



Growth culture conditions and recovery method impact the yield of hyaluronic acid produced by genetically modified *Escherichia coli* strains

Las condiciones de cultivo y el método de recuperación impactan el rendimiento del ácido hialurónico producido por las cepas de *Escherichia coli* modificadas genéticamente

Jorge de Jesús Ramos-Sánchez¹, Escarlett González-Morales¹, Juan Carlos Ramírez-Vázquez¹, Froylán M. Espinoza-Escalante^{1,2*} 

¹Departamento de Biotecnológicas y Ambientales, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco 45120, Mexico.

²Dirección de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Lomas del Valle, Zapopan, Jalisco 45120, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: froymario@edu.uag.mx; froymario@gmail.com (F. M. Espinoza-Escalante)

Article history:

Received: 5 January 2023 / Received in revised form: 19 February 2023 / Accepted: 25 February 2023 / Published online: 1 April 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.2.17>

ABSTRACT

Hyaluronic acid is a biopolymer present in a wide variety of biological structures and it is implied in multiple biochemical processes, this is why it has been suggested its artificial use to treat several illnesses and, also in cosmetology. Nowadays, recombinant bacteria seem to be the key for the biotechnological production of this molecule since non-pathogenic strains can be used and, in some cases, it could be expected to increase the production yields. Given that culture conditions have an impact on the generation of any microbial metabolite, in this work, we looked for the best culture conditions in the bioreactor. Then, we present the bioengineering analysis of hyaluronic acid production by two genetically modified strains of *E. coli*. We tested two plasmids and three

physicochemical parameters in flasks. In this work, we demonstrated that the media composition, aeration, and the relation between agitation and volume, but the extra plasmid, impact the production of the biopolymer. Besides, it was determined the modified *E. coli* with genes *PmHAS* and *kfiD* is viable to produce up to 105 mg/L of hyaluronic acid in a culture media with a carbohydrate source, such as glycerol, and keeping an aeration ratio of 1.5 vvm. This last was corroborated using the carbazole method with modifications in the purification procedure of the produced acid.

Keywords: Glycerol; aeration; carbazole; plasmids.

RESUMEN

El ácido hialurónico es un biopolímero presente en gran cantidad de estructuras biológicas y tiene actividad en múltiples procesos bioquímicos, es por ello que se ha buscado utilizarlo de forma artificial para el tratamiento de diversos padecimientos o con fines cosméticos. Actualmente, las bacterias recombinantes parecen ser una alternativa altamente viable para la producción biotecnológica de esta molécula ya que se pueden utilizar organismos no patógenos y en algunos casos incrementar el rendimiento. Puesto que las condiciones de cultivo impactan significativamente la producción de cualquier metabolito, se buscó determinar las mejores condiciones de cultivo en el biorreactor. Por lo tanto, en este trabajo presentamos el análisis bioingenieril de la producción de ácido hialurónico utilizando dos cepas genéticamente modificadas de *E. coli*. Probamos dos plásmidos y tres parámetros fisicoquímicos en matraces. Además, se propone un nuevo método de extracción del ácido hialurónico. En este trabajo se demostró que la composición del medio, la aireación y la relación agitación/volumen, no así el plásmido extra, tienen impacto en la producción del biopolímero. Además, se pudo determinar que *E. coli* modificada con los genes *PmHAS* y *kfiD* es viable para producir hasta 105 mg/L de ácido hialurónico cuando el medio de cultivo contiene una fuente de carbohidratos, como el glicerol, y se mantiene una aireación de alrededor de 1.5 vvm; lo cual se corroboró utilizando el método del carbazol con una modificación de la purificación del ácido generado.

Palabras clave: Glicerol; aireación; carbazol; plásmidos.

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha llevado a la generación de una nueva era de moléculas industriales a partir de fuentes naturales las cuales se han denominado bioproductos. La gran diversidad de aplicaciones de estos productos y su éxito viene de la transformación de la investigación biotecnológica en el laboratorio hacia plataformas industriales por medio de la ingeniería de bioprocesos. En todo esto, los microorganismos juegan un rol importante al convertir las materias primas en productos útiles con alto valor comercial, social e higiénico. La mayoría de estos microorganismos debe ser modificado

genéticamente para incrementar los rendimientos. Un ejemplo de interés es la producción de ácido hialurónico (AH) el cual tiene múltiples aplicaciones médicas y cosméticas.

La producción industrial actual del AH puede clasificarse en tres grandes categorías: la producción proveniente de fuentes animales, la de células bacterianas y finalmente, por síntesis *in vitro* utilizando enzimas de origen bacteriano. Sin embargo, cada método de producción tiene inconvenientes los cuales están relacionados con bajas tasas de producción, daños del polímero tras su purificación y posibles contaminaciones, entre otros. Actualmente, las bacterias recombinantes parecen ser la mejor alternativa para la producción biotecnológica del AH ya que se pueden utilizar organismos no patógenos y, en algunos casos, incrementar el rendimiento de producción. Algunos de los organismos que se han utilizado incluyen *Enterococcus faecalis* (DeAngelis *et al.*, 1993), *Escherichia coli* (Woo *et al.*, 2019), *Bacillus subtilis* (Widner *et al.*, 2005), *Agrobacterium* sp. (Mao & Chen, 2007), *Lactococcus lactis* (Prasad *et al.*, 2010).

Los avances en el conocimiento de la fisiología de *E. coli* y en el desarrollo de herramientas moleculares han permitido la obtención de cepas diseñadas para mejorar la producción de proteínas recombinantes. En particular, la cepa BL21 (DE3) y derivados es preferida en el ámbito industrial ya que además de carecer de las proteasas Lon y Omp-t, lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante dentro de la bacteria, produce bajas cantidades de acetato (un subproducto metabólico altamente indeseable que inhibe el crecimiento), lo que resulta ampliamente atractivo a la hora de seleccionarla como organismo productor (Lara, 2011).

