



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

## DIVISIÓN DE INGENIERÍA

### DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**“Producción en cultivo por lote alimentado de la  
proteína recombinante NprR de *Bacillus thuringiensis*  
en *Escherichia coli*”**

**TESIS PROFESIONAL**

Para obtener el título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

Presenta:

**Guadalupe Yapur Villaseñor**

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 28 de Enero de 2014.


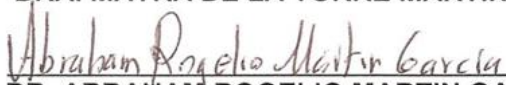
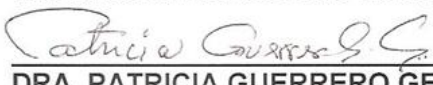
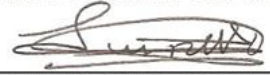
**M.C. JESÚS LEONEL SERVÍN RODRÍGUEZ**  
JEFE DEL DEPARTAMENTO  
INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "PRODUCCIÓN EN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NprR DE BACILLUS THURINGIENSIS EN ESCHERICHIA COLI", presentada por:

**GUADALUPE YAPUR VILLASEÑOR**

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

<u>29.01.14</u> Fecha	 _____ DRA. MÀYRA DE LA TORRE MARTÍNEZ
<u>29/01/2014</u>	 _____ DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA
<u>29/01/2014</u>	 _____ DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN
<u>29/01/2014</u>	 _____ DR. LUIS CARLOS PLATT LUCERO

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, mi alma mater, y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por la formación, el aprendizaje y el apoyo que me han brindado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de su institución.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar este trabajo.

A mi directora de tesis, la doctora Mayra de la Torre Martínez, por acogernos entusiastamente desde el primer día y darnos la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por el tiempo y esfuerzo invertidos en guiarme durante este proceso y por todo el aprendizaje que significó esta experiencia. Admiro mucho la energía, pasión, dedicación y cariño que tiene al realizar su labor, lo que la hace una persona excepcional, convirtiéndose para mí en un modelo a seguir.

A mi comité, formado por el Dr. Abraham Martin, la Dra. Patricia Guerrero y el Dr. Luis Carlos Platt, por las valiosas opiniones que aportaron para mejorar este trabajo. Quiero agradecer en especial al Dr. Abraham Martin por las asesorías que me brindó durante la fase experimental de mi trabajo, las cuales fueron de gran ayuda para obtener los resultados a continuación presentados.

A la Q.F.B. Elvira Rios Leal y al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav México por apoyarme con las mediciones de ácido acético.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del CIAD: Ana Lilia López, Jorge Rocha, Rosina Cabrera, Viridiana Vega, Ernesto Gallardo y

Alfonso Álvarez, quienes son muy talentosos y de quienes aprendí mucho, pero sobre todo por la amistad que me brindaron, saturando de risas y alegrías esta experiencia.

Quiero agradecer en especial a Viridiana Vega y a Rosina Cabrera quienes fueron como mis tutoras ya que me llevaron de la mano durante todo el proceso. Gracias por compartirme sus proyectos y darme las herramientas que me permitieron realizar esta tesis.

A Adriana Hinojosa quien fue de gran ayuda durante el verano, apoyándome en todos los experimentos que realicé y por los buenos momentos que surgieron de su visita.

También quiero agradecer en especial a Alfonso Álvarez Villa, quien me dirigió al CIAD y que, desde entonces, ha sido mi inseparable amigo, sin ti nada hubiera sido lo mismo, gracias por todo el apoyo y cariño que me has dado.

A mis padres, por los sacrificios que han realizado para convertirme en la profesionalista y persona que soy hoy. A mi familia y a mi novio, Javier, por ver siempre por mi bienestar y apoyarme en todo lo que hago, por su compañía y cariño.

Finalmente le doy gracias a Dios por permitirme vivir ésta experiencia en la cual, no sólo aprendí mucho, sino que además me divertí y es por esto que me siento muy feliz.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Hermosillo, Sonora. La tesis forma parte del proyecto CONACYT “**Activación y función del regulador transcripcional de *quorum sensing* NprR en *Bacillus thuringiensis*”**”.

Éste trabajo participó en el III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias en la modalidad poster (Anexo 1) y se espera que forme parte de un artículo de investigación.

## RESUMEN

NprR forma parte de una familia de receptores de quórum sensing denominada RNPP (Rap fofatasas, NprR, PlcR y PrgX), que son intracelulares y actúan directamente como efectores (Declerck, et al., 2007) (Rocha-Estrada, et al., 2010). En investigaciones recientes de nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que NprR juega un papel en la regulación de la esporulación y en la síntesis de proteínas insecticidas Cry en *Bacillus thuringiensis* (Bt). Por lo cual, es necesario producir grandes cantidades de proteína para estudios posteriores. La proteína fue sobre-expresada usando como sistema de expresión heterólogo *Escherichia coli* BL21(DE3), en el que también se sobre-expresaron las chaperonas moleculares DnaK-DnaJ-GrpE y GroES-GroEL para facilitar el plegamiento de la proteína y tenerla en forma soluble. Para aumentar la densidad celular y consecuentemente la producción volumétrica de proteína NprR se diseñó un sistema de cultivo por lote alimentado en bio-reactor. El nivel de oxígeno disuelto es crítico y por lo tanto se mantuvo arriba del 50% de saturación. Se utilizó una alimentación constante que se inició en la fase exponencial de crecimiento con la cual se logró obtener una densidad celular final de 53.5 g/L (base seca). La inducción de chaperonas y proteínas se realizó al final de lote alimentado cuando había una alta concentración celular y se podían mantener condiciones óptimas para su expresión. Después de extraer y purificar la proteína, se obtuvo un rendimiento de 147.5 mg(NprR)/L.

# TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN .....	VII
TABLA DE CONTENIDOS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABLAS .....	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	1
1.2 Quorum Sensing .....	1
1.3 NprR.....	2
1.4 Producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	3
1.5 Cultivos de alta densidad celular en bio-reactor .....	4
1.6 Dificultades .....	9
1.6.1. Oxígeno Disuelto .....	9
1.6.2. Producción de acetato .....	9
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 Hipótesis .....	12
3.2 Objetivo general .....	12
3.3 Objetivos específicos .....	12
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>



<b>4.1 Cepa y plásmidos.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Preparación del inóculo.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3 Cultivo por lote en matraz .....</b>	<b>14</b>
4.3.1. Inducción de las chaperonas.....	15
4.3.2. Inducción de <i>nprR</i> .....	15
<b>4.4 Cultivo en bio-reactor .....</b>	<b>15</b>
4.4.1. Condiciones de operación.....	17
4.4.2. Control de los niveles de oxígeno disuelto.....	17
4.4.3. Medio de cultivo.....	17
<b>4.5 Perfil de alimentación .....</b>	<b>18</b>
<b>4.6 Inducción de las chaperonas y la proteína NprR.....</b>	<b>19</b>
<b>4.7 Obtención de proteínas intracelulares.....</b>	<b>20</b>
<b>4.8 Purificación de la proteína NprR .....</b>	<b>21</b>
4.8.1. Paso 1 .....	21
4.8.2. Diálisis.....	21
4.8.3. Paso 2 .....	22
<b>4.9 Medición del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno .....</b>	<b>23</b>
<b>4.10 Métodos analíticos.....</b>	<b>24</b>
4.10.1. Crecimiento bacteriano .....	24
4.10.2. Cuantificación de proteína .....	24
4.10.3. Cuantificación de glicerol .....	24
4.10.4. Cuantificación de ácido acético .....	24
<b>4.11 Análisis de datos.....</b>	<b>25</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Curva de calibración de peso seco .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 Curva de calibración de concentración de proteína.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3 Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4 Producción de proteína en cultivo por lote en matraz agitado .....</b>	<b>28</b>
<b>5.5 Cultivo por lote en bio-reactor.....</b>	<b>29</b>
<b>5.6 Diseño de la alimentación .....</b>	<b>33</b>
<b>5.7 Producción de proteína recombinante NprR en cultivo por lote alimentado .....</b>	<b>35</b>

<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción de los plásmidos pG-KJE6 y pET-11a.....	13
<b>Figura 2.</b> Diagrama del bio-reactor Applikon® 3 L.....	16
<b>Figura 3.</b> Gradiente de concentración de NaCl para la elución de la proteína NprR por cromatografía de intercambio aniónico.....	23
<b>Figura 4.</b> Curva de calibración de concentración celular (g/L) en función de la DO <sub>600</sub> .....	26
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración de la DO <sub>595</sub> en función de la concentración de proteína (mg/mL) .....	27
<b>Figura 6.</b> Cálculo del K <sub>L</sub> a por el método dinámico de Taguchi y Humphrey .....	27
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento y evolución de pH de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en fermentación por lote en matraz.....	28
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en bio-reactor con agitación y aireación constantes de 300 rpm y 2.5 vvm.....	30
<b>Figura 9.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en bio-reactor con agitación variable entre 400-600 rpm y aireación constante de 2.5 vvm. ....	30
<b>Figura 10.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en bio-reactor con agitación variable de 600-1000 rpm y aireación de 1.0 vvm con posterior alimentación de oxígeno puro de 0.1 vvm. ....	31
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en bio-reactor con OD menor al 10% de saturación.....	33
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento en lote alimentado de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> en bio-reactor.....	36
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 12%.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estrategias de alimentación de cultivos por lote alimentado.....	7
<b>Tabla 2.</b> Cultivos de alta densidad por lote alimentado de <i>Escherichia coli</i> para la producción de proteína recombinante .....	8
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio de cultivo Terrific Broth (TB) sin sales y suplementado con glicerol .....	14
<b>Tabla 4.</b> Composición del medio de cultivo TB suplementado con glicerol.....	15
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio de cultivo TB suplementado con glicerol utilizado en el bio-reactor.....	18
<b>Tabla 6.</b> Composición del medio complejo de alimentación .....	19
<b>Tabla 7.</b> Composición del regulador de lisis.....	20
<b>Tabla 8.</b> Composición de los amortiguadores para la cromatografía de afinidad de metales .....	21
<b>Tabla 9.</b> Composición de los amortiguadores para la cromatografía de intercambio aniónico .....	22
<b>Tabla 10.</b> Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> utilizando el modelo logístico en los cultivos por lote en bio-reactor a diferentes límites inferiores de porcentajes de oxígeno disuelto .....	31
<b>Tabla 11.</b> Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ <i>nprR</i> utilizando el modelo logístico en el cultivo por lote alimentado en bio-reactor y el cultivo por lote en matraz.....	36
<b>Tabla 12.</b> Producción de proteína recombinante NprR en cultivo por lote alimentado en bio-reactor y cultivo por lote en matraz.....	38

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Bacillus thuringiensis*

El grupo de *Bacillus cereus* comprende un amplio número de especies entre las que se encuentran *B. thuringiensis* (patógeno de insectos) y *B. anthracis* (agente etiológico del ántrax) (Slati & Lereclus, 2002), estas bacterias son formadoras de esporas. Durante la esporulación, llevada a cabo en la fase estacionaria del ciclo celular, *B. thuringiensis* produce cristales de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente para larvas de lepidópteros y dípteros (Asaff, et al., 2002). Estas proteínas se han denominado Cry (del inglés *Crystal*) las cuales al ser procesadas proteolíticamente en el intestino del insecto provocan su muerte (Schnepf, et al., 1998) por lo que son de gran interés en la agricultura (Aranson, 2002). Las formulaciones basadas en *B. thuringiensis* (mezcla de esporas y proteínas Cry) se han usado por más de 60 años como insecticidas biológicos para el control de plagas y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (Sauka & Benintende, 2008). Debido a su alta especificidad y seguridad para el medio ambiente, la especie *B. thuringiensis*, actualmente representa una valiosa alternativa al uso de pesticidas químicos en la agricultura comercial y en actividades forestales (Roh, et al., 2007).

## 1.2 Quorum Sensing

La esporulación en bacilos está regulada por Quorum Sensing (QS), que es un mecanismo de comunicación célula-célula y se refiere a la habilidad de las bacterias a responder a moléculas químicas, nombradas auto inductores (Reading & Sperandio, 2006). La concentración de éstos aumenta al incrementar la densidad celular, cuando se alcanza una concentración umbral del inductor el regulador de respuesta es activado, y realiza su

función alterando la expresión de genes regulados directa o indirecta por QS. Usando estos sistemas de señales, la bacteria sincroniza funciones particulares como simbiosis, virulencia, competencia genética, conjugación, producción de antibióticos, movilidad, formación de bio-películas y esporulación (Miller & Bassler, 2001). De esta manera la población bacteriana responde a estímulos como un todo de manera coordinada, por lo tanto actúa de manera similar a un organismo multicelular (Waters & Bassler, 2005).

En bacterias Gram positivas se emplean como señales péptidos autoinductores (AIP) que son sintetizados como péptidos precursores, exportados y modificados por proteasas extracelulares, para luego ser re-internalizados mediante un sistema de transporte activo de oligopéptidos (Gohar, et al., 2008) (Pottathil & Lazazzera, 2003).

### 1.3 NprR

Existe una familia de receptores de QS denominada RNPP (Rap fosfatasa, NprR, PlcR y PrgX) que son intracelulares y actúan directamente como efectores (Declerck, et al., 2007) (Rocha-Estrada, et al., 2010). Dentro de esta familia se encuentra la proteína NprR, originalmente descrita como activador de proteasa neutra en *Bacillus subtilis* (Uehara, et al., 1979). Estas proteínas se caracterizan por tener múltiples motivos de repetición tetra-tricopéptidos (TPR) para la interacción proteína-proteína y algunas, como NprR, contienen motivos hélice-giro-hélice (HTH) para unirse al DNA en la región N-terminal, lo que sugiere su función como regulador transcripcional (Rocha-Estrada, et al., 2010). Estas proteínas interactúan con su oligopéptido autoinductor y son activadas o inhibidas por su péptido maduro de señalización. Los genes que codifican para la proteína receptora y para el pro-péptido, que se procesa al péptido de señalización, forman un casete en el cromosoma bacteriano (Declerck, et al., 2007) (Rocha-Estrada, et al., 2010).

