

**STRAIN AND PROCESS DEVELOPMENT FOR
RECOMBINANT PROTEINS IN
ESCHERICHIA COLI**

P KATHIRESAN



**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

SEPTEMBER 2021

© Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2021

**STRAIN AND PROCESS DEVELOPMENT FOR
RECOMBINANT PROTEINS IN
ESCHERICHIA COLI**

by

P Kathiresan

Department of Chemical Engineering

Submitted

**in fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy
to the**



**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI
SEPTEMBER 2021**

Dedicated to my family

Certificate

This is to certify that the thesis entitled “**STRAIN AND PROCESS DEVELOPMENT FOR RECOMBINANT PROTEINS IN ESCHERICHIA COLI**” being submitted by

P. KATHIRESAN to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of **Doctor of Philosophy** is a record of the original bonafide research work carried out by him under my guidance and supervision. The results contained in this thesis have not been submitted in part or in full to any other University or Institute for the award of any degree or diploma.

I certify that he has pursued the prescribed course of research.

Prof. Anurag S. Rathore

Department of Chemical Engineering

Indian Institute of Technology Delhi

Acknowledgements

This thesis would not have been possible without the immense support from many people. To them I'm deeply grateful and sincere appreciation.

Firstly, I would like to express my sincere gratitude to my advisor Prof. Anurag Rathore for the continuous support of my Ph.D study and related research, for his patience, motivation, and immense knowledge. As a supervisor, he has mentored my research work from the beginning of the doctoral program. He supported me not only as a research supervisor but, also emotionally, giving moral support and freedom.

With his constant motivation and constructive feedback, he channelized my energy in proper direction. His immense knowledge and plentiful experience have encouraged me in all the time of my academic research and daily life. Without his guidance and continuous optimism this thesis would not have been possible. I would like to thank my supervisor for his invaluable supervision, support and tutelage during the course of my doctoral program.

I would like to express gratitude to my research committee members Prof. James Gomes, Prof. Ali Haider, Prof. Mandipa Banerjee and Prof. Rajesh Khanna for their treasured support which was really influential in shaping my experiment methods and critiquing my results.

I would like to specially thank the upstream processing team- Dr.Jaya Gupta, Dr.Wajihul Hassan, Dr.Viki Chopda and Jashwant for a cherished time spent together in the lab, and in social settings. I thank all other lab members of bioseparations lab for their kind support and co-operation during this work.

I am extremely grateful to Dr. Ashish Chauhan for his invaluable advice, continuous support, and patience.

I specially thank my friend Vishwanath Hebhi who provided immense mental support and encouragement. Special thanks is also due to Naresh Kumar for his co-operation at times of need.

I would also like to gratefully acknowledge the support of all the interns, bachelor and master students for helpful discussions in carrying out experiments.

My gratitude extends to the Administration for the funding opportunity to undertake my studies at the Department of Chemical Engineering, IIT Delhi.

My wife Dr. Chandrakala has been extremely supportive throughout this entire period and has stood by me through all my travails, my absences, my fits of pique and impatience. Thank you for being with me and for your appreciated sacrifices.

Finally, I would like to express my gratitude to my parents P. Pandi and R. Sethulakshmi and my brother and sister. Without their tremendous understanding and encouragement in the past few years, it would be impossible for me to complete my research.

