

Informe de actividades realizadas durante el período sabático

Alvaro R. Lara

Profesor Titular C, Departamento de Procesos y Tecnología

1. Introducción

El presente informe abarca las actividades de investigación, docencia y difusión llevadas a cabo durante mi estancia sabática. Mis actividades experimentales se llevaron a cabo en los sistemas de caracterización masiva de cultivos microbianos desarrolladas por el Prof. Jochen Büchs de la Universidad Técnica de Aquisgrán, Alemania (RWTH Aachen), en donde se evaluaron circuitos genéticos desarrollados en nuestro grupo de trabajo. Particularmente, se desea evaluar circuitos de autoinducción de proteína recombinante por agotamiento de glicerol y de oxígeno. Adicionalmente se caracterizó una biblioteca de mutantes de *E. coli* en factores de transcripción. Se retomaron además colaboraciones con la Universidad Técnica de Berlín y la Universidad de Lieja (Bélgica). El proyecto se enmarcó en actividades de un proyecto con apoyo del CONACyT.

2. Duración del período sabático

El período sabático tuvo una duración de 14 meses; inició el 1 de noviembre de 2021 y finalizó el 31 de diciembre de 2022).

3. Actividades de Docencia

Se continuó con la dirección y asesoría de estudiantes del PCNI. En particular, de la estudiante de maestría Mitzi de la Cruz Hernández, quien actualmente cursa su penúltimo trimestre y cuenta con un avance experimental estimado en 85 %. También he sido asesor de los estudiantes de doctorado Lorena Quiroz y Emmanuel Francisco Solano. He iniciado una colaboración con la Universidad de Sonora, por lo que participo como co-director de proyecto de Maestría en Ingeniería de Carlos Molina Ortiz, y de Doctorado en Ingeniería de Jennifer Ramírez Puerta. Ambos estudiantes iniciaron sus proyectos el segundo trimestre de 2022. Adicionalmente, estoy dirigiendo los proyectos de Maestría en Biotecnología de la estudiante Laura Pohlen (Universidad de Ciencias Aplicadas de Aquisgrán) y de Flavio Kunert (Universidad Técnica de Aquisgrán), quienes deben obtener su grado en junio y julio de 2023, respectivamente.

4. Actividades de Difusión

Impartí la conferencia titulada: *Avances y retos en la manufactura de ADN plasmídico*, en el Simposio de Medicina y Diagnóstico del XI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sur-Sureste. La conferencia se presentó de manera virtual, el 10 de noviembre de 2022. Se anexa probatorio.

5. Actividades de Investigación

Las actividades experimentales se describen en relación al proyecto propuesta para la aprobación del periodo sabático.

5.1 Paquete de trabajo 1. Caracterización de los circuitos genéticos en cultivos en microbiorreactores

Se caracterizaron dos promotores dependientes de glicerol, encontrando que el control de la expresión no es satisfactorio. Se caracterizaron entonces dos versiones del interruptor de palanca diseñado en UAM. Una de ella demostró un nivel aceptable de represión y activación en función de la presencia de glicerol. Se realizaron cultivos con mezclas de glucosa y glicerol empleando 4 cepas de *E. coli* con mutaciones en el sistema de transporte de glucosa. Una de ellas produjo resultados muy atractivos que permitieron cultivarla con concentraciones relativamente altas de fuentes de carbono, emulando el comportamiento de un cultivo por lote alimentado, pero realizado en modo lote. Esta nueva tecnología representa una excelente área de oportunidad para acelerar el desarrollo de bioprocesos.

5.2 Paquete de trabajo 2. Validación de la tecnología en cultivos en biorreactores de 2 L

Las cepas nativa y modificada en el sistema de transporte de glucosa han sido cultivadas usando glucosa, glicerol mezclas como fuentes de carbono. La velocidad de transferencia de oxígeno y generación de dióxido de carbono han sido medidas, y se han tomado muestras para medir la concentración de metabolitos extracelulares. Las muestras están en espera de ser analizadas por HPLC. Con esto se podrán calcular las velocidades extracelulares, realizar balances de carbono y estimar los flujos metabólicos mediante un modelo reducido del metabolismo de *E. coli*. Se espera terminar este trabajo en los próximos dos meses.