La información acerca de la proteína de quórum sensing NprR y su péptido de señalización es limitada, por ejemplo, no hay respuesta a preguntas importantes como: qué

genes están incluidos en el regulón NprR, cuál es la forma del péptido maduro, cómo es mecanismo de regulación y cuál es la función del sistema (Rocha-Estrada, et al., 2010). Se sabe que NprR y su péptido de señalización regulan 41 genes (Dubois & et, 2012) y nuestro grupo de trabajo ha encontrado que además juega un papel en la regulación de la esporulación y en la síntesis de proteínas Cry. Para contribuir a elucidar este mecanismo se requiere estudiar *in vitro* la interacción proteína-péptido e inclusive cristalizarla, para lo que requiere la producción y purificación de gramos de proteína.

#### **1.4 Producción de proteínas recombinantes en *E. coli***

La producción de proteína recombinante se ha convertido en un pilar en la industria biotecnológica y en la investigación. La combinación de la tecnología de DNA recombinante y los procesos a gran escala han habilitado la producción en grandes cantidades de compuestos que de otra manera hubieran sido muy difícil o imposible de obtener de fuentes naturales, como por ejemplo, insulina, interferón, enzimas y factores de crecimiento (Roeva, et al., 2010). *Escherichia coli* es el sistema procariota más usado para la síntesis de proteínas recombinantes, principalmente por ser un sistema bien caracterizado en términos de genética molecular, fisiología y sistemas de expresión (Choi & Lee, 2004). A pesar de que *E. coli* no puede ser utilizada para producir ciertas proteínas complejas de gran peso molecular, en particular aquellas que requieran modificaciones post-transaccionales o que contengan puentes di-sulfuro, otras proteínas y productos no proteicos como amino ácidos, metabolitos primarios y secundarios han sido producidos satisfactoriamente con altas productividades (Hogson, 1993) (Jeong, et al., 1999) (Gerigk, et al., 2002).

Un problema común en *E. coli* es que generalmente las proteínas recombinantes forman cuerpos de inclusión. Éstos son proteínas incorrectamente dobladas que forman agregados insolubles, biológicamente inactivos, los cuales tiene que pasar por un

complicado proceso de desnaturalización y posterior plegamiento para volver a adquirir su actividad biológica (Kane & Hartley, 1988); el proceso generalmente es ineficiente. Sin embargo, estudios recientes en el entendimiento del plegamiento de proteínas y la acción de proteínas moleculares en el proceso, ha permitido diseñar cepas de *E. coli* que acumulen proteína soluble (Hockney, 1994). Una estrategia es la co-expresión de chaperonas moleculares, las cuales son proteínas que se unen al polipéptido nascente y prevén las reacciones de agregación fuera de curso al unirse transitoriamente a dominios hidrofóbicos (Gottesman, et al., 1997). Muchos estudios han documentado los beneficios del plegamiento de proteínas con la co-expresión de diferentes chaperonas (Armein, et al., 1995), (Thomas & Baneyx, 1996), (Nishihara, et al., 1998), (Nishihara, et al., 2000).

## **1.5 Cultivos de alta densidad celular en bio-reactor**

El principal objetivo de un bio-reactor, además de contener la fermentación, es el control de los parámetros ambientales en valores predeterminados. El número de parámetros que pueden ser manipulados dependen de la complejidad del bio-reactor. Entre estas condiciones están los niveles de oxígeno disuelto, pH, temperatura, velocidad de agitación, potencial redox, dióxido de carbono disuelto, concentración celular, velocidad de crecimiento, concentración del sustrato, velocidad superficial de aireación, presión hidráulica y manométrica e hidrodinámica del fluido, etc. Todas estas variables se relacionan con los rendimientos de la proteína recombinante, particularmente en el crecimiento y el estado metabólico celular, la transcripción y translación. Puesto que estas variables se pueden controlar en bio-reactores, éstos tienen un enorme potencial para incrementar la productividad de la proteína recombinante (Palomares, et al., 2004).

Una de las principales metas en la investigación de fermentaciones son las técnicas para incrementar los rendimientos de producción. Ya que la mayoría de las proteínas en *E. coli* se producen intracelularmente, la productividad es proporcional a la concentración



celular y la productividad específica de proteína (la cantidad de proteína producida por unidad de masa celular por unidad de tiempo) (Lee, 1996). Técnicas para producir cultivos de alta densidad (HCDC) de *E. coli* han sido desarrolladas para aumentar la productividad y además brindar ventajas como reducción del volumen de fermentación, facilitar las subsecuentes operaciones de purificación, bajar costos de producción y reducir la inversión en equipo (Lee, 1996).

Los procesos de lote alimentado son comúnmente los más usados para obtener altas densidades celulares (Yee & Blanch, 1993) (Riesenberg, 1991). Los cultivos en lote alimentado utilizan un inóculo creciendo a la máxima velocidad de crecimiento que puede ser sostenida por los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador; varios regímenes de alimentación son impuestos hasta que termina la fermentación. Una concentración celular mayor de 50 gramos de células (peso seco) por litro (g/L) puede ser rutinariamente obtenida en cultivos por lote alimentado de ambas cepas recombinantes y no recombinantes de *E. coli* (Yee & Blanch, 1993) (Riesenberg, 1991).

Algunos nutrientes, incluyendo las fuentes de carbono y nitrógeno, pueden inhibir el crecimiento celular al presentarse en concentraciones superiores a cierto límite. Esto explica que el hecho aislado de aumentar la cantidad de nutrientes en el cultivo por lote no necesariamente produce una mayor producción celular. Es por esto que los nutrientes tienen que ser dosificados mediante una alimentación, para así mantener concentraciones menores a aquel límite de inhibición y proveer los nutrientes necesarios para mantener altas velocidades de crecimiento.

Las estrategias de alimentación son críticas para el éxito de cultivos de alta densidad celular (HCDC), ya que la alimentación no sólo afecta la máxima concentración alcanzada, sino también la productividad celular (Lee, 1996). La formación de producto también puede verse afectada al variar las estrategias de alimentación (Bench & Carlsen, 1990) (Jung, et al., 1988). Los HCDC funcionan normalmente como alimentación constante

(Markl, et al., 1993) (Bench & Carlsen, 1990) (Jung, et al., 1988), alimentación escalonada (Konstantinov, et al., 1990) (Paalme, et al., 1990) (Pan, et al., 1987) y alimentación exponencial (Pan, et al., 1987) (Lee, et al., 1989) (Jung, et al., 1988) (Hellmuth, et al., 1994) (Yee & Blanch, 1993) y han sido usadas para obtener altas concentraciones celulares en cultivos de *E. coli*. Existen además estrategias más sofisticadas con esquemas de control retroalimentado, los cuales pueden ser directos o indirectos; los primeros alimentan según la medición de la concentración de sustrato en el medio de cultivo (Lee, 1996), y los segundos correlacionan la medición de parámetros físicos como porcentaje de oxígeno disuelto (DO-stat) (Mori, et al., 1979) (Eppstein, et al., 1989) (Ohta, et al., 1993), pH (pH-stat) (Lee & Chang, 1994) (Lee & Chang, 1993), concentración celular y velocidad de evolución de CO<sub>2</sub> (CER) (Paalme, et al., 1990). Un resumen de las anteriores estrategias citadas se encuentra en la Tabla 1 y en la Tabla 2 se enlistan diferentes proteínas recombinantes producidas por cultivo en lote alimentado.

**Tabla 1.** Estrategias de alimentación de cultivos por lote alimentado

<b>Estrategias de alimentación</b>	
<b>Sin control retroalimentado</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Constante:</b> alimenta sustrato a una velocidad predeterminada a lo largo del cultivo, lo que hace que la velocidad de crecimiento disminuya.</li> <li>• <b>En incrementos:</b> la alimentación aumenta ya sea gradualmente, de manera escalonada o lineal, este incremento puede compensar la disminución en la velocidad de crecimiento.</li> <li>• <b>Exponencial:</b> se alimenta sustrato a una velocidad exponencial de acuerdo a la demanda, permitiendo mantener una velocidad de crecimiento constante.</li> </ul>	
<b>Con control retroalimentado</b>	
<p><b><u>Directo</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>DO-stat:</b> se alimenta por pulsos cuando se elevan los niveles de oxígeno disuelto, lo cual indica el agotamiento del sustrato.</li> <li>• <b>pH-stat:</b> se alimenta por pulsos cuando se eleva el pH debido al agotamiento de nutrientes.</li> <li>• <b>Evolución de la velocidad de dióxido de carbono (CER):</b> la medición se realiza en-línea usando un espectrómetro de masas, la cual es aproximadamente proporcional a la velocidad de consumo de la fuente de carbono.</li> <li>• <b>Concentración celular:</b> la alimentación de sustrato es determinada por la concentración celular, la cual es medida en-línea usando un turbidímetro laser.</li> </ul> <p><b><u>Indirecto</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Concentración de sustrato:</b> el sustrato alimentado es directamente controlado por medición en-línea de la concentración de la principal fuente de carbono.</li> </ul>	

**Tabla 2.** Cultivos de alta densidad por lote alimentado de *Escherichia coli* para la producción de proteína recombinante

Cepa de <i>E. coli</i>	Alimentación	$X_{max}$ (g/L) base seca	Producto	Concentración de producto	Referencia
W	pH-stat	124	PHB	34.3 g/L	(Lee & Chang, 1993)
K12	Escalonada	20	Factor de crecimiento humano	600 mg/L	(Tsai, et al., 1987)
K12	Exponencial	27	RhuA	2.7 g/L	(Ruiz, et al., 2013)
AM-7	Escalonada	68	$\alpha$ -interferón humano	5.6 g/L	(Fieschko & Ritch, 1986)
X90	Exponencial	92	Tripsina	56 mg/L	(Yee & Blanch, 1993)
B	Exponencial	55	Interlucina humana $1\beta$	2.15 g/L	(Gleiser & Bauer, 1981)
TG1	Exponencial	77	$\beta$ -galactosidasa	19.2 g/L	(Hellmuth, et al., 1994)
RV308	Exponencial	50	Mini anticuerpo	1.04 g/L	(Pack, et al., 1993)
TG1	Exponencial	40	Hormona paratiroidal humana	338 mg/L	(Hellmuth, et al., 1994)
BL21 (DE3)	Constante	14.4	Streptokinasa	1120 mg/L	(Goyal, et al., 2009)

## 1.6 Dificultades

Para mejorar la productividad, es importante alcanzar altas densidades de células. Por lo tanto, se tienen que minimizar los problemas encontrados como inhibición por sustrato o nutriente, inhibición por formación de subproductos, inhibición por acumulación de producto, degradación de producto, la limitación del oxígeno disuelto bajo condiciones aerobias y la generación de calor. La fermentación en bio-reactor nos permite controlar las principales variables relacionadas con estos problemas (Palomares, et al., 2004).

### 1.6.1. Oxígeno Disuelto

De los parámetros enlistados anteriormente, la tensión del oxígeno disuelto ha recibido una especial atención, porque el oxígeno tiene una baja solubilidad en agua y es difícil de suministrar dentro del medio de cultivo (Shuler & Kargi, 2002). Este problema empeora a altas concentraciones celulares, al tener que aumentar la cantidad de oxígeno transferido al medio de cultivo para satisfacer la demanda. El cultivo necesita estar completamente aireado y ser homogéneo para evitar la fermentación alcohólica o ácida de la bacteria (O'Beirne & Hamer, 2000) (Palomares & Ramírez, 1996) . Consecuentemente, el bio-reactor está diseñado para incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) a valores máximos o inclusive para alimentar mezclas oxígeno-aire y en condiciones extremas oxígeno puro.

### 1.6.2. Producción de acetato

Una desventaja en *E. coli* es el sobre flujo en su metabolismo. Acetato es producido cuando *E. coli* crece en condiciones anaerobias o con limitación de oxígeno, pero también se puede presentar su producción en la presencia de un exceso de carbono (Korz, et al., 1995) (Luli & Strohl, 1990). El ácido acético inhibe el crecimiento (Luli & Strohl, 1990) (Shimizu, et al., 1988) y reduce la producción de proteína recombinante (Turner, et al., 1994). El acetato es producido cuando el flujo de carbono en la vía metabólica excede la

demanda bio-sintética y la capacidad de generación de energía de la célula (El-Mansi & Holms, 1989); la saturación del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y/o la cadena de transporte de electrones pueden ser las principales causas (El-Mansi & Holms, 1989).

La formación de ácido acético también puede ser detectada cuando la velocidad de crecimiento excede un rango crítico. La velocidad crítica de crecimiento es dependiente de la cepa y del medio (Meyer, et al., 1984). Ésta suele mantenerse entre 0.1 y 0.3 h<sup>-1</sup> para evitar la formación de acetato (Strandberg & Enfors, 1991) (Yee & Blanch, 1993).

Para evadir la formación de ácido acético una solución es la manipulación del medio. El uso de glicerol como fuente de carbono evita su formación (Holmes, 1986) si la velocidad de crecimiento no sobrepasa un valor de velocidad crítica (Yee & Blanch, 1993). La menor velocidad de transporte del glicerol dentro de la célula, comparado con la glucosa, aparentemente reduce el flux de carbono a través de la glicolisis, reduciendo la formación de ácido acético. (Holmes, 1986) (Korz, et al., 1995). La adición de amino ácidos o extracto de levadura puede aliviar el efecto nocivo del ácido acético sobre la célula (Han, et al., 1992). Además, el extracto de levadura disminuye la velocidad de consumo de glucosa para evitar la acumulación de ácido acético (Koh, et al., 1992).

