento)

$\rho$ = Densidad del fluido (1000 kg/m<sup>3</sup>)

El número de potencia (Np) está en función del tipo impulsor y del número de Reynolds, el cual relaciona las fuerzas viscosas y las fuerzas inerciales mediante la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\rho D_i^2 n}{\mu} \quad (2)$$

Donde  $\mu$  es la viscosidad del caldo de cultivo. Para todas las velocidades de agitación calculadas en este trabajo (de 100 a 1100 rpm), se obtuvieron números de Reynolds mayores a 200,000, lo cual indica un régimen turbulento para todos los casos, por lo que el número de potencia permanece constante en 5.5 para todos los cálculos (Rushton *et al.*, 1950)

Al burbujear aire al medio de cultivo, la potencia disminuye, esta disminución es una función compleja de la geometría del sistema y de las características fisicoquímicas del líquido. Se menciona que esta disminución es debida principalmente a la disminución en la densidad del líquido por presencia de burbujas de aire en las inmediaciones del impulsor (Hugmark, 1980).

Como se puede observar en las ecuaciones 1 y 2, la geometría del biorreactor influye de manera importante en las condiciones hidrodinámicas que tendrá el cultivo. De este modo, cambios tan aparentemente sutiles, como el número de baffles utilizado y el flujo de aireación en un biorreactor, pueden llevar a cambios importantes en la hidromecánica del sistema. En la Tabla 9 se resumen las similitudes y diferencias entre el sistema modelo (Tough *et al.*, 1996) y el sistema utilizado en este trabajo.



**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Se han propuesto correlaciones para estimar el valor de la relación potencia gaseada sobre potencia ( $P_g/P$ ). Se utilizó la correlación propuesta por Hugmark (1980) para impulsores tipo Rushton.

$$\frac{P_g}{P} = 0.1 * \left(\frac{F_g}{NV}\right)^{-0.25} * \left(\frac{N^2 D^4}{g W V^{2/3}}\right)^{-0.20} \quad (3)$$

Donde:

$P_g/P$ = Relación entre potencia y potencia gaseada (-)

$F_g$ = Flujo de aireación (L/min)

$N$ = Velocidad de agitación (rpm)

$V$ = Volumen de llenado (L)

$D$ = Diámetro del impulsor (m)

$g$ = aceleración de la gravedad ( $9.8\text{m/s}^2$ )

$w$ = ancho del impulsor (m)

Así mismo, es importante señalar que las correlaciones aquí utilizadas para el cálculo de la potencia y potencia gaseada, fueron propuestas para sistemas con diseño estándar con 4 baffles. Existen factores de corrección para sistemas con más o menos baffles. En particular, para 2 baffles, con una relación  $w/D_t=1/12$ , el factor de corrección propuesto es 0.9, para sistemas sin baffles el factor de corrección es 0.2 (Bittorf & Dickey, 2004).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Tabla 9.** Valores para el cálculo de la potencia y potencia gaseada en el sistema modelo (Tough *et al.*, 1996) y para el sistema utilizado en este trabajo.

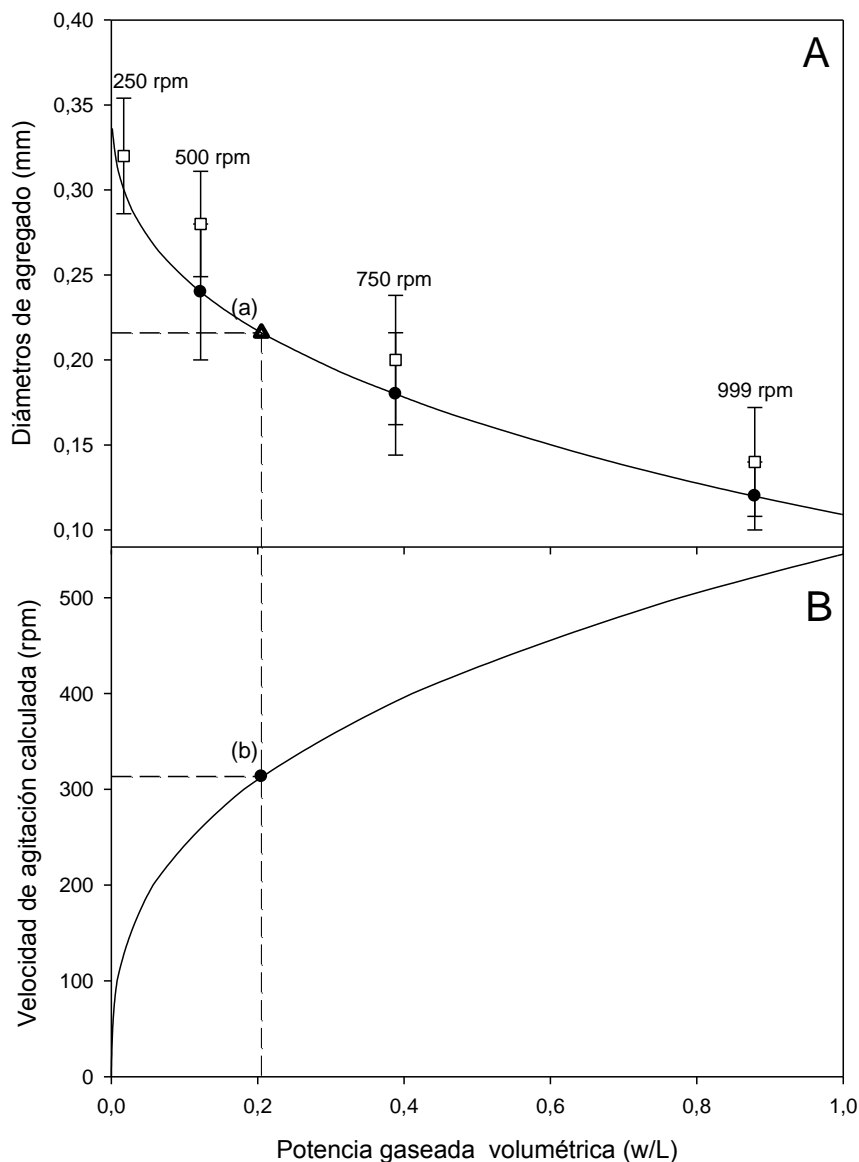
Parámetro	Tough <i>et al.</i> , 1996	Este trabajo
Marca de Biorreactor	Bioflo II NBS (USA)	Applikon (USA)
Fg (L/min)	$3.3 \times 10^{-5}$	$8.3 \times 10^{-6}$
N (rpm)	100-1100	100-1100
V (L)	1.0	1.0
D <sub>i</sub> (m)	0.045	0.045
W (m)	0.011	0.011
Baffles	0	2

Tomando en cuenta los datos del biorreactor utilizado en el reporte de Tough *et al.*, (1996 y 1995) (Bioflo II, New Brunswick Scientific de 1.0 L volumen de operación, 2 impulsores tipo rushton, D<sub>i</sub>= 0.045m, sin baffles y 2 vvm), los valores obtenidos para la relación P<sub>g</sub>/P y los factores de corrección para el número de baffles, se construyó la Figura 15, en donde la P<sub>g</sub>/V entregada al sistema (abscisa) se relaciona con la el tamaño de agregado esperado (ordenada). Así mismo, con los valores correspondientes a nuestro sistema (Biorreactor Applikon de 1.60 L volumen de operación, 2 impulsores tipo Rushton de 0.045 m de diametro, 0.5 vvm, 2 baffles), se construyó la Figura 15B, en la que la velocidad de agitación se relaciona con la P<sub>g</sub>/V.

Considerando los resultados del análisis de imágenes de los agregados formados en matraces, y conociendo que no existen diferencias significativas entre los agregados formados en matraces con resorte y bafleados, se decidió buscar en biorreactores una morfología en la mitad del intervalo de estas dos. De este modo el objetivo de escalamiento, fue lograr agregados de alrededor de 0.20 mm de diámetro. Para tal fin, se calcularon las potencias gaseadas por unidad de volumen en nuestro sistema y se ajustaron los datos a un modelo potencial ( $r^2=1$ ,  $y=546.33X^{0.3509}$ ), para poder conocer que velocidad de agitación entrega la P<sub>g</sub>/V requerida (Figura 15 B). Así se obtuvo un requerimiento de potencia gaseada volumétrica de 0.20 W/L, la cual corresponde al punto (a) en la Figura 15A, que relacionado con la agitación necesaria en nuestro

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

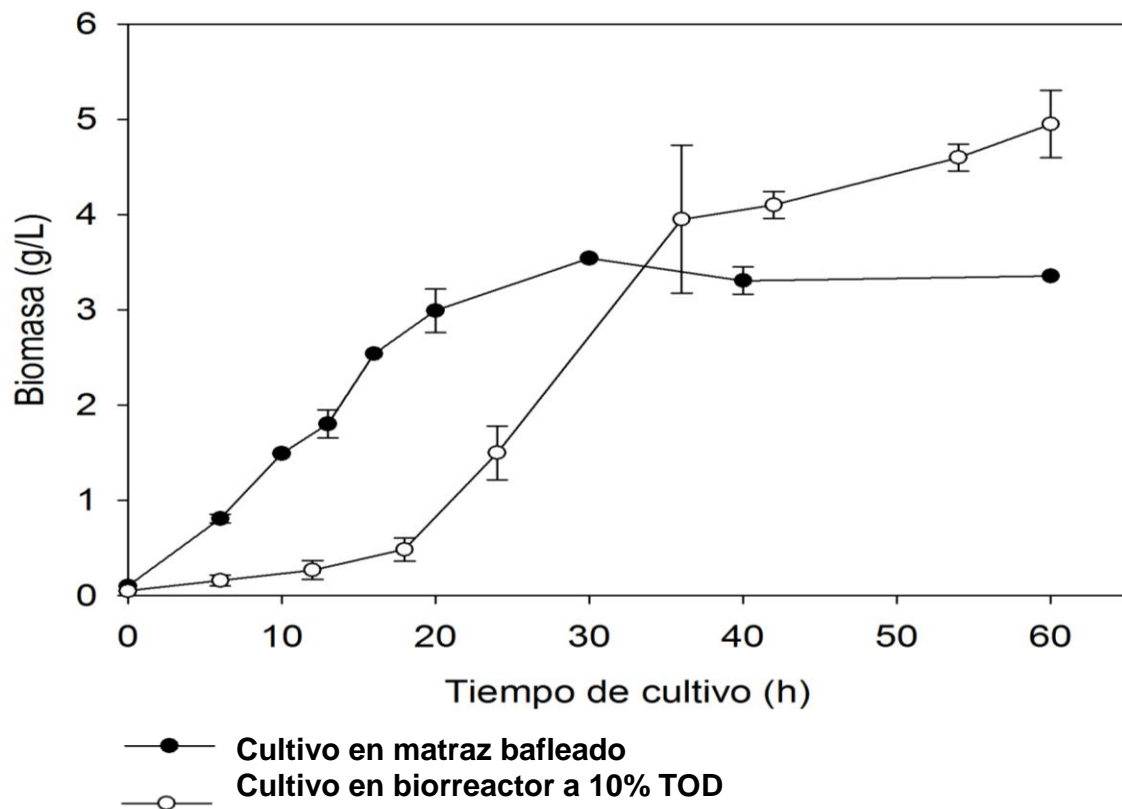
biorreactor para alcanzar ese valor, corresponde al punto (b) en la Figura 15B, es de aproximadamente 313 rpm.



**Figura 15.** Relación entre la velocidad de agitación, potencia volumétrica gaseada y los diámetros de los agregados de *S.coelicolor*, según el trabajo de Tough *et al.*, (1996). **A)** Diámetros de agregado obtenidos a diferentes velocidades de agitación en el trabajo de Tough *et al.*,1996. **B)** Correspondencia entre la potencia gaseada volumétrica y la velocidad de agitación en el biorreactor utilizado en este trabajo. En la línea punteada se muestra el diametro de agregado buscado (punto (a) en 15A) y su equivalencia en potencia y agitación en el biorreactor usado en este trabajo (punto (b) en 15B).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

En la Tabla 11 y la Figura 16, se muestra la comparación del crecimiento en escala matraz y biorreactor. La producción de biomasa final fue mayor en biorreactores. Sin embargo la velocidad de crecimiento es menor en biorreactores, también, la fase de adaptación se prolongó hasta la hora 10 aproximadamente, estos dos aspectos podrían deberse al tamaño del inóculo, ya que se inoculaba con 1.0 mL de esporas pregerminadas y el valor de densidad óptica obtenido resultó menor que en los cultivos en matraces.

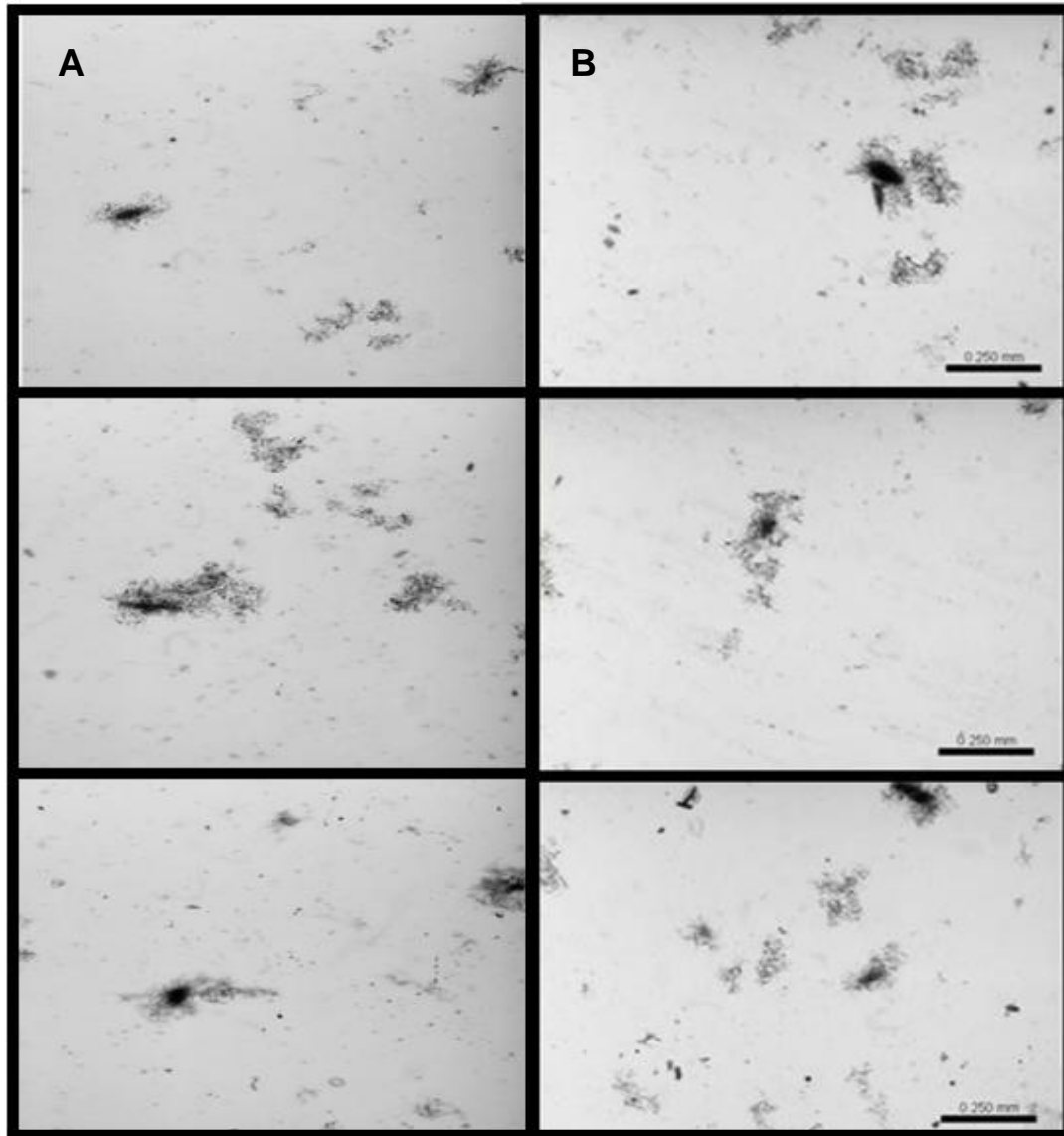


**Figura 16.** Comparación del la cinética de crecimiento en matraz bafleado y biorreactor a 10% TOD.

Para corroborar experimentalmente el tamaño de los agregados en cultivos a nivel de biorreactor a TOD constante, se realizaron dos cultivos a 10% TOD y 300 rpm. De

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

acuerdo al modelo obtenido, esta variación de 13 rpm respecto al valor calculado, no influirá de manera significativa en el diámetro de los agregados. Los resultados del análisis de imágenes se muestran en la Figura 17, y los valores en la Tabla 10.



**Figura 17.** Morfología representativa de los cultivos de *S. lividans* en biorreactor a 10% TOD constante y 300 rpm (A) y en matraces con resorte de acero a 150 rpm (B).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Tabla 10** Resultados del análisis de imágenes de los agregados producidos en biorreactor a tensión de oxígeno disuelto constante y 300 rpm y en matraces con resorte.

	Área (mm <sup>2</sup> )	Diámetro (mm)	Perímetro (mm)	Circularidad (-)
<b>Resorte</b>	<b>0.02 ± 0.01</b>	<b>0.16 ± 0.05</b>	<b>0.77 ± 0.30</b>	<b>2.66 ± 0.98</b>
<b>10% TOD</b>	<b>0.019 ± 0.01</b>	<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.17 ± 0.05</b>	<b>0.72 ± 0.09</b>

Comparando los agregados formados en biorreactor a 300 rpm y los producidos en matraces con resorte de acero, observamos que presentan el mismo tamaño (aproximadamente 0.020 mm<sup>2</sup>), de este modo se logró establecer condiciones de hidrodinámica en los biorreactores, con base a lo observado en matraces, tratando de mantener la morfología que presentó mayor productividad.