Puesto que las condiciones de cultivo impactan significativamente la producción de cualquier metabolito, y dado que se ha reportado previamente que la velocidad de agitación, la tasa de aireación, el esfuerzo cortante y el oxígeno disuelto influyen de manera importante en la producción de AH utilizando *E. coli* (Liu *et al.*, 2011); se buscó determinar las mejores condiciones de cultivo en el biorreactor. Se ha reportado que en los cultivos de *E. coli* se logran obtener mayores rendimientos de biomasa y producto en condiciones aerobias en comparación con la anaerobiosis (Lara, 2011). Además, que la producción de AH se incrementa con el incremento en la tasa de aireación y la velocidad de agitación (Hasegawa *et al.* 1999).

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de la aireación en el crecimiento y producción de ácido hialurónico utilizando cepas modificadas con los genes *PmHAS* y *kfiD*. Se ha sugerido que la coexpresión del gen que codifica para la enzima hialuronato sintasa de *Pasteurella multocida* (*PmHAS*) con el gen de la UDP-glucosa-6 deshidrogenasa (*kfiD*) permite optimizar la producción del AH (Mao & Chen, 2007). En investigaciones pasadas, se ha propuesto el uso del gen *kfiD*, favorece la formación del disacárido base para la síntesis del AH (Mao & Chen, 2007). Hoy en día, las plantas de producción más desarrolladas que utilizan bacterias tienen la capacidad de producir hasta 10-11 g/L, aunque esto implica una eliminación constante de AH, pues las

soluciones con concentraciones superiores a los 6-7 g/L se vuelven extremadamente viscosas (Oliveira *et al.*, 2016). Adicional a la mejora en la productividad, dos desarrollos tecnológicos que permitieron la viabilidad económica para fabricar AH por este método fueron la capacidad para producir esta molécula con dos pesos moleculares distintos dependiendo de su utilización y la capacidad de aislarlo con un grado de pureza farmacéutico a través de una purificación económica y eficaz (Li *et al.*, 2019).

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de crecimiento de dos cepas de *E. coli* modificadas genéticamente; una con un vector plasmídico para la expresión de las enzimas hialuronato sintasa (*PmHAS*) y UDP-6-glucosa deshidrogenasa (*kfiD*) y otra conteniendo un vector para la expresión únicamente de la enzima *PmHAS*. Además, diseñar un protocolo de extracción del AH producido por ambas cepas y determinar si hay diferencias en la producción de ambas cepas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Medio de cultivo y condiciones

Para su conservación, todas las cepas de *E. coli* (BL21 y las dos recombinantes) se cultivaron en medio sólido Luria-Bertani (LB) a una temperatura de 37 °C. Para la producción de biomasa, las cepas antes mencionadas se cultivaron en medio en líquido manteniendo la agitación a 200 rpm a la misma temperatura por 16 h. Para la transformación de las cepas se utilizó el medio de cultivo Super Optimum Broth (SOB) y el medio de cultivo Super Optimum Culture (SOC) descritos en el manual de Sambrook & Russell (2001), bajo las condiciones ya mencionadas.

2.2 Construcción de los vectores de expresión

Para la síntesis de AH se obtuvo la información del gen para la expresión de la enzima hialuronato sintasa de *Pasteurella multocida* (*PmHAS*) con secuencia de acceso AF036004 en GeneBank de la NCBI; la información del gen se optimizó para su expresión en *E. coli*. Además, se obtuvo la información del gen *kfiD* con secuencia de acceso NC_002163.1 del mismo GeneBank de la NCBI. Se realizó la construcción *in silico* de dos vectores pUC57 los cuales contuviesen solo el gen *PmHAS* o ambos genes (*PmHAS* y *kfiD*). El primer plásmido (Eco41) se generó utilizando solo el gen *PmHAS*, mientras que el segundo incluyó además el gen *kfiD* (Eco4142). En ambos casos, los genes quedaron flanqueados por el promotor T7 y el terminador T7. Los dos plásmidos fueron sintetizados por la empresa GenScript conteniendo el gen *AmpR* como marcador de selección.

2.3 Transformación y verificación de las construcciones

Se prepararon y transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21 siguiendo los procedimientos estándar (Sambrook & Russell, 2001) utilizando cada uno de los

plásmidos construidos (Eco41 y Eco4142); las cepas se nombraron EchAS y EchASKD; estas se crecieron en medio LB a 37 °C con carbenicilina (50 µg/mL) durante 16 h a 180 rpm. Se indujo la expresión con el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se dejaron 4 horas más. Las células se cosecharon por centrifugación a 13,000 g por 10 minutos y se procesaron para verificar expresión de los plásmidos y la correcta construcción de los mismos.

Para una verificación rápida, se realizó una PCR de ambos plásmidos extraídos utilizando el kit de minipreparación de plásmidos Thermo Scientific GeneJET para amplificar el gen *PmHAS*. Los primers utilizados fueron (5'-AACATCAGCACGTCGGTC-3') el forward y (5'-CGCCATATCACAGTCCAGCA-3') el reverse, amplificando un fragmento de 293 pb. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL y se utilizaron condiciones estándar. Las muestras se observaron en un gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89mM, Na₂EDTA 10mM y H₃BO₃ 89 mM) a 90 V por 40 min. Para comprobar la correcta construcción e identidad de ambos plásmidos se realizó una doble digestión enzimática. Las muestras se observaron nuevamente en un gel con el mismo buffer y condiciones utilizadas previamente.

La producción de la enzima hialuronato sintasa se corroboró con el método de electroforesis en gel (SDS-PAGE) de acuerdo con el método descrito por Sambrook y Russell (2001).