La producción de ácido acético es superior en cultivos por lote alimentado comparado con los cultivos en lote, por lo que se han diseñado una variedad de estrategias de alimentación para reducir su formación al controlar la velocidad específica de crecimiento limitando la concentración de nutrientes como las fuentes de carbono y nitrógeno (Riesenber, 1991) (Paalme, et al., 1990) (Riesenber, 1990).

## II. ANTECEDENTES

El grupo de investigación de Rogerio Sotelo Mundo y María Auxiliadora Islas Osuna en un estudio realizado en el 2009 se dedicaron a clonar y sobre expresar NprR para estudiar la interacción péptido proteína. Se logró clonar el gen *nprR* de *Bt*, pero dado que se presentaron problemas para que se expresara en *E. coli*, la sobreexpresión fue pobre y la proteína formó cuerpos de inclusión. La proteína replegada fue inestable lo cual obligó a hacer todos los experimentos el mismo día que la proteína era solubilizada y replegada (Vázquez-Luján, 2009).

En el Laboratorio de Fisiología Celular y Bio-procesos del CIAD, el grupo de investigación del que forma parte el presente estudio diseñó en el 2011 un protocolo para la producción de NprR en forma soluble en cultivo por lote en matraz, para lo cual se mando sintetizar el gene que codifica para la NprR de *B. thuringiensis* y el vector respectivo fue clonado en *Escherichia coli* BL21(DE3). Para prevenir la formación de agregados de la proteína recombinante, se co-expresó un grupo de proteínas chaperonas: DnaK-DnaJ-GrpE y GroES-GroEL. Además, fueron necesarias condiciones específicas de cultivo como: reducción de la temperatura de cultivo a 30°C, el uso de glicerol como principal fuente de carbono y la inducción de la proteína con una concentración de 1mM de IPTG (Cabrera-Ruiz, 2011).

En el siguiente trabajo se propone la implementación de un cultivo por lote alimentado en bio-reactor para aumentar los rendimientos de proteína recombinante NprR soluble utilizando la cepa producida en el Laboratorio de Fisiología Celular y Bio-procesos y considerando las condiciones del protocolo de producción en cultivo por lote en matraz.

## **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 Hipótesis**

“Es posible aumentar la productividad volumétrica de proteína NprR soluble mediante un cultivo por lote alimentado en bio-reactor.”

### **3.2 Objetivo general**

Producir la proteína NprR soluble en cultivo por lote alimentado en bio-reactor.

### **3.3 Objetivos específicos**

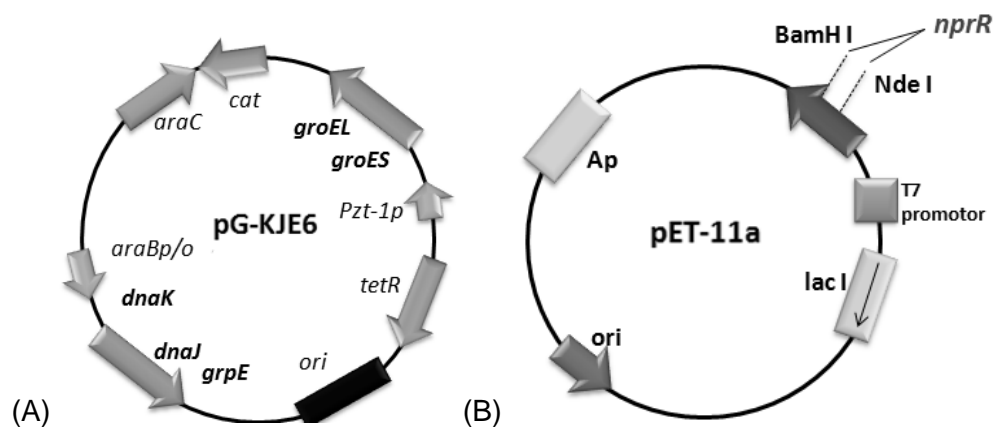
- Producir la proteína NprR soluble según el protocolo en matraz.
- Establecer las condiciones del cultivo en lote en bio-reactor y obtener los parámetros cinéticos.
- Diseñar la alimentación de glicerol y medio complejo concentrado en base a los parámetros cinéticos del cultivo en lote en bio-reactor.
- Establecer las condiciones del cultivo por lote alimentado para la producción de proteína NprR soluble.
- Purificar y cuantificar la producción de proteína NprR soluble.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepa y plásmidos

La cepa utilizada fue *Escherichia coli* BL21(DE3), ésta contiene al gen *nprR* clonado en el vector pET11a dentro de la región de clonación Nde I y BamH I. Este plásmido contiene el promotor T7 y el operador *lac I*, la expresión de la proteína es inducida con IPTG (Moffatt & Studier, 1986), además, el plásmido contiene el gen que confiere resistencia a ampicilina (Figura 1). La cepa tiene también al vector pG-KJE6 que acarrea los genes de las chaperonas moleculares DnaK-DnaJ-GrpE y GroES-GroES y el gen que confiere resistencia a cloranfenicol. El operon *dnaK-dnaJ-grpE* se encuentra bajo el control del promotor-operador (*araBp*) y el operon *groEL-groES* se encuentra bajo el control del promotor Pzt-1 (Figura 1). La expresión de *dnaK-dnaJ-grpE* es inducida con L-arabinosa y la expresión *groEL-groES* es inducida con tetraciclina (Nishihara, et al., 1998). La proteína NprR es expresada con una fusión a histidinas 6xHis-tag para su posterior purificación. Las cepas fueron conservadas a -70°C en tubos eppendorf en medio Luria Bertani con 20% glicerol.



**Figura 1.** Descripción de los plásmidos pG-KJE6 (A) que acarrea los genes de las chaperonas moleculares *dnaK-dnaJ-grpE* y *groEL-groES* y PET-11a (B) que acarrea el gen *nprR*

## 4.2 Preparación del inóculo

A un matraz Erlenmeyer de 250 mL se le añadieron 50 mL de medio de cultivo Terrific Broth (Tartoff & Hobbs, 1987) suplementado con glicerol cuya composición es descrita en la Tabla 3. El matraz con el medio fue esterilizado en el autoclave a 15 psi de presión manométrica por 15 minutos. Después de enfriarse, los antibióticos ampicilina (Am) y cloranfenicol (Cm), esterilizados por filtración, fueron adicionados a concentraciones de 100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente. Posteriormente, el matraz fue inoculado con 1.5 mL de células de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩ*nprR* conservadas a -70°C. Después de inocular, las células se crecieron incubando en una agitadora modelo G25 New Brunswick a 30°C con una velocidad de agitación de 150 rpm por 16 horas.

**Tabla 3.** Composición del medio de cultivo Terrific Broth (TB) sin sales y suplementado con glicerol

Componente	Concentración
Triptona	12 g/L
Extracto de levadura	24 g/L
Glicerol	50.4 g/L

## 4.3 Cultivo por lote en matraz

En un matraz Fernbach de 2.8 L se añadieron 900 mL de medio de cultivo TB suplementado con glicerol sin sales (Tabla 4). Las sales se prepararon en un matraz aparte en un volumen total de 100 mL de solución. Ambos fueron esterilizados en el autoclave a 15 psi de presión manométrica por 15 minutos. Después de enfriarse, se agregaron las sales al medio estéril y se suplementó con los antibióticos Am (100 µg/mL) y Cm (25 µg/mL) estériles. Posteriormente, el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 4 M y el medio fue inoculado utilizando una relación de 5 mL de inóculo por cada 100 mL de medio TB fresco.

Después de inocular, las células se crecieron incubando en una agitadora modelo G25 New Brunswick a 30°C con una velocidad de agitación de 150 rpm por 16 horas.

**Tabla 4.** Composición del medio de cultivo Terrific Broth (TB) suplementado con glicerol

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Triptona	12 g/L
Extracto de levadura	24 g/L
Glicerol	50.4 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.2 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	9.4 g/L

#### **4.3.1. Inducción de las chaperonas**

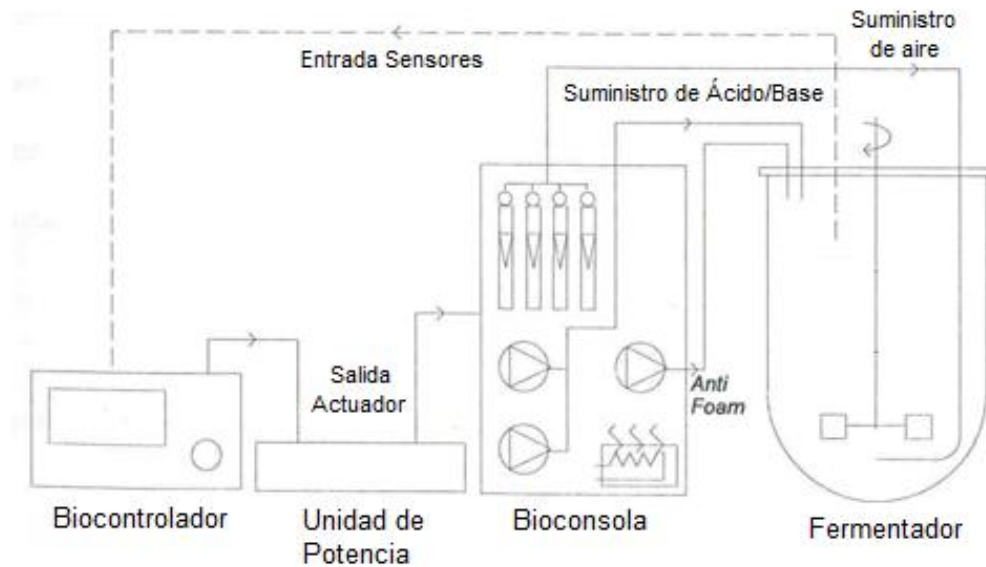
Antes de iniciar el crecimiento se adicionaron los inductores de las chaperonas moleculares, arabinosa (Ara) a una concentración de 0.5 mg/mL y tetraciclina (Tet) a una concentración de 5 ng/mL, previamente esterilizados por filtración.

#### **4.3.2. Inducción de *nprR***

Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de alrededor de 0.4 se adicionó el inductor IPTG a una concentración de 1mM. Se siguió incubando el cultivo bajo las mismas condiciones por 4 horas más.

### **4.4 Cultivo en bio-reactor**

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en un Bio-reactor Applikon® con un volumen nominal de 3 litros, acoplado a una bio-consola ADI 1025 y un bio-controlador ADI 1010, cuyo esquema se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama del bio-reactor Applikon® 3L, bio-consola ADI 1025 y bio-controlador ADI 1010

Los flujos de aire y oxígeno fueron controlados por dos diferentes rotámetros situados en la bio-consola ADI 1025. Los gases se esterilizaron por filtración en un filtro estéril Midisart 2000 Sartorius Stedim con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de entrar al reactor. Dentro del reactor el aire fue dispersado por un difusor perforado al fondo de éste.

El cultivo fue agitado por un impulsor tipo Rushton de paleta y alabes rectos impulsado por un motor eléctrico, que puede ir de 0 a 2000 rpm. El impulsor tiene un diámetro de 4.5 cm con 6 paletas de 1.2 x 1.2 cm.

La temperatura fue monitoreada por un termopar acoplado a la bio-consola ADI 1025 y se reguló mediante el uso de una chaqueta de calentamiento Applikon® y un sistema de recirculación de agua fría.

Los niveles de oxígeno disuelto fueron medidos por un electrodo polarográfico AppliSens®. El electrodo fue esterilizado junto con el bio-reactor y después se conectó a la

bio-consola por lo menos 2 horas antes de calibrar para permitir que éste se polarizara. El electrodo fue calibrado a la temperatura de operación.

El pH se monitoreó con un electrodo AppliSens® el cual fue calibrado y posteriormente esterilizado junto al bio-reactor. La bio-consola mantuvo los niveles de pH mediante la adición de  $H_3PO_4$  4 M y NaOH 4 M, los cuales eran suministrados por bombas peristálticas acoplados al modulo regulador de la consola.

Para controlar la formación de espuma, fue necesaria la adición manual de Antiespumante A de Sigma concentrado; 1 mL al principio de la fermentación y durante el transcurso cuando se necesitara.

#### **4.4.1. Condiciones de operación**

Se mantuvo una temperatura de 30°C y un pH de 7 a lo largo de todas las fermentaciones en bio-reactor. En los cultivos por lote se varió el porcentaje de oxígeno disuelto de 10%, 30% y 50% de saturación. Para el cultivo por lote alimentado se mantuvo un porcentaje de oxígeno disuelto superior al 50%.

#### **4.4.2. Control de los niveles de oxígeno disuelto**

Para manipular los niveles de oxígeno, se modificó la velocidad de agitación y el flujo de aire. Cuando la capacidad de transferencia de oxígeno dentro del reactor llegó a su máximo, se alimentó oxígeno puro para evadir que el cultivo se limitara por este nutriente.

#### **4.4.3. Medio de cultivo**

Al fermentador se le adicionaron 900 mL de medio de cultivo TB suplementado con glicerol sin sales (Tabla 5). Las sales se prepararon a parte en un matraz en un volumen total de 100 mL de solución. Ambos fueron esterilizados en el autoclave a 15 psi de presión manométrica por 15 minutos. Después de enfriarse el medio, se le agregaron las sales y

los antibióticos Am (100 µg/mL) y Cm (25 µg/mL) esterilizados por filtración. Luego de acondicionar el reactor de acuerdo a los valores de operación, el medio fue inoculado utilizando una relación de 5 mL de inóculo por cada 100 mL de medio TB fresco.