Los resultados en la cuantificación de proteína total obtenidos en matraces con resorte de acero y biorreactores a 10% TOD (Tabla 13), indican que se alcanzan valores similares, cabe mencionar que la productividad específica es menor en los biorreactores, ya que se obtiene la misma cantidad de proteína total, pero la biomasa final es mayor. Estudios de optimización son necesarios en los biorreactores para poder aumentar la productividad específica, tales como estudios en tamaño de inóculo, mezclado y control de pH.

**Tabla 11** Comparación de la producción de biomasa y velocidad de crecimiento a escala matraz y biorreactor

	Biomasa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
<b>Matraz con resorte</b>	<b>3.50 ± 0.20</b>	<b>0.12 ± 0.01</b>
<b>Biorreactor 10% TOD, 300 rpm</b>	<b>4.95 ± 0.35</b>	<b>0.087 ± 0.015</b>

En conclusión, se logró establecer un parámetro de escalamiento: la morfología miceliar de agregación. Para tal fin, se recurrió a un modelo matemático para predecir el tamaño de los agregados que se formarían en los biorreactores, con base a la potencia volumétrica entregada al sistema. Dados los pocos parámetros ingenieriles definidos en matraces, este trabajo constituye una buena propuesta para el escalado de matraces a biorreactores en cultivos filamentosos.

#### 6.4 Cálculo del oxígeno disuelto crítico con base al tamaño de agregado.

Los cultivos filamentosos se caracterizan por su complejidad, uno de los principales que presentan, es el de las diversas morfologías que se pueden obtener. En cultivos sumergidos, la morfología de agregación puede variar desde micelio disperso hasta pellets (Pamboukian *et al.*, 2005) En esta última morfología pueden presentarse limitaciones de transferencia de masa al interior del agregado (Yun *et al.*, 2001).

Como resultado de la baja solubilidad y el volumen limitado de transferencia de masa en biorreactores, el oxígeno es a menudo uno de los componentes limitantes en las fermentaciones (Garcia-Ochoa *et al.*, 2009). A 25 ° C la concentración de oxígeno en agua saturada con aire es a un bar es de sólo el 8.4 g/m<sup>3</sup>. Así mismo la viscosidad en los cultivos filamentosos es mayor que en los cultivos no miceliares, lo que dificulta mas la transferencia de masa y estas complicaciones se ven aumentadas cuando el cultivo presenta agregados miceliares, por lo que es necesario calcular la concentración mínima de oxígeno que permitirá la difusión al interior del agregado. Para determinar esto, se utilizó la correlación propuesta por Cui *et al.* (1997).

$$C_{O_2} = \frac{R_{O_2} D_{crit}^2}{24 D_{eff}} \quad (5)$$

Donde:

$C_{O_2}$  = Concentración de oxígeno disuelto (g/L)

$R_{O_2}$  = Consumo específico de oxígeno (kg/kg<sub>cel</sub>h) \* densidad del pellet (kg/m<sup>3</sup>)

$D_{crit}$  = Diámetro de la partícula (m)

$D_{eff}$  = Difusión del oxígeno en agua (m<sup>2</sup>/s) \* Porosidad

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Se consideraron los siguientes valores obtenidos de la literatura y calculados para *Streptomyces*:

$RO_2=2.5$  mmol/kg h (calculado).

Porosidad=0.8 (Cui *et al.*, 1997)

Difusividad= $1 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s

Densidad de pellet= 5000 kg/m<sup>3</sup> (Cui *et al.*, 1997)

El consumo de oxígeno fue calculado a partir de los datos preliminares obtenidos en el equipo RAMOS (Respiration Activity Monitoring System) descrito por Anderlei *et al.*, 2000, en trabajos preliminares de nuestro grupo en colaboración con el Dr J. Büchs de la Universidad Tecnológica de Aachen, Alemania, aun sin publicar. En dicho trabajo, cultivos en los tres diseños de matraces mostradas en la Figura 8, fueron realizados siguiendo la misma metodología descrita en la sección 5.2. El equipo RAMOS monitorea en línea los valores para velocidad de transferencia de oxígeno, los cuales relacionados con la producción de biomasa, resultan en el valor de  $RO_2$ . Los datos de porosidad y densidad del pellet fueron propuestos por Cui *et al.* (1997) para agregados miceliarios.

Sustituyendo los valores de los diámetros menores y mayores obtenidos en los ensayos en matraces con resorte de acero y asumiendo una concentración de saturación de oxígeno de 8 mg/L tenemos que para los agregados formados en matraces con resorte de acero ( $0.16 \pm 0.05$  mm), la tensión de oxígeno disuelto crítica para la correcta difusión hacia el interior de los agregados es de 2-4% TOD, por lo que se proponen 0.5, 10, 25 y 40% TOD para los cultivos en biorreactor.



## 6.5 Producción y O-manosilación de la proteína APA en cultivos a oxígeno disuelto constante

Las condiciones de cultivo tienen un efecto crítico en la concentración de biomasa, morfología micelar y producción de metabolitos de interés. A diferencia de los cultivos en matraces, que son sencillos y en los cuales no es posible controlar y monitorear los principales parámetros de cultivo, los cultivos en biorreactor permiten el sencillo control y monitoreo de prácticamente todas las variables, permitiendo el estudio del impacto de manera independiente de alguna de ellas, en el proceso de interés (crecimiento, producción, calidad del producto, entre otros).

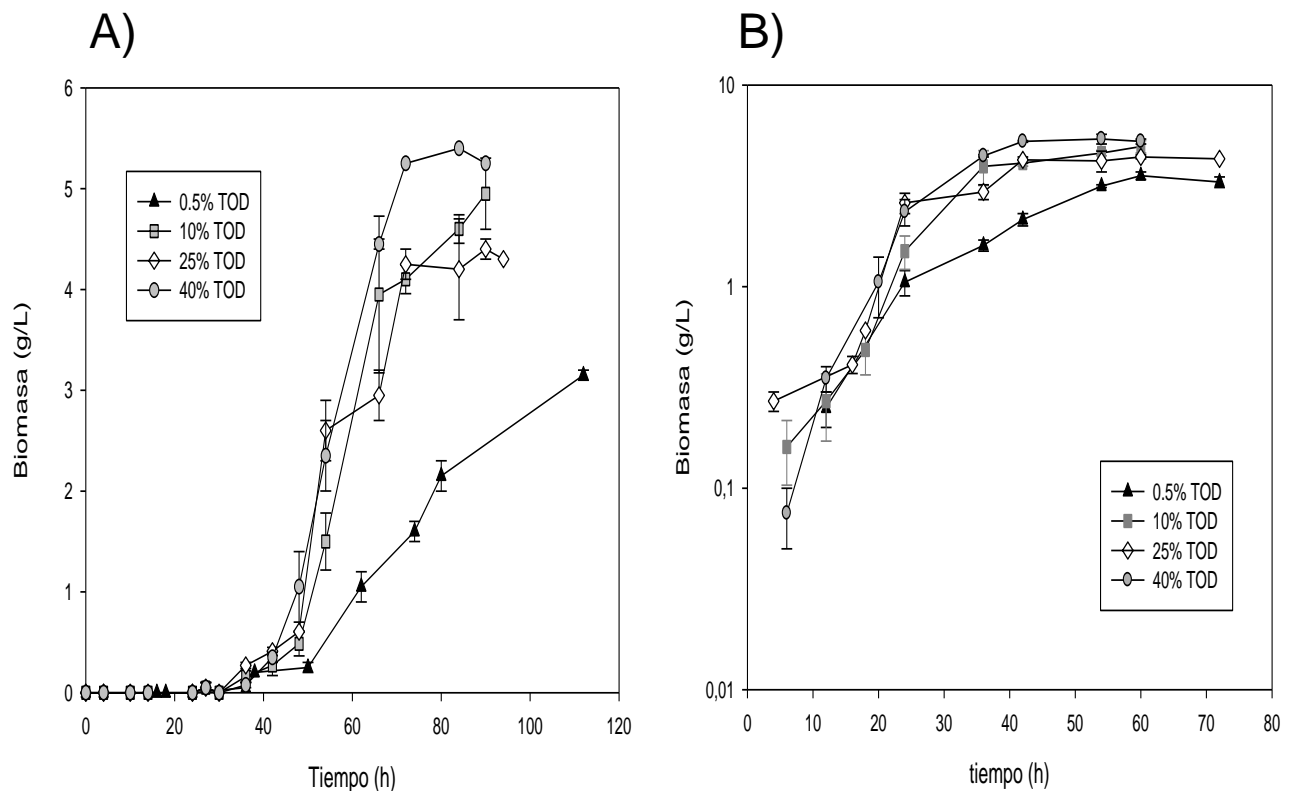
El oxígeno disuelto, que es controlado por la agitación y nivel de aireación en un cultivo, se ha reportado que afecta la morfología de agregación (Fazenda *et al.*, 2010), la velocidad de crecimiento (Olsvik *et al.*, 1992) y el patrón de O-glicosilación en células de mamífero (Serrato *et al.*, 2004). Así mismo, el tipo de biorreactor utilizado, que puede proveer de condiciones de hidrodinámica/aireación puede llevar a cambios en el patrón de glicosilación en cultivos de hibridomas (Schweikart *et al.*, 1999).

La cinética de crecimiento de todos los cultivos se muestra en la Figura 18 y el resumen de los parámetros obtenidos en la Tabla 13. Es importante mencionar que en los cultivos en biorreactor, la fase de adaptación, que en matraces duró de 4 a 6 horas, se prolongó hasta aproximadamente 24 hrs, debido probablemente al bajo inóculo utilizado (0.025 u.a.) respecto al recomendado 0.1 u.a. (Hopwood, 1985). Los gráficos de control de los cultivos se encuentran en el Apéndice 2.

En los cultivos a 10% TOD se obtuvo como biomasa final de 4.95 g/L con una velocidad de crecimiento de  $0.087 \text{ h}^{-1}$ . En estos cultivos la fase estacionaria comienza aproximadamente a las 42-45 horas de iniciado el crecimiento. De manera similar se comportó el cultivo a 25% TOD, alcanzando una biomasa final de  $4.3 \pm 0.24 \text{ g/L}$  y una velocidad de crecimiento de  $0.066 \text{ h}^{-1}$ . Un ligero aumento en la producción de biomasa

## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

se observó en los cultivos a 40% TOD, donde se obtuvo una concentración de biomasa final  $5.25 \pm 0.15$  g/L con una  $\mu$  de  $0.064$  h<sup>-1</sup>. Los cultivos a 0.5% TOD disminuyeron considerablemente la producción de biomasa respecto a los tres cultivos descritos anteriormente, ya que solamente se alcanzó 3.1 g/L de biomasa final con una velocidad de crecimiento de  $0.03$  h<sup>-1</sup>.



**Figura 18.** Cinética de crecimiento en biorreactor de 1.0 L (300 rpm, 30°C) para los cultivos a diferentes TOD. A) Crecimiento en escala lineal y en B) en escala logarítmica.

La morfología de agregación en los cultivos en biorreactor a TOD constante fue determinada por análisis de imágenes, las cuales se muestran en la Figura 19. En la Tabla 12, se puede observar que no hay una diferencia significativa en los tamaños de agregado (referidos como área) producidos en los cultivos a diferentes condiciones de tensión de oxígeno disuelto, por lo que los cambios en productividad y perfiles de O-manosilación pueden ser atribuidos a la disponibilidad de oxígeno en el medio.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

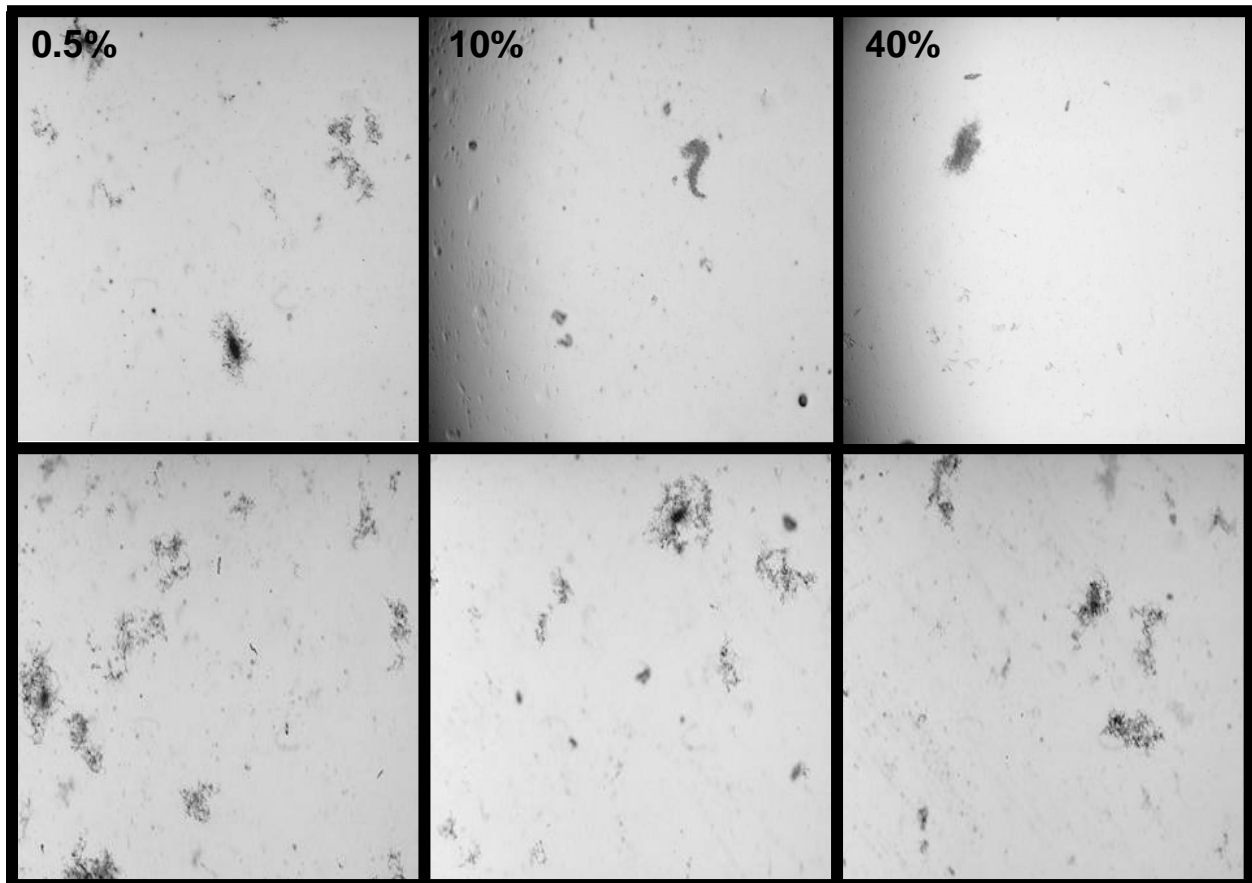
**Tabla 12** Resultados del análisis de imágenes de los agregados producidos en biorreactor a Tensión de Oxígeno disuelto constante y a 300 rpm. Los valores con el mismo superíndice no son diferentes significativamente por análisis HSD Tukey ( $p = 0.01$ )

	<b>Área</b>	<b>Diámetro</b>	<b>Perímetro</b>	<b>Circularidad</b>
<b>0% TOD</b>	<b>0.0027 ± 0.009<sup>a</sup></b>	<b>0.058 ± 0.014</b>	<b>0.213 ± 0.038</b>	<b>0.753 ± 0.112<sup>c</sup></b>
<b>10% TOD</b>	<b>0.0019 ± 0.012<sup>a</sup></b>	<b>0.048 ± 0.013</b>	<b>0.179 ± 0.050<sup>b</sup></b>	<b>0.729 ± 0.090<sup>c</sup></b>
<b>40%TOD</b>	<b>0.0016 ± 0.008<sup>a</sup></b>	<b>0.044 ± 0.010</b>	<b>0.170 ± 0.038<sup>b</sup></b>	<b>0.687 ± 0.093</b>

El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas entre las áreas de los agregados formados en los tres cultivos analizados. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el diámetro, perímetro y circularidad, indicando que aunque el tamaño de los agregados es igual, la forma es diferente. Se ha reportado que la compactación de pellets en *Streptomyces*, es dependiente de la producción de polímeros extracelulares (Kim et al., 2004) y quizá estas variaciones en la forma de los agregados podrían deberse a la modificación en la producción de estos polímeros por las condiciones de cultivo.

El oxígeno disuelto en el medio no tiene influencia en la tamaño de los agregados a el valor de potencia por unidad de volumen que se maneja en el sistema (0.18 W/L), pero si en la forma. Existen reportes donde el oxígeno disuelto afecta la morfología de agregación, sin embargo en estos mismos se menciona que el estrés hidrodinámico juega un papel mas importante en la modificación de la morfología (Vecht-Lifshitz, 1989).

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

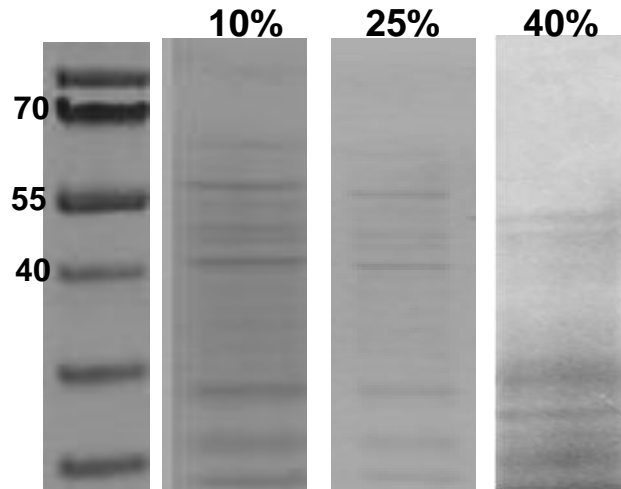


**Figura 19.** Morfología representativa de los cultivos de *S. lividans* en biorreactor a 0.5, 10, y 40% TOD y 300 rpm (muestras tomadas a 60 h de cultivo).