2.4 Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa

Para evaluar el crecimiento de las cepas de *E. coli* modificadas se siguió un diseño experimental mixto (Mezclas – Factorial). La parte de mezclas se generó siguiendo un diseño de mezclas Simplex-Centroide con tres ingredientes: extracto de levadura (EL), extracto de carne (EC) y glicerol (G); las cantidades de cada ingrediente se muestran en la Tabla 1. Se dejó fija la concentración de cloruro de sodio en 10 g/L. La parte factorial se generó utilizando dos variables: la cepa, codificada como 1 y 2 para EchAS y EchASKD, respectivamente; y la condición de agitación, considerando 0 para la condición estática (sin agitación) y 1 para la condición de agitación a 200 rpm. En todos los casos la temperatura de incubación fue de 37 °C. El volumen de trabajo fue de 50 mL con inóculos de 3 % utilizando una concentración inicial fija y matraces de 150 mL. El crecimiento de las cepas se siguió durante 24 h tomando muestras cada hora y se contrastó con el de la cepa nativa en medio LB. La variable de respuesta experimental fue la proporción de crecimiento en cada condición contra la condición de crecimiento en condiciones estándar. El análisis estadístico de los datos y la obtención del modelo de regresión se realizó con el software Statgraphics XVIII.

La mejor condición de crecimiento se determinó utilizando el procedimiento de regresión de pasos hacia adelante (Neter *et al.*, 2005) con la composición porcentual de los tres ingredientes del medio.

El medio obtenido fue nombrado Mex2. Finalmente, se realizó una curva de crecimiento con condiciones típicas (37 °C y 200 rpm) en el medio Mex2 y se determinaron las velocidades de crecimiento de EchAS y EchASKD utilizando la ecuación estándar: $\mu = \ln(X_2 - X_1)/(t_2 - t_1)$; donde X es la densidad óptica y t es el tiempo en horas. Los ensayos para determinar el efecto de las condiciones de cultivo se realizaron únicamente con la cepa EchASKD, con excepción de la etapa de cultivo e inducción de expresión.

Tabla 1. Diseño de mezclas para la producción de biomasa utilizando tres ingredientes

Table 1. Mixture design for biomass production using three ingredients

Mezcla	Concentración (g/L)			Composición (%)		
	Extracto de levadura	Extracto de carne	Glicerol	Extracto de levadura	Extracto de carne	Glicerol
1	14	6	0	70	30	0
2	6	14	0	30	70	0
3	14	3	3	70	15	15
4	3	14	3	15	70	15
5	14	0	6	70	0	30
6	0	14	6	0	70	30
7	8.5	8.5	3	42.5	42.5	15

2.5 Efecto de aireación en el crecimiento bacteriano

Para evaluar el efecto de la relación entre la velocidad de agitación, el volumen de cultivo y la aireación sobre el crecimiento se utilizó la cepa EchASKD y medio Mex2. En este caso se utilizaron matraces de 2 L y bombas de aire marca Otto con mangueras de silicona Masterflex; el flujo de aire se ajustó según se requirió. En el primer grupo de experimentos se probaron dos volúmenes de medio (100 y 300 mL) y dos velocidades de agitación (50y 200 rpm). Mientras que en el segundo grupo de experimentos se probaron flujos de aireación equivalentes a 0.75, 1.5 y 2 vvm manteniendo una agitación orbital de 100 rpm; el aire fue esterilizado con filtros de 0.20 μm . En ambos casos la incubación se llevó a cabo a 37 °C y se tomaron muestras de cultivo cada hora para medir la densidad óptica a 600 nm, esto con el fin de calcular tasas de crecimiento.

2.6 Producción y recuperación de ácido hialurónico

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de agitación y aireación se realizó una curva de crecimiento para determinar los tiempos de las fases de crecimiento. Para cada cepa se preparó un preinóculo con 50 mL de medio, mismo que se incubó durante 14 h a 37 °C, 200 rpm y 1.5 vvm. Posteriormente, se inocularon los

matraces que contenían 447 mL de medio Mex2 y se dejaron crecer durante 6 h. Seguido se realizó la inducción de expresión de genes con IPTG a una concentración final de 1mM en el medio y se continuó el cultivo por 18 h más.

Una vez concluido el tiempo de cultivo se procedió a la recuperación del ácido hialurónico con base en información de trabajos previos (Cowman *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2010) utilizando los mismos solventes de la purificación de DNA. Esto es, se tomaron muestras de 1 mL de medio de cultivo y se centrifugaron a 13,000 g por 5 min. Cada pastilla celular fue resuspendida en 1mL de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 2.5 %, se homogeneizó y dejó reposar durante 10 min. Pasado este tiempo, la suspensión se centrifugó a 8,000 g durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó 1 mL de etanol absoluto y se mezcló por inversión hasta observar precipitados. Enseguida, la mezcla se centrifugó a 13,000 g por 5 min. Se eliminó la fase acuosa y la pastilla formada se resuspendió en 500 µL agua inyectable y se agregaron 500 µL de mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) para separar restos de proteínas. Finalmente, la muestra se agitó por inversión y se centrifugó a 10,000 g durante 5 min.

En las muestras se formaron 4 fases. Se recuperaron las fases acuosas (superiores) evitando arrastrar componentes de las fases inferiores (orgánicas). La porción recuperada se lavó con 500 µL cloroformo-isoamílico (24:1); se agitó por inversión y se centrifugó a 10,000 g por 5 min. Finalmente, se precipitó el AH con alcohol absoluto en relación 1:2, muestra-etanol, y se centrifugó a 13,000 g por 5 minutos para obtener una pastilla, la cual fue resuspendida en 500 µL agua inyectable para cuantificar el ácido recuperado.