**Tabla 5.** Composición del medio de cultivo TB suplementado con glicerol utilizado en cultivos en bio-reactor

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Triptona	12 g/L
Extracto de levadura	24 g/L
Glicerol	25.2 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.2 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	9.4 g/L

#### 4.5 Perfil de alimentación

El perfil de alimentación fue constante y la composición de la alimentación es descrita en la Tabla 6. Ésta inició durante la fase exponencial de crecimiento de la etapa del lote, y se alimentó la corriente a una velocidad de 50 mL/h durante 8 horas utilizando una bomba peristáltica Cole parmer Master Master flex® L/s TM.

**Tabla 6.** Composición del medio complejo de alimentación

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Triptona	30 g/L
Extracto de levadura	60 g/L
Glicerol	315 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5.5 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	23.5 g/L

Para establecer la concentración de glicerol en la alimentación se calculó con base en los datos de cinética por lote en bio-reactor la velocidad específica de consumo de sustrato (1) y la velocidad de alimentación requerida para mantener la concentración celular final obtenida en el lote (2).

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad (1)$$

$$r_s = q_s \cdot X \quad (2)$$

Dónde  $q_s$  es la velocidad específica de consumo de sustrato (g/g·h),  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>),  $Y_{x/s}$  es el coeficiente de conversión de sustrato (g/g),  $r_s$  es la velocidad de consumo de sustrato (g/L·h), y  $X$  es la concentración de biomasa (g/L).

#### **4.6 Inducción de las chaperonas y la proteína NprR**

Cuando se alcanzó una densidad óptica alta, alrededor de 30 (DO<sub>600</sub>), 5 horas antes de que terminara el cultivo por lote alimentado, se adicionaron los inductores de las chaperonas moleculares, arabinosa (Ara) a una concentración de 0.5 mg/mL y tetraciclina

(Tet) a una concentración de 5 ng/mL. Una hora después se añadió el inductor IPTG a una concentración de 0.5 mM y se expresó la proteína durante 4 horas.

#### 4.7 Obtención de proteínas intracelulares

Después de 4 horas de la inducción de *nprR*, se procedió a centrifugar el medio a 10,000 x g a 4°C por 15 minutos para obtener la pastilla celular. Posteriormente, la pastilla fue lavada dos veces resuspendiéndola con una solución salina de 9 g/L de NaCl. Después de cada lavado la pastilla se volvió a recuperar con las mismas condiciones de centrifugación. La pastilla recuperada fue resuspendida en regulador de lisis cuya composición es descrita en la Tabla 7; éste se preparó con agua HPLC y se le ajustó el pH a 8.

**Tabla 7.** Composición del regulador de lisis

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Fosfato de sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13.8 g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	5.84 g/L
Imidazol	1.38 g/L
Glicerol	126 g/L
Lisozima	1 g/L
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	1mM

Las células resuspendidas en regulador de lisis fueron sonicadas en un sonicador Branson Sonifier 450 a una frecuencia de 5, con 30 impulsos por 10 minutos. Se obtuvo la fracción de proteína soluble centrifugando el lisado a 10,000 x g a 4 °C durante 50 min.



## 4.8 Purificación de la proteína NprR

Para verificar la presencia de la proteína NprR, el extracto proteico se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell) teñidos con azul de Coomassie.

### 4.8.1. Paso 1

El extracto proteico crudo se purificó por cromatografía de afinidad de metales (IMAC) con una matriz de níquel acoplada a agarosa (Ni-NTA) HisTrap FF 5x5 mL GE. La matriz fue acondicionada con amortiguador de equilibrio y la elución se realizó con una concentración de 150 mM de imidazol utilizando un amortiguador de elución. La composición de ambos amortiguadores se encuentra descrita en la Tabla 8, para su preparación se utilizó agua HPLC y el pH fue ajustado a 7.5. La fracción fue recuperada y analizada mediante SDS-PAGE en geles al 12% (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell) teñidos con azul de Coomassie.

**Tabla 8.** Composición de los amortiguadores para la cromatografía de afinidad de metales

Componente	Amortiguador de equilibrio	Amortiguador de elución
Fosfato de sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	50 mM	50 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	100 mM	100 mM
Glicerol	10 %	10 %
β-mercaptoetanol	5 mM	5 mM
Imidazol	20 mM	150 mM

### 4.8.2. Diálisis

El extracto recuperado fue dializado en centricones Millipore de 30,000 MWCO, los cuales se centrifugaron tres veces a 400 x g por 10 minutos en una centrífuga Sorvall ST 16R.

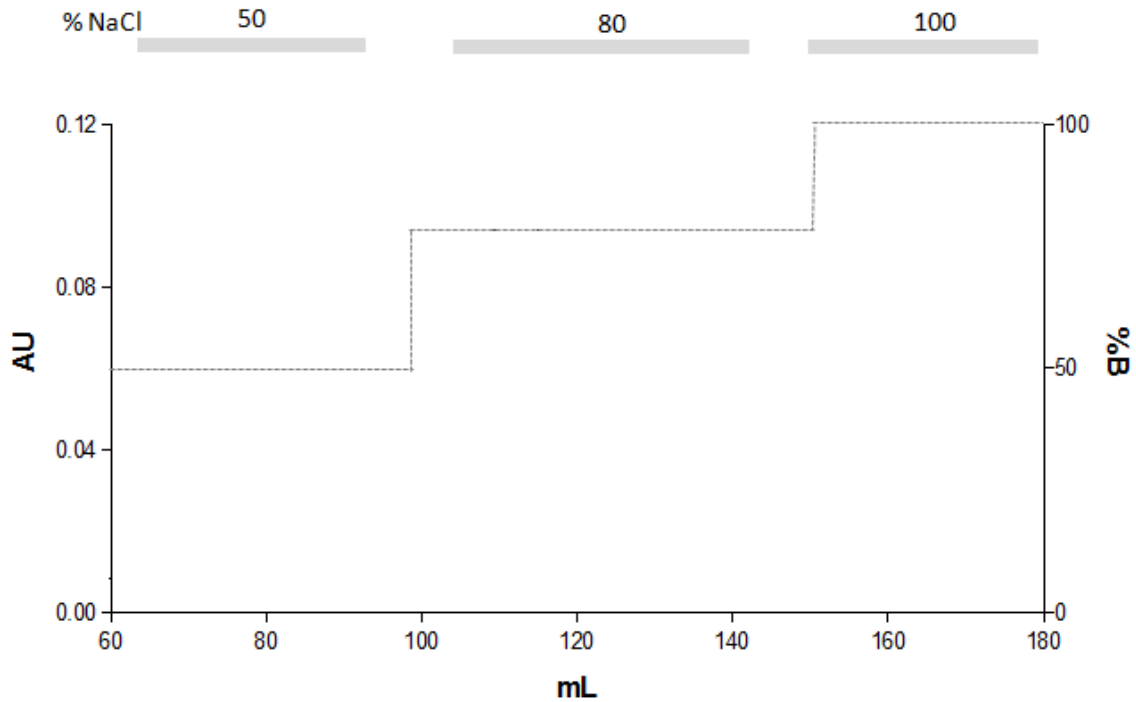
Al término de cada centrifugación se le añadió el amortiguador de equilibrio descrito en la Tabla 9 para mantener un volumen constante.

#### 4.8.3. Paso 2

Para tener a la proteína NprR pura, fue necesario un segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una matriz de DEAE sefarosa HiTrap DEAE FF 5x5 mL GE. La matriz fue acondicionada con amortiguador de equilibrio y la elución se realizó con un gradiente de concentración de 0 a 1 M de NaCl utilizando el amortiguador de elución como se muestra en la Figura 3, para lo cual se utilizó un FPLC System Pharmacia Biotech. La composición de ambos amortiguadores se encuentra descrita en la Tabla 9; para su preparación se utilizó agua HPLC y el pH fue ajustado a 7.5. Las fracciones fueron recuperadas y analizadas mediante SDS-PAGE en geles al 12% (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell).

**Tabla 9.** Composición de los amortiguadores para la cromatografía por intercambio aniónico

<b>Componente</b>	<b>Amortiguador de equilibrio</b>	<b>Amortiguador de elución</b>
tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base)	20 mM	20 mM
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	1 mM	1 mM
Dicloro difenil tricloroetano (DDT)	2 mM	2 mM
Glicerol	5 %	5 %
$\beta$ -mercaptoetanol	5 mM	5 mM
Cloruro de sodio (NaCl)	-	1 M



**Figura 3.** Gradiente de concentración de NaCl para la elución de la proteína NprR por cromatografía de intercambio aniónico

#### 4.9 Medición del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

Utilizando el método dinámico de Taguchi y Humphrey (Taguchi & Humphrey, 1966), se calculó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) para evaluar la capacidad de transferencia de oxígeno del bio-reactor a 30°C, 1300 rpm y 2.5 vvm. Los datos de concentración de oxígeno disuelto en el bio-reactor a diferentes tiempos se ajustaron linealmente a la ecuación (3).

$$LN \left( \frac{C^* - C_L}{C^* - C_0} \right) = -K_L a(t) \quad (3)$$

Donde  $C^*$  es la concentración de equilibrio gas-líquido de oxígeno disuelto (mg/L),  $C_L$  es la concentración de oxígeno disuelto en el líquido (mg/L) en el tiempo  $t$  (h),  $C_0$  es la concentración de oxígeno disuelto en el líquido (mg/L) en el tiempo 0 y  $K_L a$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $h^{-1}$ ).

## **4.10 Métodos analíticos**

### **4.10.1. Crecimiento bacteriano**

Se midió la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) en un espectrofotómetro Beckman DU® 530 de las muestras de las cinéticas de crecimiento que se tomaron cada hora. Las muestras fueron diluidas con agua hasta entrar dentro del rango de medición lineal del espectrofotómetro. Se midió el peso seco de muestras entre 0.1 y 0.5  $DO_{600}$  para obtener la curva de calibración. El procedimiento consistió en colocar alícuotas de 2 mL en tubos eppendorf anteriormente pesados, las muestras fueron centrifugadas en una centrífuga eppendorf 5415 C durante 10 minutos a 9,000 x g; el sobrenadante fue removido y las pastillas fueron secadas a 70°C por 6 horas. Se calculó el peso seco de cada muestra y se obtuvo la curva que se muestra en la Figura 4.

### **4.10.2. Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína fue cuantificada mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó la curva de calibración con albúmina de suero bovino a concentraciones de 0 a 1.4 mg/mL. Posteriormente, se añadieron 0.1 mL de muestra a 3 mL de Bradford Reagent Sigma y se midió la densidad óptica a 595 nm de cada muestra utilizando un espectrofotómetro Beckman DU® 530, como resultado se obtuvo la curva que se muestra en la Figura 5.

### **4.10.3. Cuantificación de glicerol**

El glicerol en el medio de cultivo fue cuantificado por el método enzimático de Fossati y Prencipe (1982) utilizando el kit enzimático Free Glycerol Reagent marca Sigma.

### **4.10.4. Cuantificación de ácido acético**

Las muestras fueron analizadas en la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav México por cromatografía de líquidos de alta

resolución en un cromatógrafo de líquidos Series 220 A con Detector de IR. La columna utilizada fue una Phenomenex Rezex Organic Acid de 300 x 70 mm. La fase móvil se compuso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.007 N a un flujo de 0.4 mL/min y una temperatura de 65°C. La cuantificación se realizó por estandarización externa.

#### 4.11 Análisis de datos

Los datos obtenidos en los cultivos se ajustaron al modelo logístico de Verhulst-Pearl mediante la ecuación (4) utilizando el programa NCSS (Statistical software versión 2007). El ajuste se utilizó para obtener los valores de los parámetros cinéticos de  $X_{m\acute{a}x}$  (g/L) y velocidad específica de crecimiento  $\mu$  (horas<sup>-1</sup>).

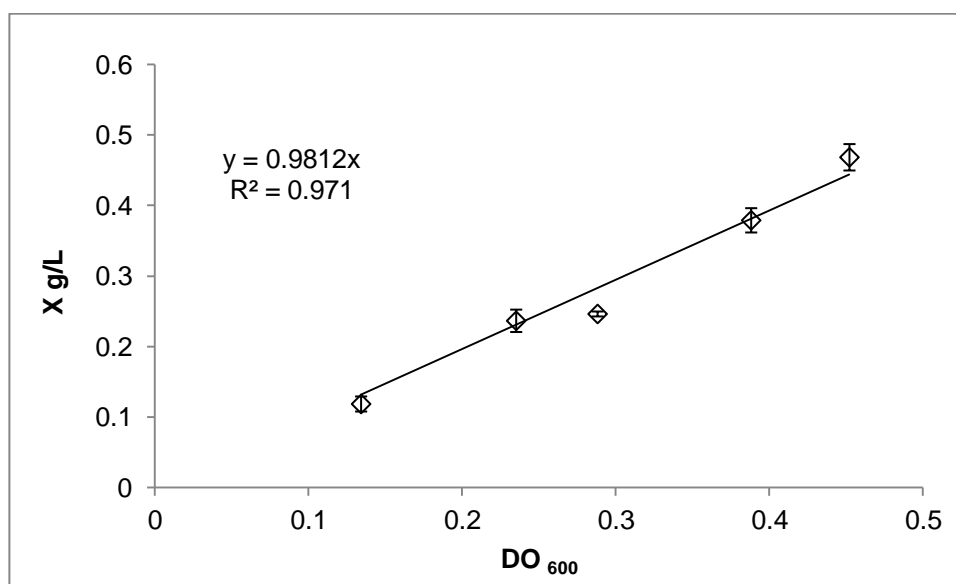
$$X(t) = \frac{X_{m\acute{a}x}}{1 + \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{X_0} - 1\right) e^{(-\mu t)}} \quad (4)$$

Donde  $X(t)$  es la biomasa en cualquier tiempo de la fermentación (g/L),  $X_0$  es la biomasa inicial (g/L),  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento máxima (h<sup>-1</sup>) y  $X_{max}$  es la biomasa máxima en el periodo de cultivo (g/L).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Curva de calibración de peso seco

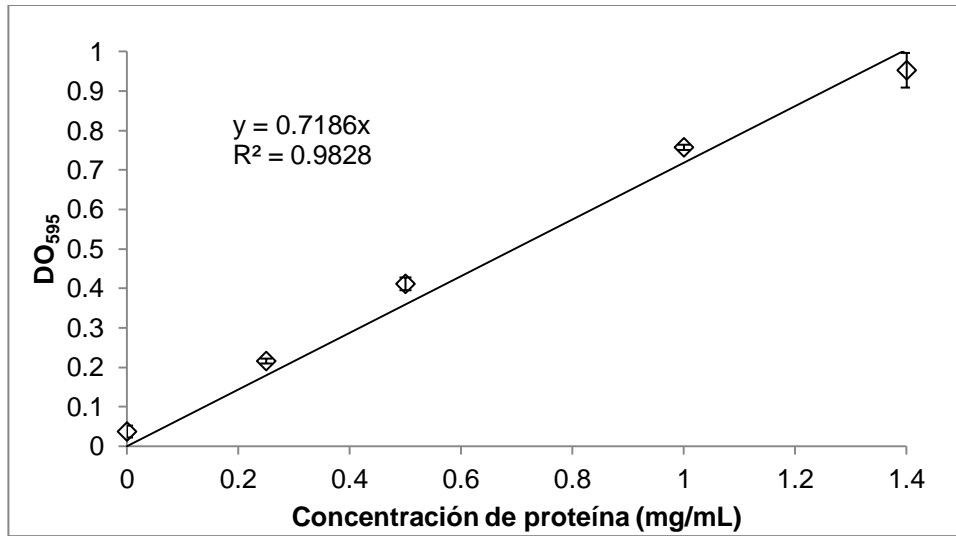
En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos del cálculo de la concentración celular en peso seco (g/L) en función de su densidad óptica a 600 nm, donde se muestra la relación lineal cuya pendiente es de 0.9812 (g/L)/DO<sub>600</sub>.