En cultivos sumergidos de *Streptomyces sp.* se ha reportado la producción de diversas proteasas y antibióticos en la fase estacionaria como consecuencia del metabolismo secundario. En especial la producción del antibiótico undecilprodigiosina que presenta coloración rojiza y es producido en fases tardías de la fase estacionaria (Bibb, 1996, Alam *et al.*, 2010).

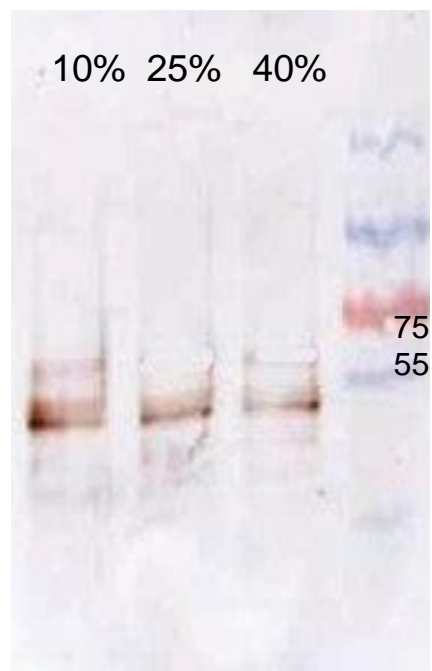
En la Figura 20, se muestran los geles de producción volumétrica de proteína total de los tres cultivos en biorreactor a tiempo final (60h), en los que la proteína pudo ser detectada por este método. En esta Figura es posible observar las diferencias de producción entre los cultivos, siendo mayor a 10% TOD y disminuyendo en 25 y 40% TOD, la densitometría realizada a estos geles se encuentra en el Apéndice 2.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 20.** Electroforesis de los cultivos en biorreactor a 10, 25 y 40% TOD.

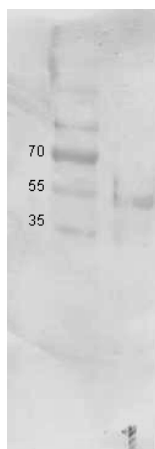
Para corroborar estas diferencias, se realizó un western blot, cargando en cada carril la misma cantidad de proteína total, el resultado se puede observar en la Figura 21. En esta Figura se puede distinguir con claridad la disminución en la producción de proteína APA a 25 y 40% TOD respecto a 10% TOD.



**Figura 21.** Western Blot de los cultivos en biorreactor a 10, 25 y 40% de TOD.

## Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*

La producción de rAPA en el cultivo a 10% fue corroborada por Western Blot (Figura 22), en el que se observa una sola banda a la altura de 47 kDa, sin degradación de proteína, lo que sugiere una baja producción de antibióticos y proteasas, además que el cultivo no presentó coloración rojiza característica de la formación de prodigiosina.

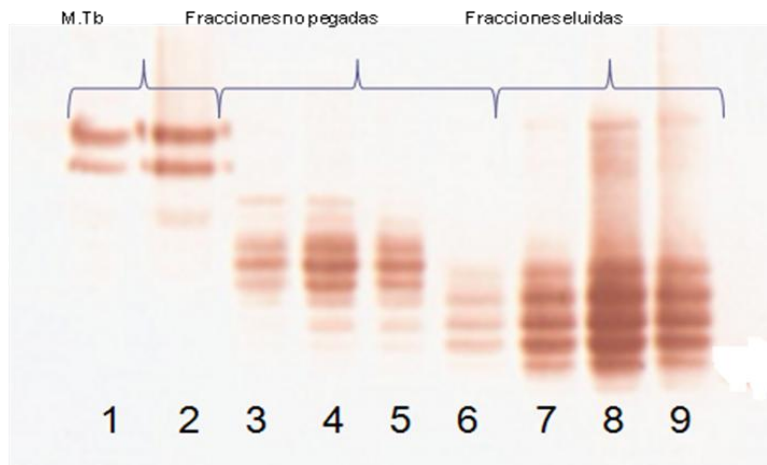


**Figura 22.** Western Blot del cultivo en biorreactor a 10% de TOD.

En los cultivos a 25% de oxígeno disuelto, se observó una alta degradación de la proteína, acompañada de antibióticos, quizá en estos cultivos en biorreactor el estrés oxidativo sea mayor, así como la producción de metabolitos secundarios incluidos proteasas y antibióticos.

En el caso particular del lote a 25% TOD, el Western Blot (Figura 23) confirmó la degradación de la proteína, así como el enriquecimiento de la fracción de 47 kDa después de la cromatografía de afinidad a conA, lo cual podría indicar que las glicofomas presentes en el cultivo de *S. lividans*, están agrupadas en ese peso molecular aparente (Lara *et al.*, 2004).

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 23.** Western Blot del cultivo en biorreactor a 25% de oxígeno disuelto. En carriles 1 y 2 APA nativa de *Mycobacterium tuberculosis*, en 3, 4, 5 y 6 rAPA de *S. lividans* fracciones no pegadas a conA, en 7, 8 y 9 fracciones pegadas a conA

En los cultivos a 40% TOD, la producción de proteína total (Tabla 13) se redujo a la mitad, a pesar de ser el cultivo en el que mayor concentración de biomasa se alcanzó. Por en los cultivos a 0.5% de TOD, los cuales oscilaron entre 0% y 3%, sin embargo estos valores están por debajo del oxígeno crítico para el tamaño de agregado formado, la fase de adaptación fue ligeramente mayor, y la producción de biomasa final se vio disminuida y la proteína APA no pudo ser detectada por Western Blot.



**Figura 24.** Western Blot del cultivo en biorreactor a 40% de TOD. En carriles 1 y 2 rAPA de *S. Lividans* fracciones pegadas a conA, en 3 y 4 fracciones no pegadas.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Tabla 13** Comparación de la velocidad de crecimiento, producción de biomasa y producción de proteína.

<b>TOD (%)</b>	<b>Velocidad de crecimiento (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>%APA (mg/mL)</b>
<b>0.5</b>	<b>0.03</b>	<b>3.1</b>	<b>no detectado</b>
<b>10</b>	<b>0.087</b>	<b>4.95 ± 0.35</b>	<b>10% (0.0323)</b>
<b>25</b>	<b>0.066</b>	<b>4.3 ± 0.24</b>	<b>8% (0.096 )</b>
<b>40</b>	<b>0.064</b>	<b>5.25 ±0.15</b>	<b>8% (0.0154)</b>

Comparando las producciones de matraces con resorte de acero, que fue el de mayor productividad, con las de los reactores observamos que los valores son cercanos con los rendimientos obtenidos al lote de 10% TOD. De esto podemos sugerir que existe una relación entre morfología de agregación y producción de proteínas recombinantes en *S.lividans*, pero que a su vez, la TOD puede modificar el metabolismo del organismo llevando en niveles bajos y altos de oxígeno a la utilización de fuentes de carbono para otros procesos celulares (Restelli *et al.*, 2006).

Se han reportado diversos efectos de la concentración de oxígeno disuelto en la producción de proteínas recombinantes en bacteria, estos incluyen cambios metabólicos (Compan *et al.*, 1994), oxidación proteica (Visick & Clarke, 1995), daños al DNA (Teebor *et al.*, 1988) y estabilidad del plásmido (Namdev *et al.*, 1993). En este último caso en específico, se ha encontrado que fluctuaciones en los niveles de oxígeno disuelto en cultivos en biorreactor de *E.coli*, que lleven a condiciones oxidativas, causan pérdida en la estabilidad del plásmido. Este fenómeno quizá pueda estar presentando en los cultivos a 40% TOD, en los que se observa un decremento en la producción de proteína recombinante.

Para analizar la influencia de la tensión de oxígeno disuelto en el patrón de O-manosilación del péptido 8 (Tabla 7) , las muestras de tiempo final de los cultivos a 0.5%, 10% y 25% TOD, fueron analizadas por MALDI-TOF, los resultados se muestran en la Figura 25 y en la Tabla 14. Cabe mencionar que a pesar de que se realizó la purificación de la proteína APA de los cultivos en biorreactor, en los análisis por MALDI-TOFa las muestras resultantes de la purificación, no fue posible detectar las señales



**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

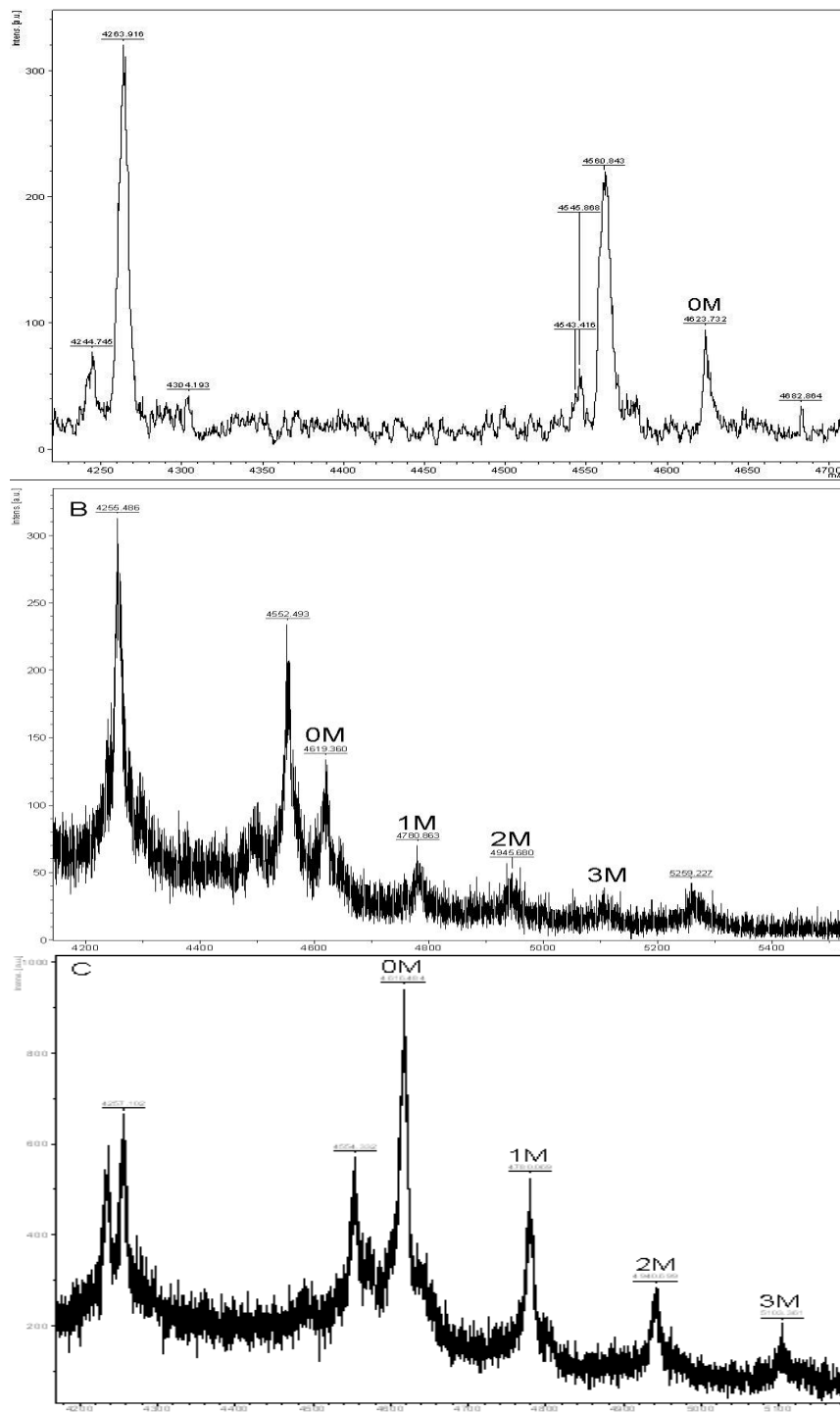
correspondientes a los péptidos teóricos esperados, por lo que los resultados de O-manosilación mostrados corresponden a muestras obtenidas a partir de geles de proteína total.

En los cultivos a 0.5% TOD, se detectó únicamente el péptido correspondiente a la proteína sin O-manosilar (Figura 25A), aunque no se puede descartar la posibilidad de que las fracciones O-manosiladas se hayan producido en cantidades tan pequeñas que no hayan sido detectadas en el análisis MALDI-TOF. A 10% TOD, se encontraron cuatro picos correspondientes al péptido sin glicosilar y con una y hasta tres manosas, de la misma manera en los cultivos a 25% TOD. De los cultivos a 40% TOD, en el análisis de MALDI-TOF no fue posible detectar los péptidos teóricos de la digestión con Lys C. Posiblemente la enzima Lys C perdió su actividad o la proteína estaba contaminada con otra proteína presente en mayor cantidad, la cual enmascaró las señales de los péptidos de rAPA. Estos datos indican que existe un efecto de la TOD en la O-manosilación de la proteína APA, cuando los valores de TOD, están por debajo de los valores críticos de oxígeno.

**Tabla 14.** Pesos observados del péptido 8 en los análisis de MALDI-TOF, los valores entre paréntesis indican las diferencias de peso respecto a la señal anterior. Todos los pesos están dados en Da.

Cultivo	Peso teórico	Peso observado manosas			
		0	1	2	3
0.5% TOD	4624	4622			
10% TOD	4624	4619	4780 (161)	4945 (164)	5108 (163)
25% TOD	4624	4616	4780 (163)	4940 (160)	5103 (162)

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 25.** Análisis de MALDI-TOF, para el péptido 8 (Tabla) correspondiente al carboxilo terminal de APA proveniente del cultivo a: A) 0.5% TOD, B) 10% TOD, C) 25% TOD. Los números junto a la letra M, indican la cantidad de manosas unidas al péptido.

## **Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Contrastando estos resultados con los obtenidos en matraces agitados sugieren que las condiciones de limitación de oxígeno, llevan a cambios en la glicosilación y productividad de la proteína APA. En cultivos en matraces convencionales los cambios en la hidrodinámica/aireación del cultivo, reflejados en la morfología de agregación estarían llevando a una limitación de oxígeno ya que los agregados alcanzan hasta 1 mm de diámetro y la respiración en el interior de estos agregados es prácticamente nula (Manteca *et al.*, 2008). En los cultivos en biorreactores, la limitación de oxígeno se dio al mantener una TOD por debajo de la concentración crítica para mantener la difusión de oxígeno al interior del agregado (Cui *et al.*, 1995).

Para poder determinar el mecanismo por el cual los efectos de hidrodinámica/aireación afectan la glicosilación de proteínas heterólogas, es necesario hacer estudios de manera independiente del estrés hidrodinámico en los cultivos (mediante variación en velocidad de agitación y potencia volumétrica), así como de transferencia de masa (velocidad de transferencia de oxígeno y consumo de oxígeno), sobre la glicosilación y productividad de alguna proteína recombinante modelo. Así mismo, evaluar la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de O-Manosilación en *Streptomyces sp.* (Wehmeier *et al.*, 2005) para determinar si están siendo reguladas por la disponibilidad de oxígeno (Dalgard *et al.*, 2004).

## 7. Conclusiones

*Streptomyces lividans*, ha sido reportado como una buena opción para la producción de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, como la proteína APA 45/47 kDa que ha sido considerada como potencial candidata para generar una nueva vacuna contra Tuberculosis. En este trabajo, la cepa de *S. lividans* 66 1326 que fue transformada con los plásmidos pRT802 y PIJ6021MT-45 para la producción de APA, fue propagada a diferentes tamaños de inóculo, no encontrando diferencias en el crecimiento.

El diseño del matraz modifica las condiciones de hidrodinámica/aireación en los cultivos, lo cual repercute en la morfología de agregación de la bacteria filamentosa *S. lividans*, y esto se ve reflejado en la producción de proteína recombinante y en su patrón de O-manosilación, el cual es relevante en la respuesta inmunogénica que presentará la proteína en caso de ser utilizada como vacuna o kit diagnóstico para Tuberculosis. En matraces donde el estrés hidrodinámico y la aireación son mayores (bafleados y con resorte), se forman agregados más pequeños y la productividad de la proteína APA aumenta, así mismo el patrón de O-manosilación se vio modificado (respecto a lo reportado para la proteína nativa producida en matraces convencionales), hallándose hasta 5 manosas unidas al péptido correspondiente al carboxilo terminal de la proteína. En matraces convencionales, los efectos de hidrodinámica/aireación son menores y los agregados formados son más grandes, lo que lleva a una disminución en la producción de proteína recombinante y a un patrón de O-glicosilación de solo 2 manosas en el carboxilo terminal de APA. En todos los casos la biomasa final y la velocidad de crecimiento permanecieron sin cambios, por lo que todos los cambios observados pueden ser atribuidos a las variaciones morfológicas.

Para poder estudiar por separado el efecto de la disponibilidad de oxígeno en el medio, el proceso se escaló a biorreactor de 1.0 L. El escalado de matraz a biorreactor es complicado, ya que no existen parámetros ingenieriles bien definidos en matraces que

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

permitan establecer condiciones de referencia en la nueva escala. En este trabajo se propuso la morfología de agregación como parámetro de escalamiento. Para tal fin se utilizó un modelo matemático, relacionando morfología con potencia volumétrica entregada al sistema. El escalamiento fue exitoso en términos de tamaño de agregado y producción de proteína total. De este modo se demuestra la factibilidad de utilizar la morfología de agregación en bacterias filamentosas, como parámetro de escalamiento.

