



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli*
PRODUCTORA DEL ANTÍGENO APA de *Mycobacterium*
***tuberculosis* POR INDUCCIÓN QUÍMICA EN CULTIVO**
CONTINUO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

MARÍA FERNANDA NAVA OCAMPO

MÉXICO, D.F.

2014





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

VOCAL: Dra. Aida Gutiérrez Alejandre

SECRETARIO: Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

1er. SUPLENTE: Dr. Luis Tonatihut Sánchez Linares

2° SUPLENTE: M. En I.Q. José Gabriel Tellez Romero

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

ASESOR DEL TEMA:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

SUSTENTANTE :

MARÍA FERNANDA NAVA OCAMPO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	6
2.2 Vector pET-15B	8
2.3 Operon lac	10
2.4 IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido)	11
2.5 Tallo de Histidinas	11
2.6 Cuerpos de Inclusión	11
2.7 Producción de proteínas recombinantes para la generación de una nueva vacuna y estuche diagnóstico para tuberculosis	12
2.8 Proteína APA	13
2.9 Bioingeniería y Bioprocesos	16
2.9.1 Crecimiento microbiano	16
2.9.2 Métodos de cuantificación de biomasa	18
2.9.3 Modelo cinético de Monod y la velocidad específica de crecimiento	18
2.10 Biorreactores	20
2.11 Tipos de Cultivo en Biorreactores	21
2.11.1 Cultivo en lote	21
2.11.2 Cultivo continuo	21
2.11.3 Cultivo en lote alimentado	24
3. HIPÓTESIS	28

4. OBJETIVOS	28
4.1 General	28
4.2 Particulares	28
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1 Cultivo en Biorreactor de 1 L	30
6.2 Determinación de biomasa por densitometría	30
6.3 Verificación de producción de proteína	31
6.3.1 Preparación de muestras	31
6.3.2 Dot Blotting	31
6.3.3 Electroforesis SDS-PAGE	32
6.3.4 Western Blotting (WB)	32
6.4 Proteómica	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Mantenimiento, control y crecimiento del cultivo continuo.	35
7.2 Verificación de producción de proteína recombinante a diferentes generaciones	37
7.3 Proteómica	40
8. CONCLUSIONES	46
9. PERSPECTIVAS	46
10. REFERENCIAS	47
11. ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales antígenos candidatos para generar una vacuna o kit diagnóstico reportados para Tuberculosis (Gamboa-Suasnavart, 2012)	14
Tabla 2	Secuencia peptídica de la proteína APA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein).	15
Tabla 3	Comparación de cada uno de los grupos con respecto al gel control y se indica el número de proteínas sobreexpresadas y con disminución en la expresión.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Plásmido pRARE que propociona una batería de tRNA no presente de manera natural en <i>E. coli</i> . Tomado de Novagen ©-Merck	7
Figura 2.2	A. Mapa del vector pET-15b productor para la proteína APA adaptado de Novagen©-Merck. B. Sitios de clonación/expresión del vector pET-15b (Novagen®)	9
Figura 2.3	Cuerpos de inclusión citoplásmicos de <i>E. coli</i> . Proveniente de un trabajo sin publicar de Trujillo-Roldán M.A.	10
Figura 2.4	Curva de crecimiento microbiano típica mostrando las diferentes fases en el desarrollo de un cultivo.	18
Figura 2.5	Representación gráfica del cultivo continuo. X_0 , biomasa inicial; S_0 , sustrato inicial; P_0 , presión a la entrada del biorreactor; F , flujo de entrada y salida del biorreactor; X , biomasa producida; S , sustrato; P , presión; V , volumen del biorreactor.	22
Figura 2.6	Representación gráfica del cultivo en lote alimentado	24
Figura 6.1	Fotografía tomada durante el proceso de crecimiento de <i>E. coli</i> productora del antígeno APA. Medio de Cultivo LB para alimentación al biorreactor (1), Biorreactor (2), Producto del reactor (<i>E. coli</i> productora del antígeno APA) (3), NaOH utilizada para control de pH (4), Captura de datos del controlador del biorreactor (5).	31
Figura 7.1	Gráficos de mantenimiento, control y crecimiento en cultivo continuo de <i>E. coli</i> en biorreactor. (A) Crecimiento de <i>E. coli</i> (izquierda) Generaciones totales (derecha); la densidad óptica promedio alcanzada fue de 5.09 u.a. a 600 nm. (B) TOD a lo largo del cultivo. (C) Agitación requerida para mantener una TOD a 30%. (D) pH y temperatura registrados en el proceso.	36
Figura 7.2	Dot blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo	38

anti-His (Sigma, EUA) 1:500. Muestras tomadas a diferentes tiempos (t), así como generaciones (g). (+) control positivo. (1) t=1137 h (g=47). (2) t=1396.5 h (g=55). (3) t=1469.5 h (g=59). (4) t=1566.5 h (g=64). (5) t=1682.5 h (g=67). (6) t=1804.5 h (g=72). (7) t=1852.5 h (g=74). (8) t=1897.5 h (g=77). (9) t=1948.5 h (g=78). (10) t=1996.5 h (g=81). (11) t=2044.5 h (g=85). (12) t=2137.5 h (g=87). (13) t=2281.5 h (g=94). (14) t=2329.5 h (g=96). (15) t=2377.5 h (g=98). (16) t=2452 h (g=101). (17) t=2498 h (g=104). (18) t=2617.5 h (g=110). (19) t=2668.5 h (g=114). (20) t=2783.5 h (g=120). (21) t=3142.5 h (g=152).

- | | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 7.3 | Dot Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma EUA) 1:500. (1) control positivo APA purificada de <i>E. coli</i> , (2) muestra a las 3647.5 h (175 generaciones), (3) muestra a las 4456.5 h (220 generaciones) y (4) muestra a las 4489.5 h (223 generaciones). | 38 |
| Figura 7.4 | Western Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma® USA) 1:500. (I) Muestra a las 986 horas (40 generaciones). (II) Muestra a las 1038 horas (41 generaciones). (III) Muestra a las 1106 horas (43 generaciones). (IV) Muestra a las 1129 horas (46 generaciones). | 39 |
| Figura 7.5. | Western Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma® EUA) 1:500. (1) Muestra a las 4456.5 h (220 generaciones). (2) Control positivo APA purificada de <i>E. coli</i> . (3) Muestra a las 4489.5 h (225 generaciones). | 39 |
| Figura 7.6 | Crecimiento de <i>E. coli</i> a lo largo del tiempo de cultivo donde (C) Muestra de biorreactor en lote previo a iniciar el cultivo continuo, (Grupo 1) grupo uno de muestras a los tiempos 1560 h (59 generaciones) y 1633 h (64 generaciones), (Grupo 2) grupo dos de muestras a los tiempos 2567 h (104 generaciones) y | 41 |

2603 h (110 generaciones), (Grupo 3) grupo tres de muestras a los tiempos 3876.5 h (191 generaciones) y 3954.5 h (200 generaciones).

Figura 7.7A	Proteómica de la muestra control tomada en el cultivo en lote, antes de comenzar la alimentación a la hora 8 del cultivo.	43
Figura 7.7B	Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 1469.5 h (59 generaciones) (B') y 1566.5 h (64 generaciones) (B''), donde se obtuvo el 43% de similitud (388 coincidencias) de spots entre ambas electroforesis. Los círculos rosas son las coincidencias	43
Figura 7.7C	Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 2498.5 h (104 generaciones) (C') y 2617.5 h (110 generaciones) (C''), donde se obtuvo el 55% de similitud (472 coincidencias) de spots entre ambas electroforesis. Los círculos rosas son las coincidencias	44
Figura 7.7D	Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 3817.5 h (191 generaciones) (D') y 3982.5 h (200 generaciones) (D''), donde se obtuvo el 46.2% de similitud (495 coincidencias) de spots entre ambas electroforesis. Los círculos rosas son las coincidencias	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo1		62
	TABLAS	
Tabla 1	Información general de los geles.	62
Tabla 1.1	Análisis de coincidencias de cada gel con respecto al gel control	62
Anexo 2		63
Anexo 3		64
Anexo 4		66
Anexo 5		68

Resumen

Durante varias décadas el biorreactor en cultivo continuo ha sido considerado uno de los mejores acercamientos de crecimiento bacteriano por su semejanza al comportamiento que se tiene de éstos en el ámbito natural. Se han realizado estudios utilizando como modelo el cultivo continuo, dando resultados positivos con respecto al crecimiento celular. Una de las principales características en el cultivo continuo es que mantiene constante el volumen del biorreactor, teniendo un flujo igual en la entrada de medio de cultivo como en la salida. Esto permite que la velocidad de crecimiento sea constante, manteniendo a su vez la concentración de sustrato constante y cercano al estado estable.

Con el objetivo de analizar el comportamiento adaptativo en cultivo continuo de *E. coli* recombinante, productora del antígeno APA de *M. tuberculosis*, en el presente trabajo se evaluó la producción de la proteína APA (Aline Proline rich Antigen o 45/47 kDa) de *M. tuberculosis* como proteína recombinante en *E. coli*. Dicha proteína es candidato para ser utilizada en la elaboración de una nueva vacuna y estuche diagnóstico para la tuberculosis.

La estrategia experimental utilizada inició con la puesta en marcha de un biorreactor continuo de 1 L, el cual se mantenía en constante alimentación de medio de cultivo Luria Bertani (LB) conteniendo 0.240 g/L (1 mM) de IPTG (β -D-tio-galactósido de isopropilo), 0.240 g/L (0.686 mM) de Ampicilina y 0.034 g/L (0.105 mM) de Cloranfenicol. Dicho biorreactor se encontraba bajo control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) por arriba del 30%, control de temperatura a $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y un pH arriba de 7.5.

Durante 220 generaciones (4456.5 horas) se observó producción de la proteína recombinante de interés APA por los métodos de inmunodetección utilizados. Además, la cepa *E. coli* Rosetta (DE3), hasta dicha generación, fue portadora del plásmido pET-15b conteniendo el gen de interés. Posterior a este tiempo ya no se logró apreciar la producción de la proteína APA dado que el plasmido pET-15b, el cual contiene la proteína recombinante, fue segregado por la bacteria. Existe una

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

alta probabilidad de que la segregación del plasmido haya ocurrido por una razón mecánica del proceso, debido a que durante aproximadamente 10 horas, la alimentación al bioreactor fue interrumpida por bloqueo en el suministro de nutrientes.

Se realizó electroforesis en una y dos dimensiones donde se observó que la producción de proteínas del hospedero no se mantenían constantes a lo largo del cultivo. En muestras tomadas en diferentes tiempos del cultivo, se observó que existía una producción diferencial de proteínas, a pesar de que, al ser un cultivo continuo, se esperaría una producción constante. Dichos resultados nos permiten discutir que no se obtiene un estado estable en el cultivo continuo.

1. Introducción

La expresión de proteínas heterólogas en microorganismos utilizando la manipulación genética es una herramienta muy utilizada y eficiente para la producción de productos biotecnológicos (**Kamionka, 2011; Liu et al., 2013; Habibi et al., 2014**). El reto para la producción de proteínas en 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 (**Yin et al., 2006; Habibi et al., 2014**). La variedad de modelos 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; Kamionka, 2011**).

Para el año 2012, existían más de 151 proteínas heterólogas para uso terapéutico en diferentes situaciones clínicas, aprobadas por la FDA (Administración de comida y fármacos, por sus siglas en inglés) y/o por la Agencia Europea de Medicinas (**Huang et al., 2012**). La glicoproteína APA (Aline Proline rich Antigen) de 45/47 kDa es un antígeno secretado por *Mycobacterium tuberculosis*, el cual ha sido reportado como de alto nivel inmunogénico asociado a su patrón de glicosilación y es un candidato para generar una nueva vacuna y estuche diagnóstico para esta enfermedad (**Gamboa-Suasnavart et al., 2013**). Esta glicoproteína se encuentra en *M. tuberculosis* como una adhesina (**Ragas et al., 2007; Nandakumar et al., 2013**) es secretado como antígeno inmunodominante (**Coddeville et al., 2012; Carlétti et al., 2013**) y es un antígeno prominente en la respuesta inmune humoral y celular (**Dobos et al., 1996; Benz y Schmidt, 2002**).

Cerca del 30% de las proteínas heterólogas aprobadas para uso terapéutico son producidas en *Escherichia coli* (**Huang et al., 2012**). *E. coli* es una bacteria que ha sido estudiada ampliamente y utilizada desde hace varias décadas para la sobreproducción de proteínas recombinantes. *E. coli* Rosetta (DE3) es una de las cepas de esta bacteria que ha sido manipulada específicamente para sobre

producir proteínas recombinantes (**Jovanovic et al., 2014**). Dicha cepa es la que se utiliza en el presente trabajo para la producción de la proteína recombinante APA en cultivo continuo.

El cultivo continuo provee condiciones ideales para el estudio de producción de los microorganismos (**van Heerden y Nicol, 2013**). La producción en cultivo continuo tiene ventajas sobre la producción en cultivo en lote y cultivo en lote alimentado ó semilote, ya que las altas productividades reducen los gastos de capital y las operaciones prolongadas reducen los costos de operación (**van Heerden y Nicol, 2013**).

La teoría del cultivo continuo se inició en 1950 con Monod, Novick y Herbert, quienes utilizaron las bases matemáticas necesarias y las bases de un cultivo continuo para poder realizar dicha teoría: “Cuando la estabilidad de un cultivo en continuo se alcanza, la velocidad de dilución (D) es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ)” (**Drake y Brogden, 2002; Lüdecke et al., 2014**). Para obtener D es necesario que se tenga un flujo (F) de entrada y de salida igual para que el volumen del cultivo (V) se mantenga constante, obteniendo la velocidad de dilución de la siguiente manera: $D = F/V$ (**Lüdecke et al., 2014**). El tiempo de generación (T) del microorganismo requerido para una densidad constante en el fermentador es $T = \ln 2/D$. (**Lüdecke et al., 2014**). Se ha demostrado que al realizar el cultivo continuo, las proteínas de la pared celular se sobreexpresan y responden al estímulo ambiental en forma similar a las células en condiciones naturales (**Drake y Brogden, 2002; Flickinger, 2013**).

Cuando el cultivo continuo se encuentra en su fase exponencial, también puede ser llamado quimiostato, que es cuando la velocidad de dilución y la velocidad específica de crecimiento son iguales. Al mantener la velocidad de crecimiento específica constante, las condiciones del cultivo permanecen estables (**Kuenen y Johnson, 2009; Folsom et al., 2014**).

Previamente, se ha reportado la producción de la proteína recombinante APA en cultivos en lote en *Streptomyces lividans* (**Vallin et al., 2006; Gamboa-**

Suasnavart et al., 2011, 2013; Marín-Palacios et al., 2014). Por lo que es necesario realizar estudios detallados de condiciones y estrategias de cultivo, entre ellas el cultivo continuo, que permitan obtener la proteína con la calidad deseada para la generación de una nueva vacuna o la generación de un estuche diagnóstico para tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad causada por *M. tuberculosis*. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, esas personas están infectadas por el bacilo pero (aún) no presentan síntomas ni pueden transmitir la infección (**WHO, 2014**). La infección de tuberculosis está caracterizada por una compleja respuesta inmunológica, por lo que se hace difícil tratarla y controlarla (**Luca y Mihaescu, 2013**). La primera vacuna contra la tuberculosis fue creada en 1921, la cual era una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* conocida como Bacilo Calmette-Guerin (BCG) (**Calmette, 1930**). Sin embargo, a pesar de ser una enfermedad infecciosa aerotransmisible tratable, siguen existiendo 2 millones de muertes por año (**Luca y Mihaescu, 2013**). Dadas las estadísticas, es necesario encontrar alternativas al diagnóstico con el motivo de que dichas cifras sean disminuidas.

En este proyecto, se plantea el uso de *E. coli* Rosetta (DE3) como modelo en la producción de la proteína recombinante APA de *M. tuberculosis*. La cepa se hizo crecer en un biorreactor en cultivo continuo de 1L con control de oxígeno disuelto y temperatura. Se tomaron muestras cada 50 horas, que posteriormente fueron analizadas por métodos de inmunodetección. La gran utilidad de la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) consiste en que es derivada de la cepa BL21 y está manipulada para mejorar la expresión de proteínas recombinantes que contienen codones raramente utilizados en *E. coli*. Dicha cepa porta una copia cromosómica de la T7 RNA polimerasa del fago λDE3 bajo control del promotor lacUV5, mejorando la expresión de proteínas recombinantes, como la proteína de estudio APA de *Mycobacterium tuberculosis*, contenidas en vectores que aportan el promotor T7 (**Tabor y Richardson, 1985; Nilsen et al., 2013**).