P. KATHIRESAN

Abstract

Bacterial cells are of industrial significance for producing speciality biochemicals, amino acids, enzymes, biofuels and biopharmaceuticals. Biopharmaceuticals is currently gaining attention in the pharma market. Biopharmaceuticals producing from living cells require high quality and there are strict requirements for safety and efficacy. Therefore, process of producing recombinant proteins is subject of rigorous process optimisation to meets the regulatory requirements. Industrial bioprocesses are controlled by complex parameters. Henceforth, a successful design of industrial strain and process optimisation demands a thorough understanding of the cellular metabolism under production conditions. *E. coli* was the main host for recombinant production owing to fast growth rate, ability to grow on inexpensive media and easy to achieve high cell densities for attaining maximum productivity. The popularity of *E. coli* as an expression host has led to the development of genetic tools and strategies for high-level expression of recombinant protein. Numerous studies has been done to optimize the bacteria as an expression host has generated many engineered recombinant strains of *E. coli*. Despite all these advancements in *E. coli*, research community is continually striving to gain a fundamental understanding of cellular metabolism and impact of process to produce high titre of recombinant proteins with consistent product quality. *E. coli* BL21 (DE3), a popular industrial B strain for expression of recombinant protein, they are repressed until IPTG or lactose is added. It is generally desirable that the over expression of recombinant protein trigger the cascade of cellular stress response results in low titre of recombinant protein. This can only be solved when the influence of the changes on the process is sufficiently well understood. Hence, central to the thesis is the application of knowledge based approach to understand the performance of strain and process dynamics during recombinant protein expression. First phase of study involve a novel process development by growing *E. coli* cells to high cell density and gradually shifting the cells to microaerobic process for production of recombinant proteins such as lethal toxin neutralizing factor (rLTNF) and pramlintide (rSymlin) oligomers. Due to the shift in the process, recombinant proteins titre was improved 2 folds. To gain understanding of process dynamics, comprehensive transcriptomic profiling has been done with the *E. coli* BL21 (DE3) strain. Overall, microaerobic process led to improve the lactose utilisation, cellular productivity and product titre. Adaptive laboratory evolution (ALE) has been

commonly used with great success to develop robust industrial strain. Industrial strain will be subjected to a severe environment in the bioreactor, where the concentration of carbon or nitrogen source can be much higher, are often less defined, and contain undefined impurities. In order to achieve and maintain the product yield, the industrial strain must be tolerated with a high concentration of sugar and by product accumulation. Therefore, it is important to engineer strains that can consume efficiently to high substrate and/or by-product concentration. *E. coli* BL21 (DE3) strain is galactose knock out strain, which fails to utilise lactose completely. Second phase of study applies dynamic laboratory evolution to improve metabolism of lactose, galactose and acetate. As a result, laboratory adapted strain showed both an enhanced galactose utilization rate with less acetate accumulation and improved metabolic capacity to produce recombinant protein. A 2.31 fold increase in growth rate and 2.40 fold increase in product titre of rSymlin peptide was observed in adapted *E. coli* strain cultured under galactose. Gene expression profiling showed that pentose phosphate pathway enzymes were significantly upregulated in adapted strain. The novel adapted strain demonstrated highest biomass yield per galactose that has been ever reported in novel *E. coli* BL21 (DE3) strain. The adapted strains should be further investigated by using gene reporter systems and also, knock in/out of particular gene in the pathway in order to gain mechanistic understanding of the actual mutations. When we consider process, phosphate is one of the major constituents in growth media for *Escherichia coli*. Phosphate closely regulates central carbon and energy metabolism. Biochemical reactions in central carbon metabolism are known to be regulated by phosphorylation and dephosphorylation of enzymes. Phosphate scarcity can limit microbial productivity. However, microorganisms are evolved to grow in phosphate starvation environments. Final phase of thesis investigates the effect of phosphate starved response stimuli (PSR) in wild type and recombinant *Escherichia coli* cells cultivated in two different substrates, lactose and glycerol. Phosphate starved *E. coli* culture sustained bacterial growth despite the metabolic burden that emanated from recombinant protein expression albeit with altered dynamics of substrate utilisation. This study shown that metabolic flow of central carbon metabolism is modulated by phosphate starvation. In particular, glycerol as main carbon source along with lactose helps in production of sufficient metabolic precursors for recombinant protein production. The cumulative effects of phosphate starved metabolism results in a 2 fold increase in cellular productivity of the rSymlin peptide. Recent times, combinatorial approach consists of strain improvement along with process development has become a routine for biotechnological

applications which helps to design optimal strain and improve product titre. The work here establishes microaerobic process as a novel approach for achieving high titre of recombinant proteins using lactose. In another study, dynamic adaptive laboratory evolution strategy was successfully employed to develop a potential industrial *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain for successfully utilising galactose and improving titre of recombinant proteins. Final part of the study focus on establishing novel mechanism between lactose metabolism and phosphate starvation. *E. coli* employs a decoupling strategy by limiting growth and redirecting metabolic resources to improve recombinant protein under phosphate starvation conditions. Findings in the studies led to significant improvement in the strain and process to produce high titre recombinant proteins with low cost, which eventually benefits the biopharma industry.