En los cultivos en biorreactor a TOD constante, se encontró diferencia en el patrón de glicosilación entre los cultivos a 10% y 25% TOD respecto a los microaerobios (0.5% TOD). El patrón de glicosilación en el carboxilo terminal se mantuvo en 3 manosas para los primeros y en 0 manosas para los microaerobios. En estos cultivos la biomasa producida y la velocidad de crecimiento si se vieron disminuidas en los cultivos microaerobios. La morfología de agregación no cambió en ninguno de los cultivos, ya que en todos se mantuvo la potencia volumétrica mediante una agitación constante. La producción de proteína es afectada por los niveles de oxígeno disuelto, encontrándose una mayor producción de proteína recombinante a 10% TOD, por valores por encima y por debajo se vio disminuida.

En este trabajo queda demostrado que bajo condiciones de limitación de oxígeno, ya sea por difusión o por baja concentración en el medio de cultivo, el patrón de glicosilación de la proteína APA se ve modificado (disminuyendo el número de manosas unidas al carboxilo terminal), sugiriendo que la actividad metabólica y de las enzimas involucradas en el proceso de glicosilación en *S. lividans* se ven afectadas.

## 8. Referencias

- Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, **The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4(+) and CD8(+) T cells in adults.** *Am J Respir and Crit Care Med*, 2010, **181**:1407–1417.
- Abu-Qarn M, Eichler J, Sharon N, **Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea,** *Curr Opin Struct Biol.* 2008 **18**:544-50.
- Alam M, Merlo ME, The STREAM Consortium, Hodgson A, Wellington E, Takano E, Breitling R, **Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*,** 2010, *BMC Genomics*, **11**:202.
- Ali N, Herron PR, Evans MC, Dyson PJ, **Osmotic regulation of the *Streptomyces lividans* thiostrepton-inducible promoter, ptipA.** *Microbiology.* 2002, **148**(Pt 2):381-90.
- Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L, Bernaerts K, **Recombinant protein production and streptomycetes,** *J Biotechnol.* 2012 , **158**:159-67.
- Arjunwadkara SJ, Sarvananb K, Kulkarnia PR, Pandit AB, **Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor,** *Biochem Eng J,* 1998, **1**:99–106.
- Benz I and Schmidt MA: **Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria,** *Mol Microbiol,* 2002, **45**:267–276
- Bermek H, Gulseren I, Li KC, Jung HC, Tamerler C, **The effect of fungal morphology on ligninolytic enzyme production by a recently isolated wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27.** *World J Microbiol Biotechnol,* 2004, **20**:345–349.

- Betton JM, Chaffotte A, **Recombinant protein folding and production**. *Med Sci (Paris)* 2005; **21**:613-617
- Bibb M, **The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)**, *Microbiol*, 1996, **142**:1335-1344.
- . Bittorf KJ, Dickey DS, **Understand Flow Patterns in Glass-Lined Reactors**, *Chem engg prog*, 2004, , **100**:21-25
- Büchs J, **Introduction to advantages and problems of shaken cultures**, *Biochem Eng J*, 2001, **7**:91-98.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B,. **Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity**, *Biotechnol Bioeng*, 2000, **68**:594–601.
- Bushell ME, Dunstan GL, Wilson GC, **Effect of small scale culture vessel type on hyphal fragment size and erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea***. *Biotechnol Lett*, 1997, **19**:849–852.
- Butler M, **Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems**, *Cytotechnology*, 2006, **50**:57-76.
- Butler MJ, Aphale JS, Binnie C, DiZonno MA, Krygsman P, Soltes G, Walczyk E, Malek LT, **Cloning and analysis of a gene from *Streptomyces lividans* 66 encoding a novel secreted protease exhibiting homology to subtilisin BPN'**. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **45**:141–147.

- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J, **Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species**, *Int Microbiol*, 2000, **3**:3-8.
- Castanon-Arreola M, Lopez-Vidal Y, Espitia-Pinzon C, Hernandez-Pando R, **A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis**, *Tuberculosis*, 2005, **85**:115–126.
- Chanteau S, Rasolofo V, Rasolonavalona T, Ramarokoto H, Horn C, Auregan G: **45/47 kilodalton (APA) antigen capture and antibody detection assays for the diagnosis of tuberculosis**, *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000, **4**:377-83.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME, **Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation—investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture**, 1995, *Microbiology-UK*, **141**:663–669.
- Clincke MF, Guedon E, Yen FT, Ogier V, Roitel O, Goergen JL, **Effect of surfactant pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production, and glycosylation of human recombinant IFN-gamma in mild operating conditions**, *Biotechnol Prog*, 2011, **27**:181-190.
- Compan I, Touati D, **Anaerobic activation of arcA transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA**, *Mol Microbiol*, 1994, **11**:955-64.
- Córdova-Dávalos LE, **Glicosilación de proteínas en bacterias patógenas**, *El Residente*, 2009, **4**:105-110.
- Cui YQ, van der Lans RG, Luyben KC, **Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation**. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **57**:409-19.



- Dalgard CL, Lu H, Mohyeldin A, Verma A, **Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors**, *Biochem J*, 2004, Jun 1;380 (Pt 2):419-24.
- Dekker RFH, Barbosa AM, **The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp.** *Enzyme Microb Technol*, 2001, **28**:81–88.
- Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT, **Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis***, *J Bacteriol*, 1996, **178**:2498-506.
- Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT, **Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis***, *Infect Immun*, 1995 ;**63**:2846-53.
- Dobson L & O’Cleirigh C. **The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus***. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **79**:859-866.
- Durocher Y, Butler M, **Expression systems for therapeutic glycoprotein production**. *Curr Opin Biotechnol*. 2009, **20**:700-7.
- Espitia C, Espinosa R, Saavedra R, Mancilla R, Romain F, Laqueyrierie A, Moreno C, **Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens**, *Infect. Immun*, 1995, **63**:580–584.
- Espitia C, Servín-González L, Mancilla R **New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes**, *Mol. BioSyst*, 2010, **6**:775–781

- Espitia C., and Mancilla R, **Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens**, *Clin Exp Immunol*, 1989, **77**:378–383.
- Eunki K, Dong-Hoon S, Irwin D, Wilson DB, **Fed-batch production of *Thermomonospora fusca* endoglucanase by recombinant *Streptomyces lividans***, *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**:70-6.
- Fattorini L, Creti R, Nisini R, Pietrobono R, Fan Y, **Recombinant GroES in combination with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against *Mycobacterium avium* infection**, *J Med Microbiol*, 2002, **51**:1071–1079.
- Fazenda ML, Harvey LM, McNeil B, **Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum***, *J Microbiol Biotechnol*, 2010, **20**:844-51.
- Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, **A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice**. *Infect Immun*, 2004, **72**: 6945–6950.
- Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi-Blanco G, Rocha- Valadez JA, Serrano-Carreón L, **Production of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks**, 2004, *Biochem Eng J*, **18**:1–8.
- Galindo E, Pena C, Serrano-Carreón L, 2008. **Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero**, *Una ventana al quehacer científico*.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 12. Mexico, D.F..  
UNAM, 131-143.

Galindo E, Salcedo G, Flores C, Ramirez ME, **Improved shake flask test for the screening of xanthan-producing microorganisms**, *World Microbiol Biotechnol*, 1993, **9**:22–124.

Gamboa-Suasnavart RA & Trujillo-Roldán MA, **Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano**, *El Residente* IV Número **3**-2009, 87-91

Gamboa-Suasnavart RA, Valdez-Cruz NA, Córdova-Dávalos LE, Martínez-Sotelo JA, Servín-González L, Espitia C, Trujillo-Roldán MA, **The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flask**, *Microbial Cell Factories* 2011, **10**:110

García-Ochoa F, Gómez E, **Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview**, 2009, *Biotechnol Adv*, **27**:153-7.

Gawlitzeck M, Valley U, Nimtz M, Wagner R, Conradt HS, **Characterization of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions**. *J. Biotech.* 1995, **42**:117-31.

Gioffréa A, Echeverría-Valencia G, Arese A, Morsellac C, Garbacciob S, Delgado F, Zumárraga M, Paolicchic F, Cataldi A, Romano MI, **Characterization of the Apa antigen from *M. avium subsp. paratuberculosis*: A conserved *Mycobacterium* antigen that elicits a strong humoral response in cattle**, *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, **32**:199–208.

- Gómez R, Schnabel I, Garrido J, **Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger***, *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**:188–191.
- Goochee CF and Monica T, **Environmental effects on protein glycosylation**, 1990, *Nat Biotechnol*, **8**:421-7.
- Goto M, Akai K, Murakami A, Hashimoto C, Tsuda E, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Ishimoto A, Chiba H, Sasaki R, **Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein**, *Nat Biotechnol*, 1988, **6**: 67-71.
- Haurum J, Gemma A, Annemarie C, LeUouch S, Wong YC, Raymond A, Andrew J, Mc Michael, Elliott T, **Recognition of Carbohydrate by Major Histocompatibility Complex Class 1-restricted, Glycopeptide-specific Cytotoxic T Lymphocytes**, *J Exp Med*, 1994; **180**:739-744.
- Henzler HJ, Schedel M, **Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures**, 1991, *Bioprocess Eng.*, **7**:123–131.
- Hoft DF, Blazevic A, Abate G, Hanekom WA, Kaplan G, **A new recombinant Bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers**, *J Infect Dis*, 2008, **198**:1491–1501.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Laydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H, **Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual**, *John Innes Institute*, 1985.
- Horn C, Namane A, Pescher P, Rivière M, Romain F, Puzo G, Bâzu O, Marchal G, **Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of**

***Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern, *J Biol Chem*, 1999, **274**:32023-30.**

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S **Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model, *Proc Natl Acad Sci*, 2000, **97**:13853–13858.**

Hugmark G, **Power Requirements and Interfacial Area in Gas-Liquid Turbine Agitated Systems, *Ind. Eng. Chem. Process Des Dev*, 1980, **19**:638-641.**

Jenkins N, and Curling EM, **Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects, *Enzyme Microb Technol*, 1994, **16**:354-64.**

Jenkins N, Parekh RB, James DC, **Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry, *Nat Biotechnol*, 1996, **14**:975-981.**

Juarez P, and Orejas J, **Oxygen Transfer in a Stirred Reactor in Laboratory Scale, *Latin. American. App. Research*, 2001, **31**:433-439.**

Justen P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR, **Dependence of Mycelial Morphology on Impeller Type and Agitation Intensity, *Appl Microbiol Biotec*, 2008, **79**:859–866.**

Kagawa Y, Takasaki S, Utsumi J, Hosoi K, Shimizu H, Kochibe N and Kobata A **Comparative Study of the Asparagine-linked Sugar Chains of Natural Human Interferon Produced by Three Different Mammalian Cells, *J. Biol. Chem*, 1988, **263**:17508-15.**

- Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ, **Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis***, *Infect Immun*, 1999, **67**:1702–1707.
- Katzer W, Blackburn M, Charman K, Martin S, Penn J, Wrigley S, **Scale-up of filamentous organisms from tubes and shake-flasks into stirred vessels**. *Biochem Eng J*, 2001, **7**:127–134.
- Kieser T, Moss MT, Dale JW, Hopwood DA, **Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in "*Streptomyces lividans*"**, *J Bacteriol*, 1986, **168**:72-80
- Kim YM, Kim JH, Formation and dispersion of mycelial pellets of ***Streptomyces coelicolor* A3(2)**, *J Microbiol*, 2004, **42**:64-7.
- Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V, **The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model**, *Infect Immun*, 2003, **71**:1929–1937.
- Kunkel JP, Jan DCH, Jamieson JC, Butler M, **Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody**, 1998, *J Biotech*, **62**:55-71.
- Lambrecht, C. a. C. **A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium sp***, *Appl environ Microbiol*, 1988, **4**:910–916.
- Laqueyrierie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G, **Cloning, sequencing, and expression of the apa gene coding for the *Mycobacterium***

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

***tuberculosis* 45/47-kilodalton secreted antigen complex**, *Infect Immun*, 1995, **63**:4003-10.

Lara AR, Galindo E, Ramírez OT, Palomares LA, **Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells**, *Mol Biotechnol*, 2006, **34**:355-81.

Lara M, Servin-Gonzalez L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimitz M, Espitia C, **Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans***, *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**:679-685.

Lochlainn L, Caffrey P, **Phosphomannose isomerase and phosphomannomutase gene disruptions in *Streptomyces nodosus*: impact on amphotericin biosynthesis and implications for glycosylation engineering**, *Metab Eng*, 2009, **11**:40-7.

Lommel M, Strahl S. **Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans**. *Glycobiology*, 2009, **19**:816-28.

MacLeod AM, Gilkes NR, Escote-Carlson L, Warren RA, Kilburn DG, Miller RC Jr., ***Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi***. *Gene*, 1992, **121**:143–147.

Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J, **Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor***. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**:3877-3886.

Manya H, Suzuki T, Akasaka-Manya K, Ishida HK, Mizuno M, Suzuki Y, Inazu T, Dohmae N, Endo T, **Regulation of mammalian protein O-mannosylation:**

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**preferential amino acid sequence for O-mannose modification. *J Biol Chem.* 2007, **13**:282 .**

McDaniel LE & Bailey EG, **Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures**, *Appl Microbiol*, 1969, Feb:286-290.

McShane H, Pathan A, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, **Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med*, 2004, **10**:1240–1244**

Mehmood N, Olmos E, Goergen JL, Blanchard F, Ullisch D, Klöckner W, Büchs J, Delaunay S, **Oxygen Supply Controls the Onset of Pristinamycins Production by *Streptomyces pristinaespiralis* in Shaking Flasks**, *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**:2151-61.

Miller W, Wilke C, Blanch H, **Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. 1988, *Bioproc Eng* **3**:113**

Moens S, Vanderleyden J. **Glycoproteins in prokaryotes**, *Arch Microbiol*, 1997, **168**:169–175.

Murakami T, Holt TG, Thompson CJ, **Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans***, *J. Bacteriol*, 1989, **171**:1459-1466.

Nakashima N, Mitani Y, Tamura T, **Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins**, *Microb Cell Fact*, 2005, **4**:7.



- Namdev PK, Irwin N, Thompson BG, Gray MR, **Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation**, *Biotechnol Bioeng*, 1993, **15**:666-70.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, et al. **Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis**, 2009, *Vaccine* **27**:3267–3270.
- Olsvik, E. S. and B. Kristiansen, **Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth-rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth**. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **40**:1293-1299.
- Organización Mundial de la Salud, **Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing**, WHO Report 2011. 2011. Report No.: WHO/HTM/TB/2011.
- Ozturk SS, Palsson B, **Effect of dissolved oxygen on hybridoma growth, metabolism, and antibody production in continuous culture**, *Biotechnol. Prog*, 1990, **6**:437.
- Pacis E, Yu M, Autsen J, Bayer R, Li F, **Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform**, 2011, *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**:2348–2358.
- Pamboukian CR, Facciotti MC, **Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations**, *Braz J Chem Eng*, 2005, **22**:1.
- Payne GF, Delacruz N, Coppella SJ, **Improved production of heterologous protein from *Streptomyces lividans***, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **33**:395-400.

- Peña C, Campos N, Galindo E, **Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks**, 1997, *Appl Microbiol Biotechnol*, **48**:510–515.
- Peter C, Suzuki Y, Büchs J, **Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate**, *Biotechnol Bioeng*, 2006, **20**:1164-76.
- Restelli V, Wang MD, Huzel N, Ethier M, Perreault H, Butler M, **The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells**, *Biotechnol Bioeng*, 2006, **94**:481-94.
- Reuter G, Gabius HJ, **Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool?**, *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**:368-422.
- Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Riviere M, Puzo G, Barzu O, Marchal G, **Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses**, *Infect Immun*, 1999, **67**:5567-72.
- Rushton JH, Costich EW, Everett HJ, **Power characteristics of mixing impellers. Parts I and II**, 1950, *Chem. Eng. Pro*, **46**:395-404, 467-476.
- Sable SB, Cheruvu M, Nandakumar S, Sharma S, Bandyopadhyay K, Kellar KL, Posey JE, Plikaytis BB, Amara RR, Shinnick TM, **Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination**, *PLoS One*, 2011, **6**:22718.

