

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2020 Volumen 24, Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente

Dr. Jaime Ortega López
Vice-Presidente

Dra. Sylvie Leborgne
Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Tesorero

Dr. Alvaro R. Lara
Subsecretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Vocal Profesional

Q. A. Alma Y. Alva Aviles
Vocal Estudiante

EDITORA

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
UNAM

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
UNAM

Dra. Andrea Sabido Ramos
UAM-C

Dr. Luis Bernardo Flores
CINVESTAV

Dr. Pablo Gortáres Moyoroqui
ITS

Dr. Jorge Gracida Rodríguez
UAQ

Dr. Daniel A. Guillén Santos
UNAM

EDITOR ASOCIADO

M. en C. Jocelin M. Rizo Villagrana
UNAM

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx

Índice

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	<u>4</u>
EDITORIAL	<u>8</u>
ARTÍCULOS	
Ingeniería de vías metabólicas en bacterias para la producción de intermediarios de interés industrial de la vía del aminoshikimato Rubén Mendoza-Flores, Dulce Díaz-Quiroz, Andrea Sabido-Ramos, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante	<u>10</u>
Ingeniería celular como una alternativa al cultivo por lote alimentado para la producción de proteínas recombinantes Daniela Velázquez, Guillermo Gosset, Álvaro R. Lara	<u>29</u>
Factores abióticos en la producción de proteínas recombinantes y su formación en cuerpos de inclusión en <i>Escherichia coli</i> Jesús Antonio Rauda-Ceja, Néstor O. Pérez, Norma A. Valdez-Cruz, Mauricio A. Trujillo-Roldán	<u>56</u>

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apearse al siguiente formato:

Instrucciones para los autores

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias

Instrucciones para los autores

se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...” Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx o romina@biomedicas.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Editorial

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería estableció en 2003 este reconocimiento a los mejores protocolos de tesis de investigación sobre Biotecnología y Bioingeniería. Este premio, tiene la finalidad de estimular a estudiantes sobresalientes durante la realización de su trabajo de investigación.

Para lograr este objetivo, se decidió apoyar a estudiantes que se encontraran apenas iniciando el trabajo experimental que los llevará a obtener el Título de Licenciatura o el Grado de Maestro o Doctor en cualquiera de las áreas de la Biotecnología o Bioingeniería, y se les convocó a participar enviando los protocolos de sus proyectos de investigación.

Al nombrar este premio se pensó en rendir homenaje a un destacado biotecnólogo que mantuviera su quehacer científico vigente. El Dr. Sergio Sánchez pertenece a una generación de médicos egresados de la UNAM que, impulsados por los pioneros de la Bioquímica en México, como Guillermo Soberón, Jesús Guzmán y Jaime Mora, decidieron hacer de la investigación científica su plan de vida profesional. Fue fundador del primer departamento de Biotecnología en México dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas, funda y coordina en 1984 el Proyecto Académico de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología de la UNAM, actualmente parte del Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la misma Universidad.

Convencido de la necesidad de fortalecer los vínculos entre la, entonces reducida comunidad biotecnológica, promueve en 1982 la fundación de la SMBB que hoy lo celebra entregando un premio con su nombre.

La labor de evaluación de estos trabajos estuvo a cargo de la Comisión de Premios de la SMBB, integrada por académicos reconocidos y miembros activos de nuestra Sociedad, los doctores Alvaro R. Lara (UAM), María Soledad Córdova Aguilar (UNAM), Katiushka Niño Arévalo (UANL), Carolina Peña Montes (ITVER) y José Luis Martínez Hernández (UAdeC), a quienes agradecemos todo el tiempo dedicado y la excelente labor de revisión, así como la difícil tarea de selección de los ganadores.

De acuerdo a las bases de la convocatoria publicada en la página de la sociedad, se dictaminó por unanimidad otorgar el premio **“SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL – APPLIKON 2019”** a los siguientes trabajos:

Editorial

LICENCIATURA

Jesús Antonio Rauda Ceja de la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia. Con el protocolo: “Efecto del pH sobre la producción de rHuGM-CSF en *Escherichia coli* a través de un sistema termoinducido.

MAESTRÍA

Rubén Mendoza Flores de la Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM. Con el protocolo: “Ingeniería de vías metabólicas para la producción de aminoshikimato en una cepa de *E. coli* PTS-”.

Además, debido a la calidad del trabajo presentado, se otorgó una mención honorífica a Daniela Velazquez Gallegos, estudiante de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, cuyo protocolo se titula: Ingeniería celular: una alternativa al cultivo por lote alimentado para la producción de proteína recombinante.

En este número de la revista se presenta el trabajo de los ganadores.

Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Editor

PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL CATEGORÍA MAESTRÍA

Ingeniería de vías metabólicas en bacterias para la producción de intermediarios de interés industrial de la vía del aminoshikimato

Rubén Mendoza-Flores¹, Dulce Díaz-Quiroz¹, Andrea Sabido-Ramos², Francisco Bolívar¹, Adelfo Escalante^{1*}

¹*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.*

²*Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, México.*

*Contacto: adelfo@ibt.unam.mx

Resumen

La vía del aminoshikimato (ASHK) descrita en *Amycolatopsis mediterranei* es una variante de la ruta del shikimato (SHK). Los principales intermediarios de esta ruta son la kanosamina, el 3-amino-5-hidroxibenzoato (aminoHBA) y el ASHK, compuestos precursores de una amplia variedad de moléculas de valor comercial entre los que se incluyen antivirales, anticancerígenos y antibióticos. Estos precursores tienen también el potencial de aplicación para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. Para mejorar la capacidad de producción de estos compuestos, se han aplicado diferentes estrategias de ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo de cepas sobreproductoras, sin embargo, en todos los casos se han alcanzado rendimientos y títulos bajos. En el caso de la kanosamina y el aminoHBA, las estrategias aplicadas se han limitado principalmente a sobreexpresar los clústeres de producción. Los experimentos de producción de ASHK ponen en evidencia que es fundamental aumentar la disponibilidad de fosfoenolpiruvato (PEP) e 1-imino-1-desoxi-D-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P), y por tanto la capacidad de producción de kanosamina o kanosamina-6-fosfato. La limitación de PEP podría ser minimizada aplicando estrategias previamente reportadas para producción de SHK y otros compuestos aromáticos. Mientras que la vía del shikimato es una fuente importante de pérdida de sustrato. En esta contribución se describe la relevancia de la vía del ASHK, las principales aplicaciones de los intermediarios de importancia de esta vía y las principales estrategias reportadas para su producción mediante ingeniería de vías metabólicas con el fin de explorar su potencial biotecnológico.

Palabras clave: Vía del aminoshikimato, aminoshikimato, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico, kanosamina, ingeniería de vías metabólicas.

Abstract

The aminoshikimic acid (ASHK) pathway is a variant of the shikimic acid pathway described in the bacteria *Amycolatopsis mediterranei*. In this pathway, the metabolic intermediates kanosamine, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (aminoHBA), and ASHK are precursors for the synthesis of high-value molecules such as antivirals, anticancer compounds, and antibiotics. These intermediates also have the potential for the development of new bioactive molecules. Metabolic engineering strategies for overproduction of kanosamine and aminoHBA have upregulated their codifying biosynthetic clusters. Meanwhile, strategies for the overproduction of ASHK shown the relevance to increasing the availability of phosphoenolpyruvate and imino-erythrose-4-phosphate, resulting in the increased production of the intermediates kanosamine or kanosamine-6-phosphate. Nevertheless, metabolic engineering pathway strategies for the overproduction of these compounds in several microbial cells resulted in the production of lower titers and yields. In this contribution, we describe the relevance of the ASHK pathway, the main applications of relevant intermediates and an overview of the central metabolic engineering strategies for the overproduction of these high-value aromatic compounds.

Key words: aminoshikimate pathway, 3-amino-5-hidroxibenzoic acid, kanosamine, aminoshikimic acid, metabolic engineering.

Introducción

La vía del aminoshikimato (ASHK) fue descrita inicialmente en la actinobacteria *Amycolatopsis mediterranei* cuyo producto es el ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (aminoHBA), un componente estructural común en los antibióticos de las familias de ansamicinas, ansamitocinas y salinicetales. La vía del ASHK es de gran relevancia desde el punto de vista biotecnológico ya que, a partir de tres de sus intermediarios, la kanosamina, el aminoHBA y el ASHK es posible obtener diferentes compuestos de importancia farmacéutica (Figura 1). La kanosamina es un antibiótico aminoglucósido

monomérico y es también un componente estructural de otros antibióticos como la kanamicina y la 3,3'-neotrehalosdiamina (Vetter et al., 2013). El aminoHBA es un componente común en una amplia variedad de metabolitos secundarios de las familias de las ansamicinas, ansamitocinas y salinicetales que incluyen antibióticos, anticancerígenos y antioxidantes (Kang et al., 2002). Mientras que el ASHK es un compuesto aromático que posee varios centros estereogénicos y grupos funcionales ordenados alrededor de un anillo carbocíclico de seis carbonos. Por estas características, el ASHK (al igual que el shikimato o SHK), es un compuesto muy

atractivo como andamio estructural para la síntesis de bibliotecas combinatorias y es también una alternativa relevante para ser utilizado como material de partida para la síntesis química del antiviral tamiflu, inhibidor de la enzima neuraminidasa de virus de influenza (Guo & Frost, 2004; Díaz et al., 2014).

La vía del aminoshikimato está presente en microorganismos como *A. mediterranei*, *Actinosynnema pretiosum* y *Streptomyces collinus* y requiere de la formación de 1-imino-1-deoxi-D-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) a partir de 3-amino-3-deoxi-D-glucosa o kanosamina. La iminoE4P es condensada con fosfoenolpiruvato (PEP) para generar ácido 3,4,dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulónico-7-fosfato (aminoDAHP); la siguiente reacción de la vía es catalizada por la enzima ácido 5-deoxi-5-amino-3-

dehidroquinico (aminoDHQ) sintasa que cicla el aminoDAHP a aminoDHQ, el cual es deshidratado para generar ácido 5-amino-5-desoxi-3-dehidroshikímico (aminoDHS). La última reacción de la vía es la biosíntesis de aminoHBA por la enzima aminoHBA sintasa la cual aromatiza al aminoDHS. Como estas reacciones de formación de aminoDAHP hasta aminoDHS son similares a las de la ruta del shikimato, ambas rutas se consideran paralelas (Guo & Frost, 2004; Díaz et al., 2014). En esta revisión se describe la vía de síntesis del ASHK y de sus intermediarios kanosamina, el aminoHBA y el ASHK como precursores para la síntesis de diferentes compuestos de relevancia farmacéutica, así como la aplicación de diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de estos intermediarios en sistemas de fermentación.

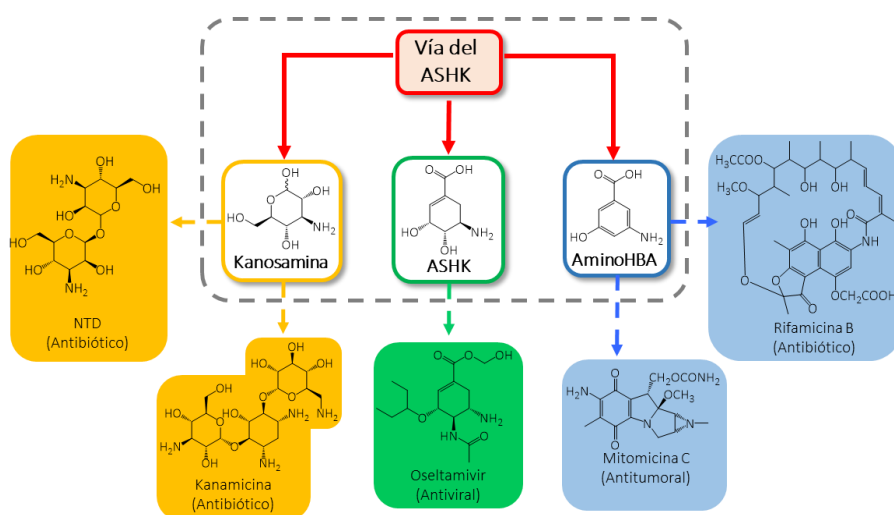


Figura 1. Algunos productos derivados de los intermediarios de la vía del aminoshikimato. ASHK (ácido aminoshikimato); aminoHBA (ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico); NTD (3,3'-neotrehalosadiamina); (Modificado de Vetter et al., 2013; Floss et al., 2011; Guo & Frost, 2002a, b).

Vía del aminoshikimato.

Reacciones de la vía del aminoshikimato en *Amycolaptosis mediterranei*.

De acuerdo con la propuesta de Guo & Frost (2002a, b), la vía del ASHK puede ser dividida en dos etapas (Figuras 2 y 3):

Etapas de síntesis de iminoE4P. La UDP-glucosa es reducida a UDP-3-ceto-D-glucosa (UDPCG) por acción de la enzima UDP-D-glucosa deshidrogenasa (*rifL*) en una reacción dependiente de NAD⁺. La UDPCG es transformada a UDP-kanosamina en una reacción catalizada por la UDP-ceto-D-glucosa aminotransferasa (*rifK*) generando UDP-kanosamina; esta molécula es transformada a kanosamina por la UDP-kanosamina fosfatasa (*rifM*); la kanosamina es fosforilada por la kanosamina cinasa (*rifN*) generando kanosamina-6-fosfato (K6P) que se isomeriza a 3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato (aminoF6P) por acción una

fosfokanosamina isomerasa; la aminoF6P junto con ribosa-5-fosfato son convertidas a 1-imino-1-desoxi-eritrosa-4-fosfato (iminoE4P) y sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) por acción de una transcetolasa (*orf15*).

Etapas de síntesis de aminoHBA. La iminoE4P es condensada junto con el PEP para formar aminoDAHP en una reacción catalizada por la enzima aminoDAHP sintasa (*rifH*), posteriormente el aminoDAHP es transformado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroquinato (aminoDHQ) por la aminoDHQ sintasa (*rifG*), el aminoDHQ es deshidratado a 5-amino-5-desoxi-3-deshidroshikimato (aminoDHS) por la enzima aminoDHQ deshidratasa (*rifJ*), finalmente, el aminoDHS es transformado a aminoHBA por la aminoHBA sintasa (*rifK*). En *A. mediterranei* el aminoHBA se incorpora a la ruta de síntesis de la rifamicina B (una ansamicina).

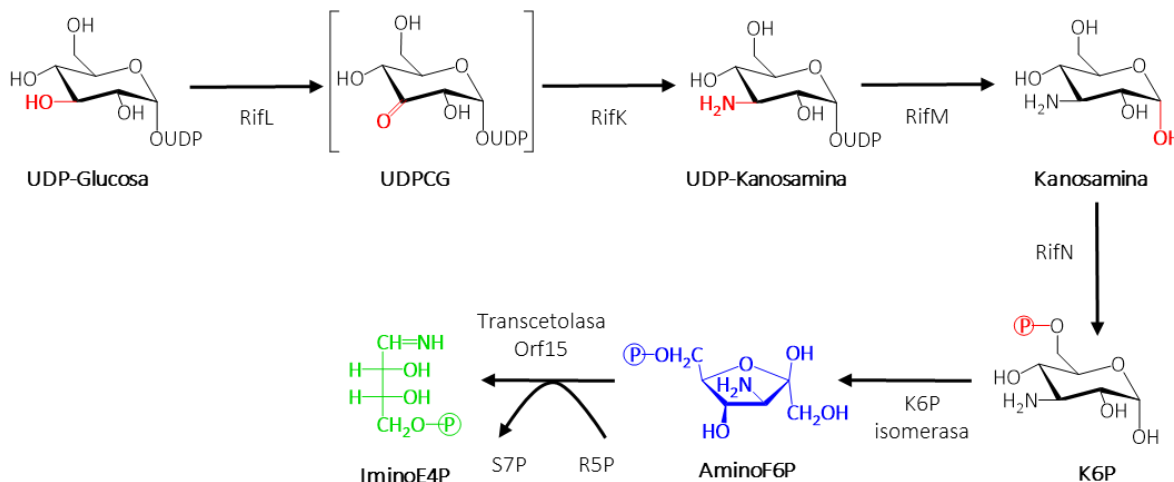


Figura 2. Etapas de síntesis de iminoE4P en *A. mediterranei*. Los grupos en rojo están involucrados en la reacción enzimática. UDPCG, UDP-3-ceto-D-glucosa; K6P, kanosamina-6-fosfato; aminoF6P, 3-amino-3-desoxi-D-fructosa-6-fosfato; iminoE4P, imino-eritrosa-4-fosfato; S7P sedoheptulosa-7-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato (Modificado de Gou & Frost, 2002a,b).

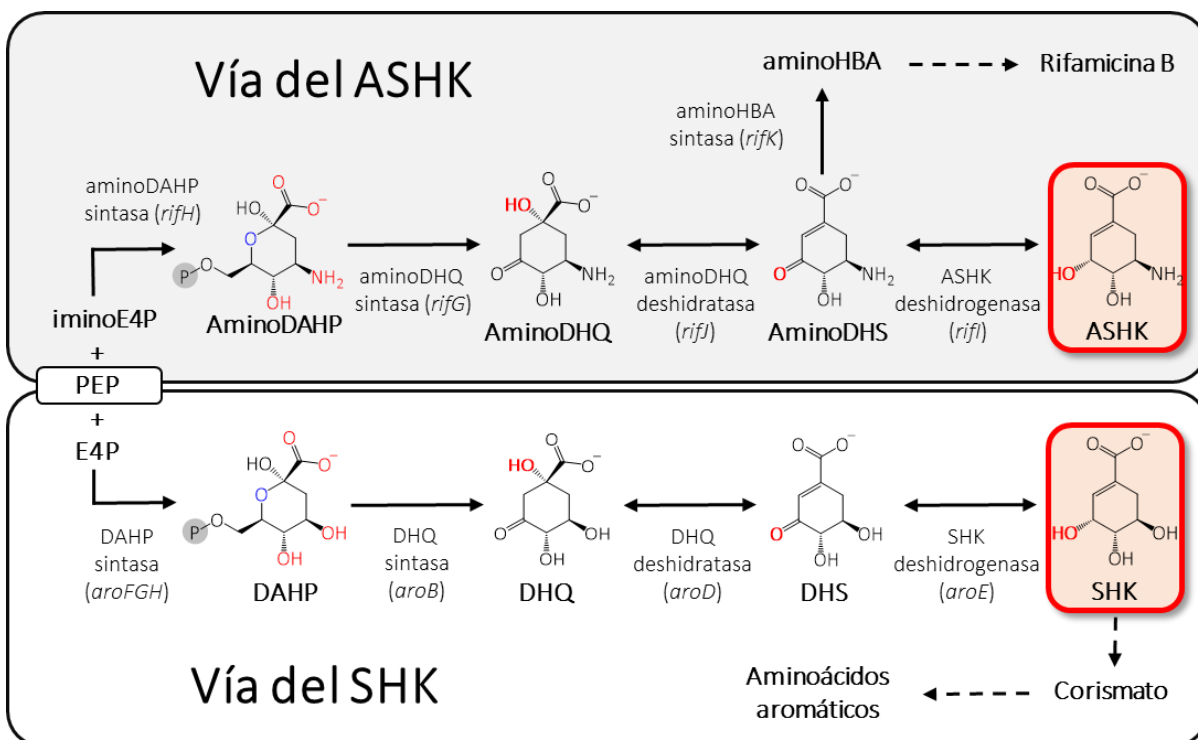


Figura 3. Segunda etapa de la vía del aminoshikimato (ASHK) en *A. mediterranei* (abajo) y vía del shikimato (SHK) en *E. coli* (arriba). Los grupos en rojo participan en la reacción respectiva. aminoDAHP, ácido 3,4,dideoxi-4-amino-D-arabino-heptulonico-7-fosfato; aminoDHQ, ácido 3-amino-3-desoxi-deshidroquinico; aminoDHS ácido-3-amino-3-desoxi-deshidroshikímico, ASHK (3-amino-3-desoxishikimato); aminoHBA, ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato; DHQ, ácido 3-deshidroquinico; DHS, ácido 3-deshidroshikímico; (*rifH*) y *aroFGH*, (amino)DAHP sintasa; (*rifG*) y *aroB*, (amino)DHQ sintasa; (*rifJ*) y *aroD*, (amino)DHQ deshidratasa; *rifK*, aminoHBA sintasa; (*rifI*) y *aroE*, (amino) shikimato deshidrogenasa (modificado de Gou & Frost, 2002a, b; Díaz et al., 2014).