**Figura 4.** Curva de calibración de concentración celular en base seca (g/L) en función de la DO<sub>600</sub>

### 5.2 Curva de calibración de concentración de proteína

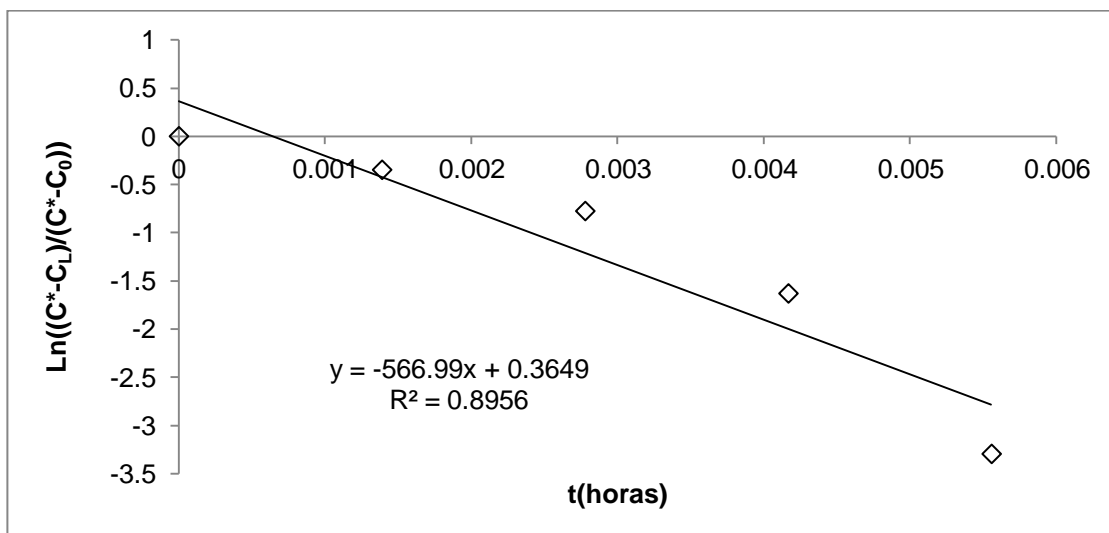
En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos del cálculo de la concentración de proteína medida por ensayo de Bradford (DO<sub>595</sub>) en función de la concentración de albúmina de suero bovino (mg/mL), donde se muestra la relación lineal cuya pendiente es de 0.7186 DO<sub>595</sub>/(g/L).



**Figura 5.** Curva de calibración de la DO<sub>595</sub> en función de la concentración de proteína (mg/mL)

### 5.3 Cálculo del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

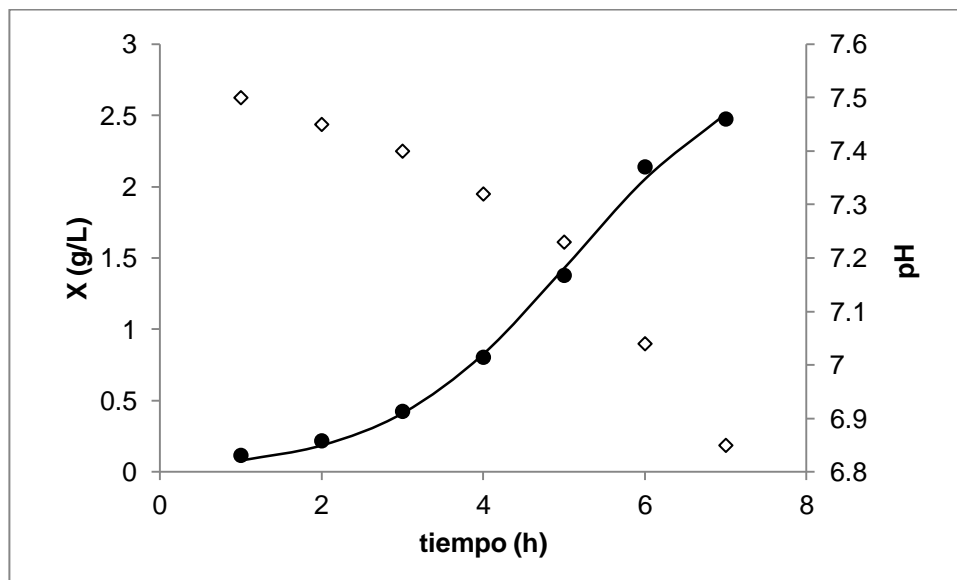
En la Figura 6 se presenta el ajuste lineal de los datos obtenidos para el cálculo coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno  $K_{La}$ , el cual, siendo la pendiente de la recta, resultó de  $566.99 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 6.** Cálculo del  $K_{La}$  por el método dinámico de Taguchi y Humphrey a 1300 rpm, 2.5 vvm y 30°C

## 5.4 Producción de proteína en cultivo por lote en matraz agitado

La cinética de crecimiento y evolución de pH del cultivo en matraz agitado de la cepa *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR se muestra en la Figura 7. La máxima densidad celular alcanzada fue de 2.47 g/L (base seca). La curva de crecimiento se ajustó al modelo logístico para obtener los parámetros cinéticos (Tabla 11), se obtuvo una velocidad de crecimiento de  $0.87 \text{ h}^{-1}$ . La proteína recombinante NprR se indujo, recuperó y purificó según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. La Figura 13 muestra el perfil proteico crudo obtenido y las subsecuentes purificaciones. Al final pudo recuperarse un total de proteína NprR de 5.68 mg/L, resultando en un rendimiento 2.37 mg de proteína/g de célula (base seca) (Tabla 12).



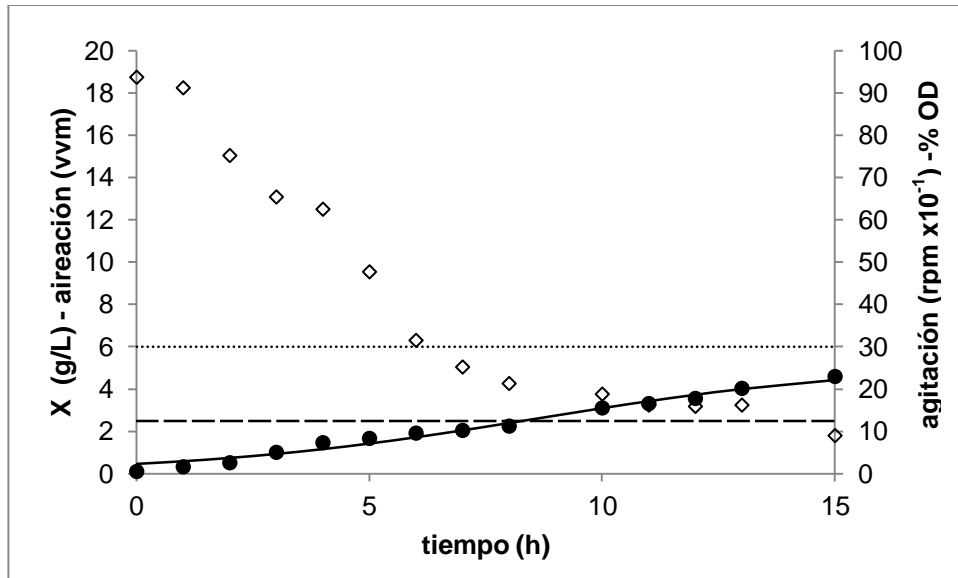
**Figura 7.** Cinética de crecimiento y evolución de pH de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en cultivo por lote en matraz, donde se representa: ◇ pH, ● X (concentración celular en g/L base seca) y (—) curva de crecimiento ajustada al modelo logístico.



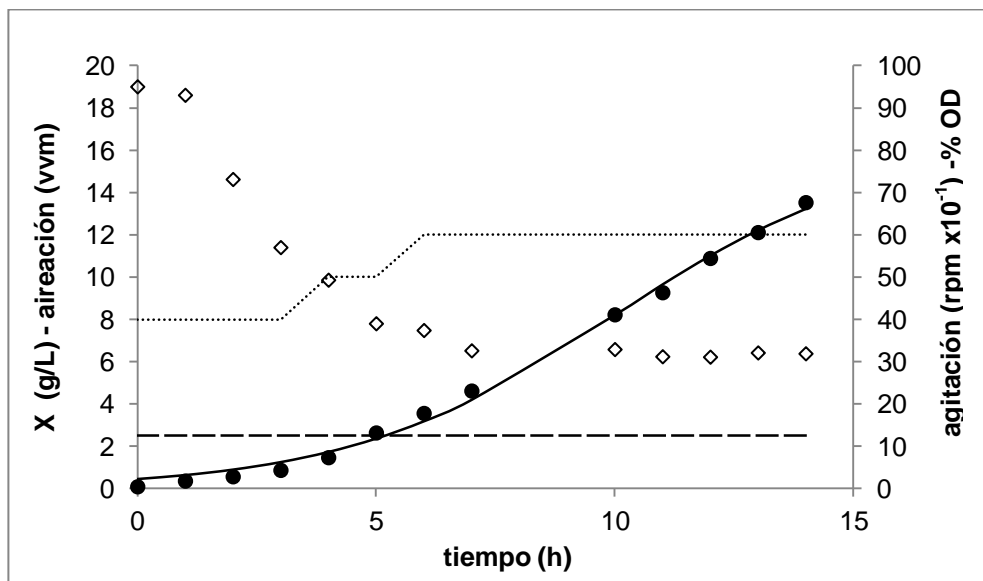
Las condiciones dentro del matraz no son adecuadas para producir gran cantidad de biomasa, ya que la velocidad de difusión de oxígeno a través de la superficie de contacto entre el gas y el líquido es limitada por la agitación y aireación dentro del matraz y, por ende, la velocidad de transferencia (Hengwei, et al., 2009). La baja densidad celular alcanzada en cultivo en matraz se debe a la limitación de oxígeno que existe, la cual hace que las células pasen a la fase estacionaria de crecimiento aún cuando el medio siga rico en sustratos (Hengwei, et al., 2009). La limitación de oxígeno también puede provocar la producción de ácido acético (Lee, 1996), la cual afecta el crecimiento celular y reduce la formación de proteína recombinante (Luli & Strohl, 1990). Aunque no hay una medición directa de la concentración de ácido acético se puede inferir su producción por el descenso del pH del medio a lo largo del cultivo (Figura 7).

## **5.5 Cultivo por lote en bio-reactor**

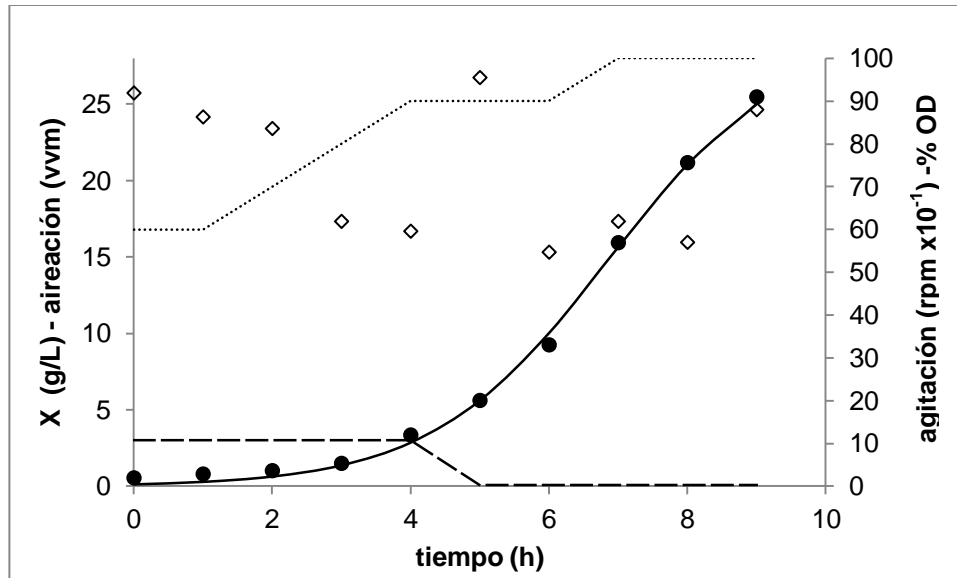
Se realizaron una serie de cinéticas para identificar las mejores condiciones de operación del cultivo por lote en bio-reactor. En las Figuras 8, 9 y 10 se muestran diferentes condiciones de agitación y aireación para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto (OD) por encima del 10%, 30% y 50% de saturación respectivamente. Las demás condiciones de operación fueron las mismas para todos los cultivos y se encuentran descritas en Materiales y Métodos.