2. Antecedentes

2.1 Proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

Las proteínas han sido consideradas entidades terapéuticas desde inicios del 1900, cuando la mayoría de éstas se obtenían directamente de animales y plantas (Huang et al., 2012; Rosano y Ceccarelli, 2014). La técnica de proteínas recombinantes es actualmente muy utilizada para obtener grandes cantidades de proteína (Yee y Blanch, 1992; Aldor et al., 2005; Babaeirpuor et al., 2008; Rosano y Ceccarelli, 2014; Wyre y Overton, 2014). En 1982, Eli Lilly sacó al mercado la primera proteína recombinante siendo esta la insulina humana (Morris, 2014).

Las proteínas heterólogas recién sintetizadas pueden localizarse dentro de la bacteria (citoplasma y periplasma) o bien secretarse al medio externo (Choi et al., 2006; Rosano y Ceccarelli, 2014). La secreción ocurre en muy bajos niveles y es dirigida por fenómenos tales como: debilitamiento de la pared y membrana celulares por métodos físicos o químicos, utilización de la porina OmpF o sistema de transporte de hemolisina (Choi et al., 2006; Wyre y Overton, 2014). La localización periplásmica se ve favorecida con el uso de señales incluidas en el vector tal como PelB, OmpA, endoxilanasas, PhoA, entre otros (Choi et al., 2006; Rosano y Ceccarelli, 2014).

En 1970, se demostró que las proteínas recombinantes para uso terapéutico pueden ser producidas en *E. coli* de una manera económica y robusta (Huang et al., 2012). Por ejemplo, *E. coli* B fue manipulada y obtenida primero por Studier y Moffatt (1986), y ha sido una cepa modelo para estudiar la sensibilidad de los fagos, sistemas de restricción y modificación, evolución bacteriana y expresión de proteínas recombinantes tanto a nivel laboratorio como en la industria biotecnológica (Studier y Moffatt, 1986; Huang et al., 2012). Desde entonces se han creado diferentes cepas de *E. coli*, las cuales han logrado que se produzcan bajos niveles de acetato aún teniendo alto nivel de glucosa, alta permeabilidad de

la membrana y deficiencias específicas de proteasas (Ray et al., 1993; van de Walle y Shiloach, 1998; Terpe, 2006; Wyre y Overton, 2014). Recientemente, un gran número de proteínas han sido expresadas en *E. coli* con una alta productividad debido al rápido desarrollo de la ingeniería genética (Gopal y Kumar, 2013). Además, la secreción de las proteínas recombinantes en el espacio extracelular de *E. coli* presenta ventajas como una purificación más simple y protección de la degradación proteolítica (Velur Selvamani et al., 2014). *E. coli* es el hospedero más utilizado (Gopal y Kumar 2013).

La cepa *E. coli* Rosetta (DE3) contiene el plásmido pRARE (figura 2.1) con información para ARN de transferencia poco frecuentes (proL, leuW, argW, glyT, argU e ileX), replicación autónoma (P15Aori) y resistencia a cloranfenicol (*Cam*). DE3 hace referencia a que esta cepa porta una copia cromosomática del gen que codifica la RNA polimerasa T7 del fago λ DE3 bajo control del promotor lacUV5. El gen previamente mencionada se vuelve más eficaz y veloz cuando se asocia a su promotor propio T7 que la propia polimerasa de la bacteria (Tabor y Richardson, 1985).

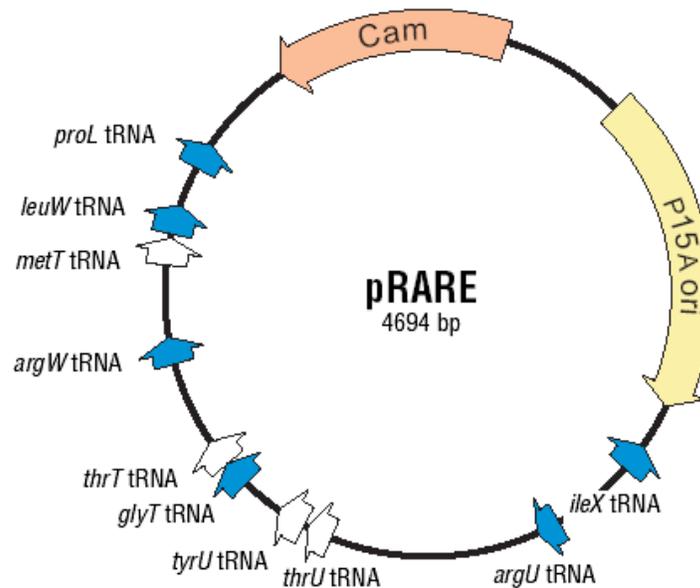


Figura 2.1 Plásmido pRARE que proporciona una batería de tRNA no presente de manera natural en *E. coli*. Tomado de Novagen ©-Merck (<http://www.merck-chemicals.com.mx>)

2.2 Vector pET-15b

El sistema pET es un sistema desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En estos vectores los genes objetivo son clonados bajo el control del promotor T7, además de los genes de interés el sistema pET cuenta con el gen de la RNA polimerasa T7, inducido por IPTG, para asegurar su presencia en la célula hospedera. (http://www.merckmillipore.com.mx/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab?PortalCatalogID=merck4biosciences&CountryName=Mexico). El sistema pET cuenta con 42 tipos de vector y 15 diferentes líneas hospederas (**Novagen®**).

El vector pET-15b (figura 2.2A) posee una señal His•Tag®, la cual será añadida a la proteína en el N-terminal (extremo de proteína que finaliza con un aminoácido que posee un grupo amina libre) para facilitar la purificación, seguida por un sitio de trombina (el sitio catalítico que confiere a la molécula su propiedad de serina proteasa, donde se fija el sustrato) y tres sitios de clonación (Figura 2.2B) (**Novagen®**). El vector pET-15 b tiene el gen de resistencia a Ampicilina (**ADDGENE, 2014**). Una cantidad relativamente pequeña de RNA polimerasa T7 es suficiente para obtener una amplia transcripción de los genes bajo el control del promotor T7 en un plásmido multicopias (**Studier y Moffatt, 1986; Rio, 2013; Nilsen et al., 2013**). La transcripción puede recorrer varias veces el plásmido sin que se termine, opacando la actividad de la RNA polimerasa bacteriana (**Studier y Moffatt, 1986; Nilsen et al., 2013**). Es probable que el mRNA de la proteína recombinante, sature rápidamente la maquinaria traduccional de *E. coli*, de modo que la velocidad de síntesis de proteína, a partir del mRNA, dependerá principalmente en la eficiencia de la traducción (**Studier y Moffatt, 1986; Bae et al., 2013**).

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

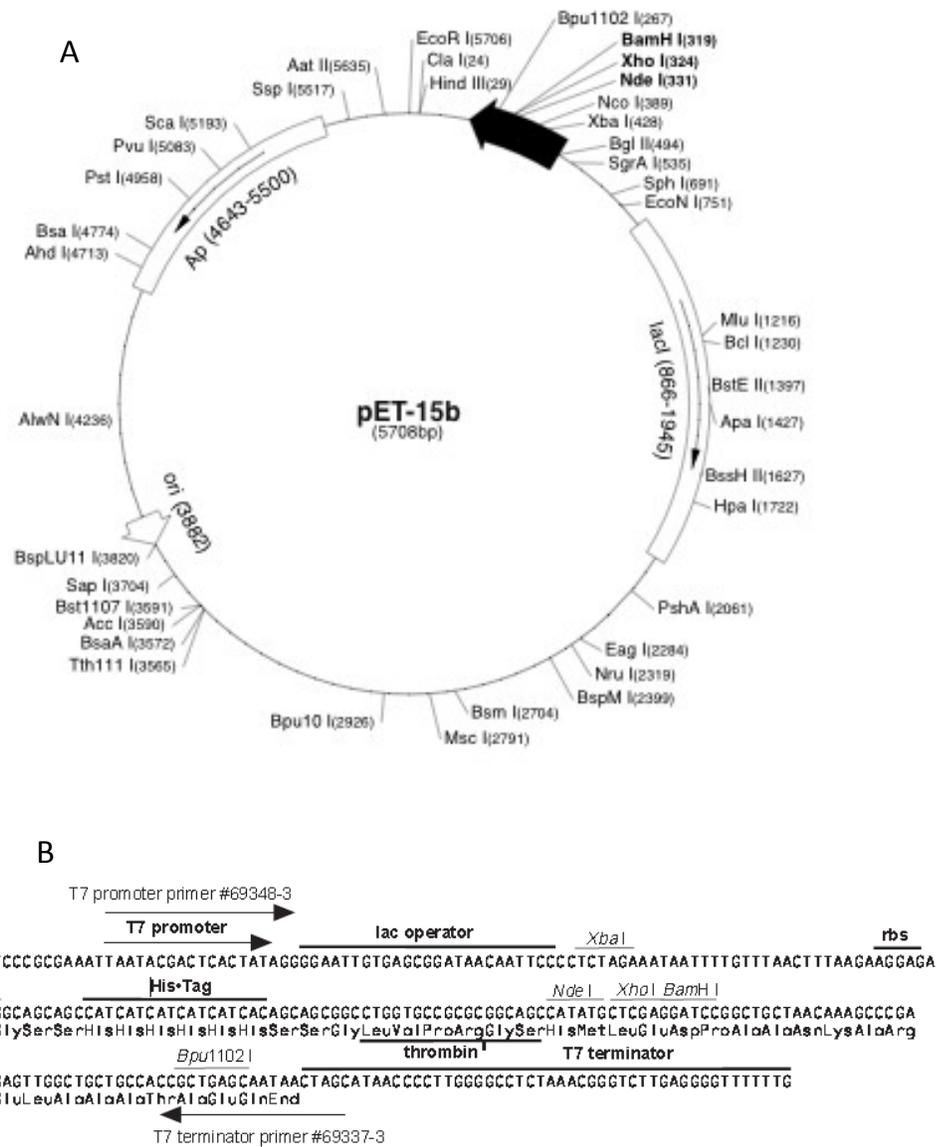


Figura 2.2 A. Mapa del vector pET-15b productor para la proteína APA obtenido de Novagen®-Merck. B. Sitios de clonación/expresión del vector pET-15b (Novagen®)

Cuando el mRNA es traducido eficientemente, la proteína de interés puede alcanzar más del 50% de las proteínas totales de la célula en tres horas o menos (Studier y Moffatt, 1986; Bae et al., 2013; Nilsen et al., 2013). Cuando no se cuenta con la presencia del inductor (en este caso IPTG), la expresión de la proteína recombinante es prácticamente nula (Studier y Moffatt, 1986; Rio, 2013).

2.3 Operón *Lac*

El Operón *lac* es un sistema inducible. La lactosa (el inductor), estimula la síntesis de enzimas de la vía del metabolismo de la lactosa, evitando que la proteína represora (que hubiera detenido la transcripción) se una al operador (**Solomon et al., 2014**). En *E. coli* es un operón requerido para el transporte y metabolismo de la lactosa en la bacteria, el cual presenta tres genes estructurales adyacentes (*Y*, *Z* y *a*), un promotor, un terminador y un operador (**Lodish et al., 2005**).

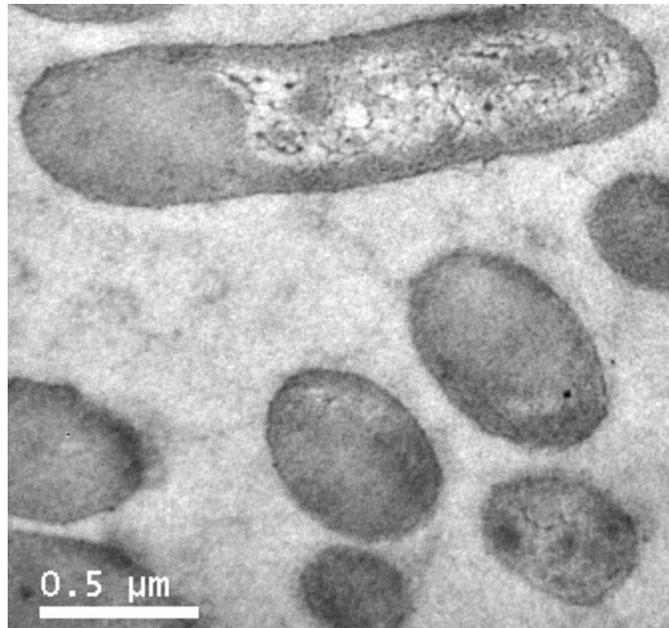


Figura 2.3 Cuerpos de inclusión citoplásmicos de *E. coli*. Proveniente de un trabajo sin publicar de **Trujillo-Roldán M.A.**

El operón *Lac* presenta una expresión basal, al igual que la mayoría de los operones, lo cual quiere decir que en ausencia de un inductor, los genes estructurales son expresados en muy baja concentración, para así mantener unas concentraciones bajas de β -galactosidasa (gen codificante *LacZ*) y de permeasa. La permeasa permitirá que pueda entrar inicialmente la lactosa a la bacteria y la alfa-galactosidasa permitirá transglicosilar la lactosa y transformarla en alolactosa (**Gardner et al., 2009**).

2.4 IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido)

El IPTG es comúnmente utilizado como inductor artificial del *operón lac*, sustituyendo a la alolactosa. Ésto es logrado ya que es capaz de unirse al represor *LacI*, pero no es un sustrato para la β -galactosidasa y no puede ser metabolizado por la bacteria por lo que se dice que es un inductor ideal para generación de proteínas recombinantes que se encuentren bajo el control del promotor de Lac (**Gardner et al., 2009; Fernández-Castané et al., 2012**).

2.5 Tallo de Histidinas

La secuencia de poli histidina (secuencia de aminoácidos en las proteínas) His-Tag® (6,8 ó 10 residuos consecutivos), se une a cationes divalentes como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} inmovilizados previamente en resinas quelantes permitiendo que la purificación de las proteínas se efectúe hasta en un 95% (**Hegen, 1995; Kirk, 2014**). Los extractos de proteínas recombinantes que se expresan en *E. coli* son hechos pasar por una resina modificada de agarosa la cual contiene cualquiera de los cationes previamente mencionados (**Hegen, 1995; Dreyfus et al., 2008**). Una vez que la secuencia de poli histidina, presente en la proteína de interés a purificar se ha unido a la matriz, puede ser eluida mediante el paso de soluciones de cloruro de amonio, glicina, histidina, imidazol, EDTA u otros iones que compitan en afinidad con la secuencia de poli histidina (**Hegen, 1995; Barathy y Suguna, 2013**). Dicho procedimiento provoca que se puedan purificar fácilmente las proteínas bajo condiciones no desnaturalizantes o en presencia de urea o guanidina (**Hegen, 1995; Dreyfus et al., 2008; Sabaty et al., 2013**).

2.6 Cuerpos de inclusión

Durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es común la aparición de cuerpos de inclusión (CI), que son agregados de proteína insoluble, de forma generalmente esférica, formados mayoritariamente por la proteína recombinante, por otras proteínas celulares y trazas de otras moléculas como lípidos y ácidos nucleicos en menor cantidad (**González-Montealban et al., 2007**). Los cuerpos son separables mediante centrifugación, logrando así procesos de

purificación más sencillos y baratos (**Kane y Hartley, 1988; Singh y Panda, 2005**). Recientemente, los CI producidos en bacterias recombinantes han sido usados para contener proteínas funcionales con potencial terapéutico (**Vazquez et al., 2012**) como vacunas orales (**Kesik et al., 2004**) y vacunas potenciales intramusculares o intranasal (**Wedrychowicz et al., 2007**).

Siendo mecánicamente estables, los CI han sido recientemente observados como prometedores materiales de nanopartículas (**García-Fruitós et al., 2009; Mitraki, 2010; Rodríguez-Carmona y Villaverde, 2010; Villaverde, 2010; Vázquez y Villaverde, 2010; Peternel y Komel, 2011; García-Fruitós et al., 2012; Villaverde et al., 2012**), cuyas propiedades biológicas y a nanoescala pueden ser controladas por una adecuada selección de la cepa hospedera de *E. coli* (**García-Fruitós et al., 2012**).