Los genes codificantes para las enzimas de síntesis de rifamicina se encuentran en un clúster denominado *rif* en el genoma de *A. mediterranei*. En el clúster *rif* de *A. mediterranei* también se encuentran otros genes involucrados en la síntesis y transporte de la rifamicina B. Clústeres similares han sido encontrados en microorganismos del género *Streptomyces flaveolus*, *S. hygroscopicus*, *S. achromogenes*, *S. collinus*, *S. lavendulae* y en otros microorganismos como *A. pretiosum* y

S. arenicola. En el clúster *rif* también se encuentra el gen *rifI* que codifica para una enzima con actividad *in vivo* de aminoshikimato deshidrogenasa que puede reducir aminoDHS a ASHK (Guo y Frost, 2002a, b).

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de intermediarios de la vía del ASHK.

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) busca manipular el metabolismo de los microorganismos con el fin de generar cepas capaces de sobreproducir metabolitos de relevancia industrial por medio de la aplicación de ingeniería genética (Lee et al., 2019). En la IVM se suelen usar herramientas de otras áreas de conocimiento como la biología de sistemas, biología sintética, evolución adaptativa en laboratorio, ciencias ómicas y bioinformática; por lo que es denominada en ocasiones ingeniería metabólica de sistemas (*systems metabolic engineering*) (Choi et al., 2019).

Dado la relevancia de la kanosamina, el aminoHBA y el aminoshikimato se han explorado estrategias para aumentar su producción, incluida la IVM en hospederos heterólogos (Tabla 1). Una primera estrategia consiste en aumentar la disponibilidad de kanosamina o kanosamina-6-fosfato por lo que se deben buscar formas eficientes de canalizar glucosa hacia su vía de síntesis (Fan et al., 2016), sin afectar el flujo de glucosa a la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato pues se pondría en riesgo la capacidad de crecimiento del fondo genético. Dado que la kanosamina presenta actividad antibiótica es necesario evitar también su acumulación mediante su rápida conversión a iminoE4P; el fondo genético debería tolerar la presencia de este antibiótico (Guo y Frost, 2007).

De forma relevante, dado que las reacciones de formación de aminoDAHP y

posteriores son similares a las de la ruta del SHK, la aplicación de diversas estrategias previamente usadas para la sobreproducción de SHK y otros compuestos aromáticos podrían ser aplicadas a la síntesis de ASHK y aminoHBA (Díaz et al., 2014; Rodríguez et al., 2014). Mientras que algunos genes de la vía del ASHK podrían sustituirse por los de la vía del SHK reduciendo la cantidad de genes heterólogos necesarios, sin embargo, también se debe considerar evitar la competencia entre las rutas de SHK y ASHK (Díaz et al., 2014; Guo y Frost, 2002a, b).

Estrategias de IVM para la síntesis de kanosamina.

La kanosamina o 3-amino-3-desoxi-D-glucosa consta de un grupo amino sustituyendo al grupo hidroxilo de la glucosa en el carbono 3 y es considerada el único antibiótico aminoglucósido monomérico. Fue identificada originalmente como componente de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus* de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus pumilus* (originalmente denominado *Bacillus aminoglucosidicus*), *Bacillus cereus* y

Artículos

Tabla 1. Reportes de Ingeniería de vías metabólicas para la producción de intermediarios de la vía del aminoshikimato.

Cepa	Compuesto	Genotipo	Condiciones de cultivo	Título (g/L)	Referencia
<i>E. coli</i> SP1.1/pSN1.292	Kanosamina	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm^R trc/ ndcA ntdB ntdC</i>	Cultivo en lote alimentado en medio rico	8	Nisthala, 2018
<i>Bacillus pumillus</i> ATCC 21143	Kanosamina	Cepa silvestre	Lote alimentado adicionado con harina de soya, soytona y NaCl	20	Gou & Frost, 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i> YU105/pHGF7612	aminoHBA	YU105 <i>pact/ rifG rifH rifK rifL rifM rifN rifJ</i>	Medio R5 modificado sin sacarosa	0.45-0.50	Yu et al., 2001
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pKW255	aminoHBA	BL21 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23</i>	Medio M9 en matraz agitado	0.0031	Watanabe et al., 2013
<i>E. coli</i> BAP1 pKW255/ pKW256	P8/1-OG	BAP1 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23 pccB accA1 rifLM+rifM1 rifM2+rifM3</i>	Cultivo lote alimentado en fermentador en medio F1	trazas	Watanabe et al., 2013
<i>E. coli</i> BAP1/pKW255	aminoHBA	BAP1 T7/ <i>rifH rifK rifL rifM rifN asm47 asm23</i>	Medio LB en matraz agitado	0.055	Rude et al., 2006
<i>A. mediterranei</i> ATCC 21789/pJG8.219 ^a	ASHK	ATCC 21789 <i>amy/ rifI</i>	Cultivo en fermentador en medio adicionado con 32 g/L de harina de soya y 7.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	Gou & Frost, 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG6.181B	ASHK	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm^R tac/ rifH aroE serA tktA glK</i>	Cultivo lote alimentado en medio minimo con glucosa y kanosamina	1.1	Gou & Frost, 2004
<i>E. coli</i> SP1.1/pJG11.265	ASHK	RB791 <i>serA::aroB aroL::Tn10 aroK::Cm^R tac/ yhjY yhjL rifH aroE serA tktA</i>	Medio mínimo en fermentador con 10 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄	0.06	Gou & Frost, 2007

ASHK = aminoshikimato; aminoHBA = ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico.

de la kanamicina producida por *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa et al., 1967). Posteriormente la kanosamina fue aislada de caldos de fermentación de *Bacillus pumilus* (originalmente denominado *Bacillus aminoglucosidicus*), *Bacillus cereus* y *Streptomyces lansus* (Umezawa, 1968; Milner, 1996; Dolak, 1980).

La kanosamina presenta actividad antibiótica contra algunas bacterias y hongos entre los que se incluyen fitopatógenos como *Phytophthora medicaginis*, *Venturia inaequalis* y *Ustilago maydis* así como cepas patógenas de humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Candida albicans* (Janiak & Milewki., 2001). Las concentraciones mínimas inhibitorias de la kanosamina son altas y no puede ser usada como antibiótico comercial, sin embargo, su actividad se ve beneficiada de forma sinérgica en presencia de otros antibióticos como la swittermicina A, por lo que cepas productoras de estos compuestos podrían ser usadas en control biológico de fitopatógenos (Milner et al., 1996). Ejemplo de esto es la cepa de *B. cereus* UW85 que ha mostrado ser efectiva para el control del mal del talluelo de la alfalfa causada por *Phytophthora medicaginis*. Se ha reportado que esta cepa de *B. cereus* logra acumular 2.2 µg/ml de kanosamina en cultivos en fermentador, aunque el título final varía de acuerdo con la composición del medio de cultivo (Milner et al., 1996). Experimentos realizados en *C. albicans* demuestran que la kanosamina es fosforilada fácilmente por la

hexocinasa, la K6P actúa como inhibidor competitivo de la enzima glucosamina-6-fosfato sintasa deteniendo la síntesis de pared celular (Janiak & Milewki, 2001). La adición de N-acetil-glucosamina en una concentración de 10 mM recupera la capacidad de crecimiento en presencia de kanosamina (Iwai et al., 1977; Janiak & Milewki., 2001).

En microorganismos como *A. mediterranei* y *B. pumilus* la kanosamina es sintetizada a partir de UDP-glucosa en tres reacciones enzimáticas. La primera es una oxidación de la glucosa dependiente de NAD⁺ en el carbono 3, seguida de una transaminación dependiente de glutamina, posteriormente el UDP es hidrolizado (Figura 2). En 2013, Vetter y colaboradores reportaron en *B. subtilis* una ruta de biosíntesis de kanosamina alternativa a la reportada previamente en *A. mediterranei*, en la que la kanosamina participa como un intermediario en la ruta de biosíntesis del antibiótico 3,3'-neotrehalosdiamina (NTD), un antibiótico descrito originalmente en *B. pumilus* y *B. circulans*, el cual presenta actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y curiosamente al mismo *B. pumilus* (Tsuno, 1986). En *B. subtilis* (Figura 4) la glucosa-6-fosfato es oxidada a 3-ceto-3-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (3OG6P) por acción de la enzima 3OG6P deshidrogenasa (*ntdC*) en una reacción dependiente de NAD⁺. La 3OG6P es posteriormente transformada a K6P por acción de la 3OG6P aminotransferasa (*ntdA*);

en esta reacción el grupo amino es cedido por el L-glutamato que es transformado a oxoglutarato. La K6P es transformada a kanosamina por la kanosamina fosfatasa (*ntdB*), para continuar la ruta de producción de NTD. Para la producción mediante IVM de kanosamina, aminoHBA o ASHK, la vía en *B. subtilis* tiene la ventaja de que permite generar

kanosamina a partir de glucosa-6-fosfato en menos reacciones enzimáticas y no requiere de UDP-glucosa.

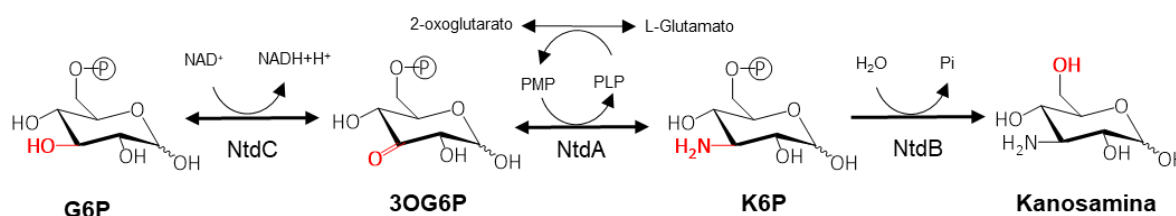


Figura 4. Síntesis de kanosamina en *B. subtilis*, los grupos en rojo están invocados en la reacción respectiva. G6P, glucosa-6-fosfato; 3OG6P, 3-oxoglucosa-6-fosfato; K6P, kanosamina-6-fosfato; PLP, coenzima piroxidal fosfato; PMP, piridoxamina fosfato; NtdC, glucosa-6-fosfato-3-deshidrogenasa; NtdA, 3-oxoglucosa-6-fosfato-glutamato aminotransferasa; NtdB, K6P fosfatasa (Tomado de van Straaten et al., 2013).

B. pumilus es el microorganismo que más acumula kanosamina por lo que es comúnmente utilizado para la producción de este metabolito. Guo & Frost (2004), han logrado la producción de hasta 20 g/L de kanosamina en cultivos en lote alimentado con la cepa *B. pumilus* ATCC 21143 en un medio de cultivo que contiene glucosa, harina de soya, soytona (hidrolizado comercial de soya) y cloruro de calcio. Estos cultivos se realizaron con la finalidad de aprovechar la kanosamina para su posterior conversión en ASHK. Por otro lado, *B. pumilus* K-169-B61 en un medio de cultivo rico optimizado se reportó la producción de hasta 700 µg/ml de NTD (Tsuno, 1986).

Más recientemente Nisthala (2018), clonó los genes *ntdC*, *ntdB* y *ntdA* en un operón regulado por el promotor *trc* en el plásmido pSN1.292 que fue utilizado para transformar a la cepa de *E. coli* SP1.1. Esta cepa ha sido previamente usada para la producción de SHK cuya principal característica es que tiene las dos isoenzimas de shikimato cinasa inactivadas (*aroK*, *aroL*) (Chandran et al., 2003). En cultivos en lote alimentado en un medio rico la cepa transformante fue capaz de acumular 8 g/L de kanosamina y 10.8 g/L de SHK, mientras que en un medio mínimo se obtuvieron 6 g/L de kanosamina y 1.3 g/L de SHK. En fermentaciones similares en medio rico usando a la misma cepa transformada con un

plásmido que solo incluye los genes *ntdB* y *ntdC* se obtuvieron 1.7 g/L de kanosamina y 7.6 g/L de SHK, lo que indica que *E. coli* es ligeramente capaz de desforilar al la K6P, La acumulación de SHK se debe a la inactivación de las dos isoenzimas de shikimato cinasa. Curiosamente en estos cultivos no se encontró ASHK debido posiblemente a que la fracción de kanosamina convertida a iminoE4P tiende a hidrolizarse rápidamente a E4P, el cual finalmente se convierte en SHK, mientras que las isoenzimas de DAHP sintasa (*aroFGH*) no serían capaces de catalizar la reacción de formación de aminoDAHP (Guo y Frost, 2002a, b).

Estrategias de IVM para la síntesis de aminoHBA

El aminoHBA es el precursor universal de las familias de metabolitos secundarios conocidos como ansamicinas, ansamitocinas y saliniciteles, entre estos compuestos se incluye al antibiótico rifamicina B, producidos de manera natural por las actinobacterias y que es utilizada para el tratamiento de la tuberculosis y compuestos antitumorales como la geldanamicina y la ansamitocina (Floss et al., 2011). La estructura del aminoHBA presente en estos antibióticos consta de un anillo aromático con un carbono adicional y un nitrógeno en arreglo meta. Esta estructura es conocida como mC₇N y funciona como la unidad de inicio de síntesis de estos policétidos (Floss et al., 2011). Se han descrito varios clústeres

biosintéticos relacionados con la síntesis de antibióticos derivados del aminoHBA que están presentes en actinobacterias tales como *Streptomyces coelicolor*, *S. collinus*, *S. hygroscopicus* y *A. pretiosum* (Floss et al., 2011). El primer cluster descrito es el del antibiótico rifamicina B de *A. mediterranei*, el cual consta de 5 genes que codifican para policétido sintasas y una amida sintasa (*rifA-F*), los genes para la síntesis de aminoHBA (*rifG-J, K-N*), además de genes involucrados en la regulación, procesamiento y exporte de dicho antibiótico. Existen clústeres adicionales para la producción de metabolitos derivados del aminoHBA tales como el de producción de ansatrianina de *S. collinus*, que posee dos clústeres, uno con genes de ansatrianina y los genes del clúster *rif* y el segundo clúster asociado con genes putativos de la biosíntesis de naftomicina y genes homólogos del clúster *rif*. De igual manera, *S. hygroscopicus* posee los clústeres AHBA-N y AHBA-B, el primero de ellos asociado con genes putativos de la biosíntesis de naftomicina y el segundo con genes de geldanamicina, en este último están presentes dos copias homólogas de *rifG*, pero carece de *rifH*. Por su parte, el clúster de ansamitocina de *A. pretiosum* posee dos copias de los genes *rifK*, una de ellas asociada al clúster principal de ansamitocina donde se encuentran homólogos de *rifJ* y *rifN*, y el segundo dentro de un grupo de genes que contienen homólogos de *rifL*, *rifM* y *rifG*. Mientras que *Actinosynnema mirum* posee otro arreglo en donde dos genes homólogos a

rifK se encuentran separados 112 Kb uno de otro y asociados con genes de las poliketido sintasas de ansamitocina. De manera general, estos hallazgos permiten identificar que los genes *rifK*, *rifL*, *rifM* y *rifN*, involucrados en los primeros pasos de la síntesis de aminoDAHP son imprescindibles, mientras que los involucrados en los pasos posteriores de la vía del ASHK pueden estar ausentes y ser sustituidos por los genes de la vía paralela del SHK (Floss, 2011). Como se ha señalado, la síntesis de metabolitos derivados del aminoHBA es compleja pues involucra múltiples genes, además de que, dependiendo del microorganismo, se encuentran organizados en diferentes arreglos. Para el caso de la biosíntesis de ansamicinas, una vez que el aminoHBA es sintetizado, éste tiene que pasar por una serie de modificaciones que involucran su activación, elongación y ensamblado por una poliketido sintasa (RifA), enzima de 530 kDa que requiere de metilmalonil-CoA y malonil-CoA para la elongación. Para el caso de la geldamicina y las ansamitocinas, también se requiere de metoximalonil-ACP (proteína acarreadora de acilos) (Rude y Khosla, 2006).

A la fecha se han obtenido cepas de actinobacterias sobreproductoras de metabolitos secundarios a partir de distintos enfoques entre los que incluyen mutagénesis tradicional e ingeniería genética (Baltz, 2011). Sin embargo, también resulta atractivo buscar su sobreproducción usando fondos genéticos heterólogos cuyo metabolismo sea más

conocido, que puedan ser fácilmente manipulados genéticamente y que puedan crecer en medios cultivo simples (Weber et al., 2014). Como el aminoHBA funciona como unidad de inicio, su sobreproducción es un primer paso hacia la producción mediante IVM de compuestos derivados (Rude & Khosla, 2006). Con este fin se han generado cepas de *E. coli* con varias modificaciones genéticas, tales como el ensamblado de operones multigénicos con 5 genes de *A. mediterranei* (*rifH*, *-K*, *-L*, *-M* y *-N*), 2 genes homólogos de *A. pretiosum* (*asm47* y *asm23*) que suplen la función de las proteínas RifG y RifJ respectivamente y 2 genes de *S. coelicolor* (*pccB* y *accA1*) involucrados en la síntesis de metilmalonil-CoA (Watanabe et al., 2003). En dicho trabajo se logró producir 3.1 mg/L de aminoHBA a partir de glucosa en medio mínimo utilizando un fermentador de 10 L. Una vez obtenida esta unidad primaria, el siguiente paso fue sintetizar el intermediario de la rifamicina, el compuesto P8/1-OG. Este compuesto es el producto de la poliketido sintasa RifA, la cual está conformada por 4 módulos cada uno con dominios y actividades enzimáticas involucradas en la activación y elongación del aminoHBA. Debido a que no fue posible sobreexpresar el polipéptido completo, los 4 módulos de RifA se dividieron en 2 construcciones genéticas por separado. Las dos proteínas trunca se lograron expresar en *E. coli*, obteniéndose trazas de P8/1-OG y 2.5 mg/L del compuesto *N*-acetil P8/1-OG en un cultivo en lote alimentado

(Watanabe et al., 2003). Otra aproximación para la síntesis de las ansamicinas en *E. coli* consiste en sobreexpresar los genes responsables de la producción de las unidades de elongación del aminoHBA, como es el caso de los genes *fkfG*, *-H*, *-I*, *-J* y *-K* de *S. hygroscopicus* involucrados en la síntesis del metoximalonil-ACP utilizado por la poliketido sintasa de la vía de síntesis de las geldamicinas (Rude y Khosla, 2006).

Otra aproximación para la producción de aminoHBA fue la sobreexpresión del clúster *rifG-N* en *S. coelicolor* que resultó ser suficiente, al menos en este hospedero, para producir de 350 a 400 mg/L de aminoHBA (Yu et al., 2001). Por su parte, la delección de *rifG* (aminoDHQ sintasa) y *rifJ* (aminoDHQ deshidratasa) en *S. coelicolor* reduce la producción de aminoHBA en un 90%, mientras que la ausencia de *rifH* (aminoDAHPSintasa) elimina la síntesis de dicho precursor. Por su parte, la inactivación de estos mismos genes en la cepa silvestre de *A. mediterranei* disminuye del 1 al 10% la producción de rifamicina (Yu et al., 2001). Estos resultados sugieren que las enzimas correspondientes a la vía de síntesis del SHK como la DHQ sintasa (*aroB*) y la DHQ deshidratasa (*aroD*) pueden suplir la función de aquellas de la ruta del aminoHBA y utilizar los compuestos aminados análogos (Yu et al., 2001).

Con el objetivo de determinar el papel de los genes involucrados en la primera parte de la vía, la síntesis de iminoE4P, se han

realizado trabajos preliminares en los que se expresan los genes *rifL* y *rifK*, el producto del primero esta involucrado en la reducción de UDP-glucosa a UDP-3-ceto-D-glucosa, mientras que en el segundo caso además de su papel como aminoHBA sintasa, tiene una segunda función como aminotransferasa, responsable de transformar la UDP-3-ceto-D-glucosa en UDP-kanosamina. La expresión individual de *rifL* en *E. coli* generó cuerpos de inclusión, mientras que al ser co-expresada con *rifK*, se logró observar en geles SDS las bandas correspondientes a cada una de las proteínas. Estos resultados sugieren un posible complejo entre ambas proteínas que provee de estabilidad estructural o funcional a cada una de ellas (Floss et al., 2011). Existe un panorama amplio de posibilidades para seguir caracterizando las diferentes vías de síntesis de policétidos naturales derivados del aminoHBA.