**Figura 8.** Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en bio-reactor con agitación y aireación constantes de 300 rpm y 2.5 vvm manteniendo un % de OD mayor a 10% del valor de saturación, donde se representa: ● X (concentración celular en g/L base seca), ◇ % de OD, (---) aireación en vvm, (.....) agitación en rpm y (—) curva de crecimiento ajustada al modelo logístico.



**Figura 9.** Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en bio-reactor con agitación variable entre 400-600 rpm y aireación constante de 2.5 vvm, manteniendo un % de OD mayor a 30%, donde se representa: ● X (concentración celular en g/L base seca), ◇ % de OD, (---) aireación en vvm, (.....) agitación en rpm y (—) curva de crecimiento ajustada al modelo logístico.



**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en bio-reactor con agitación variable de 600-1000 rpm y aireación de 1.0 vvm con posterior alimentación de oxígeno puro de 0.1 vvm manteniendo un % de OD mayor a 50%, donde se representa: ● X (concentración celular en g/L base seca), ◇ % de OD, (---) aireación en vvm, (.....) agitación en rpm y (—) curva de crecimiento ajustada al modelo logístico.

**Tabla 10.** Parámetros de la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR utilizando el modelo logístico en los cultivos por lote en bio-reactor a diferentes límites inferiores de porcentajes de oxígenos disueltos

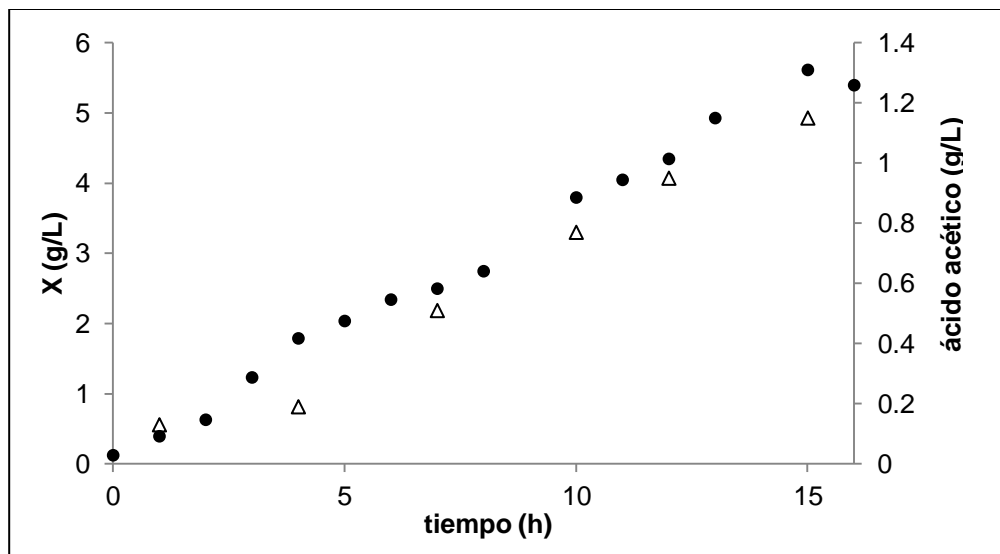
% de DO	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$X_{max}$ (g/L)	$R^2$
10	0.27	4.5	0.979
30	0.35	13.5	0.995
50	0.78	26.9	0.998

Para mantener el porcentaje de oxígeno disuelto en un 50% de saturación fue necesario suministrar oxígeno puro. Adicionando oxígeno puro, la concentración de equilibrio de oxígeno en agua cambia, aumentado de 7.6 mg/L a 36.3 mg/L; utilizando el  $K_L a$  anteriormente calculado de  $566.99 h^{-1}$  resulta una velocidad de transferencia máxima de 20.6 g/L·h, a diferencia del 4.3 g/L·h que se tenía con aire. Un sistema de fermentación

promedio puede suministrar hasta 48 g/L·h si es aireado con oxígeno puro, por lo tanto, si se utiliza oxígeno puro, la velocidad de transferencia no será un factor limitante en el cultivo líquido. (Shiloach & Fass, 2005). Además, las altas velocidades de agitación y aireación provocaban problemas del control de nivel por formación de espuma, al poder disminuir ambos se pudo controlar este problema.

Como se puede apreciar tanto en las Figuras 8, 9 y 10, así como en la Tabla 10, la velocidad de crecimiento no sólo está en función de la disponibilidad de nutrientes, sino también de la transferencia de oxígeno en cultivos aerobios (Palomares, et al., 2004); al incrementar la velocidad de crecimiento el consumo de oxígeno incrementa. Las cinéticas anteriores se ajustaron a un modelo logístico para comparar los valores cinéticos de cada una, estos se muestran en la Tabla 10. Dado que la cinética donde se mantuvo el % OD por arriba del 50% presenta una mayor velocidad de crecimiento, de  $0.78 \text{ h}^{-1}$ , se eligieron estas condiciones de operación para el cultivo por lote alimentado en el bio-reactor. La elevación de los niveles de oxígeno al final de la fermentación sugiere que el sustrato fue consumido en su totalidad, y con esta suposición se pudo calcular un coeficiente de rendimiento de biomasa en base a glicerol ( $Y_{x/s}$ ) de 1.07 g/g. El resultado obtenido es muy cercano al presentado en el estudio de Ashish, et al., 2011, en el cual también se utilizó un medio complejo con nitrógeno orgánico (aminoácidos en la triptona y el extracto de levadura) y se calculó un rendimiento de biomasa de 1-1.1 g/g (Ashish, et al., 2011).

Se analizó la producción de ácido acético en otra cinética donde se presentó una limitación de oxígeno, indicada por un porcentaje de oxígeno disuelto menor al 10% de saturación. La cinética de crecimiento y producción de ácido acético asociada al crecimiento celular son presentadas en la Figura 11.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en bio-reactor con OD menor al 10% de saturación, donde se representa: ● X (concentración celular en g/L base seca), ◇ concentración de ácido acético en g/L.

Al finalizar la fermentación se observó una concentración máxima de ácido acético de 1.1 g/L, la cual representa una producción significativa considerando la baja densidad celular. En contraste, en el trabajo de D.J. Korz, et al., 1995, se reportó la ausencia de ácido acético en el medio durante el cultivo en lote en el cual se utilizó glicerol como fuente de carbono, se evitó una limitación de oxígeno, y se alcanzó una concentración celular de 15 g/L (base seca) (Korz, et al., 1995). En base a esa investigación y dado que las condiciones de operación y resultados presentados fueron muy parecidos a aquellos del cultivo en lote en bio-reactor del actual estudio donde se mantuvo un %OD=50, se puede inferir que es poco probable que se haya producido una cantidad significativa de acetato durante dicho cultivo.

## 5.6 Diseño de la alimentación

Se decidió iniciar la alimentación de glicerol y medio complejo concentrado durante la etapa de crecimiento exponencial, ya que mejoras significativas en la concentración del producto y productividad son posibles si la alimentación inicia durante éste periodo, cuando

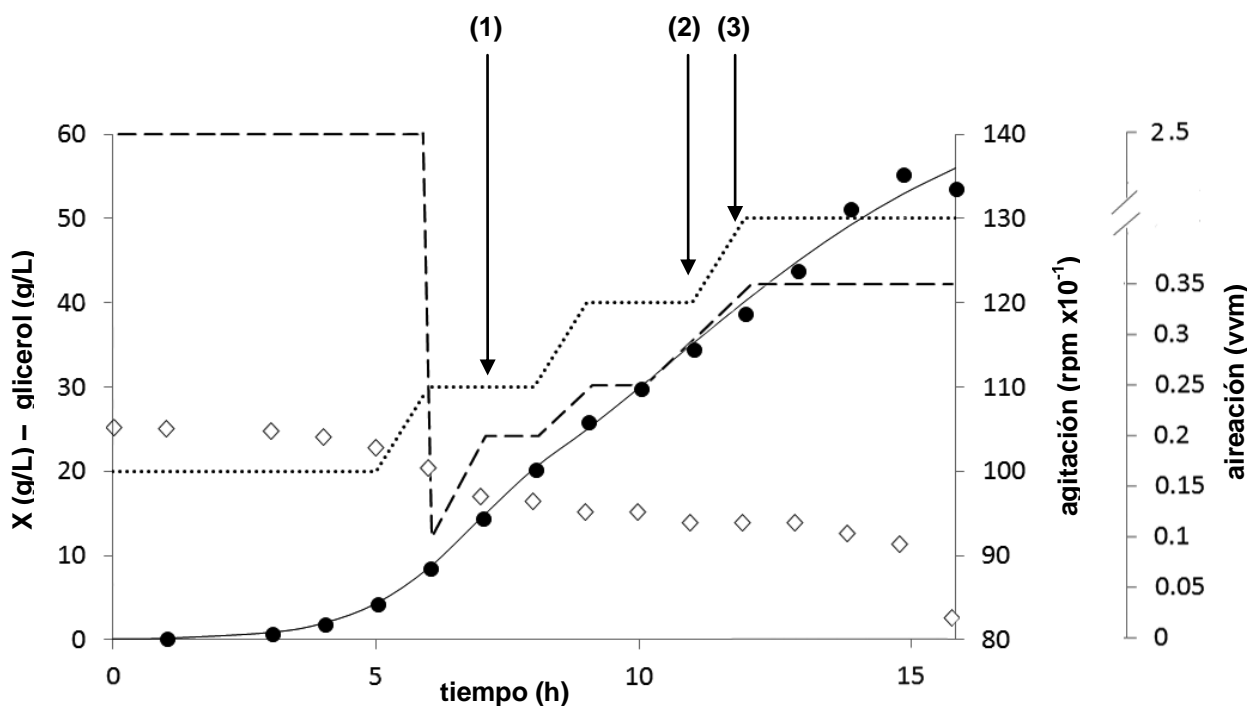
la población bacteriana es joven y está en crecimiento (Aucoin, et al., 2006). Tomando como referencia la cinética de crecimiento por cultivo en lote donde OD=50%, se estimó que la concentración celular a la mitad de la fase exponencial fuera de alrededor de 14 g/L (base seca). Tomando éste dato y considerando un coeficiente de conversión teórico de glicerol de 0.35 g/g (Passarinha, et al., 2009) se calculó el flujo de glicerol necesario para mantener una velocidad de crecimiento de  $0.3 \text{ h}^{-1}$  en el cultivo por lote alimentado utilizando las ecuaciones (1) y (2) descritas en Materiales y Métodos. El cálculo dio como resultado un flujo de glicerol de 12.5 g/h, a la corriente de alimentación además se le adicionó extracto de levadura y triptona, ya que la adición de medio complejo frecuentemente aumenta la producción de proteína, ya sea por la disponibilidad de precursores bio sintéticos (Kweon, et al., 2001) o al incrementar la estabilidad del plásmido (Matsui, et al., 1990) y el crecimiento celular (Li, et al., 1990). Se diseñó un perfil de alimentación constante, como consecuencia, se esperó una variación de la velocidad específica de crecimiento, la cual disminuiría conforme pasa el tiempo al aumentar la concentración celular, resultando en un perfil de crecimiento lineal. Sin embargo, el perfil de alimentación implementado puede ayudar a la producción de proteína recombinante, ya que la alimentación constante brinda un ambiente constante para las células, evitando la continua readaptación que sufren con otros perfiles de alimentación, así reduciendo el estrés y beneficiando la producción de proteína por gramo de célula. (Ruiz, et al., 2013).

A la fecha no hay una regla general para seleccionar una estrategia adecuada de alimentación para producir una proteína recombinante dada y garantizar los mejores rendimientos; muchas estrategias de alimentación han sido diseñadas y deben de ser probadas por métodos de ensayo y error (Jeong, et al., 1999).

## 5.7 Producción de proteína recombinante NprR en cultivo por lote alimentado

Durante el cultivo por lote alimentado se mantuvo el nivel de oxígeno disuelto por arriba del 50% de saturación implementando las condiciones de agitación y aireación que se muestran en la Figura 12. La agitación inició en 1000 rpm y fue incrementando hasta alcanzar las 1300 rpm (Figura 12). Al inicio del cultivo la aireación fue de 2.5 vvm de aire y durante fase exponencial de crecimiento ( $X=9.5$  g/L) se tuvo que alimentar oxígeno puro para mantener los niveles de oxígeno disuelto en el medio; el flujo de  $O_2$  varió de 0.1 a 0.35 vvm (Figura 12).

La alimentación de medio complejo concentrado y glicerol se inició durante la fase exponencial de crecimiento, cuando había una concentración celular de 14.4 g/L (base seca) (Figura 12, Tabla 11). Se indujeron los genes que codifican para las chaperonas a las 10 horas de cultivo cuando había una concentración celular de 34.5 g/L (base seca) (Figura 12). Una hora después se indujo el gen *nprR*, a ese tiempo  $X=38.9$  g/L (Figura 12). El cultivo durante 4 horas más, ya que al usar promotores fuertes y altamente inducibles como T7, la expresión máxima es alcanzada en tiempos cortos entre 1 y 4 horas (Dedhia, et al., 1997). Al finalizar la inducción el cultivo alcanzó una concentración celular final de 53.5 g/L (base seca) (Tabla 11). Se cuantificó la concentración de glicerol durante el cultivo para verificar que no se rebasara la concentración inicial, en efecto, ésta se mantuvo entre 11-16 g/L (Figura 12), evitando así bajas concentraciones de sustrato en el reactor que pudieran estresar a la bacteria y afectar el rendimiento de la proteína recombinante (de Maré, et al., 2005).