5.3 Actividades experimentales adicionales

El plan de trabajo original tuvo un desarrollo más lento de lo esperado debido a largos tiempos de espera para el uso de equipos y servicio técnico derivados de la pandemia de COVID-19. Se aprovecharon otras oportunidades experimentales para llevar a cabo los siguientes paquetes de trabajo adicionales:

5.3.1 Estudio del impacto de factores sigma en la expresión de proteína recombinante por *E. coli*.

Este es el proyecto de investigación de Laura Pohlen. Se analizó una librería de mutantes individuales de cada factor sigma de *E. coli*, cultivadas en medio mineral, caldo lisogénico y expresando proteína recombinante a diferentes temperaturas. Una mutante ha resultado particularmente interesante. Se estimarán sus flujos metabólicos. Los resultados serán sometidos a un número especial de la revista *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, al cual he sido invitado a colaborar.

5.3.2 Caracterización de la expresión de proteína recombinante en cepas de *E. coli* con proteoma reducido.

Se estudió la expresión de proteína recombinante bajo regímenes aerobios o microaerobios empleando un generador de proteína constitutivo, un generador inducible por microaerobiosis y una cascada transcripcional microaerobia. Los resultados demostraron que es posible alcanzar niveles de expresión mayores a los de la cepa nativa bajo condiciones aerobias y con un generador constitutivo (el sistema más fuerte empleado), si se combina una cascada transcripcional con una cepa con proteoma reducido especialmente rediseñada para condiciones microaerobias.

5.3.3 Caracterización del crecimiento aerobio y microaerobio de cepas de *E. coli* con proteoma reducido.

Se estableció una colaboración con la Universidad Técnica de Berlín, en donde se realizaron cultivos empleando una plataforma de minibioreactores con sistema robotizado de muestreo y análisis de metabolitos desarrollado en el grupo del Prof. Peter Neubauer. Los resultados se integrarán al estudio de sistemas de expresión microaerobia realizados anteriormente. Se espera someter un manuscrito para su publicación dentro de un mes.

5.3.4 Estudio de la dinámica de bi-estabilidad de un interruptor de palanca dependiente de glicerol.

El circuito genético mencionado en el numeral 5.2 está siendo analizado para comprobar su bi-estabilidad dependiente de glicerol. Se están empleando quimiostatos con muestreo automatizado y acoplado a citometría de flujo desarrollados por el Prof. Frank Delvigne en la Universidad de Lieja (Bélgica). Se espera terminar este trabajo en dos meses más, y someter el manuscrito correspondiente en cuanto sea posible.

5.4 Publicaciones

En el periodo sabático se han publicado 4 artículos de investigación con resultados de proyectos vigentes:

- a) Islas F, Sabido A, Sigala JC, **Lara AR**. Design of microaerobically inducible miniR1 plasmids. *mLife*. En prensa.
- b) Frago-Jiménez JC, Gutierrez-Rios RM, Flores N, Martinez A, **Lara AR**, Delvigne F, Gosset G. Glucose consumption rate-dependent transcriptome profiling of *Escherichia coli* provides insight on performance as microbial factories. *Microbial Cell Factories*. 2022 Sep 14;21(1):189. doi: 10.1186/s12934-022-01909-y.
- c) Velazquez D, Sigala JC, Martínez LM, Gaytán P, Gosset G, **Lara AR**. Glucose transport engineering allows mimicking fed-batch performance in batch mode and selection of superior producer strains. *Microbial Cell Factories*. 2022 Sep 7;21(1):183. doi: 10.1186/s12934-022-01906-1
- d) Taymaz-Nikerel H, **Lara AR**. *Vitreoscilla* Haemoglobin: A Tool to Reduce Overflow Metabolism. *Microorganisms*. 2021 Dec 26;10(1):43. doi: 10.3390/microorganisms10010043.

Se anexan probatorios de las publicaciones.

6 Conclusiones

El periodo sabático ha sido un excelente medio para establecer nuevas colaboraciones de investigación y reforzar las existentes. En general, estimo que se cumplió en un 85 % con el plan de trabajo originalmente planeado. El retraso se debe principalmente a problemas originados por la pandemia, como se explicó anteriormente. El incremento de costos de la energía derivado del conflicto de Rusia con Ucrania obligó a la Universidad Técnica de Aquisgrán a cerrar los laboratorios durante dos semanas, lo que representó un retraso adicional. Sin embargo, se tuvo la oportunidad de realizar investigaciones no contempladas originalmente, y que han arrojado resultados muy interesantes. Se espera que durante la primera mitad de 2023, se sometan al menos tres manuscritos para su publicación en revistas indizadas, comunicando los resultados de las investigaciones realizadas durante el periodo sabático.