Estrategias de IVM para la síntesis de aminoshikimato

El ASHK (ácido 5-amino-5-deoxishikímico) recibe su nombre por ser un análogo del SHK con la diferencia de que en el carbono 5 se sustituye al grupo hidroxilo por un grupo amino, el ASHK fue inicialmente propuesto como un posible precursor en la ruta de biosíntesis de aminoHBA. El ASHK no ha sido encontrado en cepas silvestres y su papel en el metabolismo no está claro, pues no participa en la ruta de biosíntesis del aminoHBA (Peek & Christendat, 2015). Se ha

demostrado que el ASHK puede ser sintetizado por vía enzimática *in vivo* e *in vitro* a partir de aminoDHS (Guo & Frost, 2002a), y puede ser obtenido mediante síntesis química a partir de shikimato (Kim et al., 1992). Como la vía del SHK está presente solo en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos del género *apicomplexa* y su función de síntesis de aminoácidos aromáticos es esencial (figura 2), las enzimas de esta ruta son un excelente blanco para el desarrollo de antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios, herbicidas y herramientas de control biológico de plaga. Estos compuestos deberían ser inocuos para aves, mamíferos, reptiles y anfibios dada la ausencia de la ruta en estos organismos (Díaz-Quiroz et al., 2018; Amer et al., 2008). Como los intermediarios de la vía del ASHK son similares a los de la vía del shikimato, los primeros podrían ser un excelente andamio para la generación de bibliotecas químicas para el desarrollo de inhibidores de esta vía (Pansegrau et al., 1991).

Bajo este enfoque Pansegrau y colaboradores (1991), obtuvieron ASHK a partir de SHK por síntesis química y posteriormente ASHK-3-fosfato por vía enzimática, este compuesto demostró ser un inhibidor competitivo ante la enzima ESPS sintasa, que cataliza la formación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS) a partir de la reacción de PEP en el carbono 5 del shikimato-3-fosfato (S3P); la sustitución del grupo hidroxilo en el carbono 5 por el grupo amino evita que la formación de ESPS

se lleve a cabo. Un estudio más reciente demuestra que uno o dos sustituyentes voluminosos pueden ser agregados al grupo amino del ASHK, lo que les da capacidad de inhibir a la enzima shikimato deshidrogenasa de los patógenos humanos *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori* (Prado et al., 2016). Estos experimentos demuestran que compuestos derivados del ASHK tienen potencial para el desarrollo de inhibidores de enzimas de la vía del SHK.

Por otro lado, el ASHK ha ganado interés por ser un atractivo precursor del oseltamivir fosfato (OSP) o Tamiflu® que presenta actividad contra distintos subtipos de virus de influenza, incluidos H1N1 y la influenza aviar (A5N1) (Díaz et al., 2014). El OSP actúa deteniendo el ciclo lítico del virus mediante la inhibición de la neuraminidasa, una enzima presente en la cápside de los viriones sintetizados en el interior de la célula infectada, que escinde la unión entre la hemaglutinina de la cápside de los viriones y el ácido siálico de los receptores de membrana en la célula infectada, lo que permite a los viriones continuar su ciclo lítico (Ward et al., 2005). Actualmente el OSP es sintetizado químicamente a partir de SHK que originalmente era obtenido únicamente, con bajo rendimiento, por extracción del anís estrella, un fruto del árbol *Illicium verum* (Díaz et al., 2014). En las últimas décadas la constante aparición de pandemias de influenza generó alta demanda de OSP y por lo tanto de SHK cuya cantidad ofertada llegó

a ser insuficiente, dejando a gran parte de la población mundial desprotegida ante esta amenaza, principalmente en países en desarrollo, por lo que fue necesario explorar nuevas alternativas de producción de SHK (Martínez et al., 2015).

Actualmente, mediante la aplicación de IVM se han desarrollado varias de cepas de *E. coli* productoras de SHK con las que se han obtenido títulos de hasta 84 g/L y rendimientos de hasta 43 % mol/mol usando medios ricos con glucosa como sustrato. Sin embargo, el título más alto reportado de SHK es de 151 g/L con rendimientos de hasta 56 % en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* aplicando diversas estrategias de IVM y un sistema de cultivos de células en reposo (Kogure et al., 2016; Bibal et al., 2018). En general las estrategias se han enfocado en aumentar la disponibilidad de E4P y PEP, así como de evitar pasos limitantes en la ruta y evitar la conversión de SHK a otros subproductos (Martínez et al., 2015; Rodríguez et al., 2014). En algunos de los procesos actuales de síntesis de OSP se requieren cuatro etapas para incorporar el grupo amino en la posición 5 del SHK, por lo que sustituir al SHK por ASHK eliminaría operaciones de reacción y separación en los procesos industriales, lo que se podría traducir en menor costo de producción, a la vez que aumentaría la productividad y el rendimiento global del proceso (Díaz et al., 2014; Guo y Frost, 2007, 2004; Karpf, 2005).

En el clúster *rif* de *A. mediterranei* se encuentra el gen *rifI* que fue propuesto como una quinato o SHK deshidrogenasa putativa (Peek & Christendat, 2015). Guo & Frost (2004), lograron la primera síntesis microbiana de ASHK a partir de glucosa mediante la sobreexpresión de *rifI* en el plásmido pJG8.219A en la cepa *A. mediterranei* ATCC 21789 en cultivos en lote alimentado, obteniendo 0.2 g/L de ASA, con un rendimiento molar de 0.4% y 1.4 g/L de rifamicina B; dado que no se encontró aminoquinato en el medio de cultivo, se da por hecho que esta enzima tiene actividad *in vivo* de aminoshikimato deshidrogenasa. Sin embargo, el papel de *rifI* y del ASHK en la síntesis del aminoHBA permanece incierto, se piensa que su papel sea posiblemente regular el flujo de carbono hacia la ruta de biosíntesis de ansamicinas (Peek & Christendat, 2015).

Alternativamente Guo & Frost (2004), han propuesto un cultivo en dos etapas para la producción de ASHK, en la primera etapa se utiliza a *B. pumilus* como productor de kanosamina que es posteriormente transformado a ASHK por cepas recombinantes derivadas de *E. coli* SP1.1. Una de estas cepas sobreexpresa los genes que codifican para shikimato cinasa (*aroE*), trancetolasa (*tktA*) y aminoDAHP sintasa (*rifH*) y el gen de glucosa cinasa (*glk*) en el plásmido pJG6.181B (usado para fosforilar a la kanosamina). Con esta estrategia se obtuvo un título de 1.1 g/L de ASHK, con un rendimiento global de 5 % y contaminación

con SHK de 3.4 g/L. Esta estrategia valida el concepto de que no todas las enzimas heterólogas de la vía de ASHK son necesarias para la síntesis de este compuesto, pudiendo ser sustituidas por las de la vía del SHK del hospedero (*E. coli*), y que específicamente catalizan las siguientes reacciones: conversión de K6P a iminoE4P por acción de la transcetolasa (*tktA*), conversión de aminoDAHP a aminoDHQ por la enzima DHQ sintasa (*aroB*), conversión de la aminoDHQ a aminoDHS por la enzima DHQ deshidratasa (*aroD*) y conversión de aminoDHS a ASHK por la shikimato deshidrogenasa (*aroE*). La aplicación industrial de este proceso de síntesis de ASHK se ve limitada pues se requieren dos fermentaciones y varias etapas de purificación de la kanosamina.

Una tercera propuesta de Guo & Frost (2007), utiliza la cepa recombinante *E. coli* SP1.1/ pJG11.233 que es capaz de producir ASHK en un cultivo en una sola etapa, esta cepa derivada de SP1.1 sobreexpresa el plásmido pJG11.233 con los genes *yhjL* y *yhjJ*, (*ndtC* y *ntdA*) para síntesis de K6P (Inakota et al., 2003), además de *rifH*, *aroE*, *serA*, *tktA*. La K6P que se transforma en aminoF6F por la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*) nativa de *E. coli* y posteriormente es transformada a iminoE4P por la transcetolasa (*tktA*) nativa de *E. coli*; la aminoDAHP (*rifH*) de *A. mediterranei* condensa la iminoE4P con PEP para generar aminoDAHP que es transformado a ASHK aprovechando los genes nativos de *E. coli* de

la ruta del SHK. Con esta estrategia se logró una producción de ASHK de 0.06 g/L, trazas de kanosamina y 3.10 g/L de SHK.

Si bien estas estrategias son prueba de concepto de que el ASHK puede ser producido mediante la aplicación de IVM en *A. mediterranei* y *E. coli*, los bajos títulos y rendimientos y la contaminación con SHK son una limitante para su implementación a escala industrial, lo que representa una oportunidad para el desarrollo de mejores cepas productoras.

Conclusiones

La kanosamina, el aminoHBA y el aminoSHK son compuestos derivados de la vía del ASHK con potencial industrial. Se han aplicado diferentes estrategias de IVM para el desarrollo de cepas sobreproductoras de estos compuestos, sin embargo, solo se han alcanzado rendimientos y títulos bajos. En el caso de la kanosamina y el aminoHBA, las estrategias se han limitado principalmente a sobreexpresar los clústeres de producción. Los experimentos de producción de ASHK ponen en evidencia que es fundamental aumentar la disponibilidad de PEP e iminoE4P, y por tanto la capacidad de producción de kanosamina o K6P. La limitación de PEP podría ser minimizada aplicando estrategias previamente reportadas para producción de SHK y otros compuestos aromáticos. Por otro lado, la mayor parte del carbono es canalizado a la vía del SHK por lo que se deben buscar estrategias que permitan

reducir la competencia de sustrato (SHK y ASHK) entre ambas vías.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de este trabajo al proyecto PAPIIT-UNAM IN209618 y el apoyo de CONACYT por la beca para los estudios de maestría de Rubén Mendoza Flores. Se agradece a los Dres. Juan Carlos Sigala Alanís y José Utrilla Carreri y a la M. en C. Georgina Teresa Hernández Chávez por su apoyo técnico.

Referencias

- Amer FA, El-behedy EM & Mohtady HA (2008) New targets for antibacterial agents. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3: 46–57.
- Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W & Frost JW (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Prog.* 19(3): 808-14
- Baltz RH (2011) Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 657–666.
- Bilal M, Wang S, Iqbal HMN, Zhao Y, Hu H, Wang W & Zhang X (2018) Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 7759–7773.
- Kogure T, Kubota T, Suda M, Hiraga K & Inui M (2016) Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metab. Eng.* 38: 204-216.
- Choi KR, Jang WD, Yang D et al. (2019) Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* 1744: 1–21.
- Díaz-Quiroz DC, Cardona-Félix CS, José Viveros-Ceballos JL, Reyes-González MA, Bolívar F, Ordoñez M & Escalante A (2018) Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018. 33: 397-404.
- Diaz Quiroz DC, Carmona SB, Bolivar F & Escalante (2014). Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Res. Rep. Med. Chem.* 35.
- Dolak LA, Castle TM, Dietz A & Laborde AL (1980) 3-amino-3-deoxyglucose produced by a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 33: 900-901.
- Fan Y, Zhao M, Wei L, Hu F, Imanaka T, Bai L & Hua Q (2016) Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in *Actinosynnem pretiosum*. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol.* 100: 2651-2662.
- Floss-Heinz G, Yu TW & Arakawa K (2011) The biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), the precursor of mC7N units in ansamycin and mitomycin antibiotics: A review. *J. Antibiot.* 64: 35-44.
- Guo J & Frost JW (2002a) Biosynthesis of 1-deoxy-1-imino-D-erythrose 4-phosphate: A defining metabolite in the aminoshikimate pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 528-529.
- Guo J & Frost JW (2002b) Kanosamine biosynthesis: A likely source of the aminoshikimate pathway's nitrogen atom. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 10642-10643.
- Guo J & Frost JW (2004) Synthesis of aminoshikimic acid. *Org Lett.* 6: 1585-1588.
- Guo J & Frost JW (2007) Synthesis of oseltamivir carboxylates. US Patent, 0190621 A1.
- Inaoka T, Takahashi K, Yada H, Yoshida M & Ochi K (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 279: 3885-3892.
- Iwai Y, Tanaka H, Oiwa R, Shimizu S & Omura S (1977) Studies on bacterial cell wall inhibitors. III. 3-amino-3-deoxy-D-glucose, an inhibitor of bacterial cell wall synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 498: 223-228.
- Janiak AM & Milewski S (2001) Mechanism of antifungal action of kanosamine. *Med. Mycol.* 39: 401-408.
- Kang Q, Shenb Y & Bai Q (2002) Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29: 243-263.
- Karpf M & Trussardi R. 2005. Process for the preparation of 4,5-diamino shikimic acid derivatives. US Patent 7.514,580 B2.
- Kim CG, Kirschning, Bergon P, Ahn Y, Wang JJ, Shibuya CG & Floss HG (1992) Formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC7N units in ansamycin antibiotics, by a new variant of the shikimate pathway? *J. Am. Chem. Soc.* 114: 4941-4943.
- Lee SY, Kim HU, Chae TU, Cho JS, Kim JW, Shin JH, Kim DI, Ko YS, Jang WD & Jang YS (2019) A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nat. Catal.* 2: 18-33
- Martinez,JA, Bolivar F & Escalante A (2015) Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 145.
- Milner JL, Silo-Suh J, Lee JC & Handelsman J (1996) Production of kanosamine by

[Escriba aquí]

- Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061–3065.
- Nisthala S (2018) Microbial synthesis of antibiotic precursor kanosamine and value-added chemical shikimic acid. Microbial synthesis of antibiotic precursor kanosamine. Degree of Chemistry - Master of Science. Michigan State University.
- Pansegrau PD, Anderson KS, Widlanskilhs T, Ream JE, Sammons RD, Sikorski JA & Knowles JR (1991) Synthesis and evaluation of two new inhibitors of EPSP synthase. *Tetrahedron Lett.* 32: 2589-2592.
- Peek J & Christendat D (2015) The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* *Arch. Biochem. Biophys.* 566: 85–99.
- Prado V, Lence E, Thompson P, Hawkins AR & Gonzales-Bello (2016) Freezing the dynamic gap for selectivity: Motion-based design of inhibitors of the shikimate kinase enzyme. *Chem. Eur. J.* 22: 17988-18000.
- Rodriguez A, Martínez JA, Flores N, Escalante A, Gosset G & Bolivar F (2014) Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb. Cell. Fact.* 13. 126.
- Rude MA & Khosla C (2006) Production of ansamycin polyketide precursors in *Escherichia coli*. *J. Antibiot.* 59: 464-470.
- Tsuno T, Ikeda C, Numata K, Tomita K, Konishi M & Kawaguchi H (1986) 3, 3'-Neotrehalosdiamine (BMY-28251), a new aminosugar antibiotic. *J. Antibiot.* 39: 1001-1003.
- Umezawa S, Shibahara S, Omoto S, Takeuchi T & Umezawa H (1968) Studies on biosynthesis of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J. Antibiot.* 21: 485-491.
- Umezawa S, Umino K, Shibahara S, Hamada M & Omoto S. (1967) Fermentation of 3-amino-3-deoxy-D-glucose. *J. Antibiot.* 20(6): 355-360.
- van Straaten KE, Ko JB, Jagdhane R, Anjum S, Palmer DR & Sanders DA (2013) The structure of NtdA, a sugar aminotransferase involved in the kanosamine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*, reveals a new subclass of aminotransferases. *J. Biol. Chem.* 288: 34121-30.
- Vetter ND, Langill DM, Anjum S, Boisvert-Martel J, Jagdhane RC, Omene E, Zheng H, van Straaten KE, Asiamah I, Krol ES, Sanders DA, Palmer DR (2013) A previously unrecognized kanosamine biosynthesis pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 5970–5973
- Ward, P, Small I, Smith J, Suter P & Dutkowski R (2005) Oseltamivir (Tamiflu®) and its potential for use in the event of an

Artículos

- influenza pandemic. *J. Antimicrob. Chemother.* 55. Suppl. S1: i5–i21.
- Watanabe K, Rude MA, Walsh CT & Khosla C (2003) Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *PNAS.* 100: 9774-9778.
- Weber T, Charusanti P, Musiol-Kroll EM, Jiang X, Tong Y, Kim HU & Lee SY (2014) Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol.* 33(1): 15-26
- Yu TW, Muller R, Muller M, Zhang X, Draeger G, Kim CG, Leistner E & Floss HG (2001) Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J. Biol. Chem.* 276: 12546-12555.

PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL MENCIÓN HONORIFICA MAESTRIA

INGENIERÍA CELULAR COMO UNA ALTERNATIVA AL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Daniela Velazquez^{1*}, Guillermo Gosset², Alvaro R. Lara³,

¹Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Santa Fe Cuajimalpa, 05348 Ciudad de México, CDMX

²Instituto de Biotecnología. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos

³Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología. Av. Vasco de Quiroga 4871, Santa Fe Cuajimalpa, 05348 Ciudad de México, CDMX

daniela369.velaz@hotmail.com

RESUMEN

Los avances en la ingeniería metabólica y celular han resultado en un amplio desarrollo de fábricas celulares con la capacidad de producir diversas moléculas de interés comercial. *Escherichia coli* es una de las fábricas celulares más importantes de la industria. La producción industrial de metabolitos de interés se realiza en cultivos de alta densidad celular, pues éstos maximizan los rendimientos de biomasa y producto. Una limitación de estos cultivos es la alta concentración de sustrato requerida principalmente en los cultivos por lote, la cual lleva a una alta tasa de consumo, generando un sobreflujo metabólico, el cual se refiere a la conversión de carbono en metabolitos indeseables debido a una saturación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Para evitar este fenómeno se han seguido diversas estrategias que van desde la alimentación controlada (cultivo en lote alimentado) hasta la ingeniería metabólica y celular. Los cultivos por lote alimentado son utilizados ampliamente, sin embargo, estos presentan ciertas desventajas. El presente trabajo se enfocará en el uso de

ingeniería celular para alcanzar altas densidades celulares en cultivos por lote evitando el sobreflujo metabólico, como una alternativa a los cultivos por lote alimentado, con énfasis la modificación de genes relacionados con el transporte de glucosa en *E. coli*.

Palabras clave: cultivos de alta densidad celular, sobreflujo metabólico, *E. coli*, PTS

ABSTRACT

Advances in metabolic and cellular engineering have resulted in extensive development of cellular factories with the ability to produce metabolites of commercial interest. *E. coli* is one of the most important bacterial cell factories in the industry. The industrial production of metabolites of interest is carried out in high cell density cultures, as these maximize the yields of biomass and product. A limitation of these cultures is the high concentration of substrate required, which carries a high consumption rate, generating a metabolic overflow (conversion of carbon into undesirable metabolites due to saturation in the tricarboxylic acid cycle). To avoid this phenomenon, various strategies have been followed, ranging from controlled feeding (fed batch culture) to genetic, metabolic and cellular engineering. Fed batch cultures are widely used; however, these have certain disadvantages. The present work will focus on the use of cellular engineering to achieve high cell densities in batch mode cultures avoiding metabolic overflow, as an alternative to fed batch cultures, with emphasis on the modification of genes related with the glucose transport in *E. coli*.

Key words: high density cell culture, overflow metabolism, *E. coli*, PTS

INTRODUCCIÓN

Fábricas celulares

Los avances en la ingeniería metabólica y celular han permitido el desarrollo de fábricas celulares capaces de transformar materias primas en biocombustibles, químicos, ingredientes alimenticios y productos farmacéuticos. Algunos de los organismos más utilizados como fábricas celulares incluyen a *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* (Keasling, 2010), así como las líneas celulares 3T3, HeLa, BHK, HepG2, HEK y CHO (Jayapal et al., 2007), siendo las

dos últimas las más utilizadas (Rue et al., 2019). Otros organismos utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen a hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*; células de insectos como *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*; así como animales y plantas transgénicas (Demain y Vaishnav, 2009).