- Sable SB, Verma I, Khuller GK, **Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, *Vaccine*, 2005, **23**: 4175–4184.**
- Sali M, Di Sante G, Cascioferro A, Zumbo A, Nicolo C, **Surface expression of MPT64 as a fusion with the PE domain of PE\_PGRS33 enhances *Mycobacterium bovis* BCG protective activity against *Mycobacterium tuberculosis* in mice, *Infect Immun*, 2010, **78**:5202–5213.**
- San KY, Bennett GN, Aristidou AA, Chou CH. **Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*, *Ann N Y Acad Sci*, 1994, **2**: 257-267.**
- Sandoval-Basurto E.A, Gosset G, Bolivar F, Ramirez OT, **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**:453-463.**
- Scherr N, Nguyen L, ***Mycobacterium* versus *Streptomyces*—we are different, we are the same, *Curr Opin Microbiol*, 2009, **12**:699–707.**
- Schweikart F, Jones R, Jatou JC, Hughes GJ, **Rapid structural characterisation of a murine monoclonal IgA alpha chain: heterogeneity in the oligosaccharide structures at a specific site in samples produced in different bioreactor systems, *J Biotechnol*, 1999, **15**:191-201.**
- Secott, T., Lin, T., Wu, C., 2001. **Fibronectin attachment protein orthologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, *Infect. Immun.* **69**:2075–2082.**

- Serrano-Carreón L, Salcedo G, Ramirez ME, Galindo E, **Kinetics and broth rheology evolution during xanthan production by *Xanthomonas campestris* cultured in shake flasks**, *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol*, 1995, **3**:67–73.
- Serrato JA, Palomares LA, Meneses-Acosta A, Ramirez OT, **Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures**, *Biotechnol Bioeng*, 2004, **20**: 176-188.
- Sheeley DM, Merrill BM and Taylor LCE, **Characterization of Monoclonal Antibody Glycosylation: Comparison of Expression Systems and Identification of Terminal Galactose**, *An. Biochem*, 1997, **247**:102-10.
- Strahl-Bolsinger S , Gentsch M, Tanner W, **Protein O-mannosylation**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, **1426**:297-307.
- Takahashi, Yamada, **Studies on the effect on some physical conditions on the submerged mold culture. Part II. On the two types of pellet formation in the shaking culture**, *J Agric Chem*, 1959, **38**, 707–710.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M, **Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions**, 1997, **83**:523–528.
- Trujillo-Roldán MA, Espitia C, **La prueba cutánea de hipersensibilidad aplicada en un parche. Nueva herramienta en el diagnóstico de la tuberculosis**, *El Residente*, IV, 2009, **3**:111-116.
- Tucker K.G, KellybbT, Delgrazia P, Thomas CR, **Fully automatic measurement of mycelial morphology by image analysis**, 1992, *Biotechnol. Prog.*, **8**: 353-359.

- Vallin C, Ramos A, Pimienta E, Rodriguez C, Hernandez T, Hernandez I, Del SR, Rosabal G, Van ML, Anne J, **Streptomyces as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins**, 2006, *Tuberculosis*, **86**:198-202.
- Van Keulen G, Alderson J, White J, Sawers RG, **The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress**, 2007, *Environ Microbiol*, **9**:3143-9.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S, **Pellet Formation and Cellular Aggregation in *Streptomyces tendae***, *Biotech Bioeng*, 1990, **35**:890-896.
- Visick JE, Clarke S. **Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins**, *Mol Microbiol*, 1995, **16**:835-45.
- Wehmeier S, Varghese AS, Gurcha SS, Tissot B, Panico M, Hitchen P, Morris HR, Besra GS, Dell A, Smith MC, **Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes**, *Mol Microbiol*, 2009, **71**:421-33.
- Wu Y, Woodworth JS, Shin DS, Morris S, Behar SM, **Vaccine-elicited 10-kilodalton culture filtrate protein-specific CD8(+) T cells are sufficient to mediate protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection**, 2008, *Infect Immun* **76**: 2249–2255.
- Yin j, Li g, Rena X, Herrler G, **Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes**, *J Biotechnol*, 2007, **127**:335–347.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

Yuan-Shuai L, Jian-Yong W, Kwok-Ping H, **Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures**, *Biochem Eng J*, 2006, **27**:331–335.

Yun SI, Yahya AR, Malten M, Cossar D, Anderson WA, Scharer JM, Moo-Young M, **Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans***, *Can J Microbiol*, 2001, **47**:1137-1140.

Zellweger JP, **Latent tuberculosis: which test in which situation?**, *Swiss Med Wkly*, 2008, **26**:31-7.

## APÉNDICE 1

Medios de cultivo

### **Luria Bertani Modificado**

Triptona 10g

Extracto de Levadura 5 g

NaCl 10 g

Sacarosa 34g/100 mL

Kanamicina 50 µg/mL

Agua destilada 950 mL

### **YT**

Triptona 16 g

Extracto de Levadura 10 g

NaCl 5 g

Agua destilada 1000 mL

### **MS**

Agar 1.5% & 50 mL

Manitol 20 g

Harina de soya 20 g

Disolver ambos en 500 mL de agua común

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Loading Buffer**

Tris-HCl 0.125 M

SDS 4%

Glicerol 20%

2-β Mercaptoetanol 10%

**Buffer TBS**

**Buffer TTBS**

2.42 g Tris-Hcl

1.0 mL Tween 20 en 1 L de TBS

3 g NaCl

Ajustar el pH a 7.6

**Buffer de Fosfatos (PBS)**

NaCl 0.8 g

KCl 0.2 g

NaHPO 1.44 g

KHHPO 0.24 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl

1000 mL agua Bidestilada

**Buffer Acetatos**

Buffer de acetatos 0.1 M pH 5.

- Solución A: ácido acético 0.2 M (5.8 mL/500mL).

- Solución B: acetato de sodio trihidratado 0.2 M (27.2g/1000mL).

Mezclar: 365 mL de A + 635 mL de B y aforar a 2 L.



**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Buffer de afinidad a conA**

Acetato de sodio 16.406 g

NaCl 116.88 g

MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.396 g

Azida de sodio 0.2 g

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.294 g

1000 mL agua Bidestilada

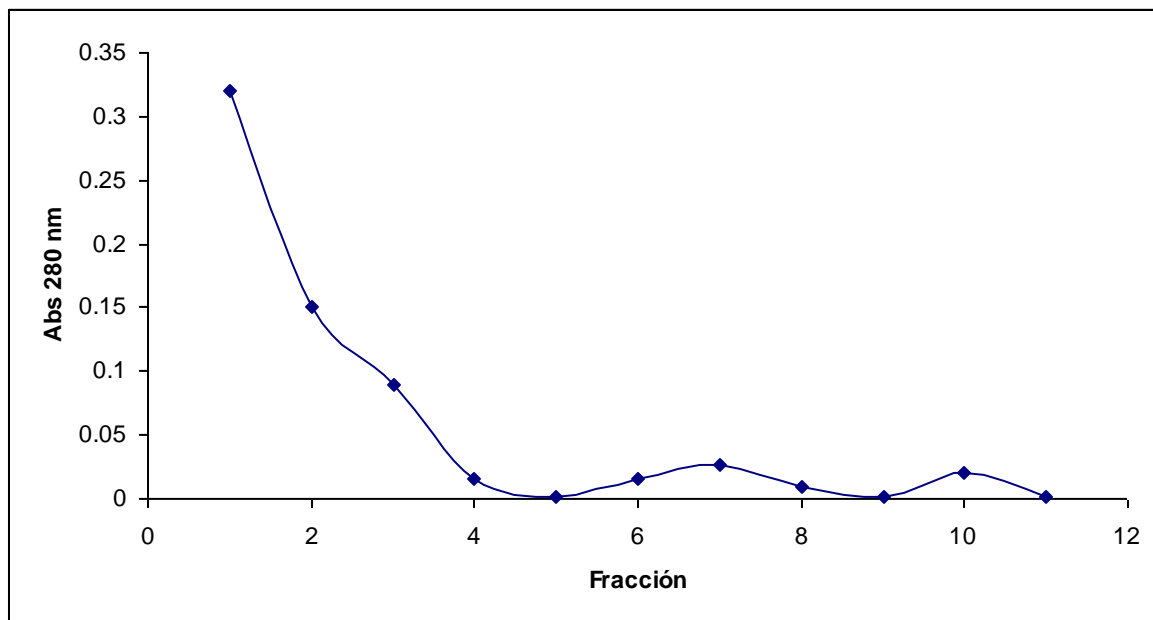
**Buffer de carbonatos 500 mM**

(NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> 1.6g en 40 mL de Agua

## APÉNDICE 2

Purificación de la proteína.

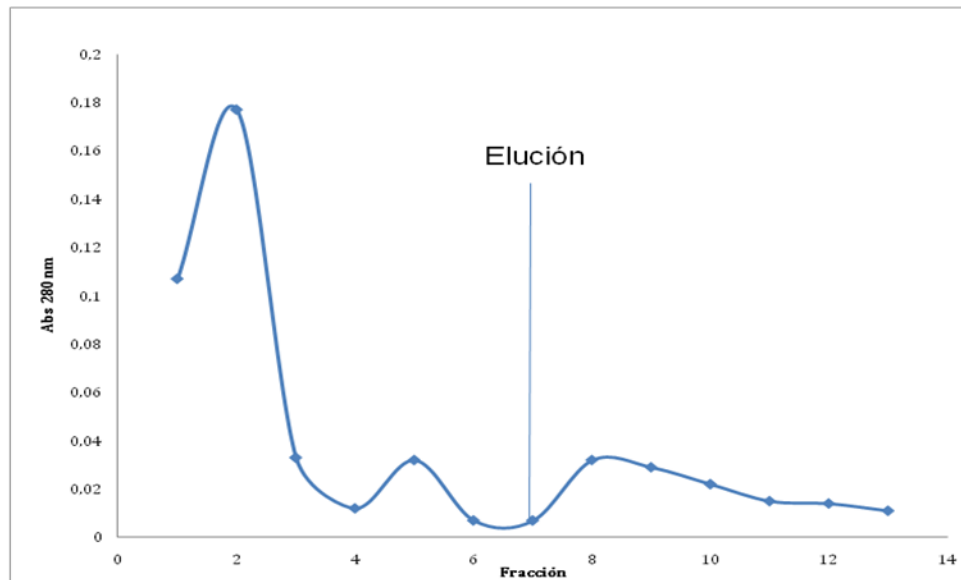
El cromatograma de la purificación de los cultivos a 10% se muestra en la Figura 26 en donde se observa que la fracción que tuvo mayor lectura de densidad óptica a 280 nm fue la número 7 con 0.027 unidades, si esto se correlaciona con el coeficiente de extinción molar de la proteína APA que es de 0.996, se obtiene una concentración de proteína aproximada de 0.027mg/mL.



**Figura 26.** Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 10% TOD. Muestra de tiempo final

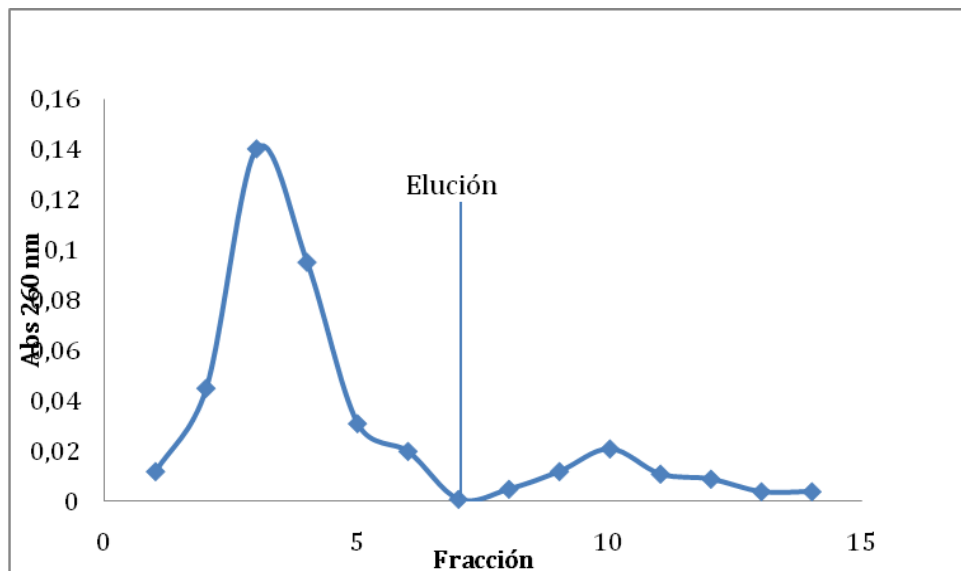
En la Figura 27 se presenta el cromatograma de purificación del cultivo a 25% TOD con la mayor absorbancia a 0.025 a 280 nm, lo cual corresponde a 0.024 mg/mL. En estos cultivos la degradación de proteína fue mayor, lo cual pudo haber disminuido la eficiencia de la purificación.

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 27.** Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 25% TOD. Muestra de tiempo final.

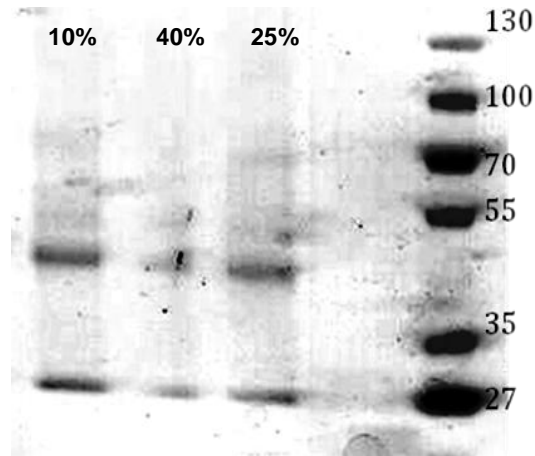
En los cultivos a 40% de TOD, la biomasa final se mantuvo similar a las obtenidas en los cultivos a 10% y 25%, resultando en 5.25 g/L en promedio, la producción de proteína total fue de 0.154 mg/mL, valor intermedio entre los cultivos a 10% y 25%. Sin embargo, si se puede observar una disminución en la productividad al aumentar el oxígeno disuelto.



**Figura 28.** Cromatograma de la purificación del cultivo en reactor a 40% >OD. Muestra de tiempo final.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

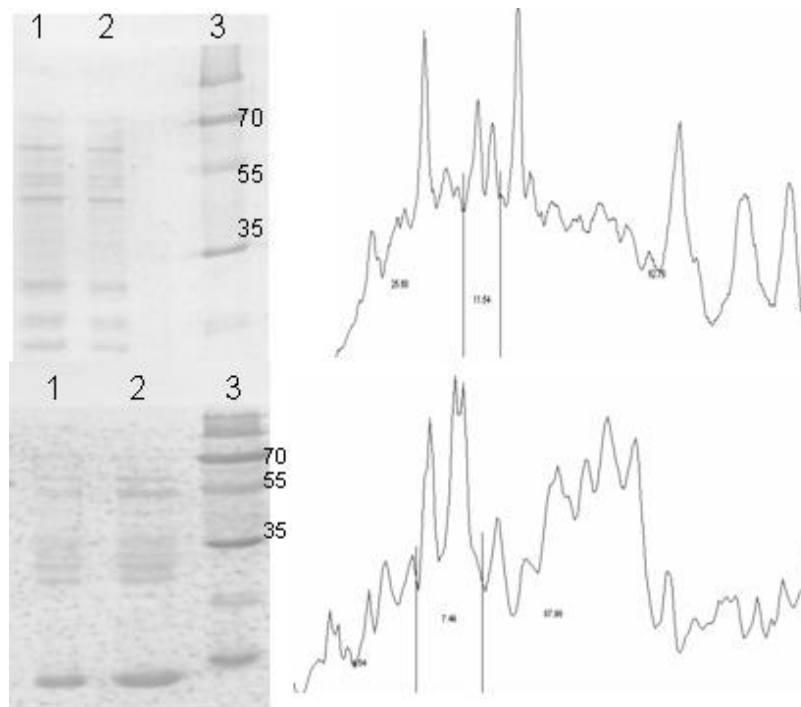
El gel correspondiente a las fracciones mas concentradas de cada purificación se presenta en la Figura 29, donde se observa mayor cantidad de proteína en los cultivos a 10% y disminuye a 25 y 40% TOD. De los cultivos a 0.5% TOD, no se recuperó proteína purificada, debido a la baja productividad.



**Figura 29.** SDS-PAGE de las fracciones de mayor concentración de las purificaciones de los cultivos a diferentes TOD%

Para determinar la cantidad de APA producida en los cultivos respecto a la proteína total, se llevo a cabo una densitometría de geles de poliacrilamida, los resultados se muestran en la Figura 30 y en la Tabla 15.

**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***



**Figura 30.** Densitometría de las electroforesis de proteína total en carriles 1 y 2, en 3 marcador de peso, de los cultivos a 10% (arriba) y 40% (abajo).

Corroborando lo observado en el Western Blot de la producción en biorreactores a diferente TOD (Figura 24), la producción aumenta en los cultivos a 10% TOD, y en cultivos con alto estrés oxidativo (Cabiscol *et al.*, 2004), la producción disminuye a la mitad. Los mismos resultados se observan con la prueba de Bradford. Sin embargo, estos datos no corresponden con los datos obtenidos en matraces agitados, en donde otro método de detección de proteína fue utilizado (BCA, Pierce USA).