El ácido precipitado se cuantificó por el método del carbazol descrito por McCready & McComb (1952). Se tomaron tubos de ensayo previamente enfriados a 4 °C en los cuales se colocaron 3 mL de solución de tetraborato de sodio (0.025 M en ácido sulfúrico concentrado) y 0.5 mL de la muestra. El contenido se homogeneizó tres veces con apoyo de un equipo vortex, hasta detener la reacción exotérmica. A continuación, los tubos se llevaron a un baño de agua hirviendo y se dejaron reaccionar por 10 minutos; luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Enseguida, a cada tubo se les agregó 0.1 mL de solución de carbazol (0.125 % disuelto en etanol absoluto y enfriado a 4 °C desde una noche antes). Se repitió el proceso de homogenización y calentamiento. Una vez las muestras se encontraban a temperatura ambiente se leyeron las absorbancias a 530 nm. Se utilizó un blanco de agua inyectable, el cual fue tratado de forma igual que las muestras. La concentración de ácido hialurónico se calculó utilizando una curva patrón preparada con ácido hialurónico puro (Merck Cat. 53747) en concentraciones desde 10 a 200 µg/mL.

3. RESULTADOS

3.1 Verificación de transformaciones

En la Figura 1 se pueden observar los productos obtenidos tras la realización de la PCR. En los dos casos los tamaños obtenidos son de 293 pb, lo cual indica una correcta amplificación y nos da un primer indicio de la presencia del gen *PmHAS* en ambas construcciones. Este amplicón fue seleccionado por ser una región conservada del gen que permite diferenciarlo en mayor medida de otros similares.

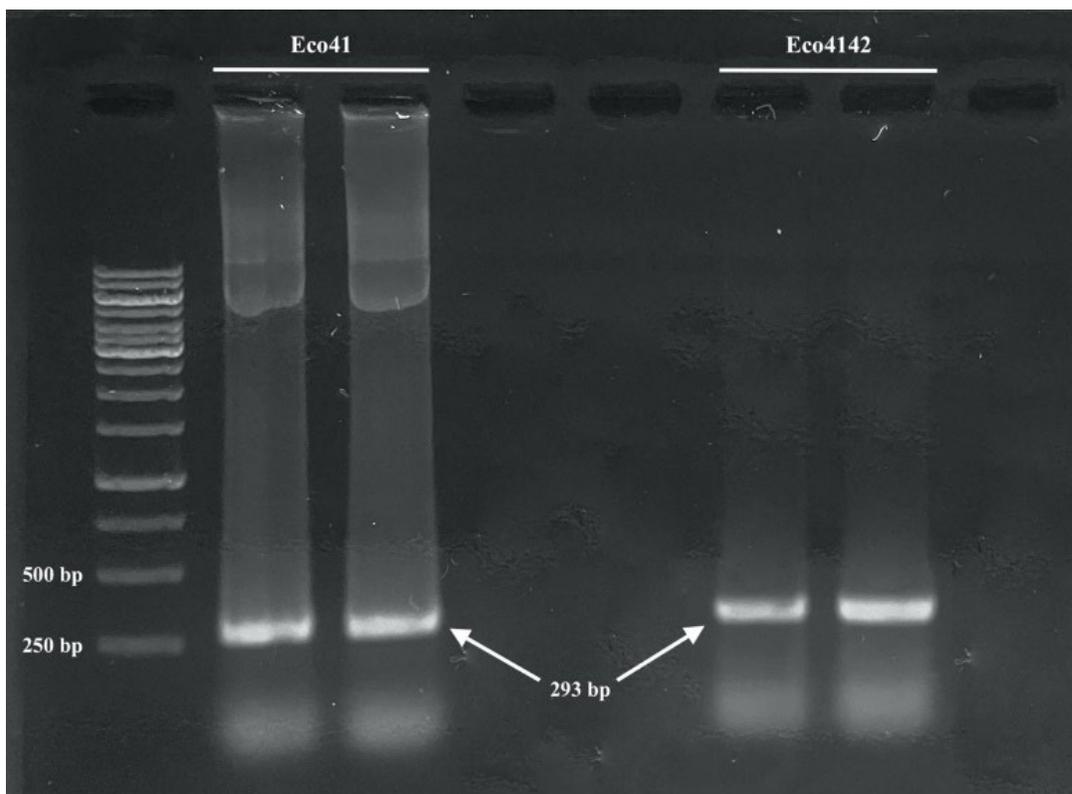


Fig. 1. En la imagen se muestran los amplicones tras la reacción de PCR para ambos plásmidos; las bandas observadas poseen el tamaño esperado en ambos casos.

Fig. 1. In this image are shown the amplicons after the PCR reaction for both plasmids; the observed bands correspond to the expected size in both cases.

En la verificación por digestión enzimática para el plásmido Eco41 se observaron dos bandas, aquella que correspondía al vector (pUC57) con un fragmento del gen *PmHAS* (4,760 pb) y el correspondiente al fragmento restante del gen *PmHAS* (984 pb). Asimismo, el plásmido Eco4142 mostró el patrón esperado tras las simulaciones. Se observó una banda con un tamaño cercano a las 6,000 pb el cual empataba con el tamaño del vector más el *PmHAS* (5,744 pb), ya que al usar *HindIII* para cortar la enzima reconoce un sitio de restricción en un extremo del vector dejando al *PmHAS* unido al fragmento mayor; la otra banda obtenida (1,369 pb) es la correspondiente al gen *kfiD* (Fig. 2).

