



LA LIMITACIÓN DE OXÍGENO DETERMINA EL SWITCH METABÓLICO, LA PRODUCCIÓN Y LA O-GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Streptomyces lividans*

Mauricio A. Trujillo-Roldán, Ramsés A. Gamboa-Suasnavart, Luz D. Marín-Palacio, Gerardo Gaytán-Ortega, Greta I. Reynoso-Cereceda, Norma A. Valdez-Cruz.

Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F.
maurotru@gmail.com, maurotru@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: glicoproteínas, Streptomyces, switch metabólico.

Introducción. En eucariotas la producción de glicoproteínas recombinantes (gPR) está bien estudiada, inclusive ocho de los primeros diez biofarmacéuticos más vendidos son gPR (1,2). Sin embargo, la glicosilación en bacterias es un tema poco estudiado, en especial la O-manosilación, y el efecto de las condiciones de cultivo en las glicofomas que pueden obtenerse aún no está entendido (3). Una de las bacterias con interés industrial para producir gPR es la bacteria filamentosa *S. lividans* (4,5). Por otra parte, el *switch* metabólico que describe el cambio de fase exponencial a estacionaria ha sido estudiado en *Streptomyces* sp. con la idea de obtener altas cantidades de metabolitos secundarios. Nuestro objetivo es determinar como las condiciones de cultivo, en especial variaciones en el oxígeno disuelto, determina el *switch* metabólico y este a su vez afecta la calidad (O-glicofomas) y producción de una gPR en *S. lividans*.

Metodología. Se utilizó una cepa recombinante *S. lividans* productora de la proteína APA (45/47 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis* (4). Se llevaron a cabo cultivos en matraces agitados convencionales (MC), bafleados (MB) y con un resorte al interior (MR) para modificar la aireación e hidrodinámica de los cultivos (4,5). Se evaluó la potencia volumétrica (P/V) (6), como también las cinéticas de tensión de oxígeno disuelto (TOD), velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y de carbono (VTC), el coeficiente respiratorio (RQ) y el coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) (7). Se evaluó el crecimiento bacteriano por gravimetría, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), la producción de la gPR rAPA por SDS-PAGE (rAPA/proteína de sobrenadante) y Western Blots. Los residuos de manosa adheridos a la parte C-terminal de rAPA por MALDI-TOF. Se midió la undecilprodigiosina (UDP) como marcador de metabolito secundario por FTIR-ATR y HPLC (7). GDP-manosa se detectó por HPLC de intercambio aniónico (7), como precursor de la O-manosilación de rAPA.

Resultados. En MC se observó un menor crecimiento como biomasa final, pero con tamaños de agregados celulares dos ordenes de magnitud mayores al ser comparado con MB y MR, seguro asociados a las diferencias en P/V (Tabla 1) (3,4,6). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la μ de *S. lividans*

(Tabla 1). Por otra parte, se encontró una menor producción y menor número de manosas en el C-terminal de rAPA en MC. Se pudo observar un orden de magnitud menor VTO y VTC en MC que en MR y MB. Igualmente, en MC se observó un RQ es >1 , durante todo el cultivo, implicando un metabolismo limitado por oxígeno (7). $RQ > 1$ implica una mayor liberación de CO_2 probablemente debido a la biosíntesis de metabolitos secundarios como UDP (que es mayor en MC). UDP se detectó desde la fase exponencial en MC como un indicativo de *switch* metabólico. De manera inversa el precursor de la O-manosilación de rAPA (GDP-man) es menor en MC, indicando un posible desvío a la ruta central de carbono, que no se observaría en MB y MR.

Tabla 1. Parámetros estequiométricos de cultivos de *S. lividans* productora de la gPR rAPA (45/47 kDa) de *M. tuberculosis* en cultivos en matraces.

Parámetro	MC	MR	MB
Biomasa (g/L)	2.5±0.3	3.2±0.8	3.2±0.2
μ (h^{-1})	0.055±0.006	0.058±0.005	0.057±0.005
Tamaño del pellet (mm)	2.11±1.22	0.04±0.02	0.02±0.01
rAPA/proteína (%)	23±6	15±4	16±5
rAPA (mg/L)	~ 0.51	~ 0.81	~ 0.81
manosas	2	5	5
K_{La} (h^{-1})	41.4±5.4	129.9±5.0	87.4±0.6
P/V (W/L)	~ 0.20	~ 0.40	~ 0.51
VTO (mmol/Lh)	0.66±0.48	9.16±0.15	9.36±0.28
VTC (mmol/Lh)	0.77±0.35	5.73±0.77	6.18±0.41
RQ (-)	1.34±0.49	0.69±0.07	0.75±0.10
UDP (mg/L)	1.540±0.021	0.120±0.002	0.004±0.001
GDP-man (ng/L)	1.1±0.1	4.0±1.0	6.0±1.1

Conclusiones. Los valores altos de OTR en MC y MB permiten a *S. lividans* evitar de alguna manera el *switch* metabólico que ocurre en MC, afectando la producción de la gPR, su O-manosilación vía su precursor GDP-manosa.

Agradecimientos. PAPIIT-UNAM proyectos: IT-200719, IN-208414. CONACYT proyectos: 247473, 220795.

Bibliografía.

- Walsh G. (2018) Nature Biotechnol 36(12):1137.
- Wurm, DJ, Spadiut O. (2019) Recombinant Protein Production in Yeast (pp. 343-350). Humana Press, New York, NY.
- Natarajan, A. *et al.* (2018) Emerg Top Life Sci 2(3), 419-432.
- Gamboa-Suasnavart *et al.* (2011) Microb Cell Fact 10:110
- Gamboa-Suasnavart *et al.* (2013) World J Microbiol Biotechnol 29(8): 1421-9
- Marín-Palacio *et al.* (2014) Biochem Eng J 90:224-33.
- Gamboa-Suasnavart *et al.* (2018) Microb Cell Fact 17:189.