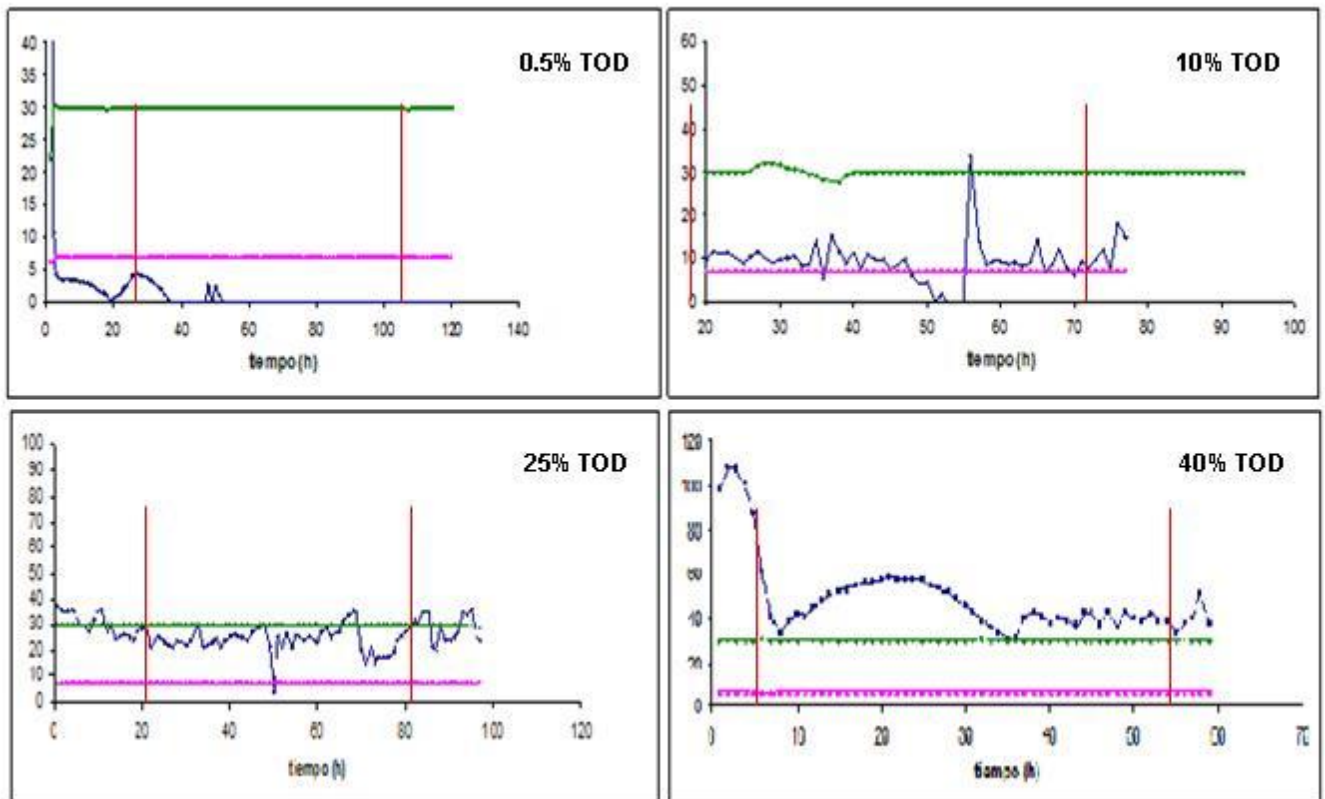
**Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans***

**Tabla 15.** Resultados de la densitometría de las electroforesis de la Figura 29.

	<b>Bradford (mg/mL) proteína total</b>	<b>%APA (mg/mL)</b>
<b>0.5 % TOD</b>	<b>0.095</b>	<b>ND</b>
<b>10 % TOD</b>	<b>0.323 ±0.057</b>	<b>10% (0.0323)</b>
<b>25% TOD</b>	<b>0.121 ± 0.032</b>	<b>8% aprox (0.096)</b>
<b>40% TOD</b>	<b>0.154 ± 0.045</b>	<b>8% (0.0154)</b>

En la Figura 31 se muestran los gráficos de control de los cultivos en biorreactor a diferente TOD. Es posible observar en cada gráfico, que el valor de TOD, se mantiene en promedio en el valor establecido para cada cultivo. Cabe mencionar que el control presenta mayores oscilaciones en las primeras horas, que corresponden a la fase de crecimiento exponencial, y en la fase estacionaria, hay mayor estabilidad en el control de TOD (a excepción del cultivo a 25% TOD, que presentó oscilaciones durante todo el cultivo). El control se llevó a cabo por mezcla de gases en un controlador Applikon 1030 (USA).

Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de glicosilación de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*



**Figura 31.** Gráficos de control de los cultivos a diferentes TOD y agitación constante 300 rpm. En línea verde el control de temperatura, en línea rosa el pH y en azul la TOD. Entre líneas rojas se indica el tiempo del cultivo.

**APÉNDICE 3**



RESEARCH

Open Access

# The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks

Ramsés A Gamboa-Suasnavart<sup>1,2</sup>, Norma A Valdez-Cruz<sup>2</sup>, Laura E Cordova-Dávalos<sup>2</sup>, José A Martínez-Sotelo<sup>3</sup>, Luis Servín-González<sup>2</sup>, Clara Espitia<sup>3</sup> and Mauricio A Trujillo-Roldán<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** The Ala-Pro-rich O-glycoprotein known as the 45/47 kDa or APA antigen from *Mycobacterium tuberculosis* is an immunodominant adhesin restricted to mycobacterium genus and has been proposed as an alternative candidate to generate a new vaccine against tuberculosis or for diagnosis kits. In this work, the recombinant O-glycoprotein APA was produced by the non-pathogenic filamentous bacteria *Streptomyces lividans*, evaluating three different culture conditions. This strain is known for its ability to produce heterologous proteins in a shorter time compared to *M. tuberculosis*.

**Results:** Three different shake flask geometries were used to provide different shear and oxygenation conditions; and the impact of those conditions on the morphology of *S. lividans* and the production of rAPA was characterized and evaluated. Small unbranched free filaments and mycelial clumps were found in baffled and coiled shake flasks, but one order of magnitude larger pellets were found in conventional shake flasks. The production of rAPA is around 3 times higher in small mycelia than in larger pellets, most probably due to difficulties in mass transfer inside pellets. Moreover, there are four putative sites of O-mannosylation in native APA, one of which is located at the carboxy-terminal region. The carbohydrate composition of this site was determined for rAPA by mass spectrometry analysis, and was found to contain different glycoforms depending on culture conditions. Up to two mannoses residues were found in cultures carried out in conventional shake flasks, and up to five mannoses residues were determined in coiled and baffled shake flasks.

**Conclusions:** The shear and/or oxygenation parameters determine the bacterial morphology, the productivity, and the O-mannosylation of rAPA in *S. lividans*. As demonstrated here, culture conditions have to be carefully controlled in order to obtain recombinant O-glycosylated proteins with similar "quality" in bacteria, particularly, if the protein activity depends on the glycosylation pattern. Furthermore, it will be an interesting exercise to determine the effect of shear and oxygen in shake flasks, to obtain evidences that may be useful in scaling-up these processes to bioreactors. Another approach will be using lab-scale bioreactors under well-controlled conditions, and study the impact of those on rAPA productivity and quality.

**Keywords:** Shake flasks, shear, oxygenation, APA 45/47 kDa, O-mannosylation, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces lividans*

\* Correspondence: maurotru@biomedicas.unam.mx

<sup>1</sup>Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México  
Full list of author information is available at the end of the article

## Background

*Mycobacterium tuberculosis* is the main bacterial pathogen causing latent infection in more than a third of the world population, and is also developing resistance to virtually every new drug used to treat tuberculosis, resulting recently in a global emergence of extensively drug-resistant tuberculosis [1-3]. At least 41 glycoproteins were identified in culture filtrates of *M. tuberculosis*, and most of them seem to play important roles in *M. tuberculosis* infection and host immune response [4-6]. Therefore, some of those glycosylated antigens are good candidates for vaccine development and improvement of diagnosis [6-9]. The first described mannosylated protein in Actinomycetes was the Ala-Pro-rich Antigen (also known as 45/47 kDa or APA protein) in *M. tuberculosis*, which is immunodominant [10-12]. The specific role of APA is not clearly defined; however, it is reported as an adhesin [13], as well as an antigen elicitor of lympho-proliferative responses and cytokine production [8]. It is worth of note, that the T cell response induced by APA is dependent of its glycosylation status specifically of the *O*-mannosylation of four of their threonines [14]. Particularly, Thr277 presents heterogeneity from none to three mannose units in native APA [11]. In addition, none to four mannose units were found in Thr277 of the rAPA produced in *S. lividans* [15].

Strains of *Streptomyces sp.* are well known as good producers of extracellular recombinant proteins; these strains also have the ability to glycosylate their own proteins, as well as heterologous proteins [15-22]. Recent studies in genetics and cell biology have revealed analogies between *Streptomyces sp.* and *Mycobacterium sp.*, both belonging to the phylum Actinobacteria [23]. Moreover, *S. lividans* allows the production, both in shake flasks [15] and in bioreactor [24], of large amounts of glycosylated rAPA suitable for biochemical studies and immunological assays. However, no detailed study of the effect of culture conditions on the productivity and *O*-glycosylation of rAPA has been reported.

On the other hand, probably more than 90% of submerged cultures for microbial research purposes are performed in shake flasks [25,26]. These studies are carried out due to their low cost, simplicity of operation and availability to do many experiments simultaneously [27,28]. Almost all the tasks, such as screening of strains, media optimization, strain development, elucidation of metabolic pathways, investigations of process conditions, and evaluation of fundamental growth kinetics are made in these vessels [27]. In shake flasks the momentum and heat transfer is influenced by the geometry of the rotating bulk liquid, that is the contact area between the liquid and the friction area, *i.e.* the flask inner wall (and indentations in baffled flasks, or the coiled stainless steel spring in flasks) [29]. On

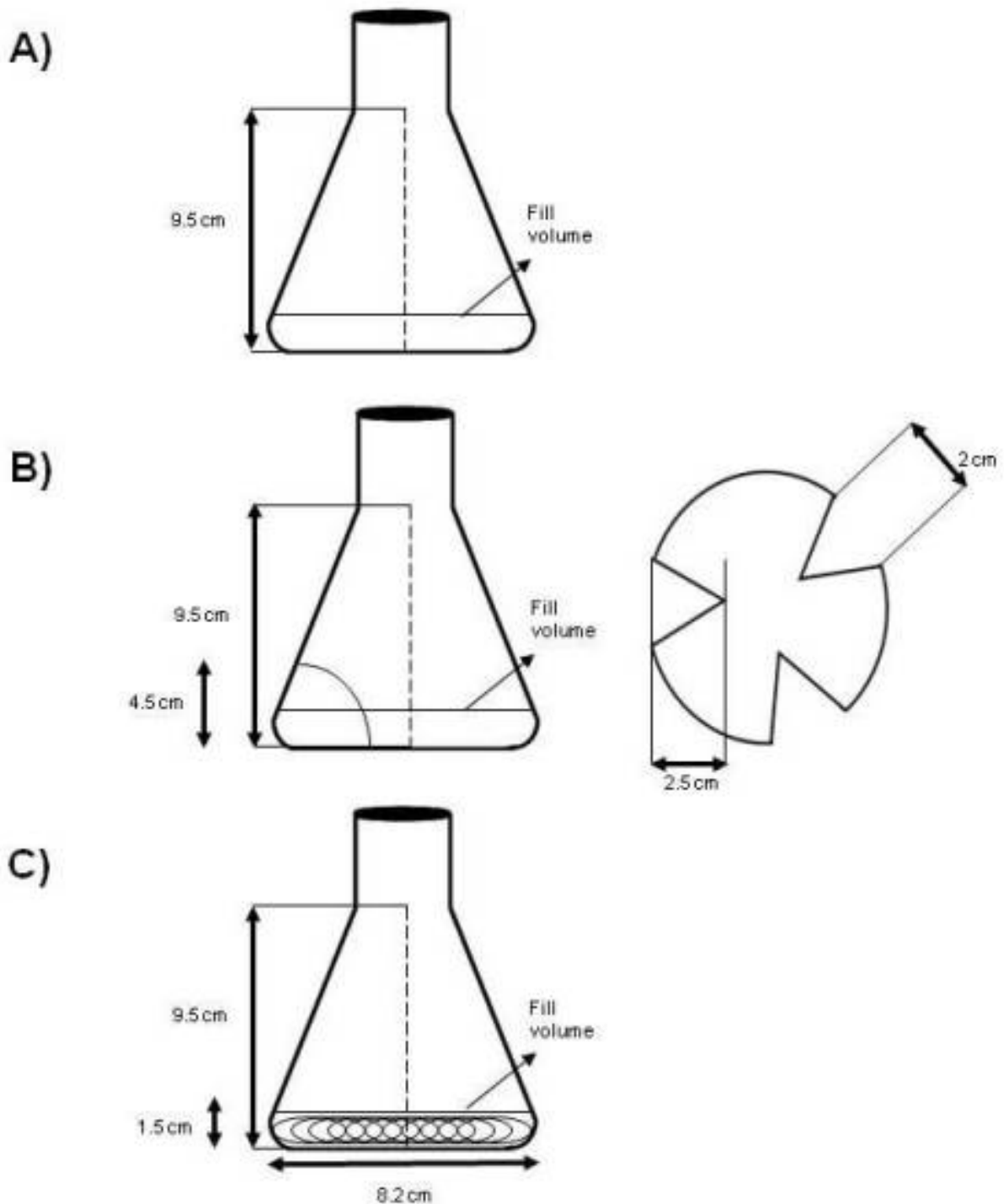
the other hand, the mass transfer (mainly oxygen) is influenced by the wet wall exposed to the surrounding air, this is the mass exchange area [29]. Modifications of shake flasks by the introduction of baffles and other enhancements (like stainless steel spring coils) are frequently necessary in order to provide sufficient aeration and shear stress [25,29,30]. In *S. lividans* cultures, coiled and baffled flasks are normally used [30-33], but no detailed study has been done on how the geometry of the flasks can affect recombinant protein production, and its *O*-glycosylation as a function of the morphology of the filamentous bacteria.

The purpose of this study was to evaluate the culture of *S. lividans* under three different shake flask geometries (conventional Erlenmeyer, baffled and coiled shake flasks, as shown in Figure 1), given different shear and oxygenation conditions, on the morphology of filamentous bacteria, their growth kinetics, and rAPA production and carbohydrate composition at the C-terminus. Furthermore, to our knowledge there are no reports regarding the influence of culture conditions on protein *O*-glycosylation by bacteria. However, there are some reports indicating modifications in the *N*-glycosylation pattern in recombinant proteins produced by eukaryotic cells due to variations in culture conditions [34-37].

## Results and Discussion

The effect of three different shear and oxygenation conditions using conventional, baffled and coiled shake flasks (Figure 1) on *S. lividans* growth, morphology, recombinant APA protein production and *O*-glycosylation was evaluated. Kinetics of bacterial growth is shown in Figure 2. The final biomass concentration was not affected significantly, being around 3.3 g/L dry weight, specifically,  $3.5 \pm 0.2$  g/L for coiled flasks and  $3.3 \pm 0.1$  g/L for conventional and baffled flasks. Moreover, the specific growth rate was not significantly different by Tukey HSD Test ( $p = 0.05$ ): in coiled shake flasks  $0.12 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup>, in baffled flasks  $0.11 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup>; and in conventional flasks  $0.10 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup>. Until differences in specific growth rates between baffled (or coiled), and conventional flasks were reported, a lag phase in conventional and baffled flasks were observed and comparing only the growth slopes, similar tendencies can be found [38]. A similar lag phase were observed in this work (figure 1), surely due to a germination of spores delay in conventional shake flasks.

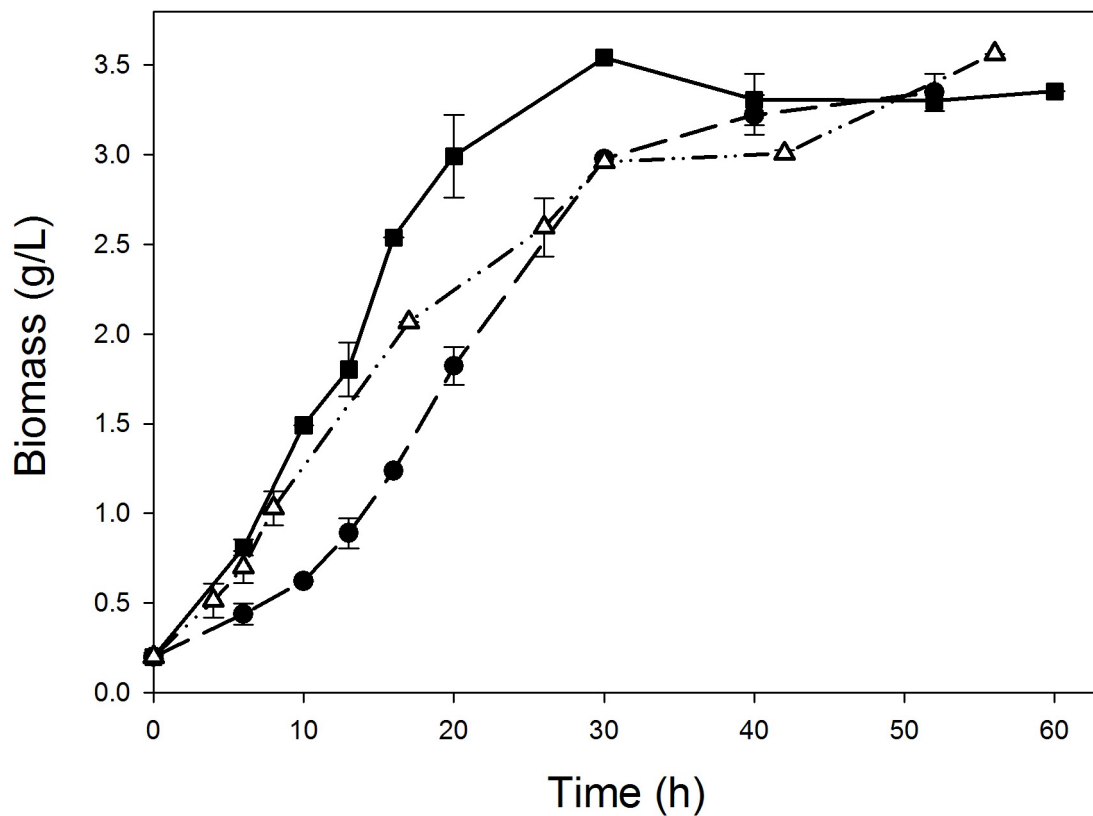
In order to determine the characteristics of mycelial aggregation, samples were taken at 60 h from each culture and fixed to avoid the loss of morphology. These samples were analyzed by microscopy (Figure 3), and the average diameter, area, perimeter, and roundness of each aggregate was determined (Table 1). The largest and roundest pellets, with diameters up to 1.0 mm, were



**Figure 1** Schematic diagrams of shake flasks used: A. Conventional Normal (NF); B. Baffled (BF); and C. Coiled shake Flasks (CF).

observed in conventional flasks; the smallest clumps, with diameters below 0.25 mm, were obtained in baffled and coiled shake flasks (Table 1, Figure 3). These morphological differences might be attributed to a greater power

input/oxygen transfer rate in coiled and baffled shake flasks than in conventional ones. Based on the equations reported by Büchs et al. [39,40], the volumetric power input ( $P/V$ ) for conventional shake flasks (250 ml, filled



**Figure 2** Kinetics of biomass growth of *S. lividans* producing rAPA from *M. tuberculosis*, in conventional (squares); baffled (triangles); and coiled (dots) shake flasks.