A pesar que *E. coli* típicamente no es utilizada para la producción de proteínas complejas o proteínas que requieran modificaciones postraduccionales, sigue siendo la fábrica celular más empleada a nivel académico e

Artículos

industrial, debido a que existe un gran conocimiento acumulado sobre su genoma, metabolismo y fisiología, aunado a su rápido crecimiento en medios simples y con altos niveles de producción de proteína recombinante (Demain y Vaishnav, 2009). En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de biomoléculas de interés industrial producidas

en *E. coli*. La insulina humana producida en *E. coli* por Genentech fue la primera proteína recombinante aprobada para su uso en humanos (Lara, 2011), aunque actualmente las células CHO constituyen el sistema preferencial para la producción de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales (Demain y Vaishnav, 2009).

Tabla 1. Algunos ejemplos de moléculas de interés industrial producidas en *E. coli*

Cepa de <i>E. coli</i>	Producto	Referencia/ compañía
<i>Interés alimenticio, cosmetológico y químico</i>		
BT03	Trealosa sintasa	Chen et al., 2012
XH001	L-treonina	Yang et al., 2011
BL21(DE3)	Ácido glutacónico	Djordjevic et al., 2010
NZN111; SBS110MG	Ácido succínico	Vemuri et al., 2002; Sánchez et al., 2005
FBR11 (B)	Ácido láctico	Dien et al., 2001
ALS848	ácido 3-hidroxipropanoico	Suthers y Cameron, 2005; Selifonova et al., 2002
<i>Biocombustibles, biopolímeros y productos de bajo valor agregado</i>		
JLX7	Ácido poliláctico (PLA) y P(3HB-co-LA)	Jung et al., 2010; Jung et al., 2011
BW25113	Butanol	Atsumi et al., 2008
DH10B	Isopentanol	Withers et al., 2007
KO11	Etanol	Underwood et al., 2002
<i>Biofármacos aprobados</i>		
	Admelog (inyección de insulina)	Sanofi (Bridgewater, NJ, USA), 2017
	Accretropin (somatropina)	Emergent Biosolutions (Rockville, MD, USA) Cangene (Winnipeg, MB, Canada), 2008
	Natpar (hormona paratiroidea)	Shire Pharmaceuticals Ireland (Dublin), 2017
	Infergen (interferon alfacon-1)	Kadmon Pharmaceuticals (Warrendale, PA, USA), 1997
	Trumenba (vacuna meningocócica del grupo B)	Pfizer (Philadelphia), 2014

Dentro de la gran variedad de productos biotecnológicos, los biofármacos tienen una gran relevancia debido a su importancia en el

sector de salud humana, además de su impacto económico. En los últimos años se ha observado un incremento continuo en el valor

de mercado de los biofármacos. Reportes financieros de La Merie indican que las ventas acumuladas durante el 2014 y el 2017 alcanzaron los 651 billones de dólares (<http://www.lamerie.com>).

Durante el periodo de enero de 2014 y julio de 2018, se aprobaron 155 biofármacos en Estados Unidos y la Unión Europea. De estos, el 52% fueron nuevos ante el mercado, mientras que el resto se trata de biosimilares,

productos reformulados o con indicaciones diferentes y productos previamente aprobados en otros lugares. Dentro de los productos nuevos se cuenta con 71 ingredientes activos diferentes, de los cuales 62 son proteínas recombinantes. 52 de estas proteínas recombinantes son expresadas en líneas celulares de mamíferos, 1 se expresa en un sistema transgénico de mamífero, 5 se producen en *E. coli* y 4 en *S. cerevisiae* (Fig. 1) (Walsh, 2018).

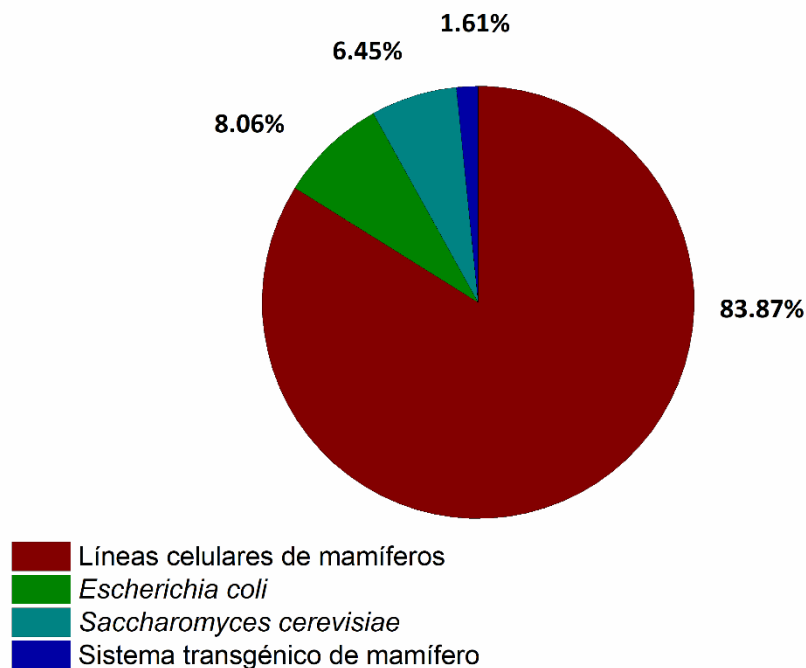


Figura 1. Número de proteínas recombinantes aprobadas en diferentes organismos (con datos de Walsh, 2018).

Cultivos de alta densidad celular

Los cultivos de alta densidad celular se utilizan a nivel industrial ya se consideran de las mejores estrategias de cultivo para reducir costos al maximizar los rendimientos de

biomasa y las productividades de metabolitos o de proteína recombinante (Blunt et al., 2019), además de ser económicamente viables para su introducción en el mercado (Lara y Ramírez, 2012) y reducir el volumen de cultivo, facilitar la purificación y reducir el

consumo de agua (Lee, 1996). Se consideran cultivos de alta densidad celular cuando se alcanzan concentraciones de biomasa de 40 g L⁻¹ o más (Borja et al., 2014). Sin embargo, este tipo de cultivos tiene desventajas tales como la inhibición por sustrato, transferencia de oxígeno limitada, formación de productos inhibitorios del crecimiento y disipación de calor limitada (Lee, 1996).

Para lograr una alta densidad celular se requieren grandes concentraciones de sustrato (generalmente glucosa). Sin embargo, para *E. coli* no suele utilizarse una

concentración que exceda los 20 g L⁻¹ pues al utilizar más que esto, el consumo de sustrato se da a una alta velocidad, generando un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarbónicos, lo cual lleva a la producción de acetato; a este fenómeno se le conoce como sobreflujo metabólico (Eiteman y Altman, 2006). Se estima que la acumulación de acetato puede llegar a ser hasta el 15% (en masa) de la glucosa suministrada (Wolfe, 2005). En la figura 2 se muestran las rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato de *E. coli*.

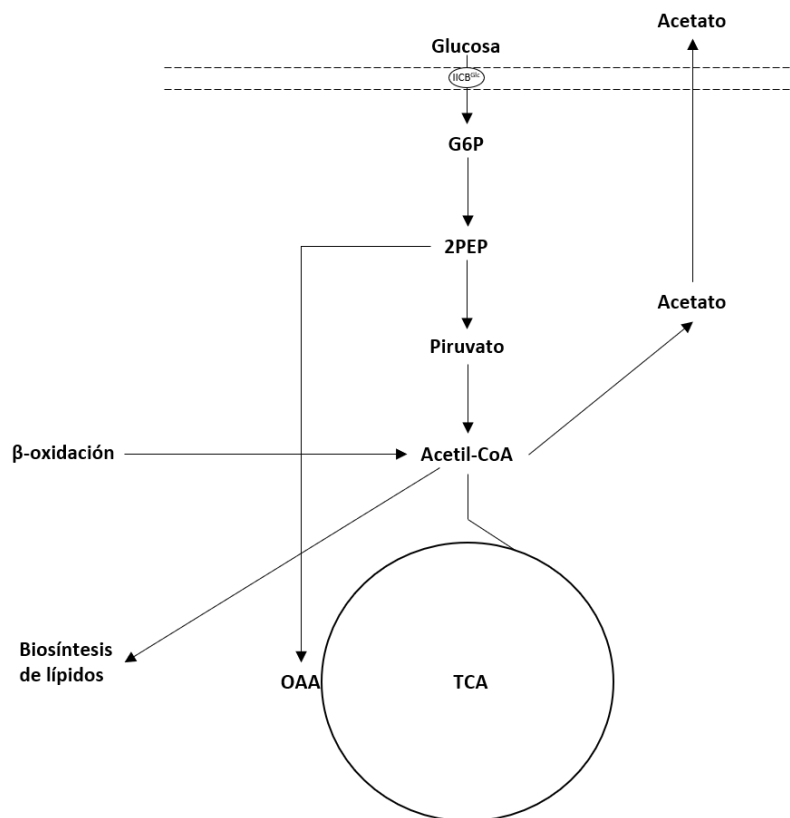


Figura 2. Rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato en *E. coli* y su relevancia con el resto del metabolismo. En la glicólisis, por cada mol de glucosa se generan dos de fosfoenolpiruvato (PEP). Uno de estos es utilizado por el PTS para la fosforilación y el transporte de

la glucosa mediante la permeasa IICB^{Glc}. A partir del catabolismo de ácidos grasos se produce acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para la producción de acetato.

Bajo condiciones aerobias y sin limitación de oxígeno, *E. coli* presenta una alta tasa de consumo específico de sustrato (q_s) así como una alta tasa de crecimiento específico (μ) y, sin importar la disponibilidad de oxígeno, la bacteria tiene una tasa de consumo de oxígeno límite (Varma y Palsson, 1994), la

cual corresponde a la tasa de crecimiento específico y tasa de consumo específico de sustrato críticas en donde comienza la acumulación de acetato (μ_{crit} y q_{scrit} , respectivamente) debido al sobreflujo metabólico (Fig. 3).

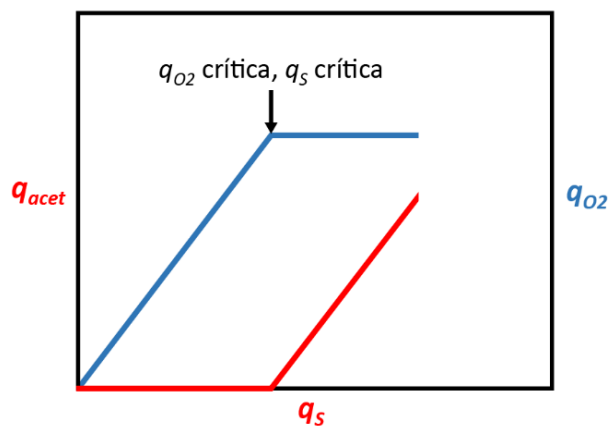


Figura 3. La tasa de producción específica de acetato (q_{acet}) en *E. coli* incrementa cuando la bacteria presenta una tasa de consumo específico de sustrato por arriba de un valor determinado (q_{Scrit}). La q_{Scrit} también corresponde a la tasa de consumo de oxígeno límite q_{O2crit} . Adaptado de Eiteman y Altman, 2006.

El sobreflujo metabólico ocurre debido a que la tasa de síntesis de acetil coenzima A (AcCoA) sobrepasa la capacidad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para consumir el metabolito. Debido a esto, la cantidad de AcCoA no consumida por el TCA es llevada a la ruta de fosfotranscetilasa (Pta)-acetato cinasa (Ack) en donde se sintetiza acetato (Delgado y Liao, 1997). Se ha propuesto que la acumulación de acetato ocurre por la represión catabólica de la expresión AcCoA

sintetasa bajo condiciones de altas tasas de importe de glucosa (Valgepea et al., 2010).

El sobreflujo metabólico se presenta en una variedad de bacterias, levaduras y células mamíferas (Paczia et al., 2012). En levaduras, al sobreflujo metabólico se le denomina efecto Crabtree y este se define como la represión de la respiración, bajo condiciones aerobias, inducida por la presencia de azúcares como fuente de carbono (Samper, 2019). Similar al sobreflujo metabólico en *E. coli*, el efecto

Crabtree representa una desviación de carbono a la producción de etanol al utilizar concentraciones altas de sustrato (Childers et al., 2016). Se ha discutido que este fenómeno es parte de una estrategia de supervivencia de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* para competir con otros microorganismos en el consumo rápido de sustrato (Rozpędowska et al., 2011).

A pesar de cultivarse bajo condiciones aerobias, las células mamíferas presentan un alto flujo de glucosa a lactato (Hu et al., 1987). La acumulación de lactato lleva a una disminución indeseable de pH, además de reducir la tasa de crecimiento y la productividad específica de anticuerpos (Glacken et al., 1986). En células cancerígenas y otras células proliferantes o en desarrollo, la tasa de consumo de glucosa incrementa y se forma lactato aún en la presencia de oxígeno, a este fenómeno se le conoce como el efecto Warburg (Liberti y Locasale, 2016).

A pesar de que el sobreflujo metabólico se encuentra descrito, no se cuenta con una explicación clara de su regulación. Enjalbert y colaboradores (2017) realizaron un análisis dinámico del flujo metabólico- ^{13}C , el cual reveló un intercambio bidireccional de acetato entre *E. coli* y su ambiente, donde la ruta Pta-AckA es central para ambas direcciones de flujo. La modelación cinética de esta ruta predijo que su flujo se encuentra controlado de manera termodinámica por la concentración

de acetato extracelular *in vivo*. A partir de una validación experimental se confirmó que es posible reducir, e incluso revertir, la producción de acetato dependiendo de su concentración extracelular.

Paczia y colaboradores (2012) realizaron análisis cuantitativos sobre los exometabolomas de *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. licheniformis* y *S. cerevisiae* en cultivos en reactor bajo condiciones controladas. En todos los casos se encontraron con un fenómeno que determinaron como sobreflujo metabólico “extendido”, en el cual se acumulan subproductos primarios tales como etanol o acetato, pero, a diferencia del sobreflujo metabólico, también se acumulan intermediarios metabólicos centrales, los cuales se transportan fuera de la célula posteriormente. Es posible que la conversión de carbono a biomasa o producto se encuentre obstaculizada por las actividades enzimáticas máximas, restricciones termodinámicas y por regulaciones metabólicas del TCA y glicólisis, lo cual puede llevar a una acumulación de intermediarios.

Zhuang y colaboradores (2011) modificaron el modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* ya existente (Feist et al, 2007) para incluir una restricción de la membrana citoplasmática, basada en la hipótesis de que existe una competencia en el espacio membranal entre transportadores de glucosa y proteínas relacionadas con la cadena respiratoria. En este estudio reveló una

utilización diferencial de los citocromos y un consumo de glucosa mayor bajo condiciones anaerobias comparado con condiciones aerobias. A partir de las simulaciones realizadas, propusieron que las bacterias modifican la composición de su membrana citoplasmática de tal forma que se mantenga una producción de ATP óptima mediante el cambio entre la fosforilación oxidativa y el nivel de sustrato.

Szenk y colaboradores (2017) propusieron la hipótesis del estado real de la membrana, la cual sugiere que el sobreflujo metabólico en *E. coli* se debe a que el crecimiento rápido hace que las células sean más grandes, reduciendo la relación de superficie/volumen. Esto provoca una disminución del área de membrana disponible para las proteínas respiratorias a pesar de la demanda de oxígeno. Esta limitación requiere que se produzca ATP mediante la producción de acetato, ya que de esta forma se produce más ATP por unidad de área de membrana. Este estudio demuestra que el comportamiento celular se encuentra limitado por los tamaños y formas de las proteínas de la célula.

Un estudio realizado por Molenaar y colaboradores (2009) sugirió que el sobreflujo metabólico es el resultado de una asignación global de recursos celulares, en donde se consideran tanto las eficiencias enzimáticas, como el rendimiento global de las rutas metabólicas para obtener un crecimiento óptimo sujeto a diferentes condiciones. Esto

da noción a que el proceso fermentativo puede ser más eficiente en términos del proteoma, que la respiración. Basan y colaboradores (2015) propusieron y validaron que el costo proteómico de la generación de energía por respiración supera el de la fermentación, lo cual lleva a la producción de acetato bajo condiciones de alto crecimiento. Esta teoría fue incorporada al análisis de balances de flujo, obteniendo un modelo capaz de predecir de manera cuantitativa el inicio y el alcance del sobreflujo metabólico en varias cepas de *E. coli* (Zeng y Yang, 2019).

La producción de acetato en *E. coli* es indeseable debido a que, además de representar un desperdicio de carbono, concentraciones ca. 1 g L^{-1} resultan perjudiciales para la producción de biomasa y de proteína recombinante (Continero et al., 2000). El acetato tiene un impacto negativo en la estabilidad de proteínas intracelulares, induce respuestas de estrés (Han & Eiteman, 2019) y su acumulación lleva a una acidificación del medio lo que podría llevar a la lisis celular (Cherrington, 1991). Para solucionar el problema de la producción problema se han explorado estrategias como la alimentación controlada y la modificación genética de cepas. También se han generado cepas mutantes con la capacidad de importar glucosa reducida con la finalidad de reducir la producción de acetato (Chou y Bennet, 1994).

Como ya se mencionó, la transferencia de oxígeno suele ser una limitante en los cultivos

de alta densidad celular debido a la baja solubilidad de este, así como las restricciones operacionales del sistema. La concentración de saturación del oxígeno disuelto en agua bajo condiciones estándar (25°C, 1 atm) es de aproximadamente 7.54 mg L⁻¹ (Carpenter, 1966), sin embargo, el suministro de oxígeno se puede aumentar mediante el incremento en la velocidad de agitación y/o la tasa de aireación, el enriquecimiento del aire con oxígeno, o bien, el suministro de oxígeno puro (Lee, 1996). Otra estrategia que se ha implementado de manera exitosa es el uso de reactores presurizados, pues estos permiten incrementar la tasa de transferencia de oxígeno máxima (Knoll et al., 2005; Matsui et al., 2006; Knoll et al., 2007).

La alta densidad celular es difícil de alcanzar en cultivos por lote, pues la alta concentración de glucosa requerida resultaría en una q_{crit} , lo que llevaría a la acumulación de acetato (Lara et al., 2008). Una estrategia para realizar cultivos de alta densidad celular y evitar el sobreflujo metabólico es la operación en por lote alimentado. En este modo de operación el sobreflujo metabólico se puede prevenir mediante el control de la μ , ya que esta se puede disminuir al limitar nutrientes esenciales tales como la fuente de carbono o de nitrógeno (Riesenberg et al., 1991).

Los cultivos por lote alimentado consisten en una fase lote de corta duración y posteriormente una fase de alimentación de sustrato o medio completo. En estos cultivos,

la tasa de alimentación determina tanto la μ como la q_s ; esta tasa puede ser constante o con un incremento ya sea lineal o exponencial de tal forma que se evite el sobreflujo metabólico. En la alimentación exponencial, la tasa de alimentación incrementa en proporción al crecimiento celular, de tal forma que se mantenga a una μ determinada y que la concentración de sustrato en el medio sea igual a cero (Korz et al., 1995). Esta tasa de alimentación se puede determinar mediante la siguiente ecuación (Ec. 1) (Jaén et al., 2013):

$$F = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{x/s}} + m_s \right) \frac{xV e^{\mu_{set}(t)}}{S_i} \quad (Ec. 1)$$

Donde F es la tasa de alimentación, μ_{set} es la tasa de crecimiento específica deseada, $Y_{x/s}$ es el rendimiento biomasa-sustrato, m_s se refiere al coeficiente de mantenimiento, x y V son la concentración de biomasa y el volumen actuales respectivamente, t es el tiempo y S_i es la concentración de sustrato inicial.

A pesar de que este modo de cultivo se ha implementado de manera exitosa en la industria, presenta algunas desventajas como una larga duración debido a los bajos valores de q_s y μ , lo cual puede llevar a una baja productividad global, además de requerir esquemas de control adicionales y equipo suplementario. De igual forma, pueden existir gradientes de glucosa debido a un mezclado imperfecto, lo que lleva a una serie de respuestas fisiológicas indeseables, ya que podrían impactar de manera negativa al proceso (Lara, et al., 2008).