**Figura 12.** Cinética de crecimiento en lote alimentado de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR en bio-reactor, donde se representa: ● X (concentración celular en g/L base seca), ◇ concentración de glicerol en g/L, (---) aireación en vvm, (.....) agitación en rpm, (—) curva de crecimiento ajustada al modelo logístico, la flecha (1) indica el inicio de la alimentación, la flecha (2) indica la inducción de las chaperonas y la flecha (3) indica la inducción de de la proteína NprR

**Tabla 11.** Parámetros de la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR utilizando el modelo logístico en el cultivo por lote alimentado en bio-reactor y el cultivo por lote en matraz

Cinética	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	X <sub>max</sub> (g/L)	R <sup>2</sup>
Cultivo en bio-reactor antes de iniciar la alimentación	0.87	14.4	0.999
Cultivo en bio-reactor después de iniciar la alimentación	0.30	53.5	0.984
Cultivo en lote en matraz	0.87	2.47	0.997

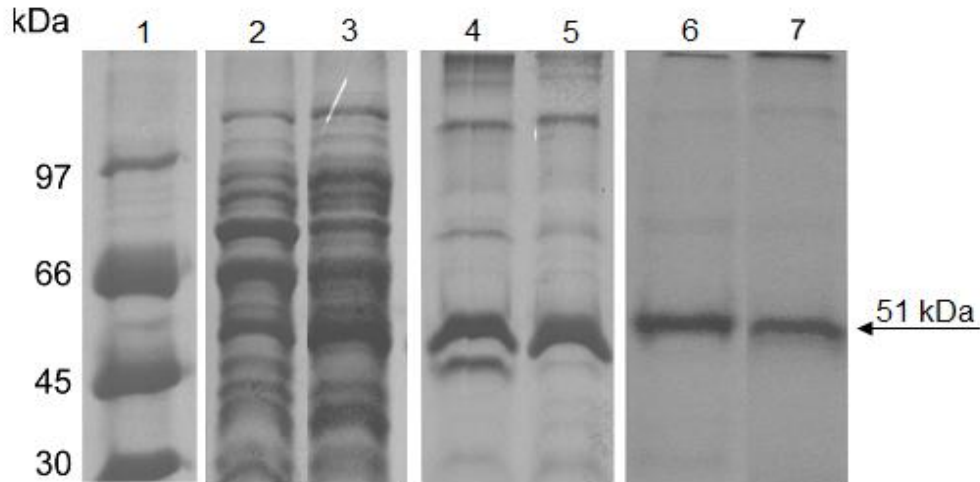


Durante la etapa del lote alimentado se logró mantener una velocidad de crecimiento específico de  $0.30 \text{ h}^{-1}$  (Tabla 11), la cual es menor a la reportada como límite para la producción de ácido acético, de  $0.35 \text{ h}^{-1}$  (El-Mansi & Holms, 1989). Por lo anterior, y por el hecho de que no se vio reflejado en el crecimiento celular, es posible que no haya una concentración inhibitoria de acético en el medio, beneficiando el crecimiento celular y la expresión de proteína recombinante (Turner, et al., 1994) (Luli & Strohl, 1990).

Con la implementación del cultivo por lote alimentado y bajo las condiciones óptimas de operación establecidas se pudo aumentar 2 veces la concentración celular (base seca) en comparación con el cultivo en lote en bio-reactor y 21.7 con relación al cultivo en lote en matraz. En cultivos de alta densidad las concentraciones celulares alcanzadas varían en un amplio rango, desde 20 hasta 190 g/L (base seca) (Shiloach & Fass, 2005), lo que sitúa los resultados de la presente investigación dentro del rango medio de concentraciones reportadas. Probablemente se podrían haber alcanzado densidades celulares más altas si se hubiera continuado la alimentación, sin embargo, conforme aumenta la concentración celular aumenta la acumulación de ácido acético, el calor generado por la reacción (calor de fermentación), la formación de espuma y el estrés celular (Shiloach & Fass, 2005).

Se recuperaron las proteínas intracelulares según la metodología descrita en Materiales y Métodos y se analizó el perfil proteico crudo y después de cada paso de purificación (Figura 13). En todas las etapas se observó la presencia de una banda de aproximadamente 51 kDa, peso esperado para la proteína de interés, indicando que se expresó el gen *nprR* y, por lo tanto, fue posible producir la proteína recombinante en forma soluble en un cultivo por lote alimentado. Al final del lote alimentado se obtuvo un total de proteína recombinante de 147.50 mg/L, resultando en un rendimiento de 2.95 mg por gramo de célula (base seca) (Tabla 12). Ya que la producción de proteína es proporcional

a la concentración celular alcanzada y dado que se mantuvo el mismo rendimiento por gramo de célula (base seca), se consideró que las condiciones de operación, el perfil de alimentación y la densidad celular alcanzada fueron adecuadas, resultando en un aumento de 27.41 veces el rendimiento de NprR por litro en comparación al obtenido en cultivo por lote en matraz.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. SDS-PAGE al 12% donde se muestra en los carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) extracto proteico total del cultivo en matraz, (3) extracto proteico total del lote alimentado, (4) paso 1 de purificación del cultivo en matraz, (5) paso 1 de purificación del lote alimentado, (6) paso 2 de purificación del cultivo en matraz, y (7) paso 2 de purificación del lote alimentado. En todos los casos se puede apreciar la presencia de una banda correspondiente al peso de 51 kDa, pero estimado de la proteína NprR.

**Tabla 12.** Producción de proteína recombinante NprR en cultivo por lote alimentado en bio-reactor y cultivo por lote en matraz

Cultivo	Reactor	mg de NprR/L	mg de NprR/g (base seca)
Lote alimentado	Bio-reactor	147.50±43.48	2.76
Lote en matraz	Matraz agitado	5.68 ± 1.16	2.37

Comparando nuestra producción con la de otras proteínas recombinantes, las cuales pueden llegar al orden de gramos por litro (Jeong, et al., 1999) como se muestra en la Tabla 1, se observa que tanto producción de proteína es relativamente baja. Sin embargo, la productividad de proteína recombinante soluble y correctamente plegada no es considerada en la mayoría de los estudios. En muchos casos, la proteína sobreexpresada se presenta como cuerpos de inclusión, es decir como proteínas no funcionales, que tienen que someterse a un proceso de desnaturalización seguido por otro de plegamiento, ambos ineficientes, por lo tanto, el plegamiento correcto de las proteínas es importante para aumentar la producción de proteínas funcionales (Gupta, et al., 2009), lo cual en el presente estudio se logró. Además, la productividad de proteína recombinante varía dependiendo de la cepa hospedera de *E. coli* y del tipo de proteína recombinante a producir (Jeong, et al., 1999), puesto que NprR es un receptor de quorum sensing implicado en sistemas de regulación muy finos indispensables para la sobrevivencia de la población bacteriana, es difícil sobreexpresarlo, otros grupos no han logrado obtener la proteína completa estable o bien han obtenido cuerpos de inclusión (Zouhir, et al., 2013). Varios estudios han demostrado que es difícil predecir la productividad y estabilidad del producto final en cultivos de alta densidad (Weiker, et al., 1998) (Curles, et al., 1996) mientras que otros no encontraron efecto entre la densidad celular y la concentración y calidad final del producto (Ryan, et al., 1996) (Shin, et al., 1997). Ha sido reportado que la productividad específica en fermentaciones de alta densidad es generalmente menor a la obtenida en cultivo en matraz (Jeong, et al., 1999). En el caso del presente trabajo, la implementación del lote alimentado mantiene la productividad de proteína y permite reducir la concentración de inductor IPTG utilizado. Esto puede deberse a la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio que brinda energía (ATP) para la replicación y segregación de los plásmidos para la subsecuente expresión de la proteína que codifican (Zabriskie & Arcuri, 1986). El uso final de la proteína es un factor importante para determinar el sistema

de producción, pues dicta la pureza deseada y costos de producción. (Choi, et al., 2006). La proteína interés del presente estudio es requerida en cantidades relativamente pequeñas pero debe cumplir con un alto criterio en lo que respecta la pureza, autenticidad y funcionalidad (solubilidad). Considerando ésto, se puede afirmar que la calidad y cantidad de la proteína NprR producida entra dentro de los lineamientos y que el cultivo en lote alimentado presenta una alternativa efectiva para su producción.

## VI. CONCLUSIONES

En el cultivo de *E. coli* BL21 DE3-pGKJE6Ω/pET11aΩnprR por lote alimentado en bio-reactor, se alcanzaron altas densidades celulares ( $X=53$  g/L) ya que las condiciones de operación utilizadas propiciaron una buena oxigenación del medio, limitando la formación de subproducto inhibitorio. Con un perfil de alimentación constante se pudo controlar la velocidad de crecimiento dentro de los rangos deseados ( $0.1-0.3$  h<sup>-1</sup>), evitando la formación de ácido acético y favoreciendo la producción de proteína recombinante. Las concentraciones celulares alcanzadas junto con las condiciones óptimas de cultivo que representaba el cultivo por lote alimentado en bio-reactor permitió aumentar la productividad volumétrica de proteína recombinante NprR soluble de manera considerable; 27 veces más la producción de proteína en cultivo en matraz. Considerando la dificultad que representa la sobre-expresión de proteínas de la naturaleza de NprR, el hecho de que se produjera de forma soluble y se alcanzara un rendimiento de 147 mg/L demuestra que el cultivo por lote alimentado implementado resulta una alternativa efectiva para su producción.

## VII. RECOMENDACIONES

En lo que respecta la inducción de los genes que codifican para la proteína NprR y para las chaperonas, se podrían probar diferentes tiempos de inducción y concentraciones de inductor, ya que no se realizaron experimentos variando estos parámetros. Al evaluarlos se podría obtener una mayor producción de proteína recombinante.

El método de extracción y purificación fue diseñado para la producción del cultivo por lote en matraz, la cual es muy baja en comparación al cultivo por lote alimentado, por lo tanto, resulta ineficiente a la hora de aplicarlo al anterior. Se tendría que evaluar principalmente las condiciones de lisado celular y purificación por cromatografía de afinidad, ya que parte de la producción de proteína se perdió en estas etapas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aranson, A., 2002. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol Life Sci*, 3(59), pp. 417-425.

Armein, K. E. et al., 1995. Purification and characterization of recombinant human p50 protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Issue 92, pp. 1048-1052.

Asaff, A., Reyes, Y., López, E. & de la Torre, M., 2002. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, Issue 21, pp. 291-295.

Ashish, K. S. et al., 2011. Comparative transcriptomic profiles analysis of fed-batch cultures expressing different recombinant proteins in *Escherichia coli*. *AMB Express*, Issue 1, p. 33.

Aucoin, M. G. et al., 2006. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microb Cell Fact*, pp. 5-27.

Bench, J. E. & Carlsen, S., 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol Bioeng*, Issue 36, pp. 1-11.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram amounts of protein using the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem*, Issue 72, pp. 248-254.

Cabrera-Ruiz, R., 2011. Overexpression and Purification of quorum sensing transcriptional regulator NprR of *Bacillus thuringiensis*. Huatusco, Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Choi, J. H., Keum, K. C. & Lee, S. Y., 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, Issue 61, pp. 876-885.

Choi, J. H. & Lee, S. Y., 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Issue 64, pp. 625-635.

Curles, C., Baclaski, J. & Sachdev, R., 1996. Phosphate glass as phosphate source in high cell density *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol Prog*, Issue 24, pp. 22-25.

de Maré, L. et al., 2005. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to maximum oxygen transfer capacity for the reactor. *Biotechnology Letters*, Issue 27, pp. 983-990.

Declerck, N. et al., 2007. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47(104), pp. 18490-18495.

Dedhia, N. N., Richins, R. & Mesina, A., 1997. Improvements in recombinant protein production in ppGpp-deficient *Escherichia coli*. *Biotech Bioeng*, Issue 53, pp. 379-386.

Dubois, T. et al., 2012. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog*, 4(8).

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

Eppstein, L., Shevitz, J., Yang, X. M. & Weiss, S., 1989. Increased biomass production in a benchtop fermentor. *Bio/Technology*, Issue 7, pp. 1178-1181.

Fieschko, J. & Ritch, T., 1986. Production of human alpha consensus interferon in recombinant *Escherichia coli*. *Chem Eng Commun*, Issue 45, pp. 229-240.

Gerigk, M. et al., 2002. Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, Issue 80, pp. 746-754.

Gleiser, I. E. & Bauer, S., 1981. Growth of *E. coli* W to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechnol Bioeng*, Issue 23, pp. 1015-1021.

Gohar, M. et al., 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus* PLoS. *ONE*, 7(3).

Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R., 1997. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. *Genes Dev*, Issue 11, pp. 815-823.

Goyal, D., Sahni, G. & Sahoo, D. K., 2009. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresource Technology*, Issue 100, pp. 4468-4474.

Gupta, P., Ghosalkar, A., Mishra, S. & Chaudhuri, T. K., 2009. Enhancement of over expression and chaperon assisted yield of folded recombinant aconitase in *Escherichia coli* in bioreactor cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Issue 107, pp. 102-107.

Han, K., Lim, H. C. & Hong, J., 1992. Acetic acid formation in *E. coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, Issue 39, pp. 663-671.

Hellmuth, K., Korz, D. J., Sanders, E. A. & Deckwer, W. D., 1994. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J Biotechnol*, Issue 32, pp. 289-298.

Hengwei, W., Fengqing, W. & Dongzhi, W., 2009. Impact of oxygen supply on rtPA expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3): ammonia effects. *Appl Microbiol Biotechnol*, Issue 82, pp. 249-259.