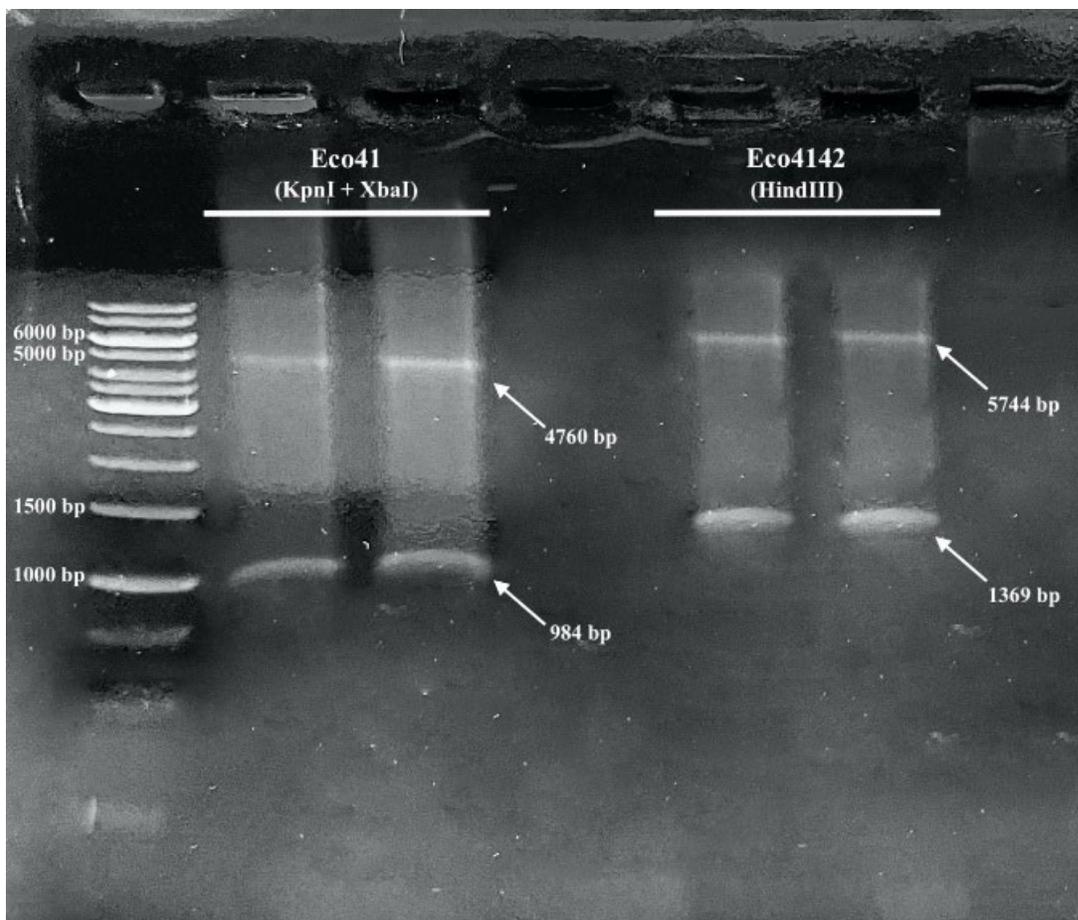


Fig. 2. Bandas de digestión de los plásmidos Eco41 y Eco4142 utilizando enzimas de restricción.

Fig. 2. Digestion bands of the plasmids Eco41 and Eco4142 using restriction enzymes.

Se pudo determinar, además, la producción de la hialuronato sintasa por medio de la recuperación de las tres fracciones proteicas y su análisis en el gel SDS-PAGE, el cual dio como resultado bandas cercanas a las 111 kDa que se corresponden con el tamaño de la enzima en cuestión.

3.2 Diseño de un medio de cultivo y evaluación del crecimiento de las cepas recombinantes

Se evaluaron las velocidades de crecimiento bajo las condiciones típicas de laboratorio para *E. coli* (200 rpm y 37 °C) en medio LB. Los resultados obtenidos permitieron determinar las velocidades de crecimiento para las tres cepas: 0.6831 ± 0.0005 , 0.4565 ± 0.0010 , $0.4642 \pm 0.0004 \text{ h}^{-1}$, la nativa, la EchAS y la EchASKD, respectivamente.

En la evaluación de las diferentes formulaciones del medio de cultivo el análisis estadístico arrojó que todos los ingredientes fueron estadísticamente significativos ($p <$

0.05) para describir el crecimiento de las cepas estudiadas (EcHAS y EcHASKD). Siendo el extracto de carne el componente más importante de la mezcla; al incrementarse su concentración se incrementó considerablemente el crecimiento de las dos cepas. Dado que el tipo de cepa no mostró efectos significativos, la variable se retiró del modelo.

El análisis de regresión permitió formular la siguiente ecuación (Ec. 1) que describe la relación de densidad óptica lograda al cambiar las condiciones de cultivo:

$$DO_{600} = 0.0388*EC + 0.0005*EL *G - 0.0091*EC*A - 0.0002*EC*EC \quad (\text{Ec. 1})$$

donde las concentraciones de cada componente (en %) se abrevian como EC (extracto de carne), EL (extracto de levadura) y G (glicerol), mientras que A representa la agitación (0: estado estático y 1: agitación estándar). Este modelo tiene un buen ajuste ($R^2 = 0.9721$ y $p < 0.0001$) con un error estándar de 0.2264, lo que sugieren que la ecuación 1 es útil para predecir la densidad óptica esperada en función de la composición del medio de cultivo (en %) y las condiciones de agitación. Se mantiene el % de composición ya que permite tener valores más grandes en las constantes del modelo.

Utilizando la ecuación 1 se puede determinar que la acumulación de biomasa (DO_{600}) de cualquiera de las dos cepas modificadas en un medio que contenga en (%): EC, 80; EL, 5; G, 15, o bien, en (g/L): EC, 16; EL, 1; G, 3 con adición de 10 g/L de NaCl y conservando la agitación a 200 rpm será igual al crecimiento observado en medio LB, *i.e.* $DO_{600} \approx 1.13$. Dicho crecimiento se puede incrementar en 30 % al incrementar el contenido de glicerol a 50 % (10 g/L) y disminuir el contenido de extracto de carne a 20 % (4 g/L) y el extracto de levadura a 30 % (6 g/L). Utilizando estas condiciones se crecieron todas las cepas y se corroboró la predicción del modelo.