2.7 Producción de proteínas recombinantes para la generación de una nueva vacuna y estuche diagnóstico para tuberculosis

La tuberculosis es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. Según la Organización Mundial de la salud (**WHO**), en 2012, se estimó que 530 000 niños se enfermaron de tuberculosis y 74 000 niños, aún siendo seronegativos para la bacteria murieron de tuberculosis, teniendo mayores incidencias en India, China, Indonesia, Nigeria y Sudáfrica. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados corren un riesgo mucho mayor de enfermar de tuberculosis. Las personas afectadas por el VIH tienen aproximadamente entre 20 y 30 veces más probabilidades de desarrollar una tuberculosis activa (**WHO, 2014**). 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, 1930**). En países desarrollados el uso de esta vacuna ha ido disminuyendo, ya que su eficacia es variable y sólo brinda protección contra tuberculosis meníngea en niños y no contra tuberculosis pulmonar en adultos (**Sable et al., 2011**).

Por otro lado, es necesario también mejorar las técnicas de diagnóstico, ya que el

cultivo bacilar (técnica establecida para diagnosticar la enfermedad), es tardado y costoso (Trujillo-Roldán y Espitia, 2009). La prueba rápida conocida como *Protein Purified Derivative* (PPD), es una prueba de diagnóstico para tuberculosis, la cual contiene antígenos que al ser aplicados a pacientes infectados con tuberculosis resulta en una induración. 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 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 (Zellweger et al., 2008).

Por lo mencionado anteriormente, 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 protéicos que sean solo producidos por *M. tuberculosis*, en estado replicativo. Diversos antígenos han sido reportados como candidatos para vacuna y estuche diagnóstico como se muestra en la Tabla 1.

2.8 Proteína APA

La proteína *Aline Proline rich Antigen*, también conocida como 45/47 kDa ó antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) comparte una cantidad significativa de proteínas homólogas con la familia de proteínas de fijación a la fibronectina (Zhao et al., 1999; Carlétti et al., 2013). APA es encontrada en algunos miembros del género *Mycobacterium*, tales como *M. avium*, *M. marinum* y *M. leprae* y ha sido demostrado que posee actividad de unión a las fibronectinas (Zhao et al., 1999). En *Mycobacterium*, la proteína O-manosilada es una adhesina potencial, la cual tiene un papel en la fijación de la célula con el huésped, entrada y evasión inmune (Zhao et al., 2000; Ragas et al., 2007; Nandakumar et al., 2013). APA es un antígeno inmunodominante y es fuertemente reconocido por los anticuerpos séricos de pacientes infectados con tuberculosis (Kunnath-Velayudhan y Porcelli, 2013).

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

Tabla 1. Principales antígenos candidatos para generar una vacuna o estuche diagnóstico reportados para Tuberculosis (**Gamboa-Suasnavart, 2012**)

Antígeno	Peso Molecular (kDa)	Función	Referencia
Ag85 A	35.55	Unión a Fibronectina	Sable et al., 2005; Huygen, 2014.
Ag85 B	34.45	Unión a Fibronectina	Hoft et al., 2008; Abel et al., 2010; Huygen, 2014.
MPT-64	24.72	Evasión del sistema inmune	Sali et al., 2010; Shenoy y Mukhopadhyay, 2014
Pst-S1	38.11	Trasportador de fosfato	Castanon-Arreola et al., 2005
APA	28.78	Invasividad/Unión a Fibronectina	Kumar et al., 2003 Sable et al., 2011; Nandakumar et al., 2013.
GroEs	10.67	Chaperonina/ATPasa	Maurya et al., 2014
GroEL	56.7	Chaperonina	Okada et al., 2009
DnaK	66.7	Chaperonina/ATPasa	Ferraz et al., 2004
ESAT-6	6	Factor de virulencia	Kumar et al., 2003; Zhang et al., 2014
CFP-10	10.66	Desconocida/Miembro de la familia de ESAT-6	Wu et al., 2008; Zhang et al., 2014

La proteína APA ha sido propuesta como una candidata alternativa a la generación de nuevas vacunas contra la tuberculosis o ser utilizada para estuches

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

diagnóstico de la enfermedad (**Kumar et al., 2003; Ferraz et al., 2004; Sable et al., 2011; Gamboa-Suasnavart et al., 2013; Nandakumar et al., 2013**). La proteína de 45/47 kDa APA es una de las pocas glicoproteínas de *Mtb* para la que se ha descrito el patrón de glicosilación completo (**Dobos et al. 1995; Dobos et al., 1996; Nandakumar et al., 2013**), además es producida por todos los miembros del complejo *Mtb* incluyendo la cepa de la vacuna, *M. bovis* Bacilo Calmette Guerin (BCG) (**Romaine et al. 1993; Laqueyrie et al., 1995; Nandakumar et al., 2013**). El contenido de prolina y alaninas y el patrón de glicosilación, son rasgos muy particulares de dicha proteína (**Romaine et al., 1993; Dobos et al., 1995; Schorey et al., 1996; Gioffré et al., 2009**). La proteína APA ha sido reportada con alta actividad inmunogénica, relacionada a su patrón de glicosilación y ha sido propuesta como un candidato para la generación de una nueva vacuna o estuche diagnóstico para tuberculosis (**Horn et al., 1999; Sable et al., 2011; Nandakumar et al., 2013**). Dado que contiene una gran cantidad de alaninas y prolinas, la proteína migra aberrantemente en geles de poliacrilamida presentando un peso aparente de 45/47 kDa cuando su peso teórico es de 28.78 Da (**Dobos et al., 1995; Gamboa-Suasnavart et al., 2011**).

En *Mtb*, la secuencia primaria de la proteína APA contiene 325 aminoácidos, con un péptido señal de 39, el cual es eliminado al ser secretada la proteína (**Laqueyrie et al., 1995**).

Tabla 2: Secuencia peptídica de la proteína APA de *Mycobacterium tuberculosis*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

▫ mhqvdnltr rkgrlalai aamasaslt vavpatanad pepappvptt aasppstaaa
ppapatpvap pppaaantpn aqpgdpnaap ppadpnappp pviapnapqp vridnpvggf
sfalpagwve sdaahldygs allskttgdp pfpgqpppva ndrtrivlgrl dqklyasaea tdskaaarlq
sdmgefymy pgtrinsetv sldangvsgs asyyevkfsd pskpngqiwg gvigspaana
pdagppqrwf vvwlgtannp vdkgaakala esirplvapp papapapaep apapapagev

2.9 Bioingeniería y bioprocesos

2.9.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano o generación de biomasa es el aumento del número de microorganismos en el tiempo. El ciclo celular es el proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del ADN, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento y su división por bipartición para dar lugar a dos células hijas (**Schlegel, 1997; Fujikawa y Sakha, 2014**). Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado, en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que se encuentran replicando su ADN y elongándose y otras que están iniciando la división celular (**Freeman, 1988; Hall et al., 2014**). Los requerimientos para el crecimiento microbiano pueden dividirse en dos categorías principales: físicos y químicos. Los aspectos físicos comprenden la temperatura, el pH y la presión osmótica; los requerimientos químicos incluyen la fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánico (**Tortora et al., 2007; Hall et al., 2014**).

Para poder comprender mejor el crecimiento de un cultivo bacteriano es recomendable que se grafique el logaritmo de la concentración celular respecto al tiempo. Una curva de crecimiento típica (Figura 2.4) tiene un aspecto sigmoideo y permite diferenciar las fases de crecimiento que se presentan en un cultivo (**Schlegel, 1997; Cohen, 2011; Pommerville, 2011**). Dichas fases son las siguientes:

1. Fase de latencia (FL): Abarca desde la inoculación hasta el momento en el que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende principalmente de la edad del inóculo, así como de la facilidad del microorganismo de desarrollarse en cierto medio de cultivo. Si el inóculo proviene de un cultivo previo en la fase estacionaria de crecimiento, el cultivo celular debe adaptarse primero a las nuevas

condiciones de crecimiento mediante la síntesis de RNA, ribosomas y enzimas. Si las fuentes de energía y de carbono del nuevo medio de cultivo son diferentes a las del previo, la adaptación a las nuevas condiciones, por lo general, va ligada a una nueva síntesis de enzimas que no eran necesarias para el cultivo previo (**Schlegel, 1997; Cohen, 2011**).

2. Fase de crecimiento exponencial (FCE): Cuando no se limita los nutrientes en un cultivo bacteriano, el cultivo crece a una velocidad proporcional a la densidad de éste. El tiempo de generación durante el crecimiento exponencial es un parámetro específico de cada especie bacteriana y dependiente del medio y/o condiciones ambientales. La velocidad específica de crecimiento (μ) se define en esta misma fase debido a la relativa constancia en crecimiento. Esta fase es comunmente utilizada para el estudio de la influencia de factores ambientales como lo son el pH, potencial redox, temperatura y aireación, entre otras. Así como la utilización de diversos sustratos (**Schlegel, 1997; Cohen, 2011**).
3. Fase estacionaria (FE): Ocurre cuando las células mueren y se duplican en una velocidad similar. Además de la disminución de sustrato, la densidad de población, la presión parcial de oxígeno baja y la acumulación de productos metabólicos tóxicos pueden hacer que se disminuya la velocidad de crecimiento llevándola a fase estacionaria. En dicha fase pueden aún utilizarse materiales de reserva, descomponerse parte de los ribosomas y sintetizarse enzimas. En muchos procesos microbianos de producción enfocados a la formación de un metabolito secundario, esta fase es la verdadera fase productiva. Por ello, en biotecnología se diferencia una trofofase (fase de nutrición o crecimiento) y una idiofase (fase de producción). A pesar de que las células no crezcan durante la idiofase, la presencia de sustratos repercuten la generación de productos de interés (**Schlegel, 1997; Pommerville, 2011**).
4. Fase de muerte celular (FMC): Cuando los nutrientes en el medio de cultivo se encuentran limitados o el crecimiento bacteriano es bajo, el cultivo entra

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

en la fase de muerte celular. Ahora el número de células muertas excede al número de nuevas células formadas (Pommerville, 2011).

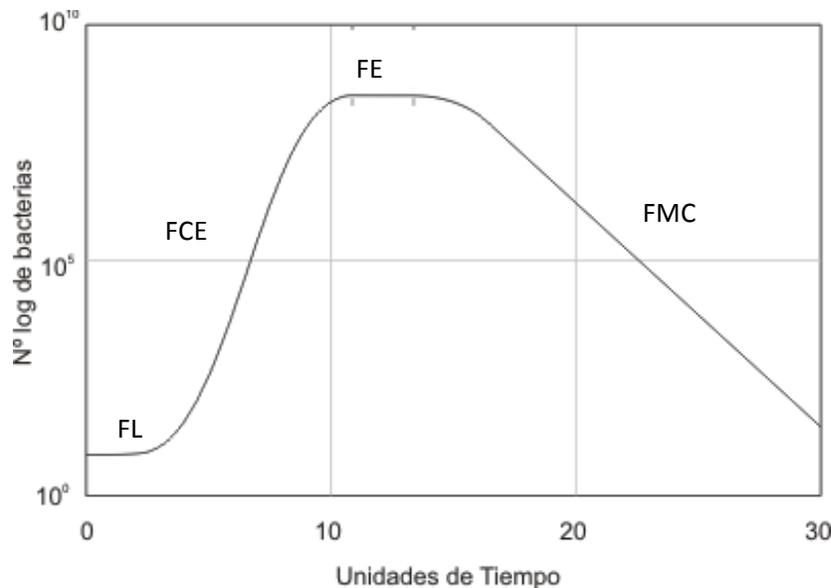


Figura 2.4 Curva de crecimiento microbiano típica mostrando las diferentes fases en el desarrollo de un cultivo, las cuales son: Fase de Latencia (FL), Fase de Crecimiento Exponencial (FCE), Fase Estacionaria (FE) y Fase de Muerte Celular (FMC).

2.9.2 Métodos de cuantificación de biomasa

Existen dos grupos de grandes métodos de evaluación en el aumento de biomasa:

- Métodos directos: son útiles cuando se tiene una suspensión homogénea de células, el medio es líquido, poco viscoso y no hay otros sólidos en el medio. Dichos métodos son peso seco, peso húmedo y volumen celular empacado (Schuler y Kargi, 2008).
- Métodos indirectos: Estos métodos son densidad óptica a 600nm (D.O.) y cuantificación de componentes relacionados a la biomasa como DNA, RNA, ATP y proteínas o metabolitos (Schuler y Kargi, 2008).

2.9.3 Modelo cinético de Monod y la velocidad específica de crecimiento

La velocidad de crecimiento de un microorganismo (μ) es el cambio en el número de células en el tiempo y es función de la concentración de un sustrato limitante

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

cuando los demás se encuentran en exceso por arriba de las necesidades del microorganismo y éste se encuentra creciendo exponencialmente (**Schlegel, 1997; Hemond y Fechner, 2014**).

$$\text{Ecuación 1} \quad \mu X = \frac{dX}{dt}$$

Arreglando: $\mu dt = \frac{dX}{X}$

E integrando:

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{X_1}^{X_2} \frac{dX}{X}$$

$$\mu (t_2 - t_1) = \ln \frac{X_2}{X_1}$$

Despejando se obtiene la ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2} \quad \mu = \frac{\ln \frac{X_2}{X_1}}{t_2 - t_1}$$

La ecuación 1 es la definición a la velocidad específica la cual caracteriza la velocidad de crecimiento de un microorganismo; donde X es la biomasa producida y la velocidad de crecimiento específica se mantiene constante (**Schuler y Kargi, 2008**). En la ecuación 2 se define un valor para la velocidad específica de crecimiento (μ) como la pendiente de una recta, en función del logaritmo de la biomasa (x) y el tiempo (t) durante la fase exponencial de crecimiento (**Schlegel, 1997; Widdel, 2010**).

Se grafica el logaritmo natural de la biomasa contra el tiempo de cultivo, al obtener la gráfica se realiza un ajuste lineal a la fase exponencial de ésta y se obtiene la pendiente de la recta, siendo ese el valor de μ (**Schuler y Kargi, 2008**). El tiempo

de duplicación (t_d) se deriva de μ y se refiere al tiempo en horas en el que una célula madre da lugar a dos células hijas (**Schlegel, 1997; Widdel, 2010**). El tiempo de duplicación y su relación con la velocidad de crecimiento (μ) se define mediante la ecuación 3.

Asumiendo de la ecuación 2 que:

- Se considera tiempo inicial $t_1=0$
- $2X_1= X_2$ y $t_2=t_d$

Despejando t_2 de la ecuación 2

$$t_d - 0 = \frac{\ln \frac{2X_1}{X_1}}{\mu}$$

Por lo tanto:

$$\text{Ecuación 3} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

2.10 Biorreactores

Un biorreactor es un contenedor que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un contenedor en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. Este proceso puede ser tanto aerobio como anaerobio. Puede también ser un dispositivo o sistema para crecer células o tejidos en operaciones de cultivo celular (**Doble y Gummadi, 2007; Widdel, 2010**).

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

Las funciones características que se realizan en el biorreactor de cultivos de células en suspensión involucran **(Doble y Gummadi, 2007)**:

1. Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
2. Mantener constante y homogénea la temperatura.
3. Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
4. Suministrar oxígeno a una velocidad que satisfaga el consumo.
5. El diseño debe ser adecuado para permitir que se mantenga el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y, posteriormente, sembrado con el microorganismo de interés.

2.11 Tipos de cultivo en biorreactores

2.11.1 Cultivo en lote (CL)

Se refiere a un cultivo celular en un reactor con una carga inicial de medio de cultivo que no será alterada por la adición o remoción de nutrientes u otros elementos. El reactor se carga con el medio de cultivo y se inocula, a medida que se lleva a cabo el cultivo, cambian las condiciones al consumirse los sustratos, formándose biomasa y metabolitos. Cuando se ha alcanzado la producción requerida o se ha investigado el fenómeno de interés, se vacía el reactor, se limpia y el proceso se repite si es que se requiere. Es la forma de cultivo más simple que se hace tanto a escala laboratorio como a nivel industrial **(Doble y Gummadi, 2007)**. En este tipo de cultivo se sigue el patrón de crecimiento explicado en la **Figura 2.4**

2.11.2 Cultivo continuo (CC)

En un CL, las condiciones de cultivo, crecimiento, formación de producto y utilización del sustrato, varían con respecto al tiempo. En un CC (Figura 2.5) se alimenta continuamente medio de cultivo donde las células y productos están siendo retiradas simultáneamente, logrando mantener un volumen constante **(Villadsen et al., 2011)**. El crecimiento y la formación de productos pueden ser

mantenidos por tiempos prolongados en cultivos continuos (**Schuler y Kargi, 2008**). Después de cierto periodo de tiempo (normalmente 3 tiempos de residencia) el sistema alcanza un estado estacionario donde las concentraciones de células, productos y sustrato se mantienen constantes (**Schuler y Kargi, 2008; Villadsen et al., 2011**). El CC es una herramienta importante para determinar la respuesta de los microorganismos a su entorno y para la producción de productos deseados bajo óptimas condiciones de crecimiento (**Schuler y Kargi, 2008; Shijie, 2013**).