सार

विशेष जैव रसायन, अमीनो एसिड, एंजाइम, जैव ईंधन और बायोफार्मासिटिकल के उत्पादन के लिए जीवाणु कोशिकाएं का औद्योगिक महत्व है। बायोफार्मास्युटिकल्स वर्तमान में फार्मा बाजार में ध्यान आकर्षित कर रहा है। जीवित कोशिकाओं से उत्पादित बायोफार्मासिटिकल्स को उच्च गुणवत्ता की आवश्यकता होती है और सुरक्षा और प्रभावकारिता के लिए सख्त आवश्यकताएं होती हैं। इसलिए, रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन के उत्पादन की प्रक्रिया कठोर प्रक्रिया अनुकूलन के विषय है, जो नियामक आवश्यकताओं को पूरा करने के लिए किया जाता है। औद्योगिक जैवप्रक्रियाओं को जटिल मापदंडों द्वारा नियंत्रित किया जाता है। इसके बाद, औद्योगिक स्ट्रेन और प्रक्रिया अनुकूलन का एक सफल डिजाइन और उसके उत्पादन के स्थितियों के तहत सेलुलर उपापचय की गहन समझ की जरूरत होती है। *E. coli* तेजी से विकास दर, सस्ती मीडिया पर बढ़ने की क्षमता और अधिकतम उत्पादकता प्राप्त करने के लिए उच्च सेल घनत्व प्राप्त करने में आसान होने के कारण, रेकॉम्बिनेंट उत्पादन के लिए मुख्य होस्ट था। एक एक्सप्रेसन होस्ट के रूप में *E. coli* की लोकप्रियता ने रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन की उच्च-स्तरीय एक्सप्रेसन के लिए आनुवंशिक उपकरणों और रणनीतियों का विकास किया है। बैक्टीरिया को अनुकूलित करने के लिए कई अध्ययन किए गए हैं क्योंकि एक एक्सप्रेसन होस्ट ने *E. coli* के कई इंजीनियर रेकॉम्बिनेंट स्ट्रेन को उत्पन्न किया है। *E. coli* में इन सभी संशोधन के बावजूद, अनुसंधान समुदाय लगातार उत्पाद की गुणवत्ता के साथ उच्च मात्रा में रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन का उत्पादन करने के लिए सेलुलर चयापचय और प्रक्रिया के प्रभाव की एक मौलिक समझ हासिल करने के लिए प्रयास कर रहा है। *E. coli* BL21 (DE3), रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन की एक्सप्रेसन के लिए एक लोकप्रिय औद्योगिक B स्ट्रेन, आईपीटीजी या लैक्टोज जोड़े जाने तक उनका संकोची किया जाता है। यह आम तौर पर वांछनीय है कि रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन की अधिक एक्सप्रेसन सेलुलर तनाव प्रतिक्रिया के कैस्केड को ट्रिगर करती है जिसके परिणामस्वरूप रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन का निम्न स्तर हो जाता है। इसे तभी हल किया जा सकता है जब प्रक्रिया पर परिवर्तनों के प्रभाव को पर्याप्त रूप से अच्छी तरह समझ लिया जाए। इसलिए, थीसिस के केंद्र में रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन एक्सप्रेसन के दौरान तनाव और प्रक्रिया की गतिशीलता के प्रदर्शन को समझने के लिए ज्ञान आधारित दृष्टिकोण का अनुप्रयोग है। अध्ययन के पहले चरण में *E. coli* कोशिकाओं को उच्च कोशिका घनत्व में विकसित करके और धीरे-धीरे रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन जैसे घातक टॉक्सिन न्यूट्राइजिंग फैक्टर