Hockney, R. C., 1994. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, Issue 12, pp. 456-463.



- Hogson, J., 1993. Expression systems: a user's guide. *Bio/Technology*, Issue 11, pp. 887-893.
- Holmes, W. H., 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul*, Issue 28, pp. 69-105.
- Jeong, K. L., Lee, S. Y. & 4, 1999. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. *Applied and Environmental Microbiology*, Issue 65, pp. 3027-30332.
- Jung, G., Deneffe, P., Becquart, J. & Mayaux, J. F., 1988. High-cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1 beta. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, Issue 139, pp. 126-146.
- Kane, J. F. & Hartley, D. L., 1988. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, Issue 6, pp. 95-101.
- Koh, B. T., Nakashimada, U., Pfeiffer, M. & Yap, M. G., 1992. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. *Biotechnol Lett*, Issue 14, pp. 1115-1118.
- Konstantinov, K., Kishimoto, M., Seki, T. & Yoshida, Y., 1990. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, Issue 36, pp. 750-758.
- Korz, D. J. et al., 1995. Simple fed-batch techniques for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, Issue 39, pp. 59-65.
- Kweon, D. H., Hans, N. S., Park, K. M. & Seo, J. H., 2001. Overproduction of Phytolacca insularis protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, Issue 36, pp. 537-542.
- Lee, J. H. et al., 1989. Production of human leukocyte interferon in *Escherichia coli* by control of growth rate in fed-batch fermentation. *Biotechnol Lett*, Issue 11, pp. 695-698.
- Lee, S. Y., 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, March. Volumen 14.
- Lee, S. Y. & Chang, H. N., 1993. High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source *Biotechnol Lett*, Issue 15, pp. 971-974.
- Lee, S. Y. & Chang, H. N., 1994. Characteristics of Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by *Escherichia coli* *J Environ Polymer Degrad*, Issue 2, pp. 169-176.
- Li, X., Robbins, J. W. & Taylor, K. B., 1990. The production of recombinant beta-galactosidase in *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. *J Ind Microbiol*, Issue 5, pp. 85-94.
- Luli, G. & Strohl, W., 1990. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, Issue 56, pp. 1004-1011.

- Markl, H., Zenneck, C., Dubach, A. & Ogbonna, J. C., 1993. Cultivation of *E. coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, Issue 39, pp. 48-52.
- Matsui, T. y otros, 1990. Effect of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, Issue 54, pp. 619-624.
- Meyer, H. P., Kuhn, H. J., Brown, S. W. & Fiechter, A., 1984. Production of human leukocyte interferon by *Escherichia coli*. Weinheim, Verlag Chemie GmbH, pp. 499-505.
- Miller, M. B. & Bassler, B. L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol*, Issue 55, pp. 165-199.
- Moffatt, B. A. & Studier, F. W., 1986. Use of bacteriophage T-7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Molecular Biology*, Issue 189, pp. 113-130.
- Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T. & Shimizu, S., 1979. High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J Chem Eng Jpn*, Issue 12, pp. 313-319.
- Nishihara, K. et al., 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, Issue 66, pp. 884-889.
- Nishihara, K. et al., 1998. Chaperon coexpression plasmids: differential and synergic roles of dnaK-dnaJ-grpE and groEL-groEs in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *E. coli*. *Appl Environ Microbiol*, Issue 64, pp. 1694-1699.
- O'Beirne, D. & Hamer, G., 2000. Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W-3110. *Bioprocess Eng*, Issue 23, pp. 375-380.
- Ohta, K. et al., 1993. High level production of human proapo A1 by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, Issue 75, pp. 155-157.
- Paalme, T. et al., 1990. Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol Bioeng*, Issue 35, pp. 312-319.
- Pack, P. et al., 1993. Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, Issue 11, pp. 1271-1276.
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. & Ramírez, O. T., 2004. Production of recombinant proteins, challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*, Issue 267, pp. 15-51.
- Palomares, L. A. & Ramírez, O. T., 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnol*, Issue 22, pp. 225-237.
- Pan, J. G., Rhee, J. S. & Lebeault, J. M., 1987. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol Lett*, Issue 9, pp. 89-94.
- Passarinha, L. A., Bonifácio, M. J. & Queiroz, J. A., 2009. Application of a fed-batch bioprocess for the heterologous production of hSCOMT in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, pp. 1-10.

- Pottathil, M. & Lazazzera, B. A., 2003. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci*, Issue 8.
- Reading, N. C. & Sperandio, V., 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1(254), pp. 1-11.
- Riesenberg, D., 1990. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *App Microbiol Biotechnol*, Issue 34, pp. 77-82.
- Riesenberg, D., 1991. High-cell density cultivation of *Escherichia coli* Curr Opin Biotechnol, 380-384(2).
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A. E., Guarneros, G. & de la Torre, M., 2010. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, Issue 87, pp. 913-923.
- Roeva, O., Tzonkov, S. & Hitzmann, B., 2010. Optimal feeding trajectories design for *E. coli* fed-batch fermentations. *Int J Bioautomation*, 2(14), pp. 89-98.
- Roh, J. Y. et al., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol*, 4(17), pp. 547-559.
- Ruiz, J. et al., 2013. From laboratory to pilot plant *E. coli* fed-batch cultures; optimizing the cellular environment for protein maximization. *J Ind Microbiol Biotechnol*, Issue 40, pp. 335-343.
- Ryan, W. et al., 1996. Growth kinetics of *Escherichia coli* and expression of a recombinant protein and its isoforms under heat shock conditions. *Biotechnol Prog*, Issue 12, pp. 596-601.
- Sauka, D. H. & Benintende, G. B., 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. *Revista Argentina de Microbiología*, Volume 40, pp. 124-140.
- Schnepf, E. et al., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 3(62), pp. 775-806.
- Shiloach, J. & Fass, R., 2005. Growing *E. coli* to high cell density- A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, Issue 23, pp. 345-357.
- Shimizu, N. et al., 1988. Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance monitoring. *J Ferment Technol*, Issue 66, pp. 187-191.
- Shin, C. S., Hong, M. S., Bae, C. S. & Lee, J., 1997. Enhancement production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnol Prog*, Issue 13, pp. 249-257.
- Shuler, M. L. & Kargi, F., 2002. *Bioprocess engineering. Basic concepts..* Upper Saddle River(NJ): Prentice Hall.

- Slati, L. & Lereclus, D., 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol*, 3(187), pp. 1182-1187.
- Strandberg, L. & Enfors, S., 1991. The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, Issue 13, pp. 609-614.
- Taguchi, H. & Huphrey, A. E., 1966. Dynamic measurement of volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *J Ferm Tech*, Issue 44, pp. 881-889.
- Tartoff, K. D. & Hobbs, C. A., 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Laboratories Focus*, pp. 9-12.
- Thomas, J. G. & Baneyx, F., 1996. Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines. *Mol Microbiol*, Issue 21, pp. 1185-1196.
- Tsai, L. B. et al., 1987. The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in high cell density *Escherichia coli* fermentation. *J Ind Microbiol*, 2(181-187).
- Turner, C., Gregory, M. E. & Thornhill, N. F., 1994. Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC. *Biotechnol Bioeng*, Issue 44, pp. 819-829.
- Uehara, H., Yamane, K. & Maruo, B., 1979. Thermosensitive, extracellular neutral proteases in *Bacillus subtilis*: isolation, characterization, and genetics. *J Bacteriol*, Issue 139, pp. 583-590.
- Vázquez-Luján, M. G., 2009. Caracterización de la proteína NprR de *Bacillus thuringiensis*. Hermosillo(Sonora): CIAD.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Ann Rev Cell Dev Biol*, Issue 21, pp. 319-346.
- Weiker, C., Sauer, U. & Baily, J. E., 1998. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of secreted recombinant protein. *Biotechnol Bioeng*, Issue 59, pp. 386-391.
- Yee, L. & Blanch, H. W., 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, Issue 41, pp. 781-790.
- Zabriskie, D. W. & Arcuri, E. J., 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganism. *Enz Microb Technol*, Issue 8, pp. 706-717.
- Zouhir, S. et al., 2013. Peptide-binding dependent conformational changes regulate the transcriptional activity of the quorum-sensor NprR. *Nucleic Acid Research*, 41(16).

## **ANEXO I**

Participación en la modalidad de cartel durante el III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias que se llevó a cabo del 03 al 07 de octubre de 2013 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

# “Production in fed batch culture of NprR recombinant protein from *Bacillus thuringiensis* in *E. coli*.”

**Guadalupe Yapur-Villaseñor, Rosina Cabrera and Mayra de la Torre.**  
 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Carretera a La Victoria km 0.6 Hermosillo, Sonora, México, C.P. 83304  
[gpe.yapur@gmail.com](mailto:gpe.yapur@gmail.com)

## INTRODUCTION

NprR belongs to the RNPP family (Rap, NprR, PlcR and PrgX) of quorum sensing receptors for regulating gene expression. NprR was described as activator of a neutral protease and it has been recently related to sporulation and expression of *cry* genes in the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). NprR has not yet been characterized, therefore, large quantities of protein are required for structure-function studies. Using a heterologous expression system (*Escherichia coli* BL21) the protein was over expressed assisted by the coexpression of chaperons DnaK-DnaJ-GrpE y GroES-GroEL. In order to achieve higher cell density cultures of the recombinant strain to increase protein production a fed batch culture was designed.

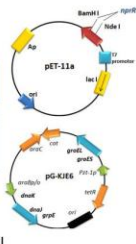
## METHODS

### 1 Strains and plasmids

Host: *Escherichia coli* BL21 DE3

Plasmid	Promoter	Regulatory gene	Drug Resistance
pEt-11a	T7 ( <i>nprR</i> )	<i>lacI</i>	Am
pG-KJE6	<i>araBp</i> ( <i>dnaK-dnaJ-grpE</i> ) <i>Pzt-1p</i> ( <i>groES-groEL</i> )	<i>araC</i> <i>tetR</i>	Cm

### 2 Fed batch design

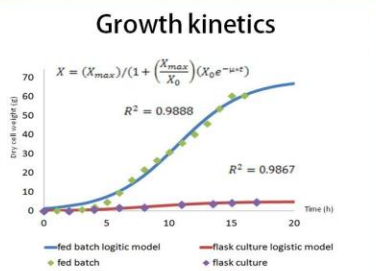
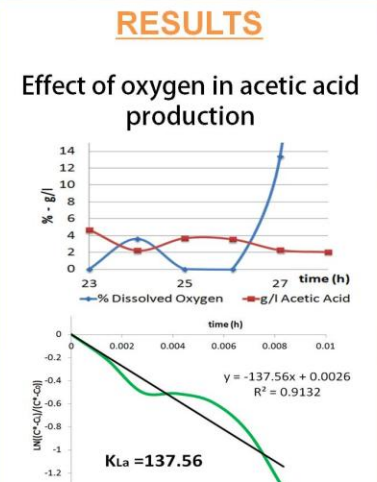
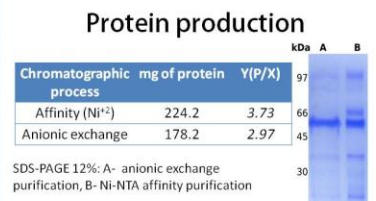
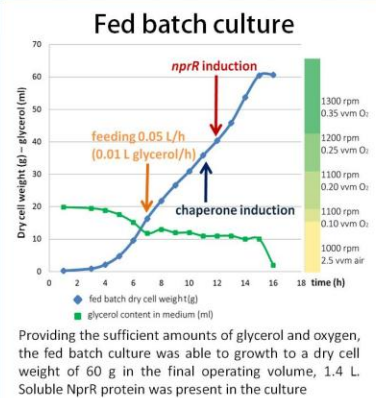


- Growth conditions: 7 pH, 30°C, TB medium
  - Dissolved Oxygen (D.O.) levels > 40% of air saturation
- Aeration: 2.5 L/min of air  
 Oxygen: 0.1- 0.35 L/min  
 Stirrer: 1000-1300 rpm

### 3 Protein production

- Induction: chaperones - 0.5 mg/ml Ara, 5 ng/ml Tet; NprR - IPTG 0.5 mM
- Purification: affinity (Ni<sup>2+</sup>) and anionic exchange chromatography

Cell growth was monitored each hour measured by optical density (OD<sub>600</sub>) and adjusted to dry cell weight.



### Comparison chart

Parameter	Fed batch culture	Flask culture	Proportion
X max	60 g	4.8 g	12.5
$\mu$	0.37	0.34	1.08
Y(S/X)	1.66 ml/g	8 ml/g	4.81
Y(P/X)	2.9 mg/g	1.4 mg/g	2.07
NprR	178.2 mg	6.5 mg	27.41
IPTG	0.5mM	1mM	2

The fed batch and flask growth curve were adjusted to a logistic model to determine the kinetic parameters in order to compare both cultures. As the comparison chart shows, the fed batch culture has many advantages over the flask culture.

## CONCLUSION

Fed batch cultures permits us to control parameters such as dissolved oxygen levels and substrate concentration, factors that directly influence growth rate and product formation. As shown in the results, less substrate and inductor were needed to achieve a higher protein yield, emphasizing the importance of optimal culture conditions.

## REFERENCES

- Jorge Rocha-Estrada, Angel E. Aceves-Olivera, Gabriel Guarneros, Mayra de la Torre (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria *Microbiol Biotechnol* 87:913–923
- Nishihara, K., Sawamoto, M., Hasegawa, M., Yanagi, H., Yano, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroE-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, *Cry2L*, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* 64(5):1694-1699.
- Bauer, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411-421.
- Lee, Y.H., W. Blanch (1992). Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 10, 1550 - 1556.
- Shin CS, Hong MS, Kim DY, Han MC, Lee J. 1998. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:364-370.