Un cultivo continuo perfectamente agitado tiene como sinónimo un quimiostato. En el quimiostato se puede establecer el valor de la velocidad de dilución (D) externamente, haciendo que los otros parámetros se adapten en consecuencia (**Kuenen y Johnson, 2009**). La velocidad de dilución es una de las variables de entrada al biorreactor más importantes y su unidad es el inverso del tiempo, generalmente h^{-1} (Ecuación 4) definida mediante el flujo (F) y el volumen (V) del reactor (**Villadsen et al., 2011**).

$$\text{Ecuación 4} \qquad D = \frac{F}{V}$$

La ecuación 5 se deduce del balance de materia con base en la concentración celular que tiene el quimiostato, donde: cambio de la concentración de biomasa con respecto al tiempo (dX/dt), concentración de biomasa (X), velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad de dilución (D), velocidad específica de muerte (k_d) (**Kuenen y Johnson, 2009; Shijie, 2013**). Al mismo tiempo que se retira biomasa, se alimenta al reactor medio de cultivo nuevo, sin crecimiento bacteriano. Por lo tanto el balance de materia para el biorreactor es que la acumulación de biomasa es igual al crecimiento obtenido de biomasa menos el flujo de salida de medio de cultivo (**Schuler y Kargi, 2008; Kuenen y Johnson, 2009**).

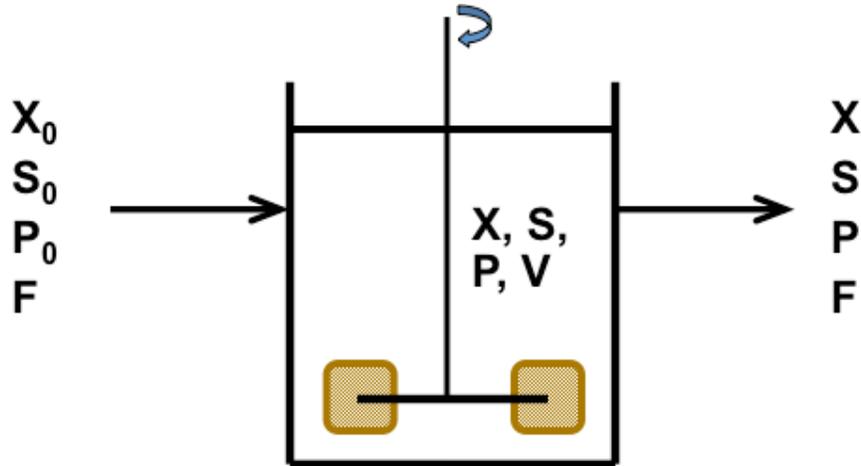


Figura 2.5 Representación gráfica del cultivo continuo. X_0 , biomasa inicial; S_0 , sustrato inicial; P_0 , presión a la entrada del biorreactor; F , flujo de entrada y salida del biorreactor; X , biomasa producida; S , sustrato; P , presión; V , volumen del biorreactor.

$$\text{Ecuación 5} \quad \frac{dX}{dt} = (D)X_0 - (D)X + \mu X - k_d X$$

Donde se toman las siguientes consideraciones:

$$X_0 = 0$$

$$k_d \cong 0$$

En el caso del estado estacionario, estado al cual se llega en un cultivo continuo, la concentración de biomasa con respecto al tiempo es constante (**Parés y Juárez, 1997; Kuenen y Johnson, 2009**).

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Por lo tanto:

$$0 = -(D)X + \mu X$$

$$(D)X = \mu X$$

$$\text{Ecuación 6} \quad \mu = D$$

Cuando es alcanzada la estabilidad de un cultivo en continuo, la velocidad de dilución (D) es igual a la velocidad de crecimiento específica (μ) (**Drake y Brogden, 2002; Flickinger, 2013**).

2.11.3 Cultivo en lote alimentado (CLA)

El CLA es un proceso de cultivo al que se le suministra un flujo de sustrato y/o nutrientes, generalmente fuente de carbono. La alimentación puede ser de manera continua o escalonada, controlando el consumo de nutrientes (Figura 2.6) (**Cinar et al., 2003; Shijie, 2013**). Se inicia con un cultivo en lote típico para posteriormente iniciar una alimentación controlada con un flujo de fuente de carbono, sustrato o mezcla de ellos, a cierta concentración cuando la fuente inicial de carbono se haya agotado o se alcance una cantidad de biomasa o velocidad específica de crecimiento deseada. En los CLA no existe una corriente de salida de medio de cultivo, por lo tanto se espera un aumento de volumen del medio de cultivo en el reactor (**Vázquez et al., 2007**).

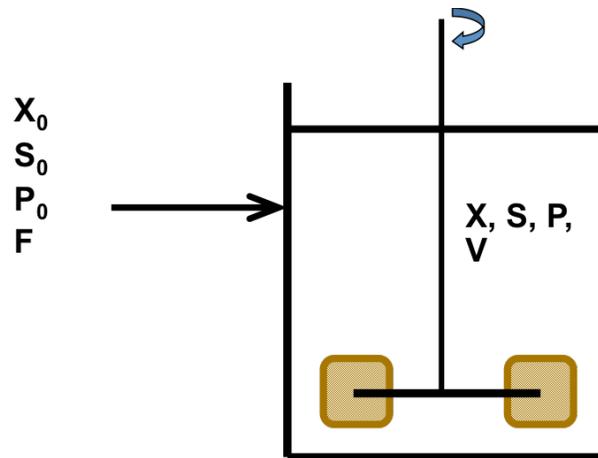


Figura 2.6 Representación gráfica del cultivo en lote alimentado

El CLA elimina problemas de represión de síntesis de producto por la fuente de carbono y problemas de limitación del crecimiento celular por exceso de sustrato. Es también llamado semicontinuo o cultivo continuo de volumen variable (**Schuler y Kargi, 2008**). La velocidad de incremento de volumen en el reactor esta

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

expresado por la ecuación 7 donde $\frac{dV}{dt}$ es el incremento de volumen con respecto al tiempo y F es el flujo de entrada al bioreactor (**Doble y Gummadi, 2009**).

$$\text{Ecuación 7} \quad \frac{dV}{dt} = F$$

Integrando:

$$V = V_0 + Ft$$

La concentración de biomasa en el tanque a cualquier tiempo esta expresado por la ecuación 8, donde biomasa (X), volumen del reactor (V) y el tiempo de estudio (t) (**Doble y Gummadi, 2009; Shijie, 2013**).

$$\text{Ecuación 8} \quad X = \frac{X^t}{V}$$

El balance de biomasa en el CLA está representado por la ecuación 9 en la que $\frac{d(XV)}{dt}$ es la biomasa producida con respecto al tiempo, V es el volumen del bioreactor, X es la biomasa, μ es la velocidad específica de crecimiento, X_0 es la biomasa inicial del cultivo y F es el flujo de alimentación al bioreactor (**Shijie, 2013**).

$$\text{Ecuación 9} \quad \frac{d(XV)}{dt} = V \frac{dX}{dt} + X \frac{dV}{dt} = FX_0 + V\mu X$$

Considerando:

$$X_0 = 0$$

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Se obtiene:

$$X \frac{dV}{dt} = V\mu X$$

Despejando μ :

$$\text{Ecuación 10} \quad \mu = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt}$$

Considerando la ecuación 7 y la ecuación 6, se obtiene la ecuación 11:

$$\text{Ecuación 11} \quad \mu = \frac{F}{V} = D$$

Basado en el modelo de Monod, al tener un flujo de alimentación (F_a) y una concentración de sustrato en la corriente de alimentación (S_a) queda definida la oferta de nutrientes (ON) (Vázquez et al., 2007) mostrada en la ecuación 12.

$$\text{Ecuación 12} \quad ON = F_a S_a$$

Se puede establecer una ecuación para alimentar exponencialmente al cultivo respecto al tiempo (t) manteniendo la velocidad específica de crecimiento (μ) requiriendo una bomba programable que sea la que suministre un flujo variable exponencial en función del tiempo (Vázquez et al., 2007; Widdel, 2010). La ecuación 13 define el flujo de alimentación (F_a) con la finalidad de mantener un crecimiento constante de comportamiento exponencial respecto al tiempo (t) en función de un flujo inicial (F_0) y la velocidad específica de crecimiento.

$$\text{Ecuación 13} \quad F_a = F_0 e^{\mu t}$$

Se necesita determinar un flujo inicial de la alimentación (ecuación 14) donde finaliza el CL (F_0) en función de la concentración de la solución de sustrato a administrar (S), la velocidad específica de crecimiento que se desea mantener (μ), la biomasa que se obtendrá cuando se finalice el CL (X_{to}), el volumen del medio en ese mismo punto (V_{to}) y el rendimiento biomasa/sustrato específico ($Y_{X/S}$) (Vázquez et al., 2007).

$$\text{Ecuación 14} \quad F_0 = \left(\frac{\mu}{S \left(Y_{X/S} \right)} \right) X_{to} V_{to}$$

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

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

3. Hipótesis

Se mantendrá constante la producción de del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo continuo de *Escherichia coli* a velocidad baja de dilución durante al menos 200 generaciones.

4. Objetivos

4.1 General

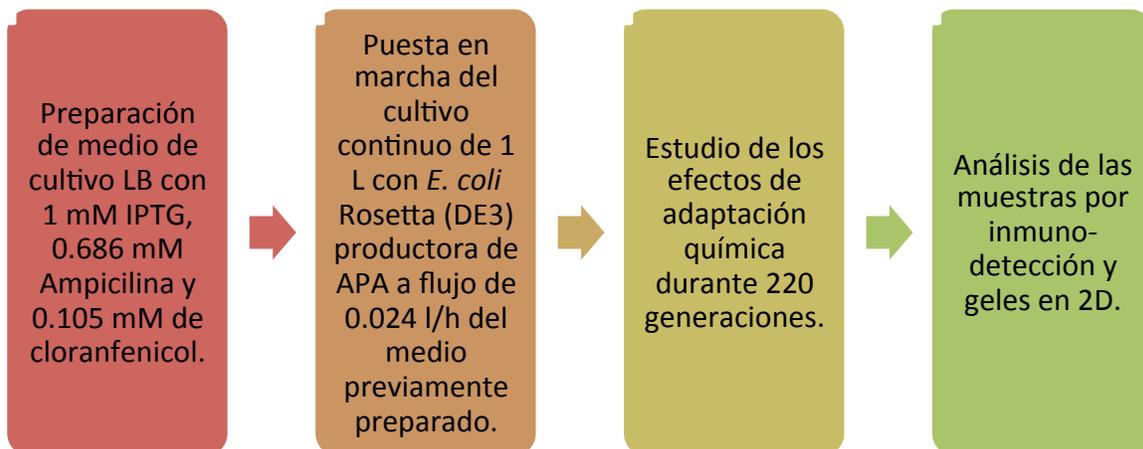
Analizar el comportamiento adaptativo de una cepa de *E. coli* recombinante, productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo continuo.

4.2 Particulares

1. Diseñar e implementar un cultivo continuo de *E. coli* recombinante, productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Evaluar la producción de la proteína recombinante APA por electroforesis e inmunodetección y crecimiento celular en cultivo continuo en al menos 200 generaciones.
3. Determinar el proteoma diferencial de *E. coli* recombinante en cultivo continuo en diferentes generaciones.

5. Estrategia experimental

Utilizando *E. coli* Rosetta (DE3) productora del antígeno APA, se llevó a cabo un cultivo continuo en biorreactor de 1.0 L de volumen de trabajo (Applikon® USA) de 2.0 L volumen nominal. A dicho biorreactor se le suministró medio de cultivo Luria Bertani (LB), el cual contenía 0.24 g/L (1 mM) de IPTG (Sigma, EUA), 0.24 g/L (0.686 mM) de Ampicilina (Sigma, EUA) y 0.034 g/L (0.105 mM) de Cloranfenicol (Sigma, EUA) a flujo constante de 24 mL/h con velocidad de dilución (D) 0.024 h⁻¹. Se estudiaron los efectos de adaptación tras una inducción química durante 220 generaciones. Se tomaron muestras aproximadamente cada 2 días y éstas se analizaron por inmunodetección y geles en 2D.



6. Metodología

6.1 Cultivo en biorreactor de 1 litro

A partir de un banco de trabajo previamente realizado con glicerol al 40% de *E. coli* Rosetta (DE3) productora de APA se inoculó el biorreactor de 1.0 L volumen de trabajo (Applikon®, EUA) de 2.0 L volumen nominal, equipado con dos turbinas Rushton con relación de diámetro ($D_i/D_t=0.5$) conteniendo primero 700 mL de medio de cultivo LB pH 7.5, 0.24 g/L de ampicilina (0.686 mM) (Sigma, EUA) y 0.034 g/L de cloranfenicol (0.105 mM) (Sigma, EUA). Cuando se alcanzó una absorbancia de 1.5 u.a. el volumen se ajustó a 1 L, para así comenzar con el cultivo continuo. El cultivo fue inducido con IPTG (Sigma, USA) 0.24 g/L (1 mM) activándose los controles de proceso para tensión de oxígeno disuelto $TOD \geq 30\%$ (Sharma et al., 2007), temperatura $30 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante un controlador ADI 1030 (Applikon®, EUA) instalada en una PC adquiriendo datos por medio del programa BioXpert (Applikon®, EUA) conectada al controlador. Se comenzó la alimentación a flujo de 24 mL/h de medio de cultivo LB con 0.034 g/L de cloranfenicol (0.105 mM) (Sigma, EUA), 0.24 g/L de ampicilina (0.686 mM) (Sigma, EUA) y 0.24 g/L de IPTG (1 mM) (Sigma, EUA) y extracción de cultivo a un flujo constante de 24 mL/h que nos permitía obtener una velocidad de dilución (D) de 0.024 h^{-1} calculada mediante la ecuación 11.

En la Figura 6.1 se muestra el sistema de cultivo continuo montado para la experimentación.

6.2. Determinación de biomasa por densitometría

Se tomaron muestras del cultivo en biorreactor y mediante espectrofotómetro DU® 730 (Beckman Coulter®, EUA) se tomaron lecturas a 600 nm en celdas de plástico de 1 mL. Cuando se obtuvieron lecturas de absorbancia mayores a 0.7 u.a. se hacían diluciones 1:10 ó 1:20.



Figura 6.1. Fotografía tomada durante el proceso de crecimiento de *E. coli* productora del antígeno APA. Medio de Cultivo LB para alimentación al biorreactor (1). Biorreactor (2). Producto del reactor (*E. coli* productora del antígeno APA) (3). NaOH utilizada para control de pH (4). Captura de datos del controlador del biorreactor (5).

6.3 Verificación de producción de proteína

6.3.1 Preparación de muestras

Las muestras provenientes de los cultivos, tomadas aproximadamente cada 2 días, fueron uniformizadas a 5.0 u.a. de tal manera que se tomaban volúmenes proporcionales de cada tiempo del cultivo, además de recolectar 1.0 mL de muestra extra para análisis posteriores. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5415C (Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se desechaba y se agregaron 100 μ L de buffer PBS (Buffer Salino de fosfatos, por sus siglas en inglés) para resuspender el pellet formado. El resuspendido fue lisado por sonicación en un sonicador Soniprep 150 (MSE, Londres) por 30 segundos a 15 μ m de amplitud de onda.