(rLTNF) और प्राम्लिंटाइड (rSymlin) ओलिगोमर्स के उत्पादन के लिए माइक्रोएरोबिक प्रक्रिया में कोशिकाओं को स्थानांतरित करके एक नवीनता प्रक्रिया विकास शामिल होता है। प्रक्रिया में बदलाव के कारण, रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन टाइटे में दो गुना सुधार हुआ था। प्रक्रिया गतिकी की समझ हासिल करने के लिए, E. coli BL21 (DE3) स्ट्रेन के साथ व्यापक ट्रांसक्रिप्टामिक प्रोफाइलिंग की गई है। कुल मिलाकर, माइक्रोएरोबिक प्रक्रिया ने लैक्टोज उपयोग, सेलुलर उत्पादकता और उत्पाद टाइटे में सुधार किया। अनुकूली प्रयोगशाला विकास (एएलई) का उपयोग आमतौर पर मजबूत औद्योगिक स्ट्रेन विकसित करने के लिए बड़ी सफलता के साथ किया गया है। औद्योगिक स्ट्रेन बायोरिएक्टर में एक गंभीर वातावरण के अधीन होगा, जहां कार्बन या नाइट्रोजन स्रोत की सांद्रता बहुत अधिक हो सकती है, अक्सर कम परिभाषित होती है, और इसमें अपरिभाषित अशुद्धियाँ होती हैं। उत्पाद की उपज प्राप्त करने और बनाए रखने के लिए, चीनी की उच्च सांद्रता और उत्पाद संचय के साथ औद्योगिक स्ट्रेन को सहन किया जाना चाहिए। इसलिए, इंजीनियर स्ट्रेन के लिए महत्वपूर्ण है जो उच्च सब्सट्रेट और/या उप-उत्पाद एकाग्रता के लिए कुशलतापूर्वक उपभोग कर सकते हैं। E. coli BL21 (DE3) स्ट्रेन गैलेक्टोज नॉक आउट स्ट्रेन है, जो लैक्टोज का पूरी तरह से उपयोग करने में विफल रहता है। अध्ययन का दूसरा चरण लैक्टोज, गैलेक्टोज और एसिटेट के चयापचय में सुधार के लिए गतिशील प्रयोगशाला क्रम-विकास को लागू करता है। नतीजतन, प्रयोगशाला अनुकूलित स्ट्रेन ने कम एसिटेट संचय के साथ एक बढ़ी हुई गैलेक्टोज उपयोग दर और रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन का उत्पादन करने के लिए बेहतर चयापचय क्षमता दोनों को दिखाया। गैलेक्टोज के तहत संवर्धित E. coli स्ट्रेन में वृद्धि दर में 2.31 गुना वृद्धि और rSymlin पेप्टाइड के उत्पाद टाइटे में 2.40 गुना वृद्धि देखी गई। जीन एक्सप्रेशन प्रोफाइलिंग से पता चला है कि पेंटोस फॉस्फेट मार्ग एंजाइमों को अनुकूलित स्ट्रेन में काफी हद तक अपग्रेड किया गया था। नवीनअनुकूलित स्ट्रेन ने प्रति गैलेक्टोज में उच्चतम बायोमास उपज का प्रदर्शन किया जो कि नवीन उपन्यास E. coli BL21 (DE3) स्ट्रेन में बताया गया है। जीन रिपोर्टर सिस्टम का उपयोग करके अनुकूलित उपभेदों की और जांच की जानी चाहिए और साथ ही, वास्तविक उत्परिवर्तन की यंत्रवत समझ हासिल करने के लिए मार्ग में विशेष जीन के अंदर/बाहर दस्तक देना चाहिए। जब हम प्रक्रिया पर विचार करते हैं, तो Escherichia coli के वृद्धि मीडिया में फॉस्फेट प्रमुख घटकों में से एक है। फॉस्फेट केंद्रीय कार्बन और ऊर्जा चयापचय को बारीकी से नियंत्रित करता है। केंद्रीय कार्बन चयापचय में जैव रासायनिक प्रतिक्रियाओं को एंजाइमों के फॉस्फोराइलेशन और डीफॉस्फोराइलेशन द्वारा नियंत्रित किया जाता है। फॉस्फेट की कमी माइक्रोबियल उत्पादकता को सीमित कर सकती है। हालांकि, फॉस्फेट अप्राप्ति के वातावरण में विकसित होने के लिए सूक्ष्मजीव विकसित होते हैं। थीसिस का अंतिम चरण वाइल्ड प्रकार और