Generalmente los cultivos por lote alimentado se realizan en reactores instrumentados, sin embargo, se han desarrollado estrategias que permiten simular un lote alimentado en matraces agitados y en placas multipozo. La empresa BioSilta (Universidad de Oulu, Oulu) desarrolló un medio en el cual la glucosa se libera de manera controlada mediante la adición de la enzima glucoamilasa (Panula-Perälä et al., 2008). Con este medio se han alcanzado concentraciones celulares de hasta 15 g L⁻¹, y se han obtenido mayores rendimientos de proteínas recombinantes y ADN plasmídico (ADNp) comparado con otros medios comúnmente utilizados (Krause et al., 2010; Ramírez et al., 2016; Galindo et al., 2016; Chrast et al., 2018).

Una estrategia similar en la que no se requiere un equipamiento adicional para realizar la alimentación controlada, es el uso de discos de elastómero de silicona que contienen cristales de glucosa. Estos fueron desarrollados por Jeude y colaboradores (2006), y los estudiaron en cultivos de *Hansenula polymorpha*, obteniendo rendimientos de biomasa similares a reactores equipados con bomba de alimentación. Utilizando este mismo sistema, Habicher y colaboradores (2019) evaluaron la producción de proteasas en *B. licheniformis* bajo limitación de glucosa y de nitrógeno simulando un lote alimentado. Con esta estrategia se evitó la represión de producción de proteasas por amonio y glucosa, además de incrementar los rendimientos productivo-

sustrato entre 1.5 y 2.1 veces comparados con los cultivos por lote.

Ingeniería metabólica para reducir el sobreflujo metabólico en E. coli

Además del uso de estrategias operacionales tales como los cultivos en lote alimentado, la producción de acetato se puede reducir mediante la modificación genética de rutas relacionadas con su síntesis (Eiteman y Altman, 2006). Las cepas B de *E. coli* tienen activado la ruta del glioxilato, por lo que producen menos acetato que las cepas derivadas de K-12 (Phue y Shiloach, 2004). Existen tres estrategias principales para reducir la producción de acetato: la primera es un enfoque en el cual se disminuye directamente el consumo de glucosa, la segunda es reducir el flujo de carbono hacia el acetato y la tercera aborda los mecanismos metabólicos y regulatorios que llevan a la producción de acetato (Eiteman y Altman, 2006).

El ciclo de los ácidos tricarbónicos juega un papel muy importante en la formación de acetato. A partir de que se forma el piruvato, el flujo de carbono puede ser dirigido al ciclo de los ácidos tricarbónicos, o bien, a la producción de acetato mediante los genes de las enzimas acetato cinasa (*ackA*), fosfotransacetilasa (*pta*), acetil-CoA sintasa (*acs*) y piruvato oxidasa (*poxB*) (De Mey et al., 2006). Un enfoque directo para reducir la formación de acetato es eliminar las enzimas

fosfotransacetilasa y/o la acetato cinasa (Bauer et al., 1990). Otro enfoque se basa en el uso de ARN antisentido para bloquear de manera parcial la síntesis de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa (Kim y Cha, 2003).

El acetato también puede ser dirigido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante la enzima piruvato carboxilasa. Esta enzima no se encuentra de manera nativa en *E. coli* y puede carboxilar directamente el piruvato a oxaloacetato (Gokarn et al., 2001). March y colaboradores (2002) produjeron un 68% más de proteína modelo (β -galactosidasa) y observaron una disminución alrededor del 60% en la producción de acetato en una cepa que expresa la enzima piruvato carboxilasa.

Veit y colaboradores (2007) identificaron que las enzimas succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, aconitasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, las cuales forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, así como el operón *acs-yjch-actP*, se correlacionan de manera negativa con la formación de acetato. En función de estos resultados, generaron una cepa de *E. coli* con una mayor actividad específica de las enzimas succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa. Esta cepa mantuvo un alto crecimiento, así como una alta tasa de consumo de glucosa, a la vez que produjo menos acetato y presentó un

mayor flujo de carbono a la formación de CO₂, comparada con la cepa parental MG1655.

El NAD⁺ tiene un papel importante en el metabolismo, ya que es una coenzima para más de 300 reacciones redox. El NAD⁺ es utilizado como coenzima durante la glicólisis y se convierte en NADH+H⁺. Mediante la reducción del oxígeno o de otro producto oxidante, la célula regenera el NAD⁺ a partir del NADH+H⁺ producido (De Mey et al., 2006). Tanto la glicólisis como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos generan NADH, mientras que en la síntesis de acetato se consume, por lo que es posible que la acumulación de NADH a altas tasas de consumo de glucosa, conduzca a la célula a formar acetato para modular el equilibrio redox (Vemuri et al., 2006a). El cociente NADH+H⁺/NAD⁺ regula la expresión de algunas enzimas tales como alcohol deshidrogenasa, al igual que la actividad de otras como el complejo de piruvato deshidrogenasa (Berríos-Rivera et al., 2002). Vemuri y colaboradores revelaron que la formación de acetato debido al sobreflujo metabólico ocurre cuando se llega al cociente NADH+H⁺/NAD⁺ crítico de 0.06. La expresión de una NADH oxidasa heteróloga, junto con la eliminación de *arcA* resultó en un incremento en el flujo glicolítico y redujo la producción de acetato (Vemuri et al., 2006b).

La acetilación de proteínas en residuos de lisina es un fenómeno ampliamente observado, sin embargo, su entendimiento es escaso. Esta modificación proteica se ha

relacionado principalmente a la regulación transcriptómica. Las enzimas involucradas en la acetilación y desacetilación de proteínas ya se han descrito en una amplia variedad de bacterias (Castaño-Cerezo et al., 2014). Varios estudios de proteómica han revelado que la acetilación es abundante en *E. coli* (Zhang, et al., 2009). CobB fue la primera desacetilasa bacteriana descrita y es la única conocida en *E. coli* (Castaño-Cerezo, et al., 2014), esta es capaz de desacetilar residuos de acetil-lisina utilizando NAD⁺ como sustrato (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

Castaño-Cerezo y colaboradores (2014) analizaron el acetiloma en mutantes de *E. coli* *cobB* y *patZ*, este último gen codifica para una acetiltransferasa. Se identificaron y cuantificaron más de 2000 péptidos acetilados pertenecientes a 809 proteínas, de las cuales cerca del 65% están relacionadas al metabolismo. En este estudio demostraron que CobB regula a la enzima acetil-CoA sintetasa, la cual es más activa en su forma desacetilada. El efecto de eliminar *cobB* y *patZ* depende del fondo genético. La eliminación de *cobB* en *E. coli* K-12 y BL21 incrementó la producción de acetato, mientras que la eliminación de *patZ* resultó en una eliminación de sobreflujo de acetato en BL21, sin embargo, K-12 no presentó este efecto. Esto puede deberse, entre otros factores, a que la actividad de acetil-CoA sintetasa se encuentra mejor regulada por la acetilación en BL21 que en K-12 (Castaño-Cerezo, et al., 2015).

Debido a que las altas tasas de transporte de glucosa están estrechamente relacionadas con la producción de acetato, una de las estrategias para reducir su acumulación se basa en limitar el consumo de sustrato. El sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) está involucrado en el transporte y fosforilación de varios carbohidratos, en la quimiotaxis y en la regulación de varias rutas metabólicas (De Mey et al., 2006).

El PTS se compone de una proteína soluble y no azúcar-específica enzima I (EI) y de la proteína acarreadora de fosfohistidina (Hpr). Esta última mueve el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) a las enzimas IIA y IIB. También se encuentran otros componentes como el IIC y IID que constituyen permeasas que transportan moléculas de azúcar, las cuales son fosforiladas por el componente IIB (Fuentes et al., 2013).

La eliminación de genes pertenecientes al PTS elimina la producción de acetato, sin embargo, reduce la tasa de crecimiento máxima un 40% o más (Sigüenza et al., 1999). La disminución de la tasa de crecimiento en cepas con deleciones en genes PTS se puede contrarrestar mediante la mejora simultánea de algún sistema de transporte de glucosa alternativo, por ejemplo, mejorar el promotor del gen *galP*, el cual codifica para una galactosa permeasa (De Anda et al., 2006).

Otra forma de modificar el PTS es mediante la regulación del gen *ptsG*, el cual codifica para la enzima específica para glucosa IIA^{Glc}. El regulador ArcA se une al promotor de *ptsG*, la delección de *arcA* incrementó alrededor de dos veces la expresión del gen *ptsG*. Por otro lado, la sobreexpresión de *arcA* disminuyó el consumo de glucosa, lo cual llevó a una disminución en la acumulación de acetato (Jeong et al., 2004).

Un enfoque más es sobreexpresar la proteína Mcl, la cual es un regulador global del consumo de carbohidratos y reprime el PTS (Kimata et al., 1998; Kim et al., 1999). Cho y colaboradores (2005) modificaron la región del promotor del gen *mcl* y observaron una disminución del 50% en la producción de acetato, así como un incremento importante en los rendimientos de proteína en cultivos en matraz agitado utilizando medio complejo.

Como ya se mencionó, el sobreflujo metabólico no está únicamente relacionado con la q_s , pues también interviene la capacidad de la célula para oxidar completamente la glucosa en CO₂ (Perrenoud y Sauer, 2005), lo cual se ve reflejado en la tasa de consumo específico de oxígeno (q_{O_2}). La hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) expresada en *E. coli*, es una proteína transmembranal que captura el oxígeno y lo transfiere a oxidasas terminales (Hwang et al., 2001).

La característica principal de esta hemoglobina es que, a pesar de que su

constante de asociación de O₂ es similar a la de otras hemoglobinas, su constante de disociación es considerablemente más alta (Wei y Chen, 2008) lo que indica que VHb es capaz de entregar de manera eficiente el O₂ a los citocromos, mejorando la respiración aerobia, lo que provocará una regeneración de NAD⁺ más rápida, activando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y disminuyendo la producción de acetato (Pablos et al., 2014).

Modificación del transporte de glucosa como estrategia para reducir el sobreflujo metabólico en E. coli

La glucosa es el sustrato más utilizado en la industria para cultivos de *E. coli* ya que es la fuente de carbono preferida por esta bacteria. Una vez dentro del periplasma, la glucosa puede ser internalizada en el citoplasma mediante el PTS. La glucosa es importada mediante el complejo enzimático de glucosa II (II^{Glc}), el cual incluye la enzima IIA^{Glc} y la permeasa IICB^{Glc} (Misset, et al., 1983). Se ha reportado que el complejo de manosa (II^{Man}) también es capaz de transportar glucosa. Este complejo está compuesto por la enzima IIAB^{Man} y por la permeasa IICD^{Man} (Curtis y Epstein, 1975).

Chou y colaboradores (1994) demostraron que una cepa mutante de *E. coli* con el complejo PTS de glucosa (*ptsG*) inactivo es capaz de crecer en glucosa con una tasa correspondiente al 80% de lo observado en una cepa silvestre. Esta estrategia permitió

disminuir el flujo glicolítico, lo que llevó a una menor acumulación de acetil-CoA. Por otro lado, Han y colaboradores (2004) encontraron un incremento en la producción de biomasa y de proteína recombinante como resultado de la eliminación de *ptsG*, ya que al reducir el flujo glicolítico se redujo la acumulación de acetato, evitando el desperdicio de carbono.

Se ha observado que en cepas de *E. coli* con el sistema PTS inactivo, proteínas relacionadas con el transporte de galactosa son inducidas y son capaces de importar glucosa (Flores et al., 2005). Esto también se ha observado en cultivos de *E. coli* en condiciones de limitación de glucosa (Death y Ferenci, 1994). Uno de estos genes inducidos es *galP*, el cual codifica para el cotransporte paralelo GalP (McDonald, et al., 1997). Los genes *mglABC* codifican para una proteína de unión al ATP, una proteína de unión al periplasma de galactosa/glucosa y una proteína intramembranal de transporte respectivamente. Estas proteínas, las cuales también se inducen bajo limitación de glucosa, son parte del sistema Mgl de alta afinidad de transporte ABC (Death y Ferenci 1994).

SgrS es un ARN pequeño de *E. coli* que regula la expresión del transportador de glucosa IICB^{Glc}, por lo que también regula el consumo de glucosa. Negrete y colaboradores (2010) estudiaron el efecto de altas concentraciones de glucosa (40 g L⁻¹) en los niveles de transcripción del SgrS y del ARN mensajero *ptsG* en las cepas de *E. coli* MG1655, JM109

y BL21. En este estudio encontraron que la transcripción de *sgrS* se regula diferente en BL21 que en las cepas derivadas de K-12 (MG1655 y JM109). En las cepas derivadas de K-12, la transcripción de *sgrS* fue más baja, lo cual contribuye a una mayor concentración del transportador y a un mayor consumo de sustrato; mientras que en BL21 ocurrió lo contrario.

Una posible explicación al incremento en la transcripción de *sgrS* es la acumulación de intermediarios de la vía glicolítica, lo que podría indicar un sobreflujo de glucosa. Estos resultados sugieren que BL21 tolera altas concentraciones de glucosa no solo por su metabolismo eficiente, si no por su capacidad de controlar el transporte de glucosa regulada por SgrS. A partir de estos resultados, se sobreexpresó SgrS en ambas cepas derivadas de K-12, lo cual resultó en una reducción en la producción de acetato (Negrete et al., 2013).

Cultivos por lote empleando cepas modificadas en el sistema de transporte para alcanzar altas densidades celulares

La inactivación del sistema PTS, mediante la delección del operón *ptsHI-crr* (el cual codifica para los genes EI, HPr y IIA^{Glu}), aunado a la sobreexpresión cromosomal del gen *galP* bajo el control del promotor *trc*, dio como resultado la cepa VH32GalP⁺. Esta cepa modificada presenta una menor tasa de producción de

acetato comparada con la cepa nativa W3110, así como una producción de GFP cuatro veces mayor que la obtenida con W3110 (De Anda et al., 2006). De igual forma, Lara y colaboradores (2008) evaluaron la producción de GFP cepa VH32GalP⁺ en lote y la compararon con la producción en la cepa W3110 en lote alimentado. En este estudio demostraron que tanto la alta densidad celular, como altas concentraciones de proteína recombinante, se pueden obtener en cultivos por lote simple al lograr evitar la producción de acetato.

La cepa VH33 (VH32GalP⁺ con el gen de resistencia a kanamicina extraído) fue evaluada por Knabben y colaboradores (2010) en un cultivo por lote en un reactor presurizado, en donde a lo largo del cultivo, la presión fue incrementando de tal forma que se mantuviera la tensión de oxígeno disuelto por arriba del 30% de la saturación del aire, alcanzando la tasa de transferencia de oxígeno más alta obtenida en cultivos por lote (451 mmol L⁻¹ h⁻¹) hasta esa fecha con este tipo de reactores. A pesar de que la concentración de glucosa inicial fue de 130 g L⁻¹, la concentración de acetato fue de 0.35 g L⁻¹ y obtuvieron una concentración de biomasa de 48 g L⁻¹, así como una productividad promedio de 2.10 g L⁻¹ h⁻¹.

La cepa VH33 también fue evaluada por Soto y colaboradores (2011) para la producción de ADN plasmídico (ADNp), empleando el plásmido pHN, el cual es una vacuna

experimental contra las paperas, en cultivos por lote con 100 g L⁻¹ de glucosa. La cepa nativa W3110 produjo 17 mg L⁻¹ de plásmido y 5.3 g L⁻¹ de acetato, mientras que VH33 produjo 40 mg L⁻¹ de pHN y únicamente 2 g L⁻¹ de acetato. Borja y colaboradores (2012) compararon la producción de ADNp en la cepa productora DH5 α con VH33 y derivadas de esta con los genes *endA*, *recA*, *deoR* y *nupG* inactivados de manera independiente y en combinación. En altas concentraciones de glucosa (100 g L⁻¹), la triple mutante VH33 Δ *recA deoR nupG* produjo 186 mg L⁻¹ de ADNp, 40 g L⁻¹ de biomasa y 2.2 g L⁻¹ de acetato, mientras que la cepa DH5 α produjo únicamente 70 mg L⁻¹ de ADNp y acumuló 9.5 g L⁻¹ de acetato.

Por otro lado, las cepas W3110 *vgb*⁺ y MG1655 *vgb*⁺, las cuales expresan VHb, se evaluaron en cultivos aerobios y se compararon con las cepas nativas W3110 y MG1655 (*vgb*). La producción de acetato se redujo un 50% en MG1655 *vgb*⁺ y más del 90% en W3110 *vgb*⁺. Los valores de μ , $Y_{x/s}$ y q_s se mantuvieron similares en las cepas *vgb*⁺ y *vgb*⁻. En contraste, la presencia de esta hemoglobina incrementó al doble el rendimiento de ADNp ($Y_{p/x}$) en la cepa W3110 *vgb*⁺ en comparación con la nativa. La cepa MG1655 no presentó cambios en $Y_{p/x}$ con la presencia de VHb. Estos resultados mostraron que mejorar la eficiencia del metabolismo aerobio es un enfoque interesante para evitar el sobreflujo

metabólico en cultivos de alta densidad celular por lote (Pablos et al., 2014).

Juárez y colaboradores (2017) estudiaron el impacto de la Vhb en el crecimiento y acumulación de lactato en cultivos de CHO-K1. La expresión de esta hemoglobina incrementó la μ y los rendimientos de biomasa en glucosa y glutamina, además de reducir la producción de lactato por célula un 40% comparada con las células *vgb*. Aunado a esto, estudiaron la distribución de Vhb, demostrando que esta se encuentra en el citoplasma y organelos, lo cual indica que Vhb puede servir como transportador de oxígeno, mejorando así la respiración aerobia. Licon-Cassani y colaboradores (2014) evaluaron la producción de dos compuestos de valor industrial: ácido 3-dehidroshikímico y ácido shikímico, en cepas de *B. subtilis* PTS⁻ y con la enzima piruvato cinasa inactiva (PYKA⁻). Comparada con la cepa nativa, los rendimientos de ácido shikímico ($Y_{SHIK/S}$) y de ácido 3-dehidroshikímico ($Y_{DHS/S}$) en glucosa con la cepa PTS⁻ fueron 1.9 y 4.6 veces mayores, respectivamente. Mientras que en la cepa PYKA⁻ los rendimientos $Y_{SHIK/S}$ y $Y_{DHS/S}$ fueron 2 y 4.2 veces mayores que en la nativa, respectivamente.

Potencial biotecnológico de cepas con diferentes capacidades de transporte de glucosa

Fuentes y colaboradores (2013) generaron una colección de *E. coli* W3110 con mutaciones en las proteínas relacionadas con

el transporte de glucosa (tabla 2). Incluyendo a la cepa progenitora, los valores de μ , q_s y q_{acet} abarcan de 0.18 a 0.65 h⁻¹; de 0.33 a 1.33 g g⁻¹ h⁻¹ y de 0 a 0.19 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Este amplio espectro de tasas específicas permite generar un panorama completo de cultivos en lote que asemejen la operación por lote alimentado. La producción de GFP inducida por IPTG fue evaluada por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019) en las cepas WHI, WHIC, WG, WGx y WGM, siendo el mayor rendimiento de GFP ($Y_{GFP/x}$) de 91.3 mg/g en WGM, mientras que para la nativa fue de 10.5 mg/g. Existen evidencias que sugieren que las modificaciones en el sistema de transporte de glucosa afectaron también el transporte de IPTG, lo que puede sesgar los resultados observados. Por otro lado, la inducción con IPTG genera estados bi-estables, que pueden dificultar la interpretación fisiológica. Debido a esto, la acumulación de proteína recombinante está acompañada de una fuerte diversificación fenotípica de la población microbiana. Las cepas que presentaron los mayores rendimientos de proteína también presentaron la mayor heterogeneidad con respecto a la morfología y acumulación de GFP. Una de las principales consecuencias de la acumulación masiva de GFP observadas en este estudio es la elongación celular, aunado a un incremento en la permeabilidad de la membrana.

El resto de la colección no ha sido evaluada para la producción de proteína recombinante.

Artículos

Sin embargo, Fuentes y colaboradores (2013) evaluaron la producción del plásmido pHN en las mutantes WG, WGMC, WGM, WGME WHIC, y la cepa nativa W3110. En este estudio encontraron que todas las cepas mutantes evaluadas presentaron mayores

rendimiento de ADNp 3.2 veces mayor al de la cepa nativa con el plásmido pHN, esto puede deberse a que la distribución de los flujos metabólicos asociados a la generación de biomasa y ácidos nucleicos en esta cepa favorece la síntesis de precursores de ADN,

Tabla 2. Colección de cepas mutantes de *E. coli* generadas por Fuentes, et al., 2013.