6.3.2 Dot blotting

Siguiendo el protocolo sugerido por Mahmood y Yang (2012), en una membrana PVDF Immobilion® (Millipore®, EUA) activada previamente con metanol por 10 s,

se dividió la membrana en cuadrantes de 1 cm² aproximadamente y se agregaron 10 µL de muestra previamente lisada en cada espacio. Se dejaron secar dichas muestras a 37°C por 60 min, la membrana fue lavada 2 veces con PBS (Buffer Salino de Fosfatos) 1X (Anexo 4) por 10 min. Posteriormente, se incubó por 1 hora en buffer de bloqueo (Anexo 4) el cual es BSA (Bovine Serum Albumin) al 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.05%. Se lavó la membrana por 10 min con PBS y después 2 veces por 10 min con PBS Tween 20 al 0.05%. Se incubó 1 h con anticuerpo primario anti-Histag (1:500) acoplado a peroxidasa, que reconoce 6xHis presente en la proteína recombinante (Roche®, Suiza) para Western blotting. Se lavó la membrana 2 veces por 10 minutos con PBS Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se lavó por 10 minutos con PBS 1X. Se dejó secar la membrana para después aplicar el revelado con una solución reveladora de 3,3'-diaminobenzidina (Anexo 4) DAB (Sigma-Aldrich®, EUA) que al oxidarse forma un producto marrón insoluble.

6.3.3 Electroforesis SDS-PAGE

Se llevó a cabo una electroforesis en un gel de acrilamida al 12% siguiendo la técnica estándar (**Towbin, et al., 1996**) (Anexo 3) con el objetivo de realizar un Western Blot y verificar que la proteína de interés continúa con su producción. Se tomaron 20 µL del lisado, explicado previamente en el punto 6.3.1 Preparación de muestras, y se agregaron 10 µL de buffer de carga reductor 2X (Anexo 3). Se inició con un voltaje de 20 V. Transcurrido el tiempo se aumentó el voltaje a 40, 60, 80, 100 y hasta 120 V. Terminada la corrida se prosiguió a análisis de Western Blotting.

6.3.4 Western Blotting (WB)

El objetivo de realizar WB fue para verificar por métodos de inmunodetección la producción de la proteína recombinante. Siguiendo el protocolo sugerido por Mahmood y Yang (2012), se transfirieron las proteínas contenidas en un gel de acrilamida después de una electroforesis SDS-PAGE mediante un equipo Trans-BlotR SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad®, EUA) a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno, por sus siglas en inglés) Immobilon® (EMD Millipore®,

Alemania), previamente activada con metanol y buffer de transferencia (Anexo 5). Se lavó la membrana con buffer PBS-Tween 20 al 0.05% 2 veces por 5 min. Se aplicó buffer de bloqueo, BSA (Bovine Suerum Albumin) al 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.05%, por 30 min. Se enjuagó la membrana con buffer PBS-Tween 20 al 0.05% 2 veces por 5 min. Se incubó por 1 h con anticuerpo primario anti-Histag (1:500) acoplado a peroxidasa, que reconoce 6xHis presente en la proteína recombinante (Roche®, Suiza) (Anexo 5) para Western Blotting. Terminado el tiempo se lavó nuevamente la membrana con buffer PBS Tween 20 al 0.05%. Se dejó secar para poder revelar la membrana con una solución reveladora de 3,3'-diaminobenzidina (Anexo 4) DAB (Sigma-Aldrich® EUA).

6.4 Proteómica

Los geles de proteómica (geles 2D) se realizaron en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, México) con el apoyo de la Dra. Norma A. Galicia. El objetivo de este estudio fue poder obtener la similitud entre geles o las variaciones experimentales entre ellos a diferentes generaciones. Se tomaron 200 µg de cada una de las muestras, 6 muestras en diferentes tiempos del cultivo y se cargaron en tiras IPG (gradiente inmovilizado de pH, por sus siglas en inglés) pH de 3-10 para su isoelectroenfoque en condiciones de IEF (isoelectroenfoque). Posteriormente, las tiras se cargaron en geles de 13 cm, 1 mm de grosor, 12% de acrilamida según las recomendaciones de la Dra. Norma A. Galicia. Los geles se tiñeron con azul de Commassie (Anexo 5). Los geles 2D se digitalizaron en un escáner y las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software de procesamiento, ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Reino Unido).

Se obtuvieron tres diferentes grupos de muestras, grupo 1 (1469.5 h y 1566.5 h) (59 y 64 generaciones respectivamente), grupo 2 (2498.5 h y 2617.5 h) (104 y 110 generaciones respectivamente) y grupo 3 (3817.5 h y 3982.5 h) (191 y 200 generaciones respectivamente). Se realizaron 2 análisis; el primero se hizo entre los geles del mismo grupo (análisis intragrupos) y el segundo se hizo comparando cada uno de los tres grupos con respecto al gel control (hora 8 del cultivo) (análisis intergrupos). Las comparaciones hechas fueron de la cantidad de spots que se

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

sobre expresaban y que disminuían su expresión en las diferentes muestras, así como el porcentaje de similitud entre los geles.

7. Resultados y discusión

7.1 Mantenimiento, control y crecimiento del cultivo continuo

Durante 220 generaciones (4456.4 h) el cultivo continuo, iniciado a la hora 8, se mantuvo con un volumen de 1 L y con densidades ópticas promedio de 5.28 ± 1.3 u.a. a 600 nm (Figura 7.1A). La alimentación de medio de cultivo LB y extracción del medio gastado fue a un flujo constante de 0.024 L/h. De las muestras obtenidas se verificó la producción de la proteína APA recombinante.

Las 220 generaciones fueron calculadas mediante la suma de duplicaciones obtenidas a lo largo del cultivo. Para dicho cálculo se utilizó la ecuación 16, donde d es la duplicación, t_d es el tiempo de duplicación, D.O. es la densidad óptica tomada al tiempo t_2 , el tiempo previo a t_2 es t_1 y P.D.O. es el promedio de las densidades ópticas desde el inicio del cultivo hasta el t_2 .

$$\text{Ecuación 16} \quad \text{Generaciones} = \sum d = \sum \frac{D.O. (t_2 - t_1)}{P.D.O. \cdot t_d}$$

El oxígeno disuelto (TOD) se mantuvo a $30 \pm 10\%$ controlado mediante cascada e aireación y agitación mecánica a lo largo del cultivo continuo (Figura 7.1B). Se controló mediante un sistema de control PID (Proporcional Integral Derivativo) con un controlador 1030 (Applikon, EUA) utilizando un electrodo AppliSens (Applikon USA). La agitación era dependiente a la TOD, aumentaba o disminuía para lograr el 30% deseado (Figura 7.1C). Las diferencias observadas en las figuras (Figura 7.1B y Figura 7.1C) son consecuencia de tomas de muestra y variaciones experimentales en el mantenimiento del cultivo continuo durante 220 generaciones.

Se mantuvo el pH en un valor de 8.0 ± 0.2 y se mantuvo un control de temperatura a $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ por medio de una chaqueta de calentamiento (Figura 7.1D).

Hasta donde sabemos, éste es el primer trabajo en biorreactor en cultivo continuo con producción de proteína APA con una duración de 4456.5 horas (220 generaciones). Los cultivos continuos más largos a los que se han llegado fueron

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

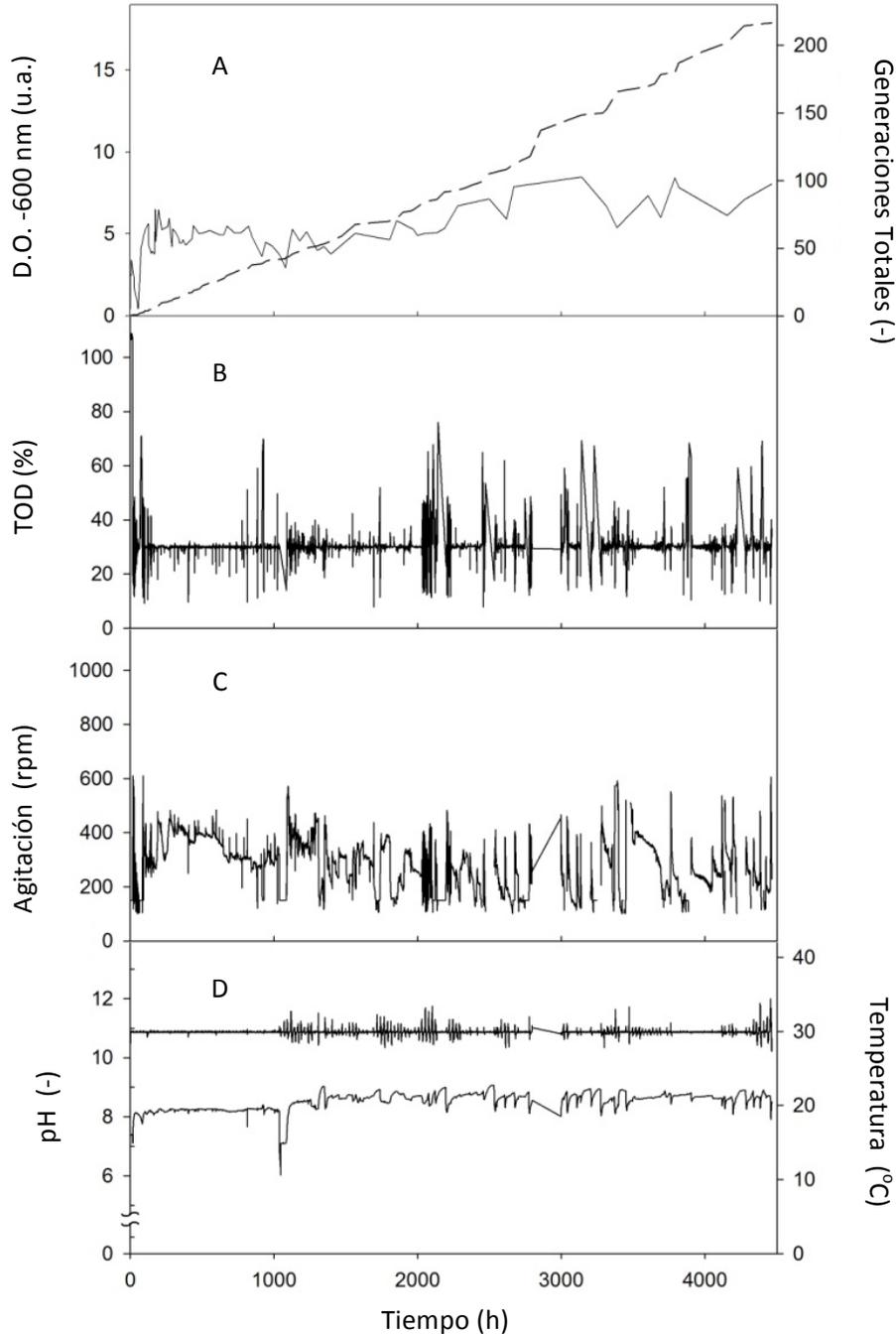


Figura 7.1 Graficos de mantenimiento, control y crecimiento en cultivo continuo de *E. coli* en biorreactor. (A) Crecimiento de *E. coli* (izquierda) Generaciones totales (derecha); la densidad óptica promedio alcanzada fue de 5.09 u.a. a 600 nm. (B) TOD (tensión de oxígeno disuelto) a lo largo del cultivo. (C) Agitación requerida para mantener una TOD a 30%. (D) pH y temperatura registrados en el proceso.

de diferentes cepas de *E. coli*, ya sea para observación de producción de otras proteínas o de comportamiento adaptativo a diferentes estímulos en el cultivo, los cuales se mantuvieron por 130 horas (aproximadamente 80 generaciones) **(Petrácková et al., 2013)** 200 horas (aproximadamente 69 generaciones) **(Velur Selvamani et al., 2014)**, 696 horas (aproximadamente 90.4 generaciones) **(van Heerden y Nicol, 2013)** y 1200 horas (aproximadamente 26 generaciones) **(Fu et al., 1993)**. Cada uno de los estudios consultados se hicieron a diferentes velocidades de dilución 0.24 h^{-1} , 0.09 h^{-1} , 0.015 h^{-1} y 0.03 h^{-1} respectivamente. Los experimentos realizados a velocidades de dilución por encima de 0.07 h^{-1} tenían valores de densidad óptica entre 1.5 u.a. y 2.0 u.a. **(Bae et al., 2000; Hua et al., 2004; Petrácková et al., 2013; van Heerden y Nicol, 2013; Lüdecke et al., 2014; Velur Selvamani et al. 2014)**. Los experimentos realizados a velocidades de dilución menores a 0.06 h^{-1} , como en este trabajo, alcanzaban densidades ópticas de entre 4 u.a. hasta 6 u.a. **(Fu et al., 1992; Wunderlich et al., 2014)**. Es probable que tener velocidades de dilución altas, en el estado estacionario, provoque que el crecimiento celular sea menor, al tener velocidades de dilución más bajas, en el estado estacionario, permite que haya mayor crecimiento celular dado que la célula se adapta mejor a las condiciones del sistema, manteniendo así un estado fisiológico estable **(Nahku et al., 2011)**.

7.2 Verificación de producción de proteína recombinante a diferentes generaciones

Se realizaron Dot Blots y Western Blots para comprobación de la producción de la proteína APA. El Dot Blot indicado en la figura 7.2 permite observar que se mantiene producción de la proteína desde la generación 47 (1137 h) hasta la generación 152 (3142.5 h) del cultivo continuo. El Dot Blot indicado en la figura 7.3, permite observar que desde la generación 175 (3647.5 h) hasta la generación 220 (4456.5 h) se mantiene la producción de la proteína de interés. De igual forma, se muestra que en el tiempo 4489.5 h, tres generaciones después, ya no se aprecia producción de proteína APA por los métodos utilizados, por lo que se considera el término del cultivo continuo.

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

Al realizar los Western Blots, se observó que se mantuvo la producción de la proteína APA tanto en generaciones tempranas (de la generación 42-45) (Figura 7.4) como en la última generación de producción (generación 220), mostrando de igual forma tres generaciones después, ya no se observa por los métodos de inmunodetección utilizados, producción de la proteína de interés APA (Figura 7.5).

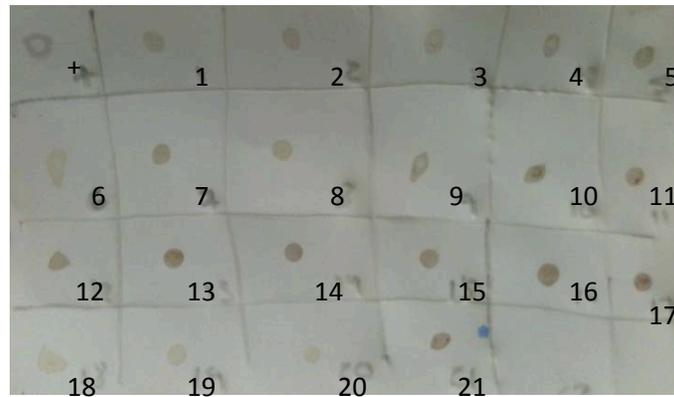


Figura 7.2 Dot blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma, EUA) 1:500.

Muestras tomadas a diferentes tiempos (t), así como generaciones (g). (+) control positivo. (1) t=1137 h (g=47). (2) t=1396.5 h (g=55). (3) t=1469.5 h (g=59). (4) t=1566.5 h (g=64). (5) t=1682.5 h (g=67). (6) t=1804.5 h (g=72). (7) t=1852.5 h (g=74). (8) t=1897.5 h (g=77). (9) t=1948.5 h (g=78). (10) t=1996.5 h (g=81). (11) t=2044.5 h (g=85). (12) t=2137.5 h (g=87). (13) t=2281.5 h (g=94). (14) t=2329.5 h (g=96). (15) t=2377.5 h (g=98). (16) t=2452 h (g=101). (17) t=2498 h (g=104). (18) t=2617.5 h (g=110). (19) t=2668.5 h (g=114). (20) t=2783.5 h (g=120). (21) t=3142.5 h (g=152).



Figura 7.3 Dot Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma EUA) 1:500. (1) control positivo APA purificada de *E. coli*, (2) muestra a las 3647.5 h (175 generaciones), (3) muestra a las 4456.5 h (220 generaciones) y (4) muestra a las 4489.5 h (223 generaciones).

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

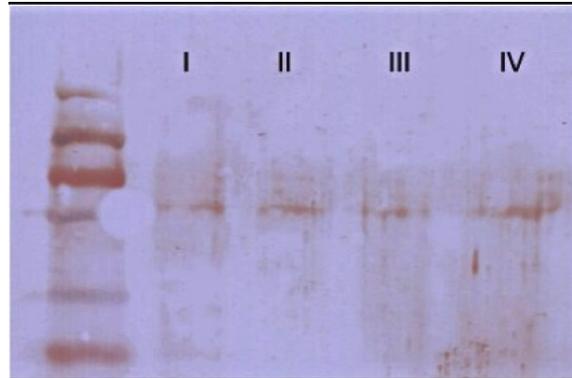


Figura 7.4 Western Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma® USA) 1:500. (I) Muestra a las 986 horas (40 generaciones). (II) Muestra a las 1038 horas (41 generaciones). (III) Muestra a las 1106 horas (43 generaciones). (IV) Muestra a las 1129 horas (46 generaciones).