रेकॉम्बिनेंट *E. coli* कोशिकाओं में फॉस्फेट अप्राप्ति प्रतिक्रिया उत्तेजनाओं (PSR) के प्रभाव की जांच करता है जो दो अलग-अलग सब्सट्रेट, लैक्टोज और ग्लिसरॉल में वृद्धि की जाती है। फॉस्फेट अपर्याप्त *E. coli* कल्चर में उपापचयी बोझ के बावजूद बैक्टीरिया की वृद्धि बनी रहती है, जो सब्सट्रेट उपयोग की परिवर्तित गतिशीलता के बावजूद रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन एक्सप्रेसन से उत्पन्न होता है। इस अध्ययन से पता चला है कि केंद्रीय कार्बन चयापचय का चयापचय प्रवाह फॉस्फेट अपर्याप्त से नियंत्रित होता है। विशेष रूप से, लैक्टोज के साथ मुख्य कार्बन स्रोत के रूप में ग्लिसरॉल रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन उत्पादन के लिए पर्याप्त चयापचय अग्रदूतों के उत्पादन में मदद करता है। फॉस्फेट अपर्याप्त चयापचय के संचयी प्रभाव के परिणामस्वरूप rSymLin पेप्टाइड की सेलुलर उत्पादकता में दो गुना वृद्धि होती है। हाल के दिनों में, प्रक्रिया विकास के साथ-साथ संयोजन दृष्टिकोण में स्ट्रेन में सुधार होता है, जैव-प्रौद्योगिकी अनुप्रयोगों के लिए एक नियमित बन गया है जो इष्टतम स्ट्रेन को डिजाइन करने और उत्पाद अनुमापांक में सुधार करने में मदद करता है। यहां काम लैक्टोज का उपयोग करके रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन के उच्च अनुमापांक को प्राप्त करने के लिए एक नवीन दृष्टिकोण के रूप में माइक्रोएरोबिक प्रक्रिया को स्थापित करता है। एक अन्य अध्ययन में, गैलेक्टोज का सफलतापूर्वक उपयोग करने और रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन के टाइट्रे में सुधार के लिए एक संभावित औद्योगिक *Escherichia coli* BL21 (DE3) स्ट्रेन विकसित करने के लिए गतिशील अनुकूली प्रयोगशाला विकास रणनीति को सफलतापूर्वक नियोजित किया गया था। अध्ययन का अंतिम भाग लैक्टोज चयापचय और अपर्याप्त फॉस्फेट के बीच नवीन तंत्र स्थापित करने पर केंद्रित है। *Escherichia coli* अपर्याप्त फॉस्फेट की स्थिति के तहत रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन में सुधार के लिए विकास को सीमित करके और चयापचय संसाधनों को पुनर्निर्देशित करके एक डिक्लीपिंग रणनीति को नियोजित करता है। अध्ययनों के निष्कर्षों ने कम लागत के साथ उच्च टाइट्रे रेकॉम्बिनेंट प्रोटीन का उत्पादन करने के लिए स्ट्रेन और प्रक्रिया में महत्वपूर्ण सुधार किया, जो अंततः बायोफार्मा उद्योग को लाभान्वित करता है।

Contents

Certificate.....	i
Acknowledgements.....	ii
Abstract.....	iv
List of Figures.....	xi
List of Tables.....	xiii
1 Introduction.....	1
1.1 Background.....	2
1.2 Problem definition, scope and objectives of research.....	3
1.2.1. Development of microaerobic fermentation as novel process for recombinant protein production in <i>E.coli</i> and comparative analysis with aerobic fermentation.....	3
1.2.2 Next genome sequencing studies in aerobic and microaerobic fermentation of <i>E.coli</i>	4
1.2.3 Adaptive laboratory evolution in <i>E.coli</i> to develop industrial strain for recombinant proteins.....	4
1.2.4 Investigation of Phosphate starvation on wild and recombinant <i>E.coli</i> in Lactose Glycerol.....	6
2. Review of Literature.....	8
2.1 Microaerobic Fermentation	10
2.2 Inducer systems.....	11
2.3 Lactose Promoter system.....	12
2.4 Arabinose inducer system.....	16
2.5 Rhamnose inducer system.....	19
2.6 Adaptive laboratory evolution and its applications.....	22
2.7 Effect of Phosphate in recombinant strains.....	25
3. Microaerobic fermentation alters lactose metabolism in <i>Escherichia coli</i>	30
3.1 Introduction.....	31
3.2 Materials and Methods.....	32
3.2.1 Microorganisms and culture conditions.....	32
3.2.2 Methods.....	34
3.2.2.1 Experimental setup.....	34