Cepa	Genes eliminados	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_{ac} (g g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{x/s}$
W3110	-	0.65 ± 0.02	1.33 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.49 ± 0.00
WG	<i>ptsG</i>	0.51 ± 0.01	1.05 ± 0.12	0.07 ± 0.05	0.53 ± 0.12
WGX	<i>ptsG, malX</i>	0.23 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0	0.41 ± 0.01
WGB	<i>ptsG, bglF</i>	0.43 ± 0.04	1.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.42 ± 0.03
WGE	<i>ptsG, nagE</i>	0.41 ± 0.02	0.69 ± 0.06	0	0.60 ± 0.08
WGM	<i>ptsG, manX</i>	0.36 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0	0.56 ± 0.08
WGMX	<i>ptsG, manX, malX</i>	0.32 ± 0.01	0.58 ± 0.06	0	0.55 ± 0.06
WGMB	<i>ptsG, manX, bglF</i>	0.29 ± 0.00	0.66 ± 0.07	0	0.40 ± 0.02
WGME	<i>ptsG, manX, nagE</i>	0.28 ± 0.02	0.56 ± 0.00	0	0.48 ± 0.03
WGP	<i>ptsG, galP</i>	0.49 ± 0.08	1.19 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.44 ± 0.01
WGC	<i>ptsG, mglABC</i>	0.49 ± 0.01	1.02 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.47 ± 0.05
WGMP	<i>ptsG, manX, galP</i>	0.29 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0	0.52 ± 0.02
WGMC	<i>ptsG, manX, mglABC</i>	0.31 ± 0.01	0.68 ± 0.00	0	0.47 ± 0.01
WHI	<i>ptsHlcr</i>	0.25 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0	0.51 ± 0.02
WHIP	<i>ptsHlcr, galP</i>	0.18 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0	0.55 ± 0.03
WHIC	<i>ptsHlcr, mglABC</i>	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0	0.38 ± 0.02

μ : Tasa específica de crecimiento

q_s : Tasa específica de consumo de sustrato

q_{ac} : Tasa específica de producción de acetato

$Y_{x/s}$: Rendimiento biomasa-sustrato

rendimientos producto-biomasa ($Y_{p/x}$) que la cepa nativa, estos incrementos pueden deberse a la escasa o nula producción de acetato. La cepa que presentó los mejores resultados fue WGMC, la cual obtuvo un

generando una mayor producción de plásmido.

Actualmente se está evaluado la producción de GFP usando un promotor constitutivo en la colección de mutantes con diferentes concentraciones de glucosa inicial. Se encontró que las cepas WGMB y WHIC presentaron valores de fluorescencia específica mayores a la nativa en todas las concentraciones de glucosa inicial evaluadas. Los rendimientos obtenidos con 20 g/L de glucosa fueron 68 y 237% mayores al de W3110 en WGMB y WHIC, respectivamente. Estos resultados indican que las cepas WGMB y WHIC resultan interesantes para la producción de proteína recombinante en cultivos de alta densidad celular en lote, por lo que se evaluará su desempeño en concentraciones altas de glucosa inicial.

De acuerdo a lo obtenido por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019), se espera que la cepa WHIC portando el plásmido con expresión constitutiva de GFP presente heterogeneidades en su morfología, provocando una posible elongación celular. De igual forma, se espera encontrar heterogeneidad poblacional respecto a la acumulación de GFP, obteniendo poblaciones en un estado alto y en un estado bajo de producción. A pesar de los posibles efectos negativos de la acumulación masiva de GFP, la cepa mutante WHIC podría resultar en una fábrica celular capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa, sin producir acetato y obteniendo altos rendimientos producto-biomasa.

Perspectivas

El desarrollo de estrategias que permitan realizar cultivos de alta densidad celular evitando el sobreflujo metabólico ha progresado notablemente en los últimos años. De acuerdo a lo reportado por diferentes autores y para el caso de *E. coli*, se puede concluir que la disminución en la acumulación de acetato requiere modificaciones en más de un gen. La inactivación total o parcial del PTS, así como la inactivación de otras proteínas relacionadas con el transporte de glucosa, resulta en fábricas celulares mejoradas para la producción de diferentes clases de compuestos. Sin embargo, varias de estas modificaciones son específicas para un solo producto, por lo que resultaría interesante desarrollar una cepa capaz de producir una variedad de productos en grandes cantidades. Adicionalmente, se requiere un análisis detallado que permita determinar el impacto de las diferentes modificaciones mencionadas en la fisiología de la fábrica celular.

Otra área de oportunidad consiste en implementar estas estrategias en otros microorganismos o líneas celulares. Wlaschin y Hu (2007) expresaron el transportador de fructosa GLUT5 en células CHO, este transportador tiene un valor de K_m alto para el sustrato, por lo que lo importa a una menor tasa, comparada con el transportador GLUT1 de alta afinidad. El importe moderado permitió el cultivo de CHO en concentraciones altas de glucosa evitando el sobreflujo metabólico y la

acumulación de lactato. Esta disminución en la acumulación de lactato llevó a un incremento importante en la concentración celular final.

La implementación de fábricas celulares capaces de crecer en altas concentraciones de sustrato, producir grandes cantidades de metabolitos de interés y sin producir subproductos metabólicos indeseables, permitirá tener una alternativa a los cultivos por lote alimentado, evitando la heterogeneidad poblacional debido a gradientes de sustrato y generando una disminución en el costo operacional.

Agradecimientos

Este trabajo es apoyado por CONACyT mediante el proyecto A1-S-8646. DV es apoyada por una beca de CONACyT con número de referencia 003760.

Referencias

- Atsumi S, Cann A F, Connor M R, Shen C R, Smith K M, Brynildsen M P, Chou K J, Hanai T & Liao J C (2008) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* 10:305-311.
- Barford J P & Hall R J (1979) An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *Microbiology.* 114:267-275.
- Basan M, Hui S, Okano H, Zhang Z, Shen Y, Williamson J R & Hwa T (2015) Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature.* 528:99.
- Bauer K A, Ben-Bassat A R I E, Dawson M, De La Puente V T & Neway J O (1990) Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1296-1302.
- Berríos-Rivera S J, Bennett G N & San K Y (2002) Metab. Eng. of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metab. Eng.*, 4:217-229.
- Blunt W, Dartiailh C, Sparling R, Gapes D J, Levin D B & Cicek N (2019) Development of High Cell Density Cultivation Strategies for Improved Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Productivity Using *Pseudomonas putida* LS46. *Bioengineering.* 6:89.
- Borja G M, Ramírez O T & Lara A R (2014) Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. *BioTecnología.* 17:87-109.
- Borja G M, Mora E M, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-

Artículos

- density cultivations in batch mode. *Microb. Cell Fact.* 11:132.
- Carpenter J H (1966) New measurements of oxygen solubility in pure and natural water 1. *Limnol. Oceanogr.* 11:264-277.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Post H, Fuhrer T, Cappadona S, Sánchez-Díaz N C, Sauer U, Heck A J, Altelaar A F & Cánovas M (2014) Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 10.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Röhrig T, Termeer S & Cánovas M (2015) Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N ϵ -lysine acetylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 3533-3545.
- Chen P T, Chiang C J, Chen Y T, Lin H C, Liu C H, Chao Y P & Shaw J F (2012) Strategy for stable and high-level expression of recombinant trehalose synthase in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* 60: 6063-6068.
- Cherrington C A, Hinton M, Pearson G R & Chopra I (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 161-165.
- Childers D S, Raziunaite I, Avelar G M, Mackie J, Budge S, Stead D & Brown A J (2016) The rewiring of ubiquitination targets in a pathogenic yeast promotes metabolic flexibility, host colonization and virulence. *PLoS Pathog.* 12: e1005566.
- Cho S, Shin D, Ji G E, Heu S & Ryu S (2005) High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 119: 197-203.
- Chou C H, Bennett G N & San K Y (1994) Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 952-960.
- Chrast L, Chaloupkova R & Damborsky J (2018) Gram-scale production of recombinant microbial enzymes in shake flasks. *FEMS Microbiol. Lett.* 365: fnx265.
- Contiero J, Beatty C, Kumari S, DeSanti C L, Strohl W R & Wolfe A (2000) Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 421-430.
- Curtis S J & Epstein W (1975) Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J. Bacteriol.* 122: 1189-1199.
- De Anda R, Lara A R, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by

Artículos

- galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8: 281-290.
- De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W & Vandamme E (2007) Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 689-700.
- Death A & Ferenci T (1994) Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176: 5101-5107.
- Delgado J & Liao J C (1997) Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13: 361-367.
- Demain A L & Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27: 297-306.
- Dien B S, Nichols N N & Bothast R J (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-264.
- Djurdjevic I, Zelder O & Buckel W (2011) Production of glutamic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 320-322.
- Eiteman M A & Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.*, 24: 530-536.
- Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M, Portais J C & Létisse F (2017) Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Sci. Rep.* 7: 42135.
- Feist A M, Henry C S, Reed J L, Krummenacker M, Joyce A R, Karp P D, Broadbelt L J, Hatzimanikatis V & Palsson B Ø (2007) A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G & Bolívar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.*, 7: 70-87.
- Fragoso-Jiménez J C, Baert J, Nguyen T M, Liu W, Sassi H, Goormaghtigh F, Van Melderen, L, Gaytán P, Hernández-Chávez G, Martínez A, Delvigne F & Gosset G (2019) Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microb. Cell Fact.*, 18: 26.

- Fuentes L G, Lara A R, Martínez L M, Ramírez O T, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2013) Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microb. Cell Fact.*, 12: 42.
- Galindo J, Barrón B L & Lara A R (2016) Improved production of large plasmid DNA by enzyme-controlled glucose release. *Ann. Microbiol.* 66: 1337-1342.
- Gokarn R, Evans J, Walker J, Martin S, Eiteman M & Altman E (2001) The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 188-195.
- Habicher T, John A, Scholl N, Daub A, Klein T, Philip P & Büchs J (2019) Introducing substrate limitations to overcome catabolite repression in a protease producing *Bacillus licheniformis* strain using membrane-based fed-batch shake flasks. *Biotechnol. Bioeng.* 116: 1326-1340.
- Han Q & Eiteman M A (2019) Acetate formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* K-12 with an elevated NAD (H) pool. *Eng. Life Sci.*
- Han C, Zhang W C, You S & Huang L Y (2004) Knockout of the ptsG gene in *Escherichia coli* and cultural characterization of the mutants. *Chin. J. Biotechnol.* 20: 16-20.
- Hu W S, Dodge T C, Frame K K & Himes V B (1987) Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Dev. Biol. Stand.* 66: 279-290.
- Hwang K W, Raje M, Kim K J, Stark B C, Dikshit K L & Webster D A (2001) *Vitreoscilla* Hemoglobin intracellular localization and binding to membranes. *J. Biol. Chem.* 276: 24781-24789.
- Jaén K E, Lara A R & Ramírez O T (2013) Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem. Eng.* 79: 230-238.
- Jayapal K P, Wlaschin K F, Hu W & Yap M G (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 103: 40.
- Jeong J Y, Kim Y J, Cho N, Shin D, Nam T W, Ryu S & Seok Y J (2004) Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 38513-38518.
- Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D & Büchs J (2006) Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 433-445.
- Juárez M, González-De la Rosa C H, Memún E, Sigala J C & Lara A R (2017) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnol. J.* 12: 1600438.

- Jung Y K & Lee S Y (2011) Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 151: 94-101.
- Jung Y K, Kim T Y, Park S J & Lee S Y (2010) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 161-171.
- Keasling J D (2010) Manufacturing molecules through Metab. Eng. *Science*, 330: 1355-1358.
- Kim J Y & Cha H J (2003) Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 841-853.
- Kim S Y, Nam T W, Shin D, Koo B M, Seok Y J & Ryu S (1999) Purification of Mlc and analysis of its effects on thepts expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 25398-25402.
- Kimata K, Inada T, Tagami H & Aiba H (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol.* 29: 1509-1519.
- Knabben I, Regestein L, Marquering F, Steinbusch S, Lara A R & Büchs J (2010) High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150: 73-79.
- Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J & Büchs J (2007) High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J. Biotechnol.* 132: 167-179.
- Knoll A, Maier B, Tscherrig H & Büchs J (2005) The oxygen mass transfer, carbon dioxide inhibition, heat removal, and the energy and cost efficiencies of high pressure fermentation. *J. Technol. Transfer.* 92: 77-99.
- Korz D J, Rinas U, Hellmuth K, Sanders E A & Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39(1), 59-65.
- Krause M, Ukkonen K, Haataja T, Ruottinen M, Glumoff T, Neubauer A, Neubauer P & Vasala A (2010) A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 11.
- La Merie Business Intelligence. (2018). Disponible en: <http://www.lamerie.com>.
- Lara A R (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10: 209-223.
- Lara A R & Ramírez O T (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications. Recombinant gene expression. Humana Press, Totowa, NJ.

- Lara A R, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2008) Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 893-901.
- Lee S Y (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14: 98-105.
- Liberti M V & Locasale J W (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends. Biochem. Sci.* 41: 211-218.
- Licona-Cassani C, Lara A R, Cabrera-Valladares N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2014) Inactivation of pyruvate kinase or the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system increases shikimic and dehydroshikimic acid yields from glucose in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microb. Biotech.* 24: 37-45.
- March J C, Eiteman M A & Altman E (2002) Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5620-5624.
- Matsui T, Shinzato N, Yokota H, Takahashi J & Sato S (2006) High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. *Process Biochem.* 41: 920-924.
- McDonald T P, Walmsley A R & Henderson P J (1997) Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* 272: 15189-15199.
- Molenaar D, Van Berlo R, De Ridder D & Teusink B (2009) Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol. Syst. Biol.* 5.
- Negrete A, Majdalani N, Phue J N & Shiloach J (2013) Reducing acetate excretion from *E. coli* K-12 by over-expressing the small RNA SgrS. *New Biotechnol.* 30: 269-273.
- Negrete A, Ng W I & Shiloach J (2010) Glucose uptake regulation in *E. coli* by the small RNA SgrS: comparative analysis of *E. coli* K-12 (JM109 and MG1655) and *E. coli* B (BL21). *Microb. Cell Fact.* 9: 75.
- Pablos T E, Sigala J C, Le Borgne S & Lara A R (2014) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* 9: 791-799.
- Paczia N, Nilgen A, Lehmann T, Gätgens J, Wiechert W & Noack S (2012). Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in

- various microorganisms. *Microb. Cell Fact.* 11: 122.
- Panula-Perälä J, Šiurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn M G & Neubauer P (2008) Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 7: 31.
- Perrenoud A & Sauer U (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 3171-3179.
- Phue J N & Shiloach J (2004) Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J. Biotechnol.* 109: 21-30.
- Ramírez E A, Velázquez D & Lara A R (2016) Enhanced plasmid DNA production by enzyme-controlled glucose release and an engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 38: 651-657.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre W A, Pohl H D, Korz D, Sanders E A, Ross A & Deckwer W D (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20: 17-27.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk O P, Orhan F, Galafassi S, Merico A, Woolfit M, Compagno, C & Piškur J (2011) Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* 2:302.
- Rue S M, Anderson P W, Gaylord M R, Miller J J, Glaser S M & Lesley, S. A. (2019) A high-throughput system for transient and stable protein production in mammalian cells. *High-Throughput Protein Production and Purification*. Humana, New York, NY.
- Samper G P (2019) The Crabtree effect shapes *Saccharomyces cerevisiae* lag phase.
- Sánchez A M, Bennett G N & San K Y (2005) Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol. Prog.* 21: 358-365.
- Selifonova O V, Jessen H, Gort S J, Selmer T & Buckel W (2002) 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds. PCT WO 02/ 42418.
- Sigüenza R, Flores N, Hernández G, Martínez A, Bolivar F & Valle F (1999) Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 587-592.
- Soto R, Caspeta L, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a

- metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng.* 56: 165-171.
- Suthers PF & Cameron DC (2005) Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. US patent 6,852,517.
- Szenk M, Dill K A & de Graff A M (2017) Why do fast-growing bacteria enter overflow metabolism? Testing the membrane real estate hypothesis. *Cell Syst.* 5: 95-104.
- Tsang A W & Escalante-Semerena J C (1998) CobB, a new member of the SIR2 family of eukaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide: 5, 6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* 273: 31788-31794.
- Underwood S A, Zhou S, Causey T B, Yomano L P, Shanmugam K T & Ingram L O (2002) Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6263-6272.
- Valgepea K, Adamberg K, Nahku R, Lahtvee P J, Arike L & Vilu R (2010) Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Syst. Biol.* 4: 166.
- Varma A & Palsson B O (1994) Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotech.* 12: 994.
- Veit A, Polen T & Wendisch V F (2007) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 406-421.
- Vemuri G N, Altman E, Sangurdekar D P, Khodursky A B & Eiteman M A (2006b) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3653-3661.
- Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2002) Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1715-1727.
- Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2006a) Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 538-542.
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36: 1136-1145.
- Wei X X & Chen G Q (2008) Applications of the Vhb gene vgb for improved microbial fermentation processes. Methods in enzymology. Academic Press.

- Withers S T, Gottlieb S S, Lieu B, Newman J D & Keasling J D (2007) Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6277-6283.
- Wlaschin K F & Hu W S (2007) Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J. Biotechnol.* 131: 168-176.
- Wolfe A J (2005). The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12-50.
- Yang H, Liao Y, Wang B, Lin Y & Pan L (2011) Draft genome sequence of *Escherichia coli* XH001, a producer of L-threonine in industry. *J. Bacteriol.* 193.
- Zeng H & Yang A (2019) Modelling overflow metabolism in with flux balance analysis incorporating differential proteomic efficiencies of energy pathways. *BMC Syst. Biol.*, 13: 3.
- Zhang J, Sprung R, Pei J, Tan X, Kim S, Zhu H & Zhao Y (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. & Cell. Proteomics.* 8: 215-225.
- Zhuang K, Vemuri G N & Mahadevan R (2011) Economics of membrane occupancy and respiration. *Mol. Syst. Biol.* 7.

PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL CATEGORIA LICENCIATURA

Factores abióticos en la producción de proteínas recombinantes y su formación en cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*

Jesús Antonio Rauda-Ceja^{1,2}, Nestor O. Perez³, Norma A. Valdez-Cruz², Mauricio A. Trujillo-Roldán^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Mich. C.P. 58120.

² Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Ciudad de México, CdMx. C.P. 04510.

³ Probiomed S.A. de C.V. Planta Tenancingo, Tenancingo, Edo. Mex. C.P. 52400.

E-mail: maurotru@gmail.com

Resumen

Uno de los sistemas de expresión predilectos para la producción de proteína recombinante (PR) es la bacteria *Escherichia coli*, a pesar de que la proteína producida generalmente forma agregados, denominados cuerpos de inclusión (CI). Estos agregados proteicos poseen una alta proporción de PR, sin embargo, la proteína generalmente pierde su actividad biológica. Distintas variables han sido estudiadas y se ha observado efecto tanto en la agregación de proteína recombinante como en la arquitectura de los CI; entre esas variables, el pH ha tomado relevancia. La respuesta metabólica de *E. coli* contra el pH ácido y básico involucra el uso de desaminasas y descarboxilasas, así como la importación y exportación de protones al espacio extracelular, la nueva homeostasis que debe alcanzar la célula modifica la estructura y tamaño de los CI. Los pH ácidos, por debajo de 6, y básicos, por encima de 8, propician la agregación, sin embargo, los mismos pH alcalinos parecen favorecer CI con arquitectura más relajada. La modificación de la arquitectura de estos agregados, desde el proceso fermentativo, puede abrir la puerta a la producción de CI para aplicaciones

específicas como enzimas inmovilizadas, andamiaje para ingeniería de tejidos o sistemas de liberación de fármacos y llegar al diseño de procesos fermentativos dirigidos a estas aplicaciones.

Palabras clave: pH, cuerpos de inclusión, proteína recombinante.

Abstract

One of the most preferred expression system of recombinant protein (RP) is the bacteria *Escherichia coli*, despite the protein produced form aggregates, denominated inclusion bodies (IBs). These protein aggregates have a high proportion of recombinant protein, notwithstanding protein generally loses its biological activity. Different variables have been studied and an effect both in recombinant protein aggregation and IBs architecture have been observed; among these variables, pH has taken relevance. The metabolic response of *E. coli* against acid and basic pH involves the use of deaminases and decarboxylases as well as importation and exportation of protons to extracellular space, the new state of homeostasis of the cell modifies the structure and size of IBs. Acid pH, below 6, and basic, above 8, propitiates aggregation, however, alkaline pH seems to favor IBs with a more relaxed architecture. The modification of these aggregates, from the fermentative process, could enable the production of IBs to specific applications as immobilized enzymes, tissue engineering scaffoldings or drug release systems, and reach the fermentative process design directed to these applications.

