

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).

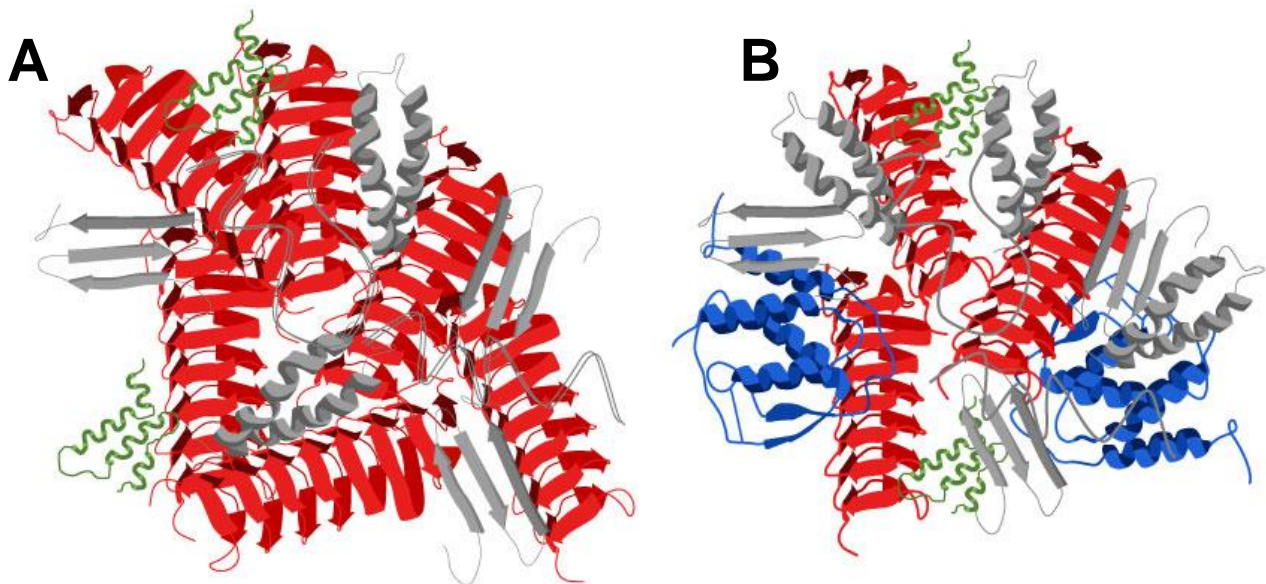


Figura 1. Representación gráfica de un cuerpo de inclusión clásico (A) y no clásico (B). Se marcan fibras tipo amiloide (rojo), proteína correctamente plegada (azul), intermediarios de plegamiento (gris) y proteínas de hospedero (verde). La menor presencia de fibras tipo amiloide y mayor cantidad de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