3.3 Efecto de la aireación en el crecimiento de la cepa recombinante Eco4142

Dados los resultados anteriores se determinó que la agitación es un factor importante para el crecimiento de las cepas recombinantes de *E. coli*. Por ello, se evaluó el efecto de la relación velocidad de agitación orbital/volumen de trabajo en medio Mex2 utilizando un diseño factorial 2^2 , utilizando como variables de proceso la velocidad de agitación orbital (50 y 200 rpm) y el volumen de cultivo (100 y 300 mL).

La combinación 50 rpm/100 mL dio como resultado una velocidad de crecimiento de $0.5243 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$, mientras que en la combinación 50 rpm/300 mL se obtuvo una tasa de $0.2684 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$, *i.e.* casi la mitad de velocidad. El efecto observado puede ser contrarrestado al subir la velocidad de agitación, como se observa con la velocidad de crecimiento alcanzada en la combinación 200 rpm/300 mL de $0.7765 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$.

Para evaluar el efecto de la aireación en el crecimiento de las cepas de *E. coli* se evaluaron tres relaciones de aireación: 0.75, 1.5 y 2.25 vvm. Se pudo observar que la

mayor tasa de crecimiento ($0.5512 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) se logró en 1.5 vvm, mientras que se obtuvo un valor similar ($0.5026 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) a 2.25 vvm. El valor más bajo en la tasa de crecimiento ($0.3411 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) se observó a 0.75 vvm.

3.4 Determinación de la cantidad de AH producido

Se buscó el punto de inducción con IPTG (punto de transición entre la etapa exponencial y la etapa estacionaria de crecimiento) para la producción de hialurónico siguiendo la curva de crecimiento de las cepas. Para ello se cultivaron en el medio Mex2 a 100 rpm, 1.5 vvm y 37 °C. Se siguió la cinética durante 9 h y se determinó el tiempo de 5 h como el mejor para adicionar el inductor y promover la producción de ácido hialurónico. Las tres cepas bajo estudio se cultivaron en las mismas condiciones para extraer y cuantificar el AH producido.

Se utilizó la técnica espectrofotométrica del carbazol para cuantificar la cantidad de AH producido por cada una de las cepas productoras en las condiciones antes mencionadas, además de un control en medio LB. El rendimiento se cuantificó en el orden de los $\mu\text{g/mL}$. Los resultados obtenidos permitieron calcular una concentración final de $105 \pm 0.20 \text{ mg/L}$ utilizando la cepa EchASKD en medio Mex2 contra 60 mg/L en medio LB; mientras que con la cepa EchAS se produjeron $81 \pm 0.18 \text{ mg/L}$ en medio Mex2.

4. DISCUSIÓN

Se demostró que las cepas de *E. coli* recombinantes que se generaron en este trabajo expresan adecuadamente las proteínas para las cuales se prepararon al introducir los plásmidos correspondientes. En este trabajo el diseño de los plásmidos de inducción para la producción de AH se basó en el vector pUC57, ya que este genera un número considerable de copias (500-700 copias/célula); no obstante, es importante considerar que un número de copias elevado no se traduce necesariamente en una mayor producción de AH. La implementación de este vector en conjunto con un organismo de alta tasa de crecimiento (*E. coli* BL21), podría compensar la disminución en el número de células sanas para la síntesis de proteínas pudiendo favorecer la producción y obteniendo buenos rendimientos de AH (Rosano & Ceccarelli, 2014). La utilización del promotor T7 en conjunto con el represor *LacI* del operón *Lac* asegura la expresión de las proteínas introducidas en el plásmido únicamente en presencia del inductor (Swint-Kruse & Matthews, 2013).

Es importante notar que se ha reportado que las cepas BL21(DE3) tienden a tener tasas de crecimiento por debajo del promedio, con respecto a las cepas nativas, aun cuando se les agregan fuentes de carbono y, sobre todo, cuando la fuente de carbono no es glucosa. No obstante, se ha reportado que esta cepa crece bien en medios con glicerol (0.4 %) con tasa de crecimiento máxima observada de alrededor de 0.4 h^{-1} (Paliy & Gunasekera, 2006). Un resultado igual fue reportado por Christensen y Eriksen (2002)

al utilizar dos cepas de *E. coli* BL21 conteniendo vectores de expresión de proteínas en dos diferentes construcciones con glucosa o glicerol como sustratos. En este trabajo, la velocidad obtenida fue de 0.6831 h^{-1} , para la cepa nativa, equiparable a lo reportado por Baez y Shiloach (2013) para *E. coli* MG1655 (0.717 h^{-1}) y, la mayor tasa de crecimiento para las cepas recombinantes fue de 0.55 h^{-1} . En vista de lo anterior, se puede considerar que el medio generado es adecuado para la producción de biomasa. Mientras que la presencia de los plásmidos Eco41 o Eco4142 parece no afectar el crecimiento de las cepas, sí lo hacen las condiciones de aireación del medio.

El estudio de la tasa de aireación (en vvm) permitió determinar que en la tasa menor (0.75) el crecimiento de las cepas se vio reducido en alrededor de 40 % con respecto a las tasas más altas (1.5 y 2.25). Según Soini *et al.* (2008) el oxígeno disuelto total en los matraces es casi nulo en sistemas de producción como los matraces agitados (el caso de este trabajo), aun a bajas concentraciones celulares. Es probable que la menor tasa evaluada en este estudio limitara el oxígeno disponible provocando una disminución en el crecimiento microbiano tal como observó Studier (2005), quien además reporta que a mayores tasas de aireación se requieren mayores cantidades de inductor en cepas recombinantes. Esto último podría explicar las bajas tasas de producción de ácido hialurónico mostrado en este reporte en comparación con otros trabajos; sin embargo, no fue posible determinar cómo impactó la aireación en los otros trabajos relacionados. Hasta donde hemos podido corroborar, este es el primer trabajo que analiza el efecto de la aireación en la producción de ácido hialurónico. Por lo tanto, es importante considerar que se requiere más trabajo para dilucidar el efecto metabólico de la aireación, la presión y la temperatura de trabajo sobre la producción de esta biomolécula. De hecho, Campani *et al.* (2016) sugieren que la presurización del reactor es crucial para alcanzar valores de productividad y eficiencia energética competitivos en la producción de proteínas recombinantes utilizando *E. coli*.