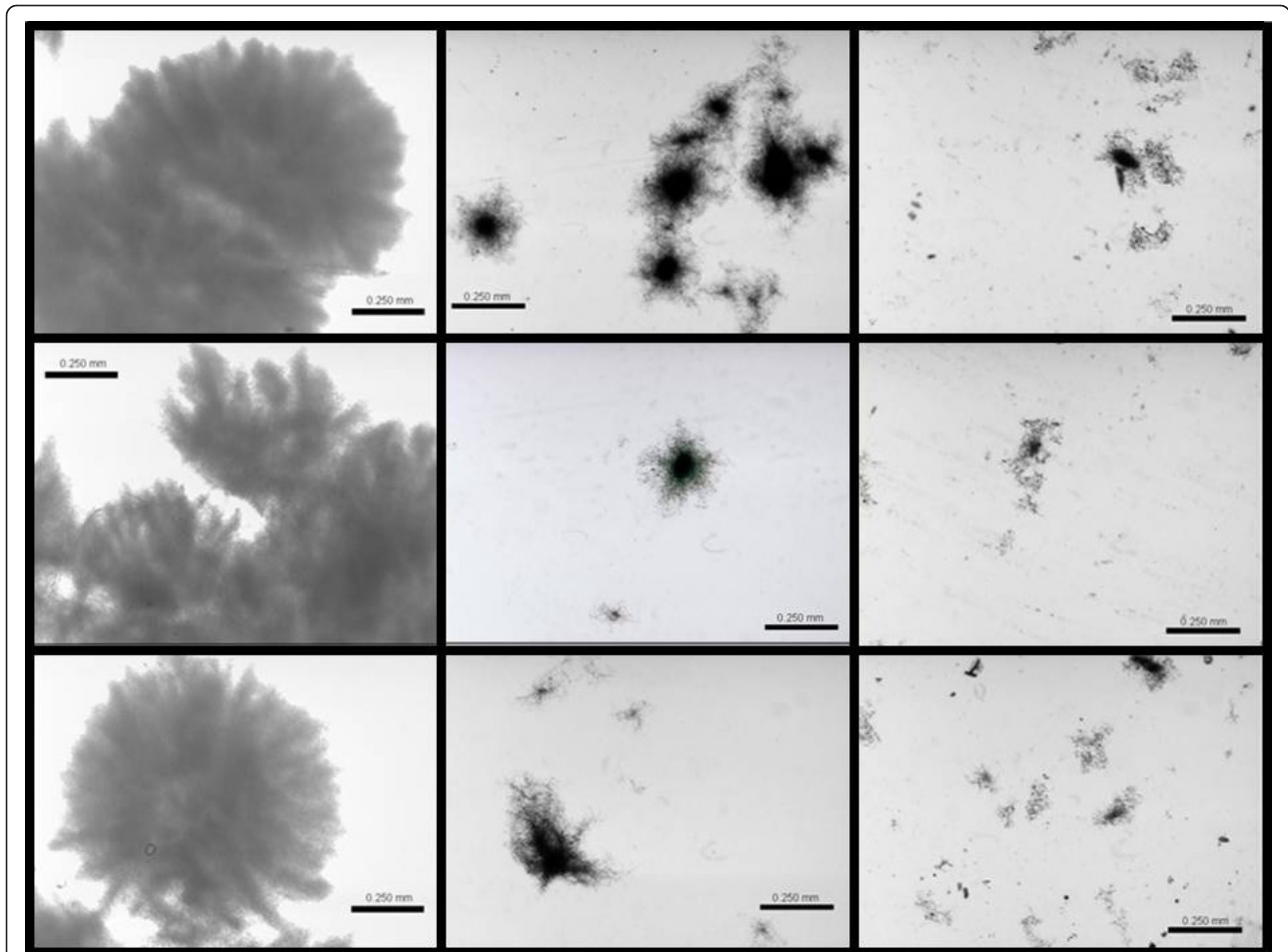
with 50 ml), at 150 rpm should be around 0.22 W/L, but the P/V for baffled shake flasks will be more than five times higher, calculated under similar conditions [39-41]. Currently, there are no equations reported for P/V in coiled shake flasks. However, since the size on the aggregates is not significantly different in coiled and in baffled flasks, then it would be expected that the power input in coiled flasks should be similar than in baffled flasks. It is worth mentioning that the power input supplied to shake flasks is directly related to the oxygen transfer rate (OTR) [42,43]. Then, it can be assumed that the OTR in baffled and coiled flasks is significantly higher than the OTR in conventional shake flasks. Based on the morphology data, between coiled and baffled shake flasks (Table 1), it can be assumed that shear and oxygenation conditions are higher in coiled and baffled flasks than in conventional normal flasks.

On the other hand, the larger pellets obtained in conventional flasks have a more rounded shape than the smallest clumps obtained in the other geometries. Although, no porosity measurements were carried out, the pellets can be seen to be very compact, which could bear the thought of nutritional and/or diffusional limitations within them [44], but not critical enough to affect

bacterial growth. Manteca et al. [45] observed that the centre of mycelium pellets can contain inactive cells, due to a rapid consumption of substrates (nutrients and/or oxygen) within the kernel of the pellets. However, Yun et al. [38] reported that mass transfer concerns were negligible in *S. lividans* growth, when pellets reach diameters around 2 mm, at least in terms of oxygen transfer [38,46]. Moreover, in *S. lividans* larger pellets some diffusional limitations might affect the internalization of the inducer, thus reducing recombinant protein production [38], total protein production [38] or the mechanisms involved in post-translational modifications of recombinant proteins [37,47].

#### Identification and quantification of rAPA produced in three flasks geometries

The total secreted proteins were analyzed by SDS-PAGE and densitometry, demonstrating that rAPA was produced after induction in all flasks but in different concentrations (Figure 4A). Densitometry analysis shows a higher production of total protein in coiled and in baffled flasks than in conventional flasks (Figure 4A) and confirmed using the BCA Protein Assay Kit obtaining  $4.02 \pm 0.08$  g/L in normal flasks and  $7.44 \pm 0.15$  g/L



**Figure 3** Representative mycelial morphology of *S. lividans* cultured A. Conventional Normal (NF); B. Baffled (BF); and C. Coiled shake Flasks (CF). (Bar indicates 250  $\mu$ m, 4X magnification).

in baffled and coiled flasks. Moreover, two characteristic bands were observed at 45 and 47 kDa, and recognized by mAb 6A3 in Western blots (Figure 4B) as previously reported in *S. lividans* cultures [15,24] and in *M. tuberculosis* secreted proteins [12,14,48]. Densitometry analysis of SDS-PAGE shows 3 times higher production of rAPA in coiled and in baffled flasks than in conventional flasks (Figure 4A). Those results correlated with the aggregation morphology, showing higher production in smaller pellets and lower production in the largest

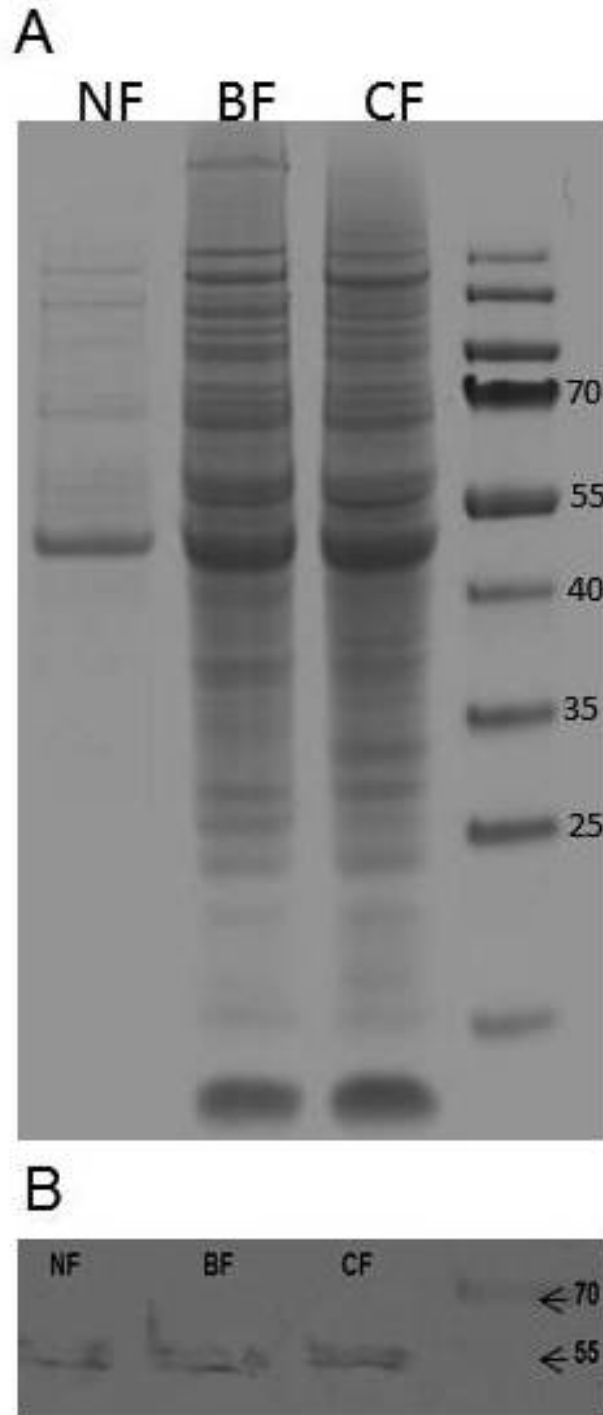
ones. Considering that there are no changes in the final biomass concentration, differences in total protein and in rAPA production can be attributed to the morphological variations, most probably caused by the dissimilar culture conditions inside the flasks, *i.e.* hydrodynamic and oxygen and nutrients transfer conditions.

#### Analysis of O-mannosylation in rAPA

O-linked glycans at the C-terminal region of rAPA were characterized. rAPA was purified and digested with

**Table 1** Morphological differences in cultures carried out in conventional Erlenmeyer normal (NF), baffled (BF), and coiled shake flasks (CF). Data are presented as average  $\pm$  standard deviation of image analysis of at least 100 clumps, mycelia or pellets for each sample, and at least 3 samples were analyzed for each flask. Values with the same superscript (a,b or c) are not significantly different by Tukey HSD Test ( $p = 0.01$ )

Shake flask	Area (mm <sup>2</sup> )	Diameter (mm)	Perimeter (mm)	Roundness (-)
Conventional	2.11 $\pm$ 1.22	1.57 $\pm$ 0.41	6.15 $\pm$ 2.32	1.51 $\pm$ 0.49
Baffled	0.04 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>	2.11 $\pm$ 0.67
Coiled	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	2.66 $\pm$ 0.98



**Figure 4** A. SDS-PAGE of total secreted proteins of Conventional Normal (NF), Baffled (BF) and Coiled shake Flasks (CF). B. Western blot of rAPA production by *S. lividans* in the shake flasks used.

LysC, producing at least eight peptides (Table 2). Native APA from *M. tuberculosis* shows in the N-terminal region 0 to 5 mannose residues that correspond to peptide 1, and in the C-terminal region 0 to 3 mannose

residues located in peptide 8 [10,11]. All peptides were analyzed by MALDI-TOF with special focus on P1 and P8. In Figure 5, a typical MALDI-TOF analysis for P8 for each shake flask is shown. In all cases P1 was

**Table 2 Theoretical peptides generated by LysC digestion of rAPA from *S. lividans***

Fragment	Cutting Position	Amino acid sequence	Peptide length	Mass (Da)
P1	106	DPEPAPPVPTTAASPPSTAA APPAPATPVAPPPAAANTP NAQPGDPNAAPPADPNAP PPVIAPNAPQPVRIIDNPVGG FFSALPAGWVESDAAHFDYG SALLSK	106	10310.439
P2	134	TTGDPPFPQPPPVANDTRI VLGRLDQK	28	2987.365
P3	145	LYASAEATDSK	11	1155.227
P4	188	AAARLGSDMGEFYMPYPGTR INQETVSLDANGVSGSASY EVK	43	4604.056
P5	194	FSDPSK	6	679.728
P6	234	PNGQIWTGVIGSPAANAPDA GPPQRWFVWVLTANNPVDK	40	4199.698
P7	238	GAAK	4	345.399
P8	286	ALAESIRPLVAPPAPAPAP AEPAPAPAPAGEVAPTPTTP TPQRTLPA	48	4624.317

detected, but only in its non glycosylated form, since peaks corresponding to the mannosylated P1 peptide could not be clearly detected. In the case of coiled and baffled shake flasks, P8 shows five mannose units attached (Figure 5B, and 5C) with a typical difference between each observed peak of 163 Da corresponding to a single mannose residues. However, in conventional flasks only two mannose units were found attached to the P8 peptide (Figure 5A). In contrast, Lara et al. [15] reported four mannose units in the C-terminal peptide digested by Glu-C in rAPA from *S. lividans*. However, *S. lividans* was cultured in 1.0 L conventional flask (filled with 250 mL of modified LB medium, 34% of sucrose). This variation could be due to different shear and/or oxygenation conditions in the 1.0 L conventional flask if compared with those conditions presented in 250 mL conventional Erlenmeyer flask.

Data from Figure 5 demonstrate that culture conditions (simulated by three different flasks geometries) can affect the *O*-mannosylation of rAPA produced in *S. lividans*. At least two different degrees of rAPA *O*-mannosylation can be obtained, but both are different from that reported by Lara et al. [15]. Putting together all the results, it can be assumed that under other culture conditions, other glycoforms might be obtained in *S. lividans* or in *M. tuberculosis*, respectively.

Those *O*-mannosylation particularities suggests to play an important function in antigenic roles, because changes in glycosylation patterns of rAPA, produced in different hosts, significantly affect the ability to stimulate T lymphocytes *in vivo* [14,48]. It will be interesting to evaluate the different *O*-glycoforms produced in the same host (*S. lividans*), using different culture conditions (either in shake flasks or in bioreactors), and compare them with the native protein immune response.

## Conclusions

The relationship between shear and morphology in filamentous bacteria has been widely studied. In this work, said relationship has been corroborated for *S. lividans*

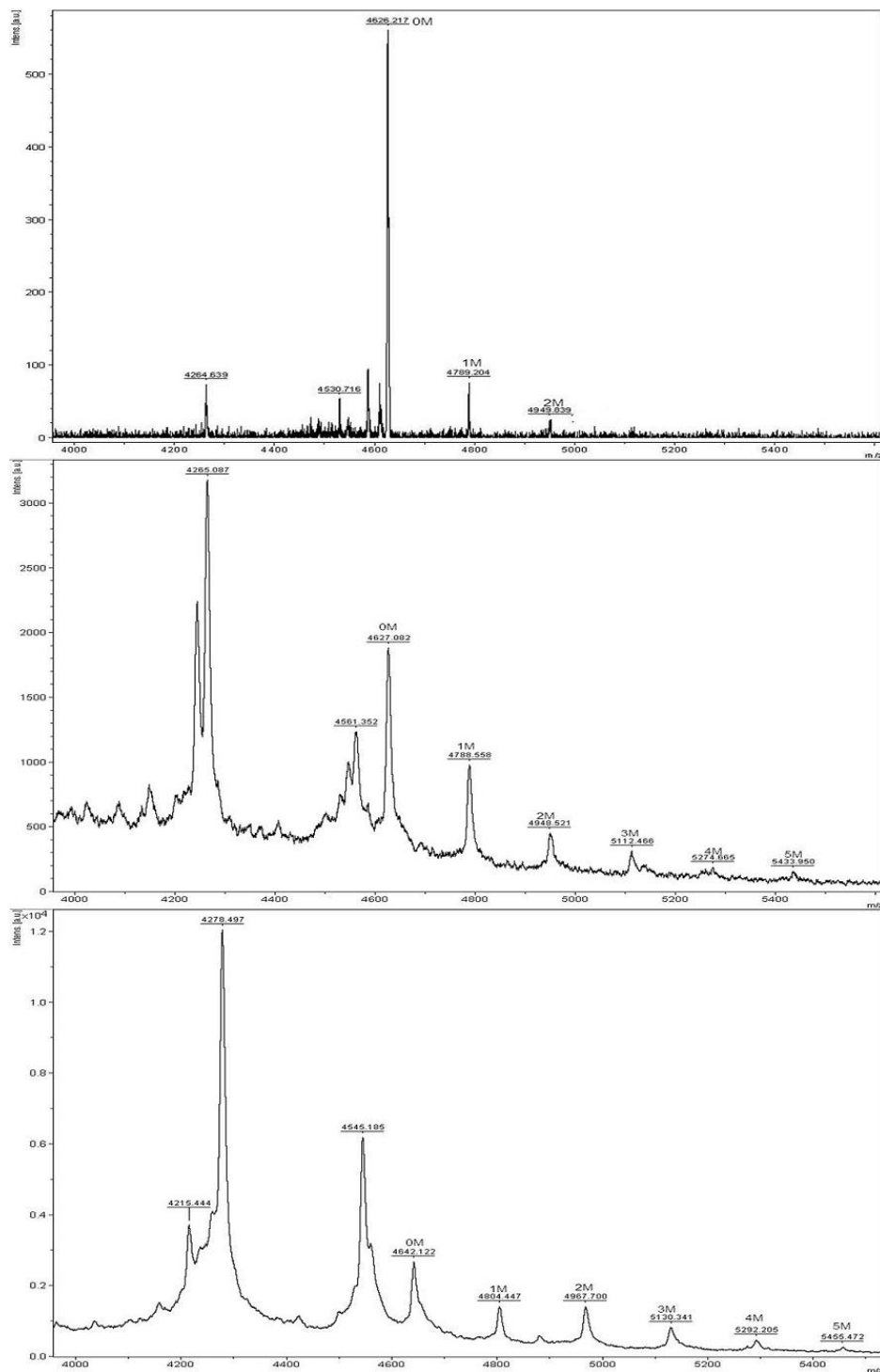
producing a recombinant glycoprotein. In addition changes in rAPA production and the degree of *O*-glycosylation, both related to morphology, were observed. The different conditions of shear and mass transfer provided by the three shake flask geometries resulted in changes in aggregation morphology. Although, there were significant roundness morphological differences between baffled and coiled shake flasks, but not differences in diameter, said differences were not sufficient to affect the production of rAPA and the degree of C-terminal *O*-mannosylation. However, the morphology of larger pellets obtained in conventional shake flasks causes a significant decrease in rAPA production and C-terminal peptide *O*-mannosylation.