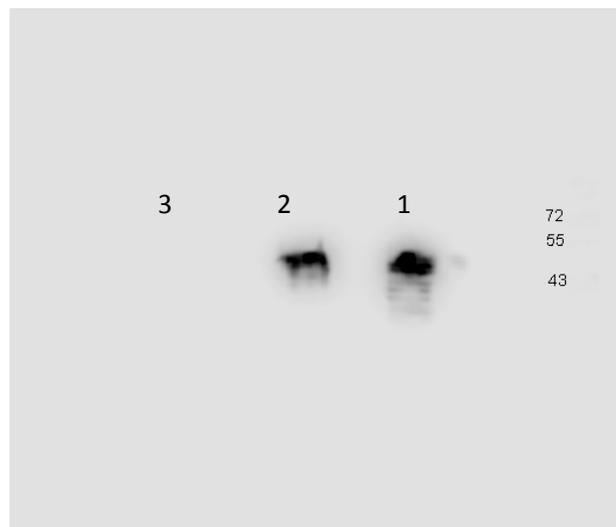


Figura 7.5 Western Blot para la proteína APA utilizando el anticuerpo anti-His (Sigma® EUA) 1:500. (1) Muestra a las 4456.5 h (220 generaciones). (2) Control positivo APA purificada de *E. coli*. (3) Muestra a las 4489.5 h (223 generaciones).

Los niveles de producción de proteínas recombinantes en biorreactores en cultivo continuo son típicamente mayores que en cultivo en matraces (**Lin Cereghino et al., 2002**). Existen trabajos previos en cultivos continuos que producen diversas proteínas recombinantes como interferon gama recombinante en células de ovario de hamster (**Nyberg et al., 1999**), streptokinasa recombinante en *E. coli* BL21 (DE3) (**Yazdani y Mukherjee, 2002**), proteinasa A recombinante en

Saccharomyces cerevisiae (Carlsen et al., 1997), tripsinogeno recombinante en *Pichia pastoris* (Paulová et al., 2012) y beta glutamasa recombinante en la cepa *E. coli* JW5807-2 (Velur Selvamani et al., 2014). En el último trabajo mencionado se observó que se mantenía la producción de beta glutamasa recombinante hasta 200 horas sin cambio, en presencia de antibiótico, manteniendo la presión de selección. Además, encontraron que la producción de proteína decaía cuando no se agregaba antibiótico. En el presente trabajo, se obtuvo producción continua de la proteína recombinante APA de *Mycobacterium tuberculosis* suministrando al medio de cultivo ampicilina y cloranfenicol durante 4456.5 horas (220 generaciones). La producción de proteína APA en cultivos continuos no había sido estudiada hasta el momento. Las producciones de esta proteína habían sido únicamente en cultivos en lote en *Streptomyces lividans* (Vallin et al., 2006; Gamboa-Suasnavart et al., 2013; Marin-Palacios et al., 2014), *Escherichia coli* XL1 (Laqueyrie et al., 1995) y *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Kumar et al., 2003; Nandakumar et al., 2013). La última cepa mencionada también fue utilizada para este trabajo.

7.3 Proteómica

Se tomaron muestras para análisis proteómico en 3 grupos diferentes, con la finalidad de obtener el posible estado estacionario en el cultivo continuo en intervalos menores a 10 duplicaciones. Además, se tomó una muestra para el análisis proteómico al final del cultivo en lote, al momento del inicio de la alimentación (hora 8 de cultivo). Los grupos 1, 2 y 3 están marcados en la figura 7.6. Las muestras del grupo 1 se tomaron a 1469.5 h (59 generaciones) (B') y 1566.5 h (64 generaciones) (B'') (Grupo 1, Figura 7.7B) 2498.5 h (104 generaciones) (C') y 2617.5 h (110 generaciones) (C'') (Grupo 2, Figura 7.7C) y 3817.5 h (191 generaciones) (D') y 3982.5 h (200 generaciones) (D'') (Grupo 3, Figura 7.7D).

Se hizo un análisis intragrupos (entre los geles del mismo grupo) (Figura 7.6) donde se observó que de los geles del grupo 1, el gel B' tiene 1088 spots y el gel B'' tiene 710 spots, de los cuales el porcentaje de similitud entre ellos es de 43%

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

(388 coincidencias). En el caso del grupo 2, el gel C' tiene 908 spots y el gel C'' tiene 784 spots, de los cuales, entre ellos tienen, el 55% de similitud (472 coincidencias). En el caso del grupo 3, el gel D' tiene 789 spots y el gel D'' tiene 1351 spots, de los cuales, entre ellos tienen 46.2% de similitud (495 coincidencias). Por lo que se puede decir que intragrupos se mantiene, en promedio, únicamente $48 \pm 6.1\%$ de similitud entre los geles del mismo grupo. Los geles del grupo 1 (Figura 7.7B) tienen 5 generaciones de diferencia, los gel grupo 2 (Figura 7.7C) tienen 6 generaciones de diferencia y el grupo 3 (Figura 7.7D) tienen 9 generaciones de diferencia, lo que nos dice que el porcentaje de similitud de spots no es dependiente al tiempo de diferencia que se tengan entre los geles.

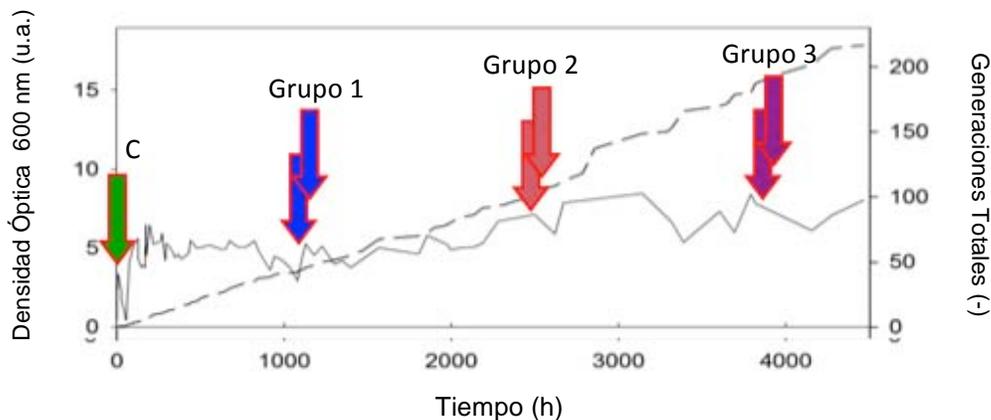


Figura 7.6 Crecimiento de *E. coli* a lo largo del tiempo de cultivo donde (C) Muestra de biorreactor en lote previo a iniciar el cultivo continuo, (Grupo 1) grupo uno de muestras a los tiempos 1560 h (59 generaciones) y 1633 h (64 generaciones), (Grupo 2) grupo dos de muestras a los tiempos 2567 h (104 generaciones) y 2603 h (110 generaciones), (Grupo 3) grupo tres de muestras a los tiempos 3876.5 h (191 generaciones) y 3954.5 h (200 generaciones).

Además, se realizó un análisis intergrupos (entre los tres grupos con respecto a la electroforesis en 2D de la muestra control, la cual fue tomada al tiempo inicial del cultivo continuo) que se hizo únicamente con los spots que se encontraban entre el porcentaje de similitud de cada grupo especificado previamente. En dicho análisis se observó que existió sobreexpresión y disminución de la expresión de

las proteínas intracelulares del hospedero (Figura 7.8A, Figura 7.8B, figura 7.8C, tabla 3). Al analizar el grupo 1 contra el gel control, se observa que se tiene una sobre expresión de 31 proteínas y una disminución en la expresión de 104 proteínas. En el caso del grupo 2 contra el gel control, se observa que se tiene sobreexpresión de 35 proteínas y disminución en la expresión de 28 proteínas. La comparación del grupo 3 contra el gel control, se tiene sobreexpresión de 19 proteínas y disminución en la expresión de 55 proteínas. Estos resultados sugieren que existe una producción diferencial de proteínas a las diferentes generaciones, a pesar de que se lleve a cabo un cultivo continuo.

Con los resultados previamente mencionados, es posible proponer, en términos proteómicos, que no se alcanza un estado estacionario dado que el proteoma varía con respecto al tiempo. Se observó que a pesar de tener un cultivo continuo a lo largo de 220 generaciones, la producción de proteínas del hospedero es diferente durante el cultivo, sugiriendo estadios celulares diferentes. Disminuía la expresión de 13 proteínas intracelulares del hospedero utilizado, así como 3 proteínas de la membrana celular, donde las intracelulares mostraban diferencias significativas en sobre expresión y disminución de la expresión de acuerdo a los límites utilizados por los autores. Cheng et al. (2008) realizaron un cultivo continuo por 56 horas del cual realizaron varios geles de electroforesis en dos dimensiones a diferentes tiempo de cultivo de *S. cerevisiae*, donde encontraron, que la producción de proteínas intracelulares de hospedero no se mantenían constantes, al igual que en este trabajo. De igual forma, Len et al. (2006) en un cultivo continuo de *Streptococcus mutans* observaron que únicamente 34 proteínas intracelulares se mantenían constantes a lo largo del cultivo. Dicho resultado es explicado porque las proteínas tienen tiempos de vida diferentes, provocando que la expresión protéica no se mantenga constante aún teniendo un cultivo continuo.

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

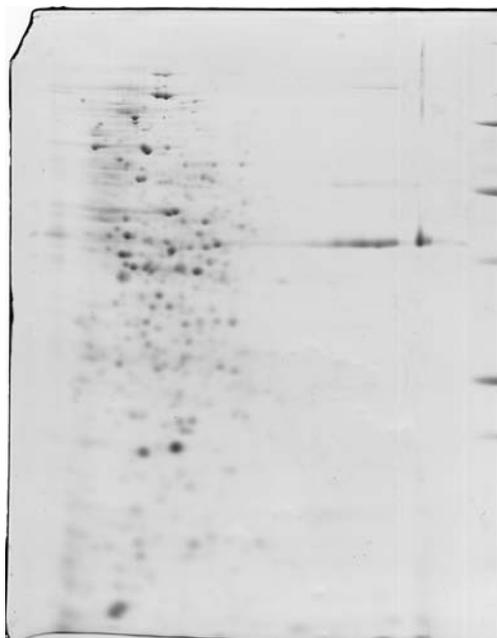


Figura 7.7A Proteómica de la muestra control tomada en el cultivo en lote, antes de comenzar la alimentación a la hora 8 del cultivo.

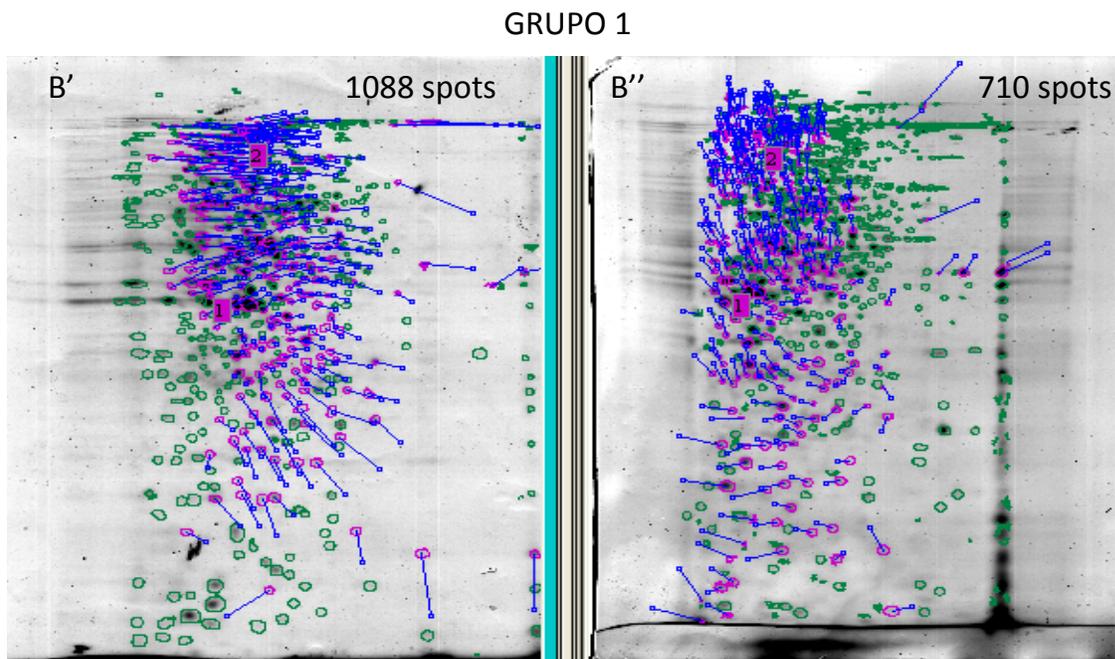


Figura 7.7B Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 1469.5 h (59 generaciones) (B') y 1566.5 h (64 generaciones) (B''), donde se obtuvo el 43% de similitud (388 coincidencias) de spots entre ambas electroforesis. Los círculos rosas indican las coincidencias.

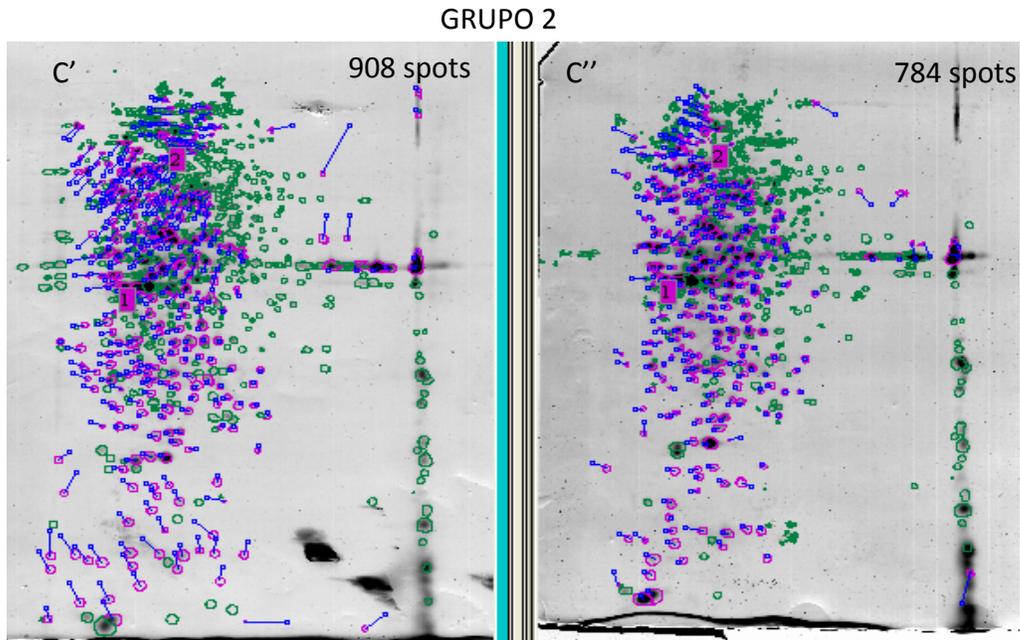


Figura 7.7C Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 2498.5 h (104 generaciones) (C') y 2617.5 h (110 generaciones) (C''), donde se obtuvo el 55% de similitud (472 coincidencias) de spots entre ambas electroforésis. Los círculos rosas indican las coincidencias.