3.2.2.2 Transcriptomic Profiling and expression studies.....	34
3.2.2.3 Cloning of <i>setB</i> gene in expression vector.....	35
3.2.2.4 Expression studies of pACYC- <i>setB</i> construct	36
3.2.2.5 RNA Isolation and RT-qPCR.....	36
3.2.2.6 Measurement of Biomass.....	38
3.2.2.7 Measurement of Metabolites.....	38
3.2.2.8 Analysis of Product.....	38
3.2.2.9 Availability of data and materials.....	38
3.3 Results and Discussion.....	38
3.3.1 Effect of dissolved oxygen on biomass.....	38
3.3.2 Effect of dissolved oxygen on lactose consumption.....	40
3.3.3 Effect of dissolved oxygen on Product.....	41
3.3.4 Deciphering the role of <i>setB</i> as a transporter for improving lactose uptake in Microaerobic fermentation of <i>Escherichia coli</i>	43
3.3.5 Shake flask and reactor study.....	44
3.4 Conclusion.....	47
4. Next Genome sequencing studies in aerobic and microaerobic fermentation of <i>Escherichia coli</i>.....	48
4.1 Introduction.....	49
4.2 Materials and methods.....	50
4.2.1 Transcriptomic profiling.....	50
4.2.2 Measurement of gene expression.....	50
4.2.2.1 Library Preparation and Sequencing.....	50
4.3 Results and Discussion.....	52
4.3.1 Data Analysis.....	52
4.3.1.1 Genome mapping.....	53
4.3.1.2 Gene Identification and quantification.....	54
4.3.2 Transcriptome analysis.....	54
4.3.2.1 Better lactose transport in microaerobic conditions than aerobic conditions.....	54
4.3.2.2 Less stress in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	54
4.3.2.3 Lower gene expression of ribosome synthesis regulating repressor r-proteins	

in microaerobic conditions in comparison to aerobic conditions.....	55
4.3.2.4 Higher gene expression of various genes related to aminoacid metabolism	
in microaerobic conditions in comparison to aerobic conditions.....	55
4.3.2.5 Higher expression of gene related to energy metabolism in microaerobic conditions	
in comparison to aerobic conditions.....	56
4.4 Conclusion.....	62
5. Adaptively Evolved <i>Escherichia coli</i> for improved utilization of galactose to	
Produce recombinant proteins.....	63
5.1 Introduction.....	64
5.2 Materials and Methods.....	65
5.2.1 Adaptive laboratory evolution (ALE) of <i>Escherichia coli</i>	65
5.2.2 Strains, plasmids and Primers.....	66
5.2.3 Microbial Cultures.....	67
5.2.4 Analytical methods	68
5.2.5 Real time gene expression of cultures.....	68
5.3 Results and Discussion.....	69
5.3.1 Evaluating the performance of galactose grown cells in shake flasks.....	69
5.3.2 Recombinant Protein overexpression in Presence of galactose.....	71
5.3.3 Analysis of Transcriptional levels of Pentose Phosphate Pathway genes.....	73
5.4 Conclusion.....	74
6. Phosphate starvation controls lactose metabolism to produce recombinant proteins in	
<i>Escherichia coli</i>.....	79
6.1 Introduction.....	80
6.2 Materials and Methods.....	81
6.2.1 Chemicals.....	81
6.2.2 Bacterial strain and plasmid.....	81
6.2.3 Growth media and cultivation condition.....	81
6.2.4 Analytical methods for biomass and recombinant protein expression.....	82
6.2.5 RNA isolation, cDNA synthesis and real time PCR amplification.....	82
6.2.6 Availability of data and materials.....	83
6.3 Results and Discussion.....	83

6.3.1 Phosphate starvation response (PSR) limits biomass growth of wild-type and Recombinant cultures.....	83
6.3.2 Phosphate starvation controls galactose efflux on wild and recombinant cultures....	85
6.3.3 PSR is beneficial for recombinant protein expression.....	87
6.3.4 Understanding of carbon flow in response to phosphate starvation using gene Expression studies.....	87
6.4 Conclusion.....	95
7. Conclusion and Scope of Future work.....	96
7.1 Conclusions	97
7.2 Scope of future work.....	99
References.....	101
Biodata.....	118