En lo que respecta a la producción del AH, la mayor concentración reportada para una cepa recombinante de *E. coli* es de 3.8 g/L (Mao *et al.*, 2009). Aun cuando la mayor concentración obtenida en este trabajo (105 mg/L) es inferior a la reportada por Mao *et al.* (2009), otros trabajos con *E. coli* recombinante reportan producciones en un rango similar al de este trabajo; por ejemplo, Yu & Stephanopolous (2008) reportan una concentración de 190 mg/L de AH al utilizar un reactor de lote alimentado, mientras que Jongsareejit *et al.* (2007) reportan 32.5 mg/L de AH al utilizar un reactor por lote; en ambos trabajos se utilizó medio LB como sustrato. En este punto es importante notar que la cepa BL21 desvía parte de su metabolismo a la producción de acetato cuando se encuentra en condiciones de exceso de glucosa (fuente de carbono del medio LB), presumiblemente debido a un desbalance entre las rutas catabólicas y anabólicas (Christensen & Eriksen, 2002; Li *et al.*, 2014; Studier, 2005). Por lo anterior, se ha estudiado y sugerido el uso de glicerol como fuente de carbono para la cepa BL21 ya que al usar esta triosa es posible reemplazar con lactosa al inductor de expresión IPTG, además de evitar la producción de acetato como metabolito secundario (Kilikian *et al.*, 2000; Neubauer *et al.*, 1992; Studier, 2005). En este trabajo, el uso de glicerol en el medio de cultivo ha permitido lograr tasas de crecimiento comparables a otros trabajos

con la misma cepa recombinante y, en su caso, ha permitido explorar alternativas en los componentes del medio de cultivo para la producción de metabolitos de interés industrial como el ácido hialurónico. Aunque no hemos probado la inducción con ácido láctico, consideramos que la exploración de esto último aunado con la búsqueda de nuevos componentes en el medio de cultivo siguiendo la metodología de diseño experimental mixto (mezclas factorial) podría representar una alternativa para disminuir grandemente los costos de producción del AH a escala industrial.

No obstante, lo anterior permite resaltar la importancia de los factores fisicoquímicos y método de cultivo en la producción de AH. Los trabajos de Yu & Stephanopolous (2008) y Mao *et al.* (2009) utilizan un reactor por lote alimentado y reportan mayores rendimientos que cuando se utilizó un reactor por lote, este trabajo y el de Jongsareejit *et al.* (2007); esto pone de manifiesto la importancia de la configuración del reactor en la producción de biomoléculas como el AH. También es remarcable la importancia del sustrato para la producción del AH; en el trabajo de Mao *et al.* (2009) utilizaron glucosa (45 g/L) y glucosamina (11.5 g/L) como sustratos; este último, precursor del ácido hialurónico. Es el mismo caso de Jongsareejit *et al.* (2007) y Yu & Stephanopolous (2008), quienes utilizaron glucosa como sustrato, sin embargo, sus producciones son más cercanas a la reportada en este trabajo. Esto puede implicar que la diferencia en rendimientos la provoca la presencia del precursor glucosamina en el medio. No obstante, da pie a investigar más a fondo la configuración de reactor más adecuada, el flujo metabólico, los sustratos, entre otros muchos factores para la producción de un metabolito de interés comercial como el AH utilizando cepas recombinantes.

Por otro lado, es de gran importancia encontrar formas de extracción, recuperación y cuantificación del AH que permitan determinaciones más precisas. Los métodos actuales, como el del carbazol, aún presentan una serie de desventajas a saber; por ejemplo, la interferencia de los cloruros residuales, los cuales provocan coloración marrón en las muestras impidiendo su correcta lectura, esto según lo reportado por Pires *et al.* (2010) quienes utilizaron *E. coli* para la producción de AH y cuyo método de recuperación implica su precipitación con etanol absoluto y lavados posteriores con cloruro de sodio a bajas concentraciones. Por otro lado, también Oueslati *et al.* (2014) describen problemas con los cloruros al utilizar el método de carbazol y proponen su cuantificación utilizando una precipitación con bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), lo cual consideran disminuye significativamente las múltiples interferencias fisicoquímicas observadas en el método original. Dada la sensibilidad del método del carbazol, Suárez *et al.* (2021) reportan la cuantificación por medio de cromatografía de exclusión por tamaño con un rango de medición entre 100 y 1000 mg/L y, Wang *et al.* (2019) describen el desarrollo de un método de cuantificación utilizando un análisis de espectrometría de movilidad diferencial con electro aspersion (ES-DMA). Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de encontrar alternativas viables a la determinación de este compuesto. En este trabajo propusimos un método con buenos resultados, sin embargo, aun requiere ser validado en trabajos posteriores. En este caso, se utilizó el método del carbazol que es común y sencillo de aplicar, pero eliminamos las múltiples interferencias utilizando solventes en pequeñas cantidades. Con este proceso es

posible separar eficientemente el AH de otras biomoléculas, sobre todo en trabajos exploratorios de producción del polímero sin incurrir en los costos asociados a técnicas más sofisticadas.