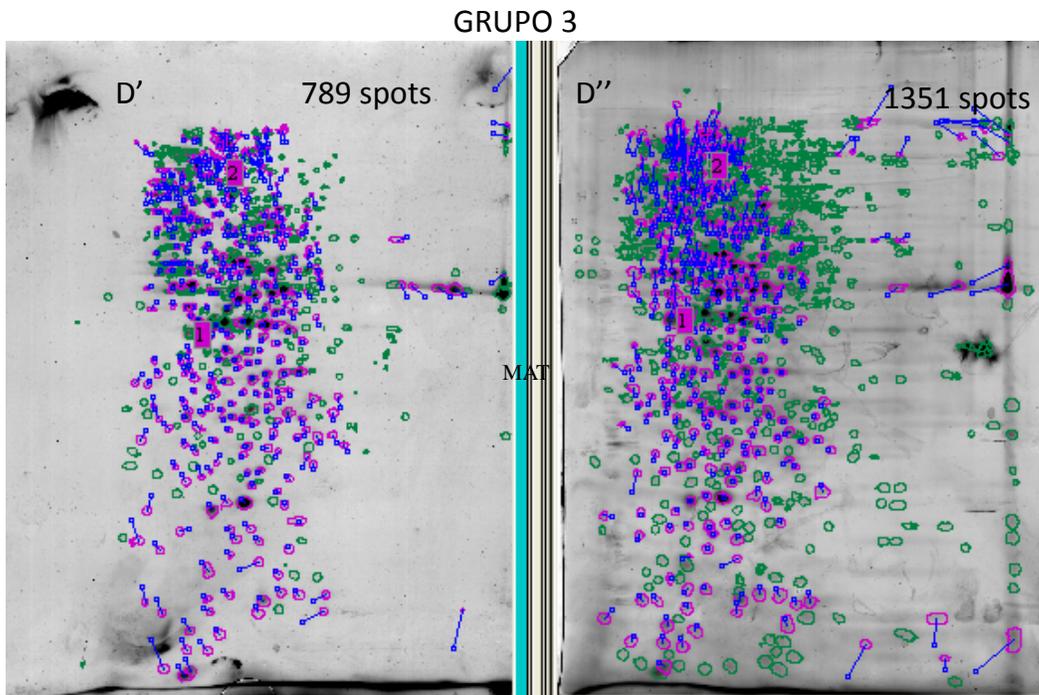


Figura 7.7D Electroforésis en 2 dimensiones de las muestras tomadas a los tiempos 3817.5 h (191 generaciones) (D') y 3982.5 h (200 generaciones) (D''), donde se obtuvo el 46.2% de similitud (495 coincidencias) de spots entre ambas electroforésis. Los círculos rosas son las coincidencias.

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

Tabla 3. Comparación de cada uno de los grupos con respecto al gel control y se indica el número de proteínas sobreexpresadas y con disminución en la expresión.

GRUPO	Sobreexpresión de proteínas (3 veces o más) respecto al grupo control	Disminución de la expresión de proteína (3 veces o más) respecto al grupo control
1	31	104
2	35	28
3	19	55

8. Conclusiones

- Se establecieron condiciones para un cultivo continuo en biorreactor de 1 L de *E. coli*, 30% de tensión de oxígeno disuelto, pH por encima de 8 y temperatura de 30 °C, las cuales permitieron crecer el cultivo por 223 generaciones en contraste a las 90.4 generaciones previamente reportadas en la literatura.
- La producción de la proteína recombinante APA se corroboró por métodos de inmunodetección hasta la hora 4456.5 (220 generaciones). Posterior a este tiempo, se sugiere la segregación del plásmido pET-15b.
- Con base al análisis proteómico, se observó variabilidad en la expresión de proteínas del hospedero (*E. coli*) durante los diferentes tiempos del cultivo, debido a esto, se considera que no se alcanza un estado estacionario.

9. Perspectivas

- Puesta en marcha de cultivo continuo por más de 220 generaciones realizando cambios en la concentración de ampicilina a lo largo del cultivo.
- Comparación de cantidad de proteína recombinante producida a lo largo del cultivo por métodos de cuantificación de proteína.
- Cuantificación del vector pET 15B por número de células a lo largo del cultivo continuo.
- Comparación de proteínas del hospedero a diferentes tiempos de cultivo con las de 10 generaciones de diferencia.
- Caracterización de proteínas similares a las diferentes horas del cultivo continuo.

10. 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. Crit. Care Med.** 2010. 181, 1407-1417.
- ADDGENE. "Vector Database: plasmid pET 15b". 2014. <http://www.addgene.org/vector-database/2543/>. Revisada Julio 2014.
- ALDOR I.S., Krawitz D.C., Forrest w., Chen C., Nishihara J.C., Joly J.C., Champion K.M. "Proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* in high-cell-density fermentations for improved production of an antibody fragment biopharmaceutical". **Appl. Environ. Microbiol.** 2005. 71 (4), 1717-1728.
- BAEIROPUR V., Shojaosadati S.A., Khalilzadeh R., Maghsoudi N., Tabandeh F. "A proposed feeding strategy for the overproduction of recombinant proteins in *Escherichia coli*". **Biotechnol. Appl. Biochem.** 2008. 49(Pt. 2), 141-147.
- BAE B., Davis E., Brown D., Campbell E.A., Wigneshweraraj S., Darst S.A. "Phage T7 Gp2 inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase involves misappropriation of $\sigma 70$ domain 1.1." **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2013. 110(49), 19772-7.
- BAE W.C., Kang T.G., Kang I.K., Won Y.J., Jeong C.J. "Reduction of Hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 in batch and continuous cultures." **J. Ind. Microbiol.** 2000. 36-39.
- BARATHY D.V., Suguna K. "Cristal structure of a putative aspartic proteinase domain of a *Mycobacterium tuberculosis* cell surface antigen PE_PGERS16". **FEBS open Bio.** 2013. 3, 256-62.
- BENZ I., Schmidt M.A. "Never say never again: Protein glycosilation in pathogenic bacteria". **Mol. Microbiol.** 2002. 45(2), 267-276.
- CALMETTE A. "Vaccination with BCG". **Br. Med. J.** 1930. 797-798.
- CARLÉTTI D., Morais da Fonseca D., Gembre A.F., Masson A.P., Weijenborg Campos L., Leite L.C., Rodrigues Pires A., Lannes-Vieira J., Lopes Silva C.,

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

- Bonato V.L., Horn C. "A single dose of a DNA vaccine encoding APA coencapsulated with 6,6'-trehalose dimycolate in microspheres confers long-term protection against tuberculosis in *Mycobacterium bovis* BCG-primed mice." **Clin. Vaccine Immunol.** 2013. 20(8), 1162-9.
- CARLSEN M., Jochumsen K.V., Emborg C., Nielsen J. "Modeling the growth and proteinase A production in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*." **Biotechnol. Bioeng.** 1997. 55(2), 447-54.
- 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.
- CHENG J.S., Qiao B., Yuan Y.J. "Comparative proteome analysis of robust *Saccharomyces cerevisiae* insights into industrial continuous and batch fermentation." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2008. 81(2), 327-38.
- CHOI J.H., Keum K.C., Lee S.Y. "Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*". **Chem. Eng. Sci.** 2006. 61 (3), 876-885.
- CINAR A., Parulekar S.J., Ündey C., Birol G. Batch fermentation. Modeling monitoring and control. Marcel Dekker Inc. EUA. 2003. p.p. 26-27.
- CODDEVILLE B., Wu S.W., Fabre E., Brassart C., Rombouts Y., Burguière A., Kremer L., Khoo K.H., Ellass-Rochard E., Guérardel Y. "Identification of the *Mycobacterium marinum* APA antigen O-mannosylation sites reveals important glycosylation variability with the *M. tuberculosis* APA homologue." **J. Proteomics.** 2012. 75(18), 5695-705.
- COHEN G.N. Microbial Biochemistry. 2a. Ed. Springer. Francia. 2011. p.p. 145-150
- DOBLE M., Gummadi S. Biochemical Engineering. Prentice Hall of India Pvt limited. Nueva Delhi. 2007. p.p. 156-160.
- DOBOS K.M., Swiderek K., Khoo K.H., Brennan P.J., Belisle J.T. "Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*". **Infect. Immun.** 1995. 63, 2846–2853

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

- DOBOS K.M., Khoo K.H., Swiderek K.M., Brennan P.J., Belisle J.T. "Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*." **J. Bacteriol.** 1996.178, 2498–2506
- DRAKE D.R., Brogden K.A., Polymicrobial diseases. **ASM Press**. Washington D.C. 2002. Chapter 2. NCBI Books.
- DREYFUS C., Pignol D., Arnoux P. "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of an archaeal protein homologous to plant nicotianamine synthase." **Struct. Biol. Cryst. Commun.** 2008. 64, 933-935
- FERNÁNDEZ-CASTANÉ A., Caminal G., López-Santín J. "Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures". **Microb. Cell Fact.** 2012. 9; 11, 58.
- FERRAZ J.C., Stavropoulos E., Yang M., Coade S., Espitia C., Lowrie D.B., Colston M.J., Tascon R.E. "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
- FLICKINGER M.C. Upstream Industrial Biotechnology. 1ª ed. Wiley. Canada 2013. p.p. 154-177
- FOLSOM J.P., Parker A.E., Carlson R.P. "Physiological and proteomic analysis of *Escherichia coli* iron-limited chemostat growth". **J. Bacteriol.** 2014. 196(15), 2748.
- FREEMAN B.A., Microbiología de Burrows. 22ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. España 1988. p.p. 57-62.
- FU J., Wilson D.B., Shuler M.L. "Continuous, high level production and excretion of a plasmid-encoded protein by *Escherichia coli* in a two-stage chemostat". **Biotechnol. Bioeng.** 1993. 41(10), 937-46.
- FUJIKAWA H., Sakha M.Z. "Prediction of Microbial growth in mixed culture with a competition model". **Biocontrol Sci. Techn.** 2014. 19(2), 89-92.

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

- GAMBOA-SUASNAVART R.A. "Efecto del oxígeno disuelto en el patrón de Glicosialación de la proteína APA 45/47 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*". Tesis de maestría. 2012.
- GAMBOA-SUASNAVART R.A., Marín-Palacio L.D., Martínez-Sotelo J.A., Espitia C., Servín-González L., Valdez-Cruz N.A., Trujillo-Roldán M.A. "Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*." **World J. Microbial. Biotechnol.** 2013. (8)1421-9.
- GAMBOA-SUASNAVART R.A., Valdez-Cruz N.A., Córdova-Dávalos L.E., Martínez-Sotelo J.A., Servin-González L., Espitia C., Trujillo-Roldán M.A., "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" **Microb. Cell Factories.** 2011. 10:110.
- GARCÍA-FRUITÓS E., Rodríguez-Carmona E., Díez-Gil C., Ferraz R.M., Vázquez E., Corchero J.L. "Surface cell growth engineering assisted by a novel bacterial nanomaterial." **Adv. Mater.** 2009. 21, 4249–4253.
- GARCIA-FRUITOS E., Vazquez E., Diez-Gil C., Corchero J.L., Seras-Franzoso J., Ratera I. "Bacterial inclusion bodies: making gold from waste". **Trends Biotechnol.** 2012. 30, 65–70.
- GARDNER, Simmons, Snustad. Principles of genetics. 8ª Edición. Wiley India Pvt. USA. 2009. p.p. 102-103, 110.
- GIOFFRÉ G., Echeverría-Valencia A., Arese A., Morsella C., Garbaccio F., Delgado M., Paolicchi F., Cataldi A., Romano M.I. "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. 132(2-4), 199-208.
- GONZÁLEZ-MONTEALBAN N., Villaverde A., Aris A., "Amyloid-linked cellular toxicity triggered by bacterial inclusion bodies". **Biochem. Biophys. Res. Commun.**

2007. 355(3), 637-42.

GOPAL G.J., Kumar A. "Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*". **Protein J.** 2013. 32(6), 419-25.

HABIBI N., Mohd Hashim S.Z., Norouzi A., Samian M.R. "A review of machine learning methods to predict the solubility of overexpressed recombinant proteins in *Escherichia coli*". **BMC Bioinformatics.** 2014. 15, 134.

HALL B.G., Acar H., Nandipati A., Barlow M. "Growth rates made easy". **Mol. Biol. Evol.** 2014. 31(1), 232-8.

HEGEN P. "Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*." **Trends Biochem. Sci.** 1995. 20(7), 285-6.

HEMOND H.F., Fechner E.J. Chemical Fate and Transport in the Environment. 3a. Ed. Elsevier. USA. 2014. p.p. 170-200

HOFT D.F., Blazevic A., Abate G., Hanekom W.A., 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.

HORN C., Namane A., Pescher P., Rivière M., Romain F., Puzo G., Bârză 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.

HUA Q., Yang C., Oshima T., Mori H., Shimizu K. "Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth limiting nutrient in chemostat cultures." **Appl. Environ. Microbiol.** 2004. 70(4), 2354.

HUANG C.J., Lin H., Yang X. "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements". **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 2012. 39, 3, 383.

- HUYGEN K. "The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*". **Front. Immunol.** 2014. 5,321
- JOVANOVIĆ P., Jeremić S., Djokić L., Savić V., Radivojević J., Maslak V., Vasiljević B., Nikodinović-Runic J. "Chemoselective biocatalytic reduction of conjugated nitroalkenes: new application for an *Escherichia coli* BL21 (DE3) expression strain". **Enzyme Microb. Technol.** 2014. 60, 16-23.
- KAMIONKA M. "Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*". **Curr. Pharm. Biotechnol.** 2011 Feb 1;12(2):268-74
- KANE J.F., Hartley D.L. "Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*". **Trends Biotechnol.** 1988. 6, 95-101.
- KESIK M., Sączynska V., Szewczyk B., Plucienniczak A. "Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route." **Immunol. Lett.** 2004. 91(2-3), 197-204.
- KIRK W.R. "Thermodynamics of imidazole-ligand binding to Ni-nitriloacetate in solution and covalently attached to agarose beads: imidazole, his-6 (hist-tag) peptide and a new bis-imidazol-dithiane". **Protein Expr. Purif.** 2014. 95, 1-7.
- KUENEN J.G., Johnson O.J. "Continuous cultures (Chemostats)". **Desk Encyc. Microb.** 2009. 309-326.
- KUMAR P., Amara R.R., Challu V.K., Chadda V.K., 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
- KUNNATH-VELAYUDHAN S., Porcelli S.A. "Recent advances in Defining the Immunoproteome of *Mycobacterium tuberculosis*." **Front. Immunol.** 2013. 4, 335.
- LAQUEYRERIE, A., Militzer P., Romain F., Eiglmeier K., Cole S., Marchal G., "Cloning, Sequencing and Expression of the apa gene coding for the *Mycobacterium*

- tuberculosis* 45-47 kilodalton secreted antigen complex”. **Infect. Immun.** 1995. 63, 4003-4010.
- LEN A.C.L., Cordwell S.J., Harty D.W.S., Jacques N.A. “Cellular and extracellular proteome analysis of *Streptococcus mutans* grown in chemostat.” **Proteomics.** 2003. 3, 627-646.
- LIN CEREGHINO G.P., Lin Cereghino J., Ilgen C., Cregg J.M. “Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*.” **Curr. Opin. Biotech.** 2002. 13(4), 329-32.
- LIU Z., Hou Z., Martínez J.L., Petranovic D., Nielsen J. “Correlation of cell growth by *Saccharomyces cerevisiae*.” **Appl. Microbiol. Biot.** 2013. 97(20), 8955-62
- LODISH H., Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. Biología Celular y Molecular. 5a. Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Argentina. 2005. p.p. 116-118.
- LUCA S., Mihaescu T. “History of BCG Vaccine”. **Maedica.** 2013. 8(1), 53-8.
- LÜDECKE C., Jandt K.D., Siegismund D., Kujau M.J., Zang E., Rettenmayr M., Bossert J., Roth M. “Reproducible biofilm cultivation of chemostat-grown *Escherichia coli* and investigation of bacterial adhesion on biomaterials using a non-constant-depth film fermenter”. **PLoS One.** 2014. 9(1), e84837.
- MAHMOOD T., Yang P.C. “Western Blot: technique, theory, and trouble shooting.” **N. Am. J. Med. Sci.** 2012. 4(9):429-34
- MARÍN-PALACIO L.D., Gamboa-Suasnavart R.A., Valdez-Cruz N.A., Servín-González L., Córdova-Aguilar M.S., Soto E. Kölckner W., Büchs J., Trujillo-Roldán M.A. “The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks”. **Biochem. Eng. J.** 2014. 224–233.
- MAURYA V.K., Singh K., Sinha S. “Suppression of Eis and expression of Wag31 and GroES in *Mycobacterium tuberculosis* cytosol under anaerobic culture conditions”. **Indian J. Exp. Biol.** 2014. 52(8), 773-780.

MITRAKI A. "Protein aggregation from inclusion bodies to amyloid and biomaterials".

Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2010. 79, 89–125

MORRIS S. "Evaluation of the safety and effectiveness of TB vaccines, including DNA-Based, Viral Vector and Live-attenuated products". 2013 U.S. Food and drug administration. Revisada Julio 2014. FDA: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/scienceresearch/biologicsresearchareas/ucm127279.htm>.