Keywords: pH, inclusion bodies, recombinant protein.

Introducción

E. coli fue aislada por primera vez en 1885, es un componente habitual de la microbiota de los mamíferos, usualmente inofensivo, y representa el modelo bacteriano utilizado por excelencia desde el inicio de la biotecnología (Kaper *et al.*, 2004; Meric *et al.*, 2016). Pese a que la industria biotecnológica ha puesto su atención en la producción de biofarmacéuticos complejos expresándolos en células animales, *E. coli* continua como el sistema microbiano más importante, ideal para la producción de proteína heteróloga que no requiera modificaciones postraduccionales

(Walsh, 2014; Walsh, 2018). El cultivo de *E. coli* es económico, pese a que la purificación de sus productos se torne problemática (Berlec & Strukelj, 2013), tiene un genoma ampliamente estudiado (Huang *et al.*, 2012), posee una alta tasa de duplicación y la posibilidad de alcanzar altas densidades celulares a partir de medios de cultivo económicos (Shiloach & Fass, 2005; Sezonov *et al.*, 2007; Rosano & Ceccarelli, 2014) así como altos rendimientos de proteínas heterólogas (Lee *et al.*, 2011), son características que hacen a *E. coli* un modelo atractivo para la producción de proteína

recombinante. Sin embargo, la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales con relevancia para la industria biotecnológica, limitan su elección a proteínas que conserven su actividad en ausencia de estas modificaciones, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón β e interferón γ , por mencionar algunos ejemplos, éstas proteínas se estima que abarcan el 40 % del mercado de biofarmacéuticos (Adrio y Demain, 2010; Zhang *et al.*, 2017).

La expresión de grandes cantidades de proteína recombinante (PR) trae consigo el problema de agregación proteica y la formación de cuerpos de inclusión (CI). Los CI son agregados electrodensos entre los 50–800 nm enriquecidos de proteína recombinante, hasta un 95 % (García-Fruitos & Villaverde, 2010). Los CI pueden contener proteínas tanto nativas como de respuesta al choque térmico, fosfolípidos de membrana y ácidos nucleicos (Rinas *et al.*, 2017). Pueden ser benéficos para el proceso productivo a gran escala, pues su formación constituye un paso de purificación por sí mismo, pero estos CI requieren ser desnaturalizados y pasar por un replegamiento para que la proteína recombinante recupere su conformación y posiblemente su actividad biológica (Ramón *et al.*, 2014).

La producción de proteína recombinante en *E. coli*, la formación de cuerpos de inclusión y el impacto sobre la arquitectura de los agregados que ejercen distintos factores abióticos como agitación, temperatura y, particularmente, pH durante la fermentación, son temas a tratar en el presente artículo.

Desafíos en la producción de proteína recombinante en *Escherichia coli*

El profundo conocimiento que se ha generado sobre la genética y fisiología de *E. coli* y la versatilidad de esta bacteria le permitieron adelantarse en la industria biotecnológica, a pesar de las limitaciones que presenta. Sigue siendo uno de los modelos más utilizados gracias a su alta velocidad de crecimiento, facilidad para trabajar y altos rendimientos de producto (Demain & Vaishnav, 2009). Las cepas más empleadas son derivadas de K-12 y BL21 (Terpe, 2006). Su velocidad de crecimiento no es equiparable con otros modelos usuales, con tiempos de duplicación de hasta 20 minutos en medios salinos adicionados con glucosa, que proporcionan un beneficio económico al ser sensiblemente menos costosos (Sezonov *et al.*, 2007; Rosano & Ceccarelli, 2014); altas densidades celulares mediante técnicas de lote alimentado, con concentraciones de biomasa en peso seco cercanas a los 150 g/L, o diálisis, hasta de 190 g/L (Shiloach & Fass, 2005); concentraciones de proteína recombinante superiores a 5 g/L (Rader & Langer, 2016) y un máximo reportado de 17.5

g/L (Lee *et al.*, 2011); y protocolos de transformación simples y extremadamente rápidos (Pope & Kent, 1996).

Sin embargo, *E. coli* es incapaz de realizar modificaciones postraduccionales, la ausencia de glicosilaciones, acilaciones y otras modificaciones afectan parámetros como la actividad biológica, función, estructura y vida media en algunas proteínas con fines farmacéuticos (Yin *et al.*, 2007; Baeshen *et al.*, 2015). Se estima que el 40 % del mercado de los biofarmacéuticos se compone de proteínas no glicosiladas, usualmente fabricadas en *E. coli* (Zhang *et al.*, 2017). El ambiente reductor en el citoplasma de *E. coli* impide la formación de puentes disulfuros en las proteínas, para evitarlo, se ha explorado el uso de cepas Origami, cepa que contiene mutaciones en la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*) y una gran capacidad para generar enlaces disulfuro en el citoplasma (Berkmen, 2012; Calcines-Cruz *et al.*, 2018).

Los aminoácidos suelen ser codificados por más de un codón y cada organismo presenta preferencia por ciertos codones y por lo tanto una mayor cantidad de ARN de transferencia (ARNt) para algún codón en específico puede ser un problema al expresar una proteína heteróloga en altas cantidades (Terpe, 2006). Codones como AGG y AGA, codificantes para arginina; CUA, para leucina; AUA, para isoleucina; CCC, para prolina y GGA, para glicina son comunes en las proteínas

humanas, pero raros en *E. coli*. La deficiencia de estos codones puede culminar en errores en la cadena peptídica, estancamiento de la traducción o hasta terminación prematura (Kurland & Gallant, 1996; Goldman *et al.*, 2006). Este problema se ha solucionado con la incorporación de plásmidos con los genes codificantes de ARNt o la mutación del gen de la proteína recombinante para que sea compatible con la reserva de ARNt usual de *E. coli* (Baeshen, 2015).

Las células tendrán que ser lisadas para obtener las proteínas, si son acumuladas en el citoplasma o periplasma. La ruptura libera componentes que pueden contaminar el producto y requerir purificación, siendo los lipopolisacáridos (LPS) la mayor fuente de contaminación (Mamat *et al.*, 2015). Este componente de la membrana celular puede desatar respuestas proinflamatorias en humanos (Yin *et al.*, 2007; Wells & Robinson, 2017). La industria farmacéutica ha ideado distintos procesos para la remoción de endotoxinas, como lo son la ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o centrifugación con gradientes de sacarosa (Petsch & Anspach, 2000).

Los cuerpos de inclusión en *Escherichia coli*

Proteínas mal plegadas o parcialmente plegadas tienden a ser problemáticas por su tendencia a agregarse, dirigida por la exposición de residuos de aminoácidos

hidrofóbicos que propician el plegamiento intramolecular hacia estructuras amorfas y, alternativamente, fibras tipo amiloide (Hartl *et al.*, 2011). Este fenómeno inicia inmediatamente después de la inducción de la expresión del gen heterólogo. Usualmente la velocidad de producción de la proteína recombinante sobrepasa la capacidad del sistema de control de calidad, por lo cual se ha considerado como el principal cuello de botella en el proceso de producción de proteínas recombinantes (Singh *et al.*, 2015). En el caso de los sistemas termoinducidos, el estrés adicional originado por la síntesis de las proteínas de choque térmico (HSP) contribuye a la aparición de CI. Además, la agregación es un fenómeno favorecido termodinámicamente, el cual ocurre de forma pasiva, mientras que la desagregación llevada a cabo por las chaperonas moleculares es un fenómeno dependiente de ATP (Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Hartl *et al.*, 2011; Rinas *et al.*, 2017). A pesar del desarrollo de algoritmos de predicción de agregación de proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos, no se ha logrado anticipar de manera precisa la tendencia a formar CI por las proteínas heterólogas en sistemas de alta productividad. Principalmente porque la solubilidad de las proteínas no es un fenómeno unifactorial dependiente únicamente de la secuencia de aminoácidos; factores como los niveles de chaperonas, proteasas, moléculas de alta energía, parámetros ambientales y hasta genética de la cepa, contribuyen a obtener

una mayor o menor agregación (de Marco *et al.*, 2019)

Existen dos modelos propuestos para describir la formación de los CI, sin existir un consenso de cuál es la teoría más probable. El primero establece la creación desde un solo o limitados sitios de nucleación termodinámicamente estables, a los cuales, la agregación de intermediarios mal plegados se verá favorecida (Kopito, 2000). El segundo modelo postula que los CI son producto de la formación de la agregación de agregados más pequeños (Upadhyay *et al.*, 2012).

Las diferencias estructurales de las proteínas que tenían la capacidad de agregarse y la ausencia de un patrón aparente concluyó en la errónea creencia que la formación de los CI era resultado de contactos intermoleculares no específicos (Ventura & Villaverde, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que la agregación sí es específica, dependiente de la secuencia y de interacciones estereoespecíficas, explicando la alta proporción de proteína recombinante presente en los CI (Morell *et al.*, 2008).

La formación de CI está ligada a respuestas fisiológicas de estrés celular y presentan un efecto negativo en la velocidad de crecimiento de la bacteria. Sin embargo, la exposición a células eucariotes o a organismos completos, vía oral o solución inyectada, no parece presentar efectos adversos; gracias a eso, se ha generado interés para formular materiales biocompatibles (de Marco *et al.*, 2019).

Históricamente, la concepción de los CI era de productos muy ricos en proteína heteróloga, cuyo estado de agregación la hace no funcional (Baneyx & Mujacic, 2004). Su estudio se centraba en generar estrategias para evitar su formación o en la desnaturalización de estos por agentes caotrópicos fuertes, como la urea o el cloruro de guanidinio, a pH alcalino y su posterior replegamiento, conocidos como CI clásicos (Tsumoto *et al.*, 2003; Singh & Panda, 2005). Durante los últimos diez años ha surgido y crecido un nuevo concepto que renovó el interés por los cuerpos de inclusión, el de CI no clásicos (Figura 1) (Peternel *et al.*, 2008). Las investigaciones alrededor de la estructura de los CI cambiaron el enfoque hacia un modelo más dinámico, donde su arquitectura, tamaño y composición se ve influido por las

condiciones del cultivo, que estos se encuentran en un constante ciclo de solubilización y agregación con los componentes del sistema de control de calidad y donde existen fracciones bien plegadas y biológicamente activas (González-Montalban *et al.*, 2007).

En los CI se presenta un desbalance entre los procesos de deposición, digestión proteolítica y desagregación proteica. Incluso, el arresto de proteína recombinante en células metabólicamente activas promueve la desintegración fisiológica de los CI. Para esta desintegración participan mecanismos de replegamiento proteico que llevan a las cadenas polipeptídicas a su estructura nativa, pero una fracción importante se desintegra por digestión proteolítica (de Marco *et al.*, 2019).

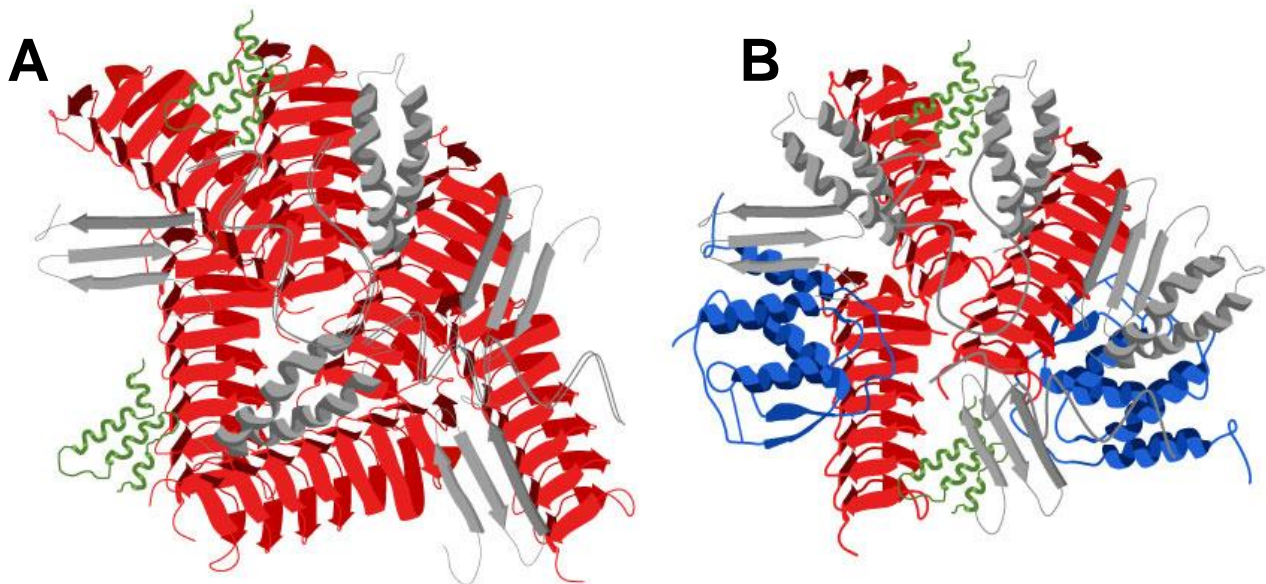


Figura 1. Representación gráfica de un cuerpo de inclusión clásico (A) y no clásico (B). Se marcan fibras tipo amiloide (rojo), proteína correctamente plegada (azul), intermediarios de plegamiento (gris) y proteínas de hospedero (verde). La menor presencia de fibras tipo amiloide y mayor cantidad de intermediarios de plegamiento favorecen la extracción de PR en los cuerpos de inclusión no clásicos.

Los CI poseen un esqueleto formado por fibras de tipo amiloide, hojas- β cruzadas que corren perpendicularmente a un eje, que le confieren estabilidad mecánica, resistencia a la degradación por proteínasa K y su carácter insoluble (Rambaran & Serpell, 2008). En los poros generados por el esqueleto amiloide se pueden encontrar estructuras secundarias desordenadas e incluso estructuras secundarias nativas, que pueden ser biológicamente activas y son sensibles a la degradación por proteínasa K (de Groot *et al.*, 2009; Cano-Garrido *et al.*, 2013). Los cuerpos de inclusión no clásicos han atraído la atención por su alta cantidad de proteína correctamente plegada que los dota de actividad biológica (Peternel *et al.*, 2009; García-Fruitos, 2010). Son agregados generalmente menos resistentes, sensibles al pH y capaces de desagregarse en condiciones no desnaturizantes, eliminando por completo la necesidad de diseñar operaciones para el replegamiento (Singh *et al.*, 2015). Su composición presenta una menor presencia de estructuras amiloides y predominan las estructuras α -hélice, lo cual representa en muchos casos una gran proporción de proteína correctamente plegada (Peternel *et al.*, 2008). Al igual que los CI clásicos, éstos pueden ser aislados mediante la ruptura de la membrana celular y su centrifugación, aprovechando que son materiales más densos que los componentes celulares. No obstante, se ha observado que los procesos de disrupción pueden afectar la

estructura de los CI, considerando la homogenización a alta presión como el método más benéfico en el aislamiento de CI no clásicos (Peternel & Komel, 2010).

Las condiciones de cultivo alteran la arquitectura de los CI

Los CI históricamente han sido concebidos como agregados muy ricos en proteína heteróloga pero sin actividad biológica (Baneyx & Mujacic, 2004). No obstante, estudios han demostrado que variables de cultivo como temperatura (de Groot & Ventura, 2006; Peternel *et al.*, 2008), pH (Strandberg & Enfors, 1991; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Calcines-Cruz *et al.*, 2018), agitación (Valdez-Cruz *et al.*, 2017) o tiempo de cultivo (Upadhyay *et al.*, 2012) pueden modificar las propiedades de los CI (Tabla 1), dando indicios que la arquitectura, tamaño y composición pueden ser optimizados, acorde a la aplicación, desde la fermentación (de Marco *et al.*, 2019; Slouka *et al.*, 2019). Se han evaluado distintas estrategias de cultivo con la finalidad de obtener cuerpos de inclusión catalíticamente activos o que puedan ser solubilizados en condiciones no desnaturizantes. En términos generales se ha observado que diferentes propiedades de los CI son modificadas mediante la variación de las condiciones de proceso. El tiempo de cultivo contribuye al incremento en el diámetro medio de los cuerpos de inclusión, llegando a un límite alrededor de los 700 nm (Upadhyay *et*

Artículos

al., 2012). Las bajas temperaturas (menores a 30 °C) favorecen la aparición de proteína correctamente plegada e incluso activa; de la misma manera, presentan menos impurezas y son solubilizadas más rápidamente, comparado con los que se formaron a temperaturas altas (Jevševar *et al.*, 2005; de Groot & Ventura, 2006). En los sistemas donde se involucran inductores químicos como IPTG, la tendencia se inclina a una disminución de la agregación y la formación de CI más pequeños y enriquecidos en

proteína recombinante, a concentraciones bajas de inductor (Luo *et al.*, 2006; Jhamb & Sahoo, 2012). Finalmente, las altas velocidades de agitación, conseguidas mediante agitación por resonancia acústica, producen CI menos resistentes a la proteólisis en contraste a los producidos mediante agitación orbital, y agregados de proteína difusos que podrían corresponder a CI nacientes (Valdez-Cruz *et al.*, 2017). Los efectos del pH sobre la producción de CI serán analizados en la siguiente sección.

Tabla 1. Influencia de distintos parámetros de cultivo sobre la producción y arquitectura de CI

Parámetro de cultivo	Efecto en el CI	Referencia
Temperatura	Las bajas temperaturas favorecen la presencia de proteínas activas y facilita su desnaturalización. Altas temperaturas favorecen la agregación de proteínas.	Jevševar <i>et al.</i> , 2005; de Groot & Ventura, 2006; Peternel <i>et al.</i> , 2008; Restrepo-Pineda <i>et al.</i> , 2019
Tiempo de cultivo	Tiempos de cultivo mayores pueden favorecer la agregación, incrementando el diámetro; de la misma forma, la afinidad por colorantes amiloides es mayor.	Upadhyay <i>et al.</i> , 2012; Castellanos-Mendoza <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2019
Concentración de inductor	Concentraciones bajas de inductor disminuyen la agregación y el diámetro y, en algunos casos, incrementa la proporción de proteína recombinante.	Luo <i>et al.</i> , 2006; Jhamb & Sahoo, 2012
Agitación	Altas velocidades de agitación (20 g) por resonancia acústica, disminuye la resistencia a la proteólisis y forma agregados de proteína difusos.	Valdez-Cruz <i>et al.</i> , 2017

Comportamiento de *Escherichia coli* ante las variaciones de pH: respuesta molecular y efecto en la formación de cuerpos de inclusión.

E. coli posee la capacidad de mantener su homeostasis en condiciones de pH extracelular (pH_o) que varían entre 5.5-9.0, mientras su pH intracelular (pH_i) se mantiene entre 7.4-7.8 (Martinez *et al.*, 2012). Las respuestas moleculares de *E. coli* a menudo están ligadas a diferentes tipos de estrés, el caso del estrés por pH no es la excepción. Un estudio transcriptómico observó que a pH_o 8.7 son activadas las respuestas mediadas por el regulón SOS (*recA* y *lexA*), la respuesta al choque térmico (*rpoH*) y la respuesta general de estrés (*rpoS*) (Maurer *et al.*, 2005); el consumo de glucosa se incrementa entre 2 a 2.5 veces, al igual que el coeficiente de mantenimiento, para hacer frente al estrés alcalino que viene acompañado frecuentemente por estrés osmótico (Wu *et al.*, 2014). Estas respuestas metabólicas asociados al estrés por pH_o alcalino se pueden agrupar en tres mecanismos diferenciados, i) proteínas de membrana encargadas de mantener la homeostasis en el gradiente de pH y osmótico, ii) catabolismo de aminoácidos y iii) reguladores transcripcionales (Cortés *et al.*, 2016).