List of Figures

Figure 3.1 Comparative dissolved oxygen profiles for aerobic and microaerobic of rLTNF and rSymlin fermentation in <i>E.coli</i>	39
Figure 3.2 Comparative biomass and lactose profiles for rLTNF and rSymlin.....	41
Figure 3.3 Comparative product profiles for rLTNF and rSymlin.....	42
Figure 3.4 Cellular productivity profiles of rLTNF and rSymlin.....	43
Figure 3.5 Gel picture of pACYC- <i>setB</i> clone.....	44
Figure 3.6 Biomass profile for microaerobic fermentation of <i>setB</i> clone and empty-pACYC control in shake flask.....	45
Figure 3.7 Biomass and lactose profile for aerobic and microaerobic of <i>setB</i> clone fermentation in shake flask.....	45
Figure 3.8 Biomass and lactose profile of <i>setB</i> clone in bioreactor.....	46
Figure 4.1 Overview of reference based genome pipeline schema.....	52
Figure 5.1 Evaluation of adapted (AS) and non-adapted (NS) strains of <i>E.coli</i> in shake flask culture	70
Figure 5.2 Performance of <i>E.coli</i> adapted (AS) and non-adapted (NS) strains during fed-batch process.....	72
Figure 5.3 Comparison of qS vs qP plot of <i>E. coli</i> adapted (AS) and non-adapted (NS) strains...73	
Figure 5.4 Comparison of selected genes of pentose phosphate pathway in galactose grown AS and NS strains of <i>E.coli</i>	74
Fig 5.5 Heat map of selected genes of pentose phosphate pathway (PPP) in galactose grown AS and NS strains of <i>E. coli</i> (Gal Vs Gal).....	75
Figure 5.6 Proposed model of galactose enhanced flux through pentose phosphate pathway...77	
Figure 6.1 Phosphate unlimited and phosphate starved <i>E.coli</i> wild type cultures grown in media.....	84
Figure 6.2 A comparison of phosphate unlimited and phosphate starved recombinant <i>E.coli</i> Strains grown in Shake flask Cultures.....	85
Figure 6.3 Biomass yield of wild and recombinant culture grown in lactose and glycerol containing phosphate unlimited and starved phosphate <i>E.coli</i>	86
Figure 6.4 Comparison of transcriptomic levels of <i>E.coli</i> phosphate starved and unlimited cultures sampled at 9h.....	88

Figure 6.5 Proposed model for galactose efflux due to lactose consumption in phosphate unlimited and starved conditions.....	90
Figure 6.6 Central metabolic reaction of <i>E.coli</i> strain growing on lactose and glycerol as carbon source and relative gene transcription of phosphate starved culture values as compared to the phosphate unlimited culture.....	92
Figure 6.7 Overall Schematic representation of lactose and glycerol metabolism considered to generate metabolic precursors for production of recombinant protein.....	94

List of Tables

Table 1.1 Precursor metabolite for Phosphate supply in cells.....	25
Table 3.1 Media Composition used for production of rLTNF and rSymlin in bioreactor.....	33
Table 3.2 Oligonucleotides used in this study.....	37
Table 3.3 A comparison of key process attributes in microaerobic and aerobic fermentation...	40
Table 4.1 Number of raw and processed reads for samples.....	53
Table 4.2 Sample wise alignment statistics of reference genome.....	53
Table 4.3 Fold change in expression of various genes related to lactose metabolism in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	56
Table 4.4 Fold change in expression of various genes related to stress response in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	56
Table 4.5 Fold change in expression of various genes related to ribosome synthesis in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	58
Table 4.6 Fold change in expression of various genes related to amino acid synthesis in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	59
Table 4.7 Fold change in expression of various genes related to ETC and respiration in microaerobic condition in comparison to aerobic condition.....	61
Table 5.1 Plasmid and strains used in this study	66
Table 5.2 Primers used in this study.....	66
Table 5.3 Composition of medium used in this study.....	67
Table 5.4 Comparison of productivity of AS strain and NS strain.....	73