NAHKU R., Peebo K., Valgepea K., Barrick J.E., Adamberg K., Vilu R. "Stock culture heterogeneity rather than new mutational variation complicates short-term cell physiology studies of *Escherichia coli* K-12 MG1655 in continuous culture." **Microbiol.** 2011. 157, 2604-2610.

NANDAKUMAR S., Kannanganat S., Dobos K.M., Lucas M., Spencer J.S., Fang S., McDonald M.A., Pohl J., Birkness K., Chamcha V., Ramirez M.V., Plikaytis BB, Posey J.E., Amara R.R., Sable S.B. "O-mannosylation of the *Mycobacterium tuberculosis* adhesin APA is crucial for T cell antigenicity during infection but is expendable for protection." **PloS Pathog.** 2013. 9(10), e1003705.

NILSEN T.W., Rio D.C., Ares Jr M. "High-Yield synthesis of RNA using T7 RNA polymerase and plasmid DNA or oligonucleotide templates". **Cold Spring. Harb. Protoc.** 2013. 2013(11).

NYBERG G.B., Balcarcel R.R., Follstad B.D., Stephanopoulos G., Wang D.I.C. "Metabolic effects on recombinant Interferon- γ glycosylation in continuous culture on chinese hamster ovary cells." **Biotechnol. Bioeng.** 1999. 62(3), 336-47.

OKADA M., Kita Y., Nakajima T., Kanamaru N., Hashimoto S., et al. "Novel Prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis". **Vaccine.** 2009. 27, 3267-3270.

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

- PARÉS R.Y., Juárez A., Bioquímica de los microorganismos. 1a Edición. Editorial Renverté. España 1997. p.p. 34-36.
- PAULOVÁ L., Hyka P., Branská B., Melzoch K., Kovar K. "Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut." **J. Biotechnol.** 2012. 157, 180-188.
- PETERNEL S., Komel R. "Active Protein Aggregates Produced in *Escherichia coli*". **Int. J. Mol. Sci.** 2011. 12, 8275–8287.
- PETRAKOVÁ D., Janecek J., Bezousková S., Kalachová L., Techniková Z., Buriánková K., Halada P., Haladová K., Weiser J. "Fitness and proteome changes accompanying the development of erythromycin resistance in population of *Escherichia coli* grown in continuous culture." **Microbiol. Open.** 2013. 2(5), 841-52.
- POMMERVILLE J.C. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 9^a ed. Jones and Bartlett Publishers. EUA. 2011. p.p. 136-140.
- RAGAS A., Roussel L., Puzo G., Rivière 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(8), 5133-42.
- RAY M.V.L., Vanduyne O., Bertelsen A.H., Jacksonmatthews D.E., Sturmer A.M., Merkler D.J. Consalvo A.P., Young S.D., Gilligan J.P., Shields P.P. "Production of recombinant salmon calcitonin by in vitro amidation of an *Escherichia coli* produced precursor peptide". **Biotechnol.** 1993. 11(1), 64-70.
- RIO D.C. "Expression and purification of active recombinant T7 RNA polymerase from *E. coli*". **Spring Harb. Protoc.** 2013. 1094-1099.
- RODRIGUEZ-CARMONA E., Villaverde A. "Nanostructured bacterial materials for innovative medicines". **Trends Microbiol.** 2010. 18, 423–430

- ROMAIN F., Laqueryerie A., Militzer P., Pescher P., Chavarot P., Lagraderie M., Auregan G., Gheorghiu M., Marchal G. "Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45-47 kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria." **Infect. Immun.** 1993. 61 (2), 742-750.
- ROSSANO G.L., Ceccarelli E.A. "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges". **Front Microbiol.** 2014. 5, 172.
- SABATY M., Gorsse S., Adryanczyk G., Boiry S., Biaso F., Arnoux P., Pignol D. "Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis". **BMC Biochem.** 2013. 14, 28.
- SABLE S.B., Cheruvu M., Nandakumar S, Sharma S, Bandyopadhyay K., "Cellular immune responses to nine *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates following intranasal vaccination". **PLoS One.** 2011. 6.
- SABLE S.B., Verma I., Khuller G.K. "Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*". **Vaccine.** 2005. 23:4175-4184.
- SALI M., Di santé G., Cascioferro A., Zumbo A., Nicolo C. "Surface expression of MPT64 as a fusion with the PE domain of PE_PGRS33 enhances *Mycobacterium tuberculosis* in mice". **Infect. Immun.** 2010, 78, 5202-5213.
- SCHLEGEL H.G. Microbiología General. 7ma Edición. Ediciones Omega. España 1997. p.p. 213-216.
- SCHOREY J.S., Holsti M.A., Ratliff T.L., Allen P.M., Brown E.J. "Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals the fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria". **Mol. Microbiol.** 1996. 21 (2), 321-329.

- SCHULER M.L., Kargi F. *Bioprocess Engineering*. 2da edición. Prentice Hall International Series In the Physical and Chemical Engineering Sciences. USA 2008. p.p. 155-158, 176.
- SHENOY V.P., Mukhopadhyay C. "Rapid immunochromatographic test for the identification and discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from non-tuberculous Mycobacteria". **J. Clin. Diagn. Res.** 2014. 8(4), DC13-5.
- SHARMA S.S., Campbell J.W., Frisch D., Blattner F.R., Harcum S.W. "Expression of two recombinant chloramphenicol acetyltransferase variants in highly reduced genome *Escherichia coli* strains". **Biotechnol. Bioeng.** 2007. 98 (5), 1056-1070.
- SHIJIE L. *Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability and Reactor Design*. 1a ed. Elsevier. Amsterdam 2013. p.p. 116-130.
- SINGH S.M., Panda A.K. "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins". **J. Biosci. Bioeng.** 2005. 99 (4), 303-310.
- SOLOMON E., Martin C., Martin B., Berg L. *Biology*. 10 ed. Cengage Learning. USA 2014. p.p. 298-302
- STUDIER F.W., Moffatt B.A. "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes". **J. Mol. Biol.** 1986. 189 (1), 113-130.
- TABOR S., Richardson C.C. "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes". **Proc. Nati. Acad. Sci.** 1985. 82, 1074-1078.
- TERPE K. "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2006. 72(2), 211–222

- TORTORA G., Gelardi T., Ciardiello F., Bianco R. "The rationale for the combination of selective EGFR inhibitors with cytotoxic drugs and radiotherapy." **Int. J. Biol. Markers**. 2007. 22 (1 Suppl 4), S47-52.
- TOWBIN H., Staehelin T., Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". **Proc. Natl. Acad. Sci**. 1996. 76, 4350–4354.
- TRUJILLO-ROLDÁN M.A., Espitia C. "La prueba cutánea de hipersensibilidad aplicada en un parche. Nueva herramienta en el diagnóstico de la tuberculosis," **El Residente**. 2009. 3, 111-116.
- VALLIN C., Ramos A., Pimienta E., Rodríguez C., Hernández T., Hernández I., Del Sol R., Rosabal G., Van Mellaert L., Anné J. "Streptomyces as host of recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins". **Tuberculosis (Edinb)**. 2006. 86(3-4), 198-202.
- VAN DE WALLE M., Shiloach J. "Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation". **Biotechnol. Bioeng**. 1998. 57(1), 71–78.
- VAN HEERDEN C.D., Nicol W. "Continuous and batch cultures of *Escherichia coli* KJ134 of succinic acid fermentation: metabolic flux distribution and production characteristics". **Microb. Cell Fact**. 2013. 12, 80.
- VÁZQUEZ D.G., Orozco C.A., Ordaz L.C., García S.S. Laboratorio de biorreactores Manual de practicas. Instituto Politécnico Nacional. México. 2007. p.p. 6-7.
- VÁZQUEZ E, Villaverde A. "Engineering building blocks for self-assembling protein nanoparticles". **Microb. Cell Fact**. 2010. 9, 101.
- VÁZQUEZ E., Corchero J.L., Burgueño J.F., Seras-Franzoso J., Kosoy A., Bosser R., Mendoza R., Martínez-Láinez J.M., Rinas U., Fernández E., Ruiz-Avila L., García-Fruitós E., Villaverde A. "Functional inclusion bodies produced in

- bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies". **Adv. Mater.** 2012. 24(13), 1742-7.
- VELUR SELVAMANI R.S., Friehs K., Flaschel E. "Extracellular recombinant protein production under continuous culture conditions with *Escherichia coli* using an alternative plasmid selection mechanism". **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2014. 37, 401-413.
- VILLADSEN J., Nielsen J., Lidén G. Bioreaction Engineering Principles. 3^a ed. Springer. Dinamarca. 2011. p.p. 65-78.
- VILLAVERDE A. "Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories". **Microb. Cell Fact.** 2010. 9,53.
- VILLAVERDE A., García-Fruitós E., Rinas U., Seras-Franzoso J., Kosoy A., Corchero J.L., Vazquez E. "Packing protein drugs as bacterial inclusion bodies for therapeutic applications". **Microb. Cell Fact.** 2012. 11, 76.
- WEDRYCHOWICZ H., Kesik M., Kaliniak M., Kozak-Cieszczyk M., Jedlina-Panasiuk L., Jaros S., Plucienniczak A. "Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke." **Vet. Parasitol.** 2007. 147 (1-2), 77-88.
- WIDDEL F. "Theory and measurement of bacterial growth". **Grund. Mikrobiol.** 2010. 1290-1300.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014, <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>; revisada Junio 2014
- WU Y., Woodworth J.S., Shin D.S., Morris S., Behar S.M. "Vaccine-elicited 10-kilodalton culture filtrate protein-specific CD8(+) T cells are sufficient to mediate protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection" **Infect. Immune.** 2008. 76, 2249-2255.

- WUNDERLICH M., Taymaz-Nikerel H., Gosset G., Ramírez O.T., Lara A.R. "Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered *Escherichia coli* strains." **J. Biosci. Bioeng.** 2014. 3, 336-342.
- WYRE C., Overton T.W. "Use of a stress-minimisation paradigm in high cell density fed-batch in *Escherichia coli* fermentations to optimize recombinant protein production". **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 2014. 9,1391-404.
- YAZDANI S.S., Mukherjee K.L. "Continuous culture studies on the stability and expression of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*." **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2002. 24, 341-346.
- YEE L., Blanch H.W. "Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*". **Nat. Biotechnol.** 1992. 10, 1550-1556.
- YIN J., Yang G., Wang S., Chen Y. "Purification and determination of stachyose in Chinese artichoke (*Stachys Sieboldii* Miq.) by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection." **Talanta.** 2006. 70(1), 208-12.
- ZELLWEGER J.P. "Latent tuberculosis: which test in which situation?" **Swiss Med. Wkly.** 2008. 26, 31-7.
- ZHANG X., Zhang X., Li Z., Xia Y., Ye Q. "Continuous culture and proteomic analysis of *Escherichia coli* DH5 α and its acetate-tolerant mutant DA19 under conditions of nitrogen source limitation." **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2011. 34, 179-187.
- ZHANG C., Song X., Zhao Y., Zhang H., Zhao S., Mao F., Bai B., Wu S., Shi C. "*Mycobacterium tuberculosis* secreted proteins as potential biomarkers for the diagnosis of active tuberculosis and latent tuberculosis infection". **J. Clin. Lab Anal.** 2014.
- ZHAO W., Schorey J.S., Bong-Mastek M., Ritchey J., Brown E.J. "Role of a bacillus

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

Calmette-Guerin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity." **Int. J. Cancer.** 2000. 86, 83–88.

ZHAO W.C., Schorey J.S., Groger R., Allen P.M., Brown E.J. "Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein." **Fap. J. Biol. Chem.** 1999. 274, 4521–4526.

11. Anexos

Anexo 1

Resultados obtenidos de la proteómica realizada bajo el apoyo de la Dra. Norma A. Galicia. Tablas del análisis estadístico de spots que coinciden entre los geles así como el porcentaje de coincidencia que se obtiene.

Tabla 1. Información general de los geles.

Grupo	Nombre del Gel	# Total de Spots	# Coincidencias por grupo	% Coincidencias por grupo
Control		678		
Grupo 1	B'	710		
Grupo 1	B''	1088	388	43.1591
Grupo 2	C'	908		
Grupo 2	C''	784	472	55.792
Grupo 3	D'	789		
Grupo 3	D''	1351	495	46.2617

Tabla 1.1 Análisis de coincidencias de cada gel con respecto al gel control

Gel Control	Gel Tratamiento	# Coincidencias	% Coincidencia
Gel Control	B'	301	34.0883
Gel Control	B''	262	37.7522
Gel Control	C'	309	38.966
Gel Control	C''	267	36.5253
Gel Control	D'	358	48.8071
Gel Control	D''	371	36.5697

Anexo 2

Composición del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis*. La composición y mezcla de los antibióticos agregados al medio de cultivo LB y el inductor utilizado para mantenimiento del plásmido pET-15b el cual contenía la proteína APA recombinante.

Medio LB (1L):

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

Fijar pH a 7.5

Ampicilina 1000X (1 mL)

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

Cloranfenicol 1000X (1 mL)

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

IPTG 0.5 mM 1000X (1 mL)

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

Anexo 3

Preparación de soluciones para los geles SDS-PAGE utilizados para comprobar la producción de la proteína recombinante APA en diferentes tiempos del cultivo, composición del gel al 12% con las cantidades respectivas de gel de resolución y gel concentrador.

Solución 1 SDS-PAGE al 30%

- Acrilamida.....29.2 g
- Bis-acrilamida.....0.8 g
- Agua.....100 mL

Solución 2 SDS-PAGE pH 8.8 (2X)

- Tris-HCl 0.75 M..... 9.075 g/100 mL
- SDS 0.2%.....0.2 g

Solución 3 SDS-PAGE pH 6.2 (2X)

- Tris-HCl 0.25 M.....3.0275 g/ 100 mL
- SDS 0.2%.....0.2 g

Preparación de gel SDS-PAGE 12%

Gel de resolución pH 8.8

- Solución 1.....4.6 mL
- Solución 2.....5.5 mL
- dd H₂O.....0.9 mL
- 10% APS
(persulfato de amonio).....50 µL
- TEMED
(N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina)...5 µL

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

Gel concentrador pH 6.8

- Solución 1.....830 μ L
- Solución 3.....2500 μ L
- dd H₂O.....1615 μ L
- 10% APS..... 50 μ L
- TEMED.....5 μ L

Anexo 4

Buffers utilizados para el corrimiento electroforético 1X (1L), carga reductor para carga de las muestras en los pozos del gel SDS-PAGE y componentes de la solución para tinción de gel con azul de comassie R-250.

- Buffer de corrimiento electroforético 1X (1 L)

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

Ajustar a pH= 8.6

- Buffer de carga reductor 2X (10 mL)

Reactivo	Cantidad
Glicerol	2.0 mL
Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 mL
SDS 10%	4.0 mL
Azul de bromofenol	1.0 mg
Mercaptoetanol	0.2 mL
Agua destilada	1.5 mL

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

- Preparación azul de Coomassie R-250 (250 mL)

Reactivo	Cantidad
Comassie R-250	0.06 g
Metanol	100 mL
Ácido acético	18 mL
Agua destilada	130 mL

Anexo 5

Buffers utilizados para realizar los Dot Blots y Western Blots de este trabajo. Composición del buffer de transferencia utilizado para transferir las proteínas del gel SDS-PAGE previamente hecho, a las membranas que se utilizaron para realizar Western Blot y composición del buffer PBS utilizado para realizar los Western Blots y Dot Blots, así como la composición de la solución reveladora de Western Blot y Dot Blot.

- Buffer de transferencia (1L)

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

Ajustar pH= 8.3

- Buffer de fosfatos PBS 20X (1 L)

Reactivo	Cantidad
NaCl	160.0 g
KCl	4.0 g
Na ₂ HPO ₄	28.8 g

Análisis del comportamiento de *Escherichia coli* productora del antígeno APA de *Mycobacterium tuberculosis* por la inducción química en cultivo continuo

KH₂PO₄	4.8 g
Agua destilada	Afoto 1L

Ajustar pH = 7.2

Buffer PBS (200 mL)

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

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

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

Buffer de bloqueo para Western Blotting (10 mL)

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

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

- Buffer PBS – Tween 20 al 0.05%.....10 mL
- Albúmina sérica bovina.....0.01 g
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-his₆-
peroxidasa(Roche).....10 µL
- Fijar pH a 7.2

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

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