La síntesis de ATPsintasa importadoras de protones se ve incrementada a pH alcalino, con la finalidad de reducir el gradiente de protones a través de la membrana celular

(Padan *et al.*, 2005); de la misma manera colabora el antiportador de sodio y protones, *NhaA*. Esta bomba incorpora un sensor de pH en su estructura formado por aminoácidos de carácter ácido que permiten o no la unión de tripsina, provocando un cambio conformacional que maximiza su actividad a pH 8.5 y tiene actividad nula por debajo de pH 6 (Karpel *et al.*, 1991; Padan, 2008). Existen otros antiportadores de cationes mono y divalentes que permiten la importación de protones en situaciones de estrés, como lo son *ChaA* y *MdfA*, e incluso porinas como *MalE*, *OmpA* y *OmpX* (Padan *et al.*, 2005; Stancik *et al.*, 2002). Cortés *et al.* (2016), encontraron que la producción de ácidos orgánicos se ve incrementada, comparando la producción a pH 7.2 vs 8.0. En los cultivos a pH alcalino, se expresan en mayor cantidad enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos, el amonio se volatiliza por las desaminaciones de los esqueletos carbonados (Stancik *et al.*, 2002). La triptofanasa *TnaA* es de los ejemplos más claros, al ser sobreexpresada entre 3-10 veces más si *E. coli* crece a pH cercanos a 9, comparadas contra *E. coli* a pH 7, *TnaA* es crucial para la desaminación de triptófano, serina y cisteína, posteriormente convertidos a piruvato (Cortés *et al.*, 2016). La descarboxilasa *GadA*, la cual, peculiarmente, es característica en la respuesta de estrés ácido para la liberación de iones amonio al medio; por otra parte, se encuentra también sobreexpresada por estrés alcalino. La

función de *GadA* se puede centrar en la formación de ácido γ -aminobutírico (GABA) a partir de glutamato, para que éste sea convertido a succinato en conjunto con la transaminasa *GabT*. *CysK*, la cisteína sintasa representa otra respuesta metabólica para el procesamiento de cisteína en O-acetil-L-serina y posteriormente piruvato (Stancik *et al.*, 2002; Krulwich *et al.*, 2011).

En el caso de valores de pH cercanos a 5, el periplasma se equilibra rápidamente con el medio, mientras que el citoplasma presenta una acidificación transitoria, posteriormente sucede la recuperación de pH citoplasmático a 7.4, siendo éste último su valor usual (Slonczewski *et al.*, 2009; Wilks & Slonczewski, 2007). Los sistemas fermentativos suplementados con glucosa, típicamente tienden a la acidificación del medio de cultivo durante la fase de crecimiento, mientras que la producción de proteína recombinante puede ocasionar sobrecarga metabólica, la cual incrementa la producción de acetato y contribuye a la disminución del pH (de Biase & Lund, 2015; Menart *et al.*, 2003). *E. coli* ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia ácida, entre ellos están el sistema oxidativo (AR1), glutamato dependiente (AR2), arginina dependiente (AR3) y lisina dependiente (AR4) (Foster, 2004).

Los sistemas oxidativos involucran la respuesta *RpoS* y el receptor de cAMP, CRP, por lo que la respuesta se encuentra inhibida

por glucosa, la inhibición por glucosa derivó en el descubrimiento, por serendipia, de los otros sistemas (Foster, 2004). Pese a ser el primer sistema descubierto, su mecanismo no se encuentra dilucidado (Aquino *et al.*, 2017). El sistema más eficiente es el AR2, consta de la participación de *GadA* y *GadB*, dos isoformas intracelulares de la glutamato descarboxilasa, que consume protones intracelulares para lograr la descarboxilación del glutamato, y *GadC*, una proteína integral de la membrana que realiza el intercambio de glutamato extracelular a GABA (Castanié-Cornet *et al.*, 2010). De la misma manera, los sistemas AR3 y AR4 dependen de la presencia de un aminoácido específico, la inducción de su enzima descarboxilasa y un antiportador. En el caso de AR3 se induce la actividad de la arginina descarboxilasa *AdiA*, que cataliza la conversión de arginina a agmatina, y el antiportador arginina/agmatina *AdiC* (Auger *et al.*, 1989). AR4 consiste en el sistema lisina/cadaverina con la descarboxilasa *LdcI* y el antiportador *CadB* (Kanjee & Houry, 2013). Los sistemas AR2, AR3 y AR4, cuya eficiencia se encuentra en ese mismo orden, pese a requerir la presencia de diferentes aminoácidos, trabajan a nivel citosólico, exportando los productos de las descarboxilasas al espacio periplásmico (de Biase & Lund, 2015). Los productos exportados actúan como bases fuertes que buscan la neutralización de los componentes ácidos del espacio extracelular (Castanié-Cornet *et al.*, 2010).

Durante la producción de proteína recombinante, existen estudios donde el pH es un factor a tener en cuenta para la formación y arquitectura de cuerpos de inclusión (Tabla 2). El decremento de pH menor a 5.5 parece propiciar la agregación de proteína recombinante, en contraste con cultivos con pH sostenido (7.0) (Strandberg & Enfors, 1991). En un estudio reciente Zhang *et al.* (2019), observó que tanto el estrés por pH ácido (≤ 5) y pH alcalino (≥ 8), induce la agregación de piruvato oxidasa recombinante, disminuyendo la actividad residual del extracto celular. El efecto campana también se ha apreciado en el tamaño de los cuerpos de inclusión, alcanzando un máximo a 7.2, sin embargo, el máximo título de proteína recombinante se alcanzó a pH 6.7 (Slouka *et al.*, 2018). La producción de proteína recombinante en pH alcalino puede ser una estrategia que permita la producción de CI con arquitectura más relajada, según lo conseguido en sistemas inducidos químicamente (IPTG). Castellanos-Mendoza *et al.* (2014), tomaron como modelo a una *E. coli* BL21-Gold (DE3) para la producción de una esfingomielinasa-D y encontraron que los cuerpos de inclusión producidos en reactores sin control de pH, que llegaron al final del cultivo a un pH de 8.4, fueron más sensibles a

la degradación por proteinasa K y solubilizados de mejor manera por soluciones de cloruro de guanidinio que sus contrapartes sintetizados a pH 7.5. Calcines-Cruz *et al.* (2017), usando una cepa de *E. coli* Origami (DE3) expresando una fosfolipasa-A, observaron, mediante Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), que la proporción de estructuras α -hélices era mayor en los cuerpos de inclusión en pH alcalino (8.5) y fueron más sensibles a la degradación por proteinasa K. Así mismo, se ha reportado que el pH alcalino activa la respuesta de choque térmico (HSR) estimulando la expresión de chaperonas moleculares, necesarias para la modificación de la arquitectura de los agregados proteicos y ayuda a la producción de proteína recombinante en sistemas con alta producción de acetato (Taglicht *et al.*, 1987; Maurer *et al.*, 2005 Wang *et al.*, 2014). Pese a que el pH intracelular no presenta modificaciones drásticas, el pH extracelular influencia en gran manera en la bioenergética celular, la importación de protones en pH básico y la exportación en pH ácido son ejemplo de ello; además de la estimulación de respuestas de estrés (Maurer *et al.*, 2005; Taglicht *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 2019).

Artículos

Tabla 2. Efectos observados en la formación y arquitectura de CI, utilizando el pH como parámetro de cultivo

pH	Efecto en el CI	Referencia
Cultivo sin control de pH, pH final 5.2	Decreció la fracción de proteína soluble cuando el pH alcanzó valores por debajo de 5.5, el título incrementó.	Strandberg & Enfors, 1991
Cultivo sin control de pH, pH final 8.4 vs pH controlado a 7.5	Los CI en cultivos que alcanzaron pH final 8.4, alcanzaron un mayor diámetro al final de la fermentación, fueron más susceptibles a la degradación proteolítica y solubilización por agentes caotrópicos.	Castellanos-Mendoza <i>et al.</i> , 2014
Cultivo a pH 6.5 vs 7.5 vs 8.5 en fase de inducción	A pH 8.5, los CI presentaron menor afinidad por colorantes amiloides, mayor susceptibilidad a degradación proteolítica, enriquecimiento de estructuras α -hélice y mayor rendimiento de PR, en contraste con el resto de condiciones plantadas.	Calcines-Cruz <i>et al.</i> , 2017
Cultivo a pH 6.7 vs 7.2 vs 7.7	Después de 6 horas de inducción, el nivel bajo de pH (6.7) favoreció el incremento en los títulos de pureza en CI, el pH 7.2, influenció en el incremento del diámetro.	Slouka <i>et al.</i> , 2018
Resuspensión de células a pH 5.0 vs 6.0 vs 7.0 vs 8.0 vs 9.0	El pH ácido, 5.0, y básico, 8.0 y 9.0 favorecieron la agregación de la proteína recombinante, la fracción insoluble se enriqueció conforme mayor fue el tiempo de cultivo.	Zhang <i>et al.</i> , 2019

Conclusiones

Actualmente, la tendencia indica que no existe una línea divisora entre qué proteínas pueden formar CI clásicos y cuáles no clásicos, en cambio, amplía la visión de que son agregados capaces de ser modificados acorde a las condiciones de cultivo, las cuales impactan en los atributos de calidad que serán expresados en los CI. Sin embargo, estos procesos de optimización han resultado dependientes de la proteína y la cepa utilizada. La formación de CI y adaptación de éstos mediante la experimentación de distintas técnicas de cultivo, cosecha y purificación han abierto las puertas a aplicaciones inimaginables a principios de siglo; su uso como enzimas inmovilizadas, andamiaje para ingeniería de tejidos o sistemas de liberación de fármacos son algunos de los nuevos enfoques que se han evaluado en los CI durante los últimos años. A pesar de la especificidad de resultados en cuanto a proteína producida y cepa utilizada, la adaptación de las condiciones de fermentación, en particular pH, es una alternativa prometedora para el desarrollo de procesos dirigidos a la producción de CI con arquitectura y tamaño necesario para aplicaciones específicas.

Agradecimientos

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,

(CONACYT 247473, 220795). Beca AMC XXVIII Verano de la Investigación Científica. Comisión de premios de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería 2018-2020.

Referencias

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng. Bugs*, 1(2), 116–131.
- Aquino, P., Honda, B., Jaini, S., Lyubetskaya, A., Hosur, K., Chiu, J. G., Ekladios, I., Hu, D., Jin, L., Sayeg, M.K., Stettner, A.I., Wang, J., Wong, B.G., Wong, W.S., Alexander, S.L., Ba, C., Bensussen, S.I., Bernstein, D.B., Braff, D., Cha, S., Cheng, D.I., Cho, J.H., Chou, K., Chuang, J., Gastler, D.E., Grasso, D.J., Greifenberger, J.S., Guo, C., Hawes, A.K., Israni, D.V., Jain, S.R., Kim, J., Lei, J., Li, H., Li, D., Li, Q., Mancuso, C.P., Mao, N., Masud, S.F., Meisel, C.L., Mi, J., Nykyfirchyn, C.S., Park, M., Peterson, H.M., Ramirez, A.K., Reynolds, D.S., Rim, N.G., Saffie, J.C., Su, H., Su, W.R., Su, Y., Sun, M., Thommes, M.M., Tu, T., Varongchakayul, N., Wagner, T.E., Weinber, B.H., Yang, R., Yaroslavsky, A., Yoon, C., Zhao, Y., Zollinger, A.J., Stringer, A.M., Foster, J.W., Wade, J., Raman, S., Broude, N., Wong, W.W., & Sayeg, M.K. (2017). Coordinated regulation

- of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.*, 11(1).
- Auger, E. A., & Bennett, G. N. (1989). Regulation of lysine decarboxylase activity in *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.*, 151, 466-468.
- Baeshen, M.N. (2015). Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7), 1–24.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, 22(11), 1399–1407.
- Berkmen, M. (2012). Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 82, 240-251.
- Berlec, A. & Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40(3–4):257–274
- Calcines-Cruz, C., Olvera, A., Castro-Acosta, R. M., Zavala, G., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2018). Recombinant-phospholipase A2 production and architecture of inclusion bodies are affected by pH in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 108, 826–836.
- Cano-Garrido, O., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Vázquez, E., Elizondo, E., Cubarsi, R., Seras-Franzoso, J., Corchero, J.L., Rinas, U., Ratera, I., Ventosa, N., Veciana, J., Villaverde, A., & García-Fruitós, E. (2013). Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies. *Acta Biomater.*, 9(4), 6134–6142.
- Castanié-Cornet, M.P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P., & Gutierrez, C. (2010). Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Res.*, 38(11), 3546-3554.
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., Garcia-Hernandez, E., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M.A., & Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 13, 1–14.
- Cortés, J. T., Flores, N., Bolívar, F., Lara, A. R., & Ramírez, O. T. (2016). Physiological effects of pH gradients on *Escherichia coli* during plasmid DNA production. *Biotechnol. Bioeng.*, 113(3), 598–611.

- de Biase, D., & Lund, P. A. (2015). The *Escherichia coli* Acid Stress Response and Its Significance for Pathogenesis. *Adv. Appl. Microbiol.*, 49–88.
- de Groot, N. S., Sabate, R., & Ventura, S. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends Biochem. Sci.*, 34(8), 408–416.
- de Groot, N.S., & Ventura, S. (2006) Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* 580:6471–6.
- de Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitós, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 43(1), 53–72.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 27(3), 297–306.
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(11), 898–907.
- García-Fruitós, E. (2010). Inclusion bodies: a new concept. *Microb. Cell Fact.*, 9(1).
- García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2010). Friendly production of bacterial inclusion bodies. *Korean J. Chem. Eng.*, 27(2), 385–389.
- Goldman, E., Rosenberg, A. H., Zubay, G., & Studier, W. F. (1995). Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 245(5), 467–473.
- González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2007). Recombinant protein solubility - does more mean better? *Nat. Biotechnol.*, 25(7), 718–720.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332.
- Huang, C-J., Lin, H., & Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39(3):383–399.
- Jevševar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., & Menart, V. (2005). Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol. Prog.*, 21(2), 632–639.

- Jhamb, K., & Sahoo, D.K. (2012). Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresour. Technol.*, 123, 135-143.
- Lee, M., Hseu, Y., Lai, G., Chang, W., Chen, H., & Huang, C. (2011). High yield expression in a recombinant *E. coli* of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development High yield expression in a recombinant *E. coli* of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful. *Microb. Cell Fact.*, 10(1), 56.
- Kanjee, U., & Houry, W. A. (2013). Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 67(1), 65–81.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2), 123–140.
- Karpel, R., Alon, T., Glaser, G., Schuldiner, S., & Padan, E. (1991). Expression of a sodium proton antiporter (NhaA) in *Escherichia coli* is induced by Na⁺ and Li⁺ ions. *J. Biol. Chem.*, 266(32), 21753–21759.
- Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.*, 10(12).
- Krulwich, T. A., Sachs, G., Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(5), 330-343.
- Kurland, C., & Gallant, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7(5), 489–493.
- Luo, J., Leeman, M., Ballagi, A., Elfving, A., Su, Z., Janson, J.C., & Wahlund, K.G., (2006). Size characterization of green fluorescent protein inclusion bodies in *E. coli* using asymmetrical flow field-flow fractionation-multi-angle light scattering. *J. Chromatogr. A*. 1120(1-2), 158-164.
- Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A.B., Lindner, B., Kohl, T.A., Corchero, J.L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S.R., Souvignier, C., Meredith, T.C., & Woodard, R.W. (2015) Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb. Cell Fact.*, 14(57).
- Martinez, K. A., Kitko, R. D., Mershon, J. P., Adcox, H. E., Malek, K. A., Berkmen, M. B., & Slonczewski, J. L. (2012). Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(10), 3706-3714.

- Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M., & Slonczewski, J. L. (2005). pH regulates genes for Flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12 †. *J. Bacteriol.*, 187(1), 304–319.
- Menart, V., Jevševar, S., Vilar, M., Trobiš, A., & Pavko, A. (2003). Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR, PL promoters from phage lambda. *Biotechnol. Bioeng.*, 83(2), 181–190.
- Méric, G., Hitchings, M. D., Pascoe, B., & Sheppard, S. K. (2016). From Escherich to the *Escherichia coli* genome. *Lancet Infect. Dis.*, 16(6), 634–636.
- Morell, M., Bravo, R., Espargaró, A., Sisquella, X., Avilés, F. X., Fernández-Busquets, X., & Ventura, S. (2008). Inclusion bodies: Specificity in their aggregation process and amyloid-like structure. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 1783(10), 1815–1825.
- Padan, E. (2008). The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na⁺-H⁺ antiporter. *Trends Biochem. Sci.*, 33(9), 435–443.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *BBA-Biomembranes*, 1717(2), 67–88.
- Peternel, Š., Gaberc-Porekar, V., & Radovan, K. (2009). Bacterial Growth Conditions Affect Quality of GFP Expressed Inside Inclusion Bodies. *Acta Chim. Slov.*, 59, 860–867.
- Peternel, Š., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V., & Komel, R. (2008) Engineering inclusion bodies for non-denaturing extraction of functional proteins. *Microb. Cell Fact.* 7(1):34.
- Peternel, Š., & Komel, R. (2010). Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 66.
- Petsch, D., & Anspach, F. B. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.*, 76(2–3), 97–119.
- Pope, B., & Kent, H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 24(3), 536–537.
- Rader, R. A., & Langer, E. S. (2016). Trends and developments in bioprocess technology. *Bioprocess. J.*, 14(4).
- Rambaran, R. N., & Serpell, L. C. (2008). Amyloid fibrils. *PRION*, 2(3), 112–117.
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: Not that

- bad... *Front. Microbiol.*, 5(56), 2010–2015.
- Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C.G., Valdez-Cruz, N.A., & Trujillo-Roldán, M.A. (2019) Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture on inclusion bodies. *Cell Stress Chaperones*. 24(4):777-792.
- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial inclusion bodies: Discovering their better half. *Trends Biochem. Sci.*, 42(9), 726–737.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5(APR), 1–17.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.*, 189(23), 8746–8749.
- Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.*, 23(5), 345–357.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb. Cell Fact.*, 14(1), 1–10.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(4), 303–310.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv. Microb. Physiol.*, 55, 1-79.
- Slouka, C., Kopp, J., Hutwimmer, S., Strahammer, M., Strohmer, D., Eitenberger, E., Schwaighofer, A., & Herwig, C. (2018). Custom made inclusion bodies: impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. *Microb Cell Fact.*, 17(1).
- Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O., & Herwig, C. (2019) Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 1143-1153.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., & Slonczewski, J. L. (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184(15), 4246–4258.

- Strandberg, L., & Enfors, S.O. (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1669–74.
- Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A. B., & Schuldiner, S. (1987). An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 169(2), 885–887.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(2), 211–222.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.*, 28(1), 1-8.
- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A., & Panda, A. K. (2012). Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 7(3), e33951.
- Valdez-Cruz, N. A., Caspeta, L., Pérez, N. O., Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. A. (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and / or pR promoters. *Microb. Cell Fact.*, 9(18), 1–16.
- Valdez-Cruz, N. A., Reynoso-Cereceda, G. I., Pérez-Rodríguez, S., Restrepo-Pineda, S., González-Santana, J., Olvera, A., Trujillo-Roldán, M. A. (2017). Production of a recombinant phospholipase A2 in *Escherichia coli* using resonant acoustic mixing that improves oxygen transfer in shake flasks. *Microb. Cell Fact.*, 16(1), 1–12.
- Ventura, S., & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.*, 24(4), 179–185.
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.*, 32(10).
- Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.*, 36, 1136-1145.
- Wang, H., Wang, F., Wang, W., Yao, X., Wei, D., & Cheng, H. (2014). Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PLoS One*, 9(11), 1–11.
- Wells, E., & Robinson, A. S. (2017). Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement. *Biotechnol. J.*, 12(1).

- Wilks, J. C., & Slonczewski, J. L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.*, *189*, 5601-5607.
- Wu, X., Altman, R., Eiteman, M. A., & Altman, E. (2014). Adaptation of *Escherichia coli* to elevated sodium concentrations production. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(9), 2880–2888.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.*, *127*(3), 335–347.
- Zhang, J., Lu, J., & Su, E. (2019). Soluble recombinant pyruvate oxidase production in *Escherichia coli* can be enhanced and inclusion bodies minimised by avoiding pH stress. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, *94*, 2661-2670.
- Zhang, Y. P., Sun, J., & Ma, Y. (2017). Biomanufacturing: history and perspective. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, *44*(4–5), 773–784.



www.smbb.com.mx