To our knowledge, this is the first report indicating how culture conditions can affect the *O*-glycosylation degree in recombinant glycoproteins produced in prokaryotes. Here, a process to obtain at least two different degrees of *O*-mannosylation, using three different flask geometries, was described. A better understanding of how hydrodynamic forces and oxygen/nutrient transfer inside *S. lividans* aggregates modify the ability to *O*-glycosylate recombinant proteins can be useful in further production processes, with the possibility to manipulate the immunogenic properties. Then, it would be interesting to separately determine and quantify the effect of shear stress and oxygen transfer rates in shake flasks, wherein dissolved oxygen is not controlled, in order to have evidences that can be useful to scale-up the production to a bioreactor.

## Methods

### Microorganism and culture conditions

Wild type *S. lividans* 66 strain 1326 [32] was transformed with plasmid pIJ6021MT-45 carrying the *apa* gene under a thiostrepton-inducible promoter, and conferring resistance to kanamycin [15]. A master stock of 30 mL of spores in 20% glycerol was obtained, divided into aliquots, and kept at -20°C until use. To start cultures spores were pregerminated in 2XYT medium for 6 h at 37°C and 150 rpm [15]; the germinated spores were then



**Figure 5** MALDI-TOF analysis for the P8 C-terminal RAPA peptide generated by LysC digestion and obtained in **A. Conventional Normal (NF); B. Baffled (BF); and C. Coiled shake Flasks (CF)**. Numbers above each peak mean the number of mannose units linked to the peptide. At least three MALDI-TOF analyses were done at the end of each independent culture.

washed and sufficient spores were inoculated in order to obtain an optical density of 0.025 at 600 nm (measured in a Beckman DU730 spectrophotometer). Three

different shake flask geometries were tested (250 ml, filled with 50 ml of medium): Coiled Flask (CF), Baffled Flask (BF), and conventional Erlenmeyer Normal Flask



(NF), as is shown in Figure 1. Coiled flasks consist of conventional normal flasks with an inserted 30 cm stainless steel spring (1.3 cm diameter, 19 sw gauge) as previously described [32]. Culture medium was Luria-Bertani's medium with kanamycin (50 µg/mL) modified by addition of 34% w/v sucrose [15]. All cultures were carried out at 30°C and 150 rpm for 60 h, with addition of the inducer (thiostrepton 10 µg/mL) at 16 h of culture. Two flasks were removed at each kinetic data point for biomass, protein and image analysis.

#### **Analytical determinations**

Biomass was evaluated by dry weight; 10 mL of culture were filtered through a 0.45 µm pore size membrane (Millipore), and washed once with one volume of distilled water. The mycelium obtained was dried for 24 h in an oven at 55°C, then placed for 2 h in a desiccator, and weighed afterwards.

#### **Image analysis procedures**

A sample of 20 µL of culture broth was fixed using a formaline solution (10% v/v) in order to avoid the loss of the actual morphology in fresh samples. This sample was placed on a slide, and carefully covered with a cover slip. At least 100 clumps, mycelia or pellets were analyzed for each sample, and at least 3 samples were analyzed for each flask. 2D images were obtained by an image analysis system consisting of a CCD camera (Nikon Color, KP-D50) coupled to a microscope (Nikon Optiphot-2), or a CCD camera (Nikon KP-160) mounted to a stereomicroscope (Olympus SZ40), and a PC with the image analysis software (Image Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) installed in it [49]. The software reported the average diameter and the roundness to characterize the size of aggregates, as the main results. Average diameter is defined as the diameter of a perfect circle, having the same area as the object to be measured. Roundness describes the deviation of mycelial particles from a true circle. In large aggregates (from conventional shake flasks), images were first converted to monochrome and then these grayscale images were processed using a special algorithm for aggregates [50]. One-way ANOVA for independent and samples and pair-wise comparisons using Tukey HSD (Test for Post-ANOVA) were carried out in order to assess the morphological statistical differences between shake flask geometries. Analysis were done using Excel® (2007) and the "VassarStats: Website for Statistical Computation" available on-line of Vassar College, NY-USA (<http://faculty.vassar.edu/lowry/anova1u.html>).

#### **Purification of rAPA**

All cultures were centrifuged at 10,000 × g and the supernatant was filtered through a 0.45 µm membrane (Millipore). Ammonium sulfate was added to the culture

filtrate to 75% saturation and the precipitated proteins were recovered by centrifugation, suspended in PBS (Phosphate Buffered Saline; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) buffer, dialyzed against distilled water overnight, subsequently against an acetate buffer (Acetic acid 0.2 M, Sodium acetate 0.2 mM, pH 5.0) for 24 h, and finally against ConA binding buffer (Sodium acetate 0.1 M, NaCl 1.0 M, Mn<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O 1 mM, Sodium Azide 0.01% and CaCl<sub>2</sub>-2 H<sub>2</sub>O 1 mM) for 24 h. The ConA-binding protein (47-kDa protein) was separated by affinity chromatography on ConA-Sepharose column (Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*, Sigma-Aldrich), and eluted with the ConA binding buffer with α methyl-mannopyranoside 0.05 M.

#### **Protein identification and quantification**

Total protein was determined using the Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo-Pierce) from supernatant. Electrophoresis in 10% polyacrylamide gels containing SDS and subsequent immunoblotting procedures were carried out as previously described [15]. For Western blots, 100 µg of total protein in SDS-PAGE (10%) were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). Nonspecific binding was blocked with 5% (w/v) skim milk in PBS containing Tween 20 (0.05% v/v) for one hour. After that, membranes were washed with PBS Tween 0.05%. The primary antibody mAb6A3 was added in dilution 1:500 and incubated overnight at 4°C [15]. After three washes with PBS-Tween 20, the membranes were incubated with diluted peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 1:1000 (Sigma-Aldrich). After incubation, the blots were stained for peroxidase activity by adding 3,3-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich) in PBS and washed with tap water.

#### **Protein digestion**

The 45 and 47 kDa bands were excised and washed with water, destained with ammonium bicarbonate buffer (100 mM) with 50% methanol, dehydrated with acetonitrile (100%), and rehydrated with ammonium bicarbonate buffer (25 mM) containing enzyme Lys-C (Roche) in dilution 1:1000. Digests were incubated overnight at 37°C, 20 µL of Trifluoroacetic acid (TFA, 0.1%) were added to stop the reaction, and concentrated in a SpeedVac concentrator (Savant-Thermo) down to a volume of 20 µL.

#### **MALDI-TOF Analysis**

Masses were determined in a Bruker Microflex matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) equipped with a 20-Hz nitrogen laser at  $\lambda = 337$  nm. Spectra were recorded in reflector and/or linear positive mode for the mass range of 3800 - 6000 Da. 1.0 mL of

sample solution was mixed with 5 mL of 30% Acetonitrile, 70% Water, 0.1% TFA, and saturated with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid or sinapinic acid. Then, 1.0  $\mu$ L of this solution was deposited onto the MALDI target and allowed to dry at room temperature. At least three MALDI-TOF analyses were done at the end of each independent culture.

#### Acknowledgements

This work was partially financed by CONACyT grants 2533, 103214, 103393, and 104951-Z, CONACyT-INNOVAPYME 137854, and PAPIIT-UNAM IN-228509-3. RGS thanks the scholarship from CONACyT (316929). Authors thank Celia Flores, M. Sc. and Enrique Galindo, PhD. (Instituto de Biotecnología, UNAM), and Marisol Córdova, PhD. (Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM) for their technical assistance in image analysis. Authors thank Erendida Garcia, Chem. (Instituto de Química, UNAM) for MALDI-TOF analysis. Also, Authors thank Cristina Parada M.Sc. (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) and Prof. J. Büchs group (RWTH Aachen University) for technical assistance on protein purification and quantification. We also thank Ana Delgado for reviewing the English version of the manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup>Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México. <sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México. <sup>3</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

#### Authors' contributions

MATR, NAVC, LSG and CE conceived, supervised and coordinated this study. RAGS participated in the experimental design, carried all cultures. LECD and RAGS carried out the transformations and participated in master stock elaboration. JAMS and RAGS participated in protein purification and identification. RAGS and NAVC carried out the protein digestion and the interpretation of MALDI-TOF analysis. RAGS, MATR and NAVC drafted the manuscript, CE and LSG revised it critically and amended the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 October 2011 Accepted: 20 December 2011

Published: 20 December 2011

#### References

1. Dubrous P, Alaoui H, N'Dounga MB, Koeck JL: **Diagnosis of tuberculosis in developing countries: new perspectives.** *Med Trop (Mars)* 2009, **69**:618-628.
2. Van DA, Martin A, Palomino JC: **Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2010, **14**:131-140.
3. Getahun H, Ravigione M: **Transforming the global tuberculosis response through effective engagement of civil society organizations: the role of the World Health Organization.** *Bull World Health Organ* 2011, **89**:616-618.
4. Espitia C, Servín-González L, Mancilla R: **New insights into protein O-mannosylation in actinomycetes.** *Mol Biosyst* 2010, **6**:775-81.
5. Gonzalez-Zamorano M, Mendoza-Hernandez G, Xolalpa W, Parada C, Vallecillo AJ, Bigi F, Espitia C: ***Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-lectin affinity capture of mannosylated proteins.** *J Proteome Res* 2009, **8**:721-733.
6. Torrelles JB, Schlesinger LS: **Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host.** *Tuberculosis (Edinb)* 2010, **90**:84-93.
7. Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JE, Young DB: **Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*.** *EMBO J* 1996, **15**:3547-3554.
8. Kumar P, Amara RR, Challu VK, Chadda VK, Satchidanandam V: **The Apa protein of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates gamma interferon-secreting CD4+ and CD8+ T cells from purified protein derivative-positive individuals and affords protection in a guinea pig model.** *Infect Immun* 2003, **71**:1929-1937.
9. Sable SB, Cheruvu M, Nandakumar S, Sharma S, Bandyopadhyay K, Kellar KL, Posey JE, Plikaytis BB, Amara RR, Shinnick TM: **Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination.** *PLoS One* 2011, **6**:e22718.
10. Dobos K, Swiderek K, Khoo K, Brennan PJ, Belisle JT: **Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Infect Immun* 1995, **63**:2846-2853.
11. Dobos K, Khoo K, Swiderek K, Brennan P, Belisle J: **Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Bacteriol* 1996, **178**:2498-2506.
12. Espitia C, Espinosa R, Saavedra R, Mancilla R, Romain F, Laqueyrierie A, Moreno C: **Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens.** *Infect Immun* 1995, **63**:580-584.
13. Ragas A, Roussel L, Puzo G, Riviere M: **The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A.** *J Biol Chem* 2007, **282**:5133-5142.
14. Horn C, Namane A, Pescher P, Riviere M, Romain F, Puzo G, Barzu O, Marchal G: **Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern.** *J Biol Chem* 1999, **274**:32023-32030.
15. Lara M, Servin-Gonzalez L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C: **Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:679-685.
16. Aretz W, Koller KP, Riess G: **Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24.** *FEMS Microbiol Lett* 1989, **53**:31-35.
17. MacLeod AM, Gilkes NR, Escote-Carlson L, Warren RA, Kilburn DG, Miller RC Jr: ***Streptomyces lividans* glycosylates an exoglucanase (Cex) from *Cellulomonas fimi*.** *Gene* 1992, **121**:143-147.
18. Ong E, Kilburn DG, Miller RC Jr, Warren RA: ***Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*.** *J Bacteriol* 1994, **176**:999-1008.
19. Zirkle R, Ligon JM, Molnar I: **Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of *Sorangium cellulosum* So ce26 in *Streptomyces lividans*.** *Microbiology* 2004, **150**:2761-2774.
20. Alduina R, Giardina A, Gallo G, Renzone G, Ferraro C, Contino A, Scaloni A, Donadio S, Puglia AM: **Expression in *Streptomyces lividans* of *Nonomuraea* genes cloned in an artificial chromosome.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **68**:656-662.
21. Pimienta E, Ayala JC, Rodriguez C, Ramos A, Van ML, Vallin C, Anne J: **Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*.** *Microb Cell Fact* 2007, **6**:20.
22. Giardina A, Alduina R, Gottardi E, Di CV, Sussmuth RD, Puglia AM: **Two heterologously expressed *Planobispora rosea* proteins cooperatively induce *Streptomyces lividans* thiostrepton uptake and storage from the extracellular medium.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**:44.
23. Scherr N, Nguyen L: ***Mycobacterium* versus *Streptomyces*—we are different, we are the same.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:699-707.
24. Vallin C, Ramos A, Pimienta E, Rodriguez C, Hernandez T, Hernandez I, Del SR, Rosabal G, Van ML, Anne J: ***Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins.** *Tuberculosis (Edinb)* 2006, **86**:198-202.
25. Büchs J: **Introduction to advantages and problems of shaken cultures.** *Biochemical Engineering Journal* 2001, **7**:91-98.
26. Zimmermann HF, Anderlei T, Büchs J, Binder M: **Oxygen limitation is a pitfall during screening for industrial strains.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:1157-1160.

27. Gupta A, Rao G: **A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **84**:351-358.
28. Losen M, Frolich B, Pohl M, Buchs J: **Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures.** *Biotechnol Prog* 2004, **20**:1062-1068.
29. Büchs J, Maier U, Lotter S, Peter CP: **Calculating liquid distribution in shake flasks on rotary shakers at waterlike viscosities.** *Biochemical Engineering Journal* 2007, **34**:200-208.
30. Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Laydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H: *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual* John Innes Institute; 1985.
31. Kieser T, Moss MT, Dale JW, Hopwood DA: **Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in "*Streptomyces lividans*".** *J Bacteriol* 1986, **168**:72-80.
32. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA: **Practical *Streptomyces* Genetics.** John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, United Kingdom. 2000.
33. Kim MR, Choeng YH, Chi WJ, Kang DK, Hong SK: **Heterologous production of streptokinase as a secretory form in *Streptomyces lividans* and nonsecretory form in *Escherichia coli*.** *J Microbiol Biotechnol* 2010, **20**:132-137.
34. Serrato JA, Palomares LA, Meneses-Acosta A, Ramirez OT: **Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **88**:176-188, %20.
35. Nam JH, Zhang F, Ermonval M, Linhardt RJ, Sharfstein ST: **The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **100**:1178-1192.
36. Gawlitzeck M, Estacio M, Furch T, Kiss R: **Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells.** *Biotechnol Bioeng* 2009, **103**:1164-1175.
37. Pacis E, Yu M, Autsen J, Bayer R, Li F: **Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform.** *Biotechnol Bioeng* 2011.
38. Yun SI, Yahya AR, Malten M, Cossar D, Anderson WA, Scharer JM, Moo-Young M: **Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans*.** *Can J Microbiol* 2001, **47**:1137-1140.
39. Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B: **Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **68**:594-601.
40. Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B: **Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **68**:589-593.
41. Peter CP, Suzuki Y, Rachinskiy K, Lotter S, Buchs J: **Volumetric power consumption in baffled shake flasks.** *Chemical Engineering Science* 2006, **61**:3771-3779.
42. Maier U, Losen M, Buchs J: **Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks.** *Biochemical Engineering Journal* 2004, **17**:155-167.
43. Nikakhtari H, Hill GA: **Closure effects on oxygen transfer and aerobic growth in shake flasks.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **95**:15-21.
44. Cui YQ, van der Lans RG, Luyben KC: **Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **57**:409-419.
45. Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yague P, Sanchez J: **Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3877-3886.
46. Chang HN, Moo-Young M: **Estimation of oxygen penetration depth in immobilized cells.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1988, **29**:107-112.
47. Clincke MF, Guedon E, Yen FT, Ogier V, Roitel O, Goergen JL: **Effect of surfactant pluronic F-68 on CHO cell growth, metabolism, production, and glycosylation of human recombinant IFN-gamma in mild operating conditions.** *Biotechnol Prog* 2011, **27**:181-190.
48. Horn C, Pescher P, Romain F, Marchal G: **Characterization of murine monoclonal antibodies specific for the 45/47 kDa antigen complex (APA) of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and BCG.** *J Immunol Methods* 1996, **197**:151-159.
49. Lucatero S, Larralde-Corona CP, Corkidi G, Galindo E: **Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology.** *Biotechnol Prog* 2003, **19**:285-292.
50. Peña C, Reyes C, Larralde-Corona P, Corkidi G, Galindo E: **Characterization of *Azotobacter vinelandii* aggregation in submerged culture by digital image analysis.** *FEMS Microbiol Lett* 2002, **207**:173-177.

doi:10.1186/1475-2859-10-110

**Cite this article as:** Gamboa-Suasnavart *et al.*: The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories* 2011 **10**:110.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