En este trabajo hemos reportado el efecto de la aireación en la producción de AH utilizando dos cepas recombinantes de *E. coli* BL21. Pudimos determinar que la condición más adecuada para su producción en matraz agitado está alrededor de 1.5 vvm. Además, se observó que aun cuando solo se requiere el gen *PmHAS*, la inclusión del gen *kfiD* favorece la producción del biopolímero al utilizar glicerol como fuente de carbono en un medio complejo. Finalmente, reportamos una técnica alternativa para la extracción y purificación del AH, la cual facilita el trabajo analítico en laboratorio, sobre todo en las etapas preliminares de experimentación. Consideramos que *E. coli* es una cepa con viabilidad para producir AH, aunque se requiere más trabajo para determinar el impacto específico de la aireación, y el uso de ácido láctico como inductor para que esta bacteria pueda convertirse en una productora a nivel industrial.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Baez A. & Shiloach J. 2013. *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese superoxide dismutase. *Microbial Cell Factories*. 12: 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>

Campani G., Possedente dos Santos M., Gonçalves da Silva G., Luperni Horta A. C., Colli Badino A., De Campos Giordano R. & Zangirolami T.C. 2016. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. *Chemical Engineering and Processing*. 103: 63 – 69.

Christensen M. L. & Eriksen N. T. 2002. Growth and proton exchange in recombinant *Escherichia coli* BL21. *Enzyme and Microbial Technology*. 31(4): 566-574. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00153-9)

Cowman M., Lee H. Schwertfeger K., McCarthy J. & Turley E. 2015. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in Immunology*. 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00261>

DeAngelis P.L., Papaconstantinou J. & Weigel PH. 1993. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 268(20): 14568–14571. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)82366-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)82366-3)

Hasegawa S., Nagatsuru M., Shibutani M., Yamamoto S. & Hasebe S. 1999. Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend® fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1): 68–71. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80178-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80178-9)

Jongsareejit B., Bhumiratana A., Morikawa M. & Kanaya S. 2007. Cloning of hyaluronan synthase (sz-has) gene from *Streptococcus zooepidemicus* in *Escherichia coli*. *Science Asia*. (33): 389–395. <http://10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.389>

Kilikian B. V., Suárez I. D., Liria C. W. & Gombert A. K. 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry* 35 (9):1019–1025. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00137-0)

Lara A. 2011. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(2): 16-27.

Li Y., Li G., Zhao X., Shao Y., Wu M. & Ma T. 2019. Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*. 9(6): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1749-x>

Li Z., Nimtz M. & Rinas U. 2014. The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. *Microbial Cell Factories* 13: 45. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-45>

Liu L., Liu Y., Li J., Du G. & Chen J. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 10(99). <https://10.1186/1475-2859-10-99>

Mao Z. & Chen R. R. 2007. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Progress*. 23(5): 1038–1042. <https://doi.org/10.1021/bp070113n>

Mao Z., Shin H. D. & Chen R. 2009. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(1): 63–69. <https://10.1007/s00253-009-1963-2>

McCready R. & McComb E. 1952. Extraction and determination of total pectin materials in fruits. *Analytical Chemistry*. (24): 1986 -1988.

Neter J., Kutner M. H., Nachtsheim C.J. & Wasserman W. 2005. *Applied linear statistical models*. McGraw-Hill. New York, EUA. pp 1396.

Neubauer P., Hofmann K., Holst O., Matthiason B. & Kruschke P. 1992. Maximising the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time

using lactose as inducer. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 739–744. <https://doi.org/10.1007/BF00172185>

Oueslati N., Leblanc P., Hascoat-Schiavoia C., Rondags E., Meunier S., Kapel R. & Marc I. 2014. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydrate Polymers*. 112: 102 – 108.

Oliveira J. D., De Carvalho L. S., Milton A., Gomes V., Queiroz L. R., Magalhães B. S. & Parachin N. S. 2016. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>

Paliy O. & Gunasekera T.S. 2007. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1169–1172. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0554-8>

Pires A., Macedo A., Eguchi S. & Santana M. 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Biosource Technology*. (101): 6506-6509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.074>

Prasad S. B., Jayaraman G. & Ramachandran K.B. 2010. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(1): 273–283. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2293-0>

Rosano G. L. & Ceccarelli E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Sambrook J. & Russell D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA. pp 999.

Soini J., Ukkonen K. & Neubauer P. 2008. High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations – consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microbial Cell Factories*. 7:26.

Studier W. F. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 41: 207-234.

Suárez-Hernández L. A., Camacho-Ruiz R. M., Arriola-Guevara E., Padilla-Camberos E., Kirchmayr M. R., Corona-González R. I. & Guatemala-Morales G. M. 2021. Validation of an analytical method for the simultaneous determination of hyaluronic acid concentration and molecular weight by Size-Exclusion Chromatography. *Molecules*. 26(17): 5360. <https://doi.org/10.3390/molecules26175360>

Swint-Kruse L. & Matthews K. S. 2013. Lac operon. In: Encyclopedia of Biological Chemistry. 2nd Edition. (Lennarz W. J. & Lane D., eds.). Academic Press. New York, EUA. pp 694 - 700. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00249-8>

Wang H. L., Huang C. P., Su C. H. & Tsai D. H. 2019. A facile quantification of hyaluronic acid and its crosslinking using gas-phase electrophoresis. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 411: 1443–1451. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01584-w>

Widner B., Behr R., Von Dollen S., Tang M., Heu T., Sloma A., Sternberg D., Deangelis P. L., Weigel P.H. & Brown, S. 2005. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology. 71(7): 3747–3752. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747>

Woo J.E., Seong H.J., Lee S.Y. & Jang Y.S. 2019. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hyaluronic acid from glucose and galactose. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00351>

Yu H. M. & Stephanopoulos G. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. Metabolic Engineering. (10): 24–32. <https://10.1016/j.ymben.2007.09.001>