



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE
CRECIMIENTO DE *Schizochytrium* sp. PARA LA
PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO RECOMBINANTE**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Jorge Paul Castro Cosio

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 16 del Mes de enero del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Schizochytrium* sp. PARA LA PRODUCCIÓN DE UN ATÍGENO RECOMBINANTE"

Presentada por el alumno:

Jorge Paul Castro Cosio

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

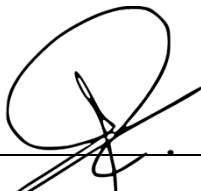
LA COMISIÓN REVISORA



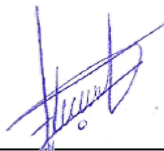
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis



Dra. Elizabeth Montreal Escalante
Co-Tutora de Tesis



Dra. Reyna de Jesus Romero Geraldo
Co-Tutora de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

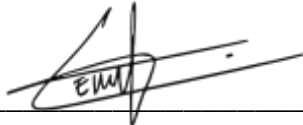
La Paz, Baja California Sur, a 23 de enero de 2023.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante JORGE PAUL CASTRO COSIO del Programa de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

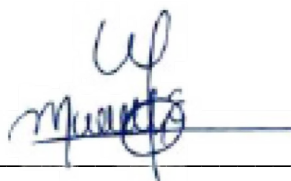
- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
Se muestra captura de pantalla



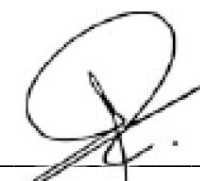
Firmas del comité



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Co-Tutora de Tesis



Dra. Reyna de Jesus Romero Geraldo
Co-Tutora de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Director de Tesis

Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co- Tutora de Tesis

Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo
Tecnológico Nacional de México, Campus La Paz
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo

Suplente

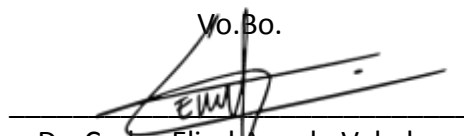
Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril

Resumen

Las microalgas heterótrofas han sido utilizadas en la producción de proteínas recombinantes debido a su facilidad de manipulación y la adaptabilidad de las técnicas de ingeniería genética. Las vacunas recombinantes son una opción para el tratamiento de enfermedades en animales, plantas y seres humanos. En este sentido, la microalga *Schizochytrium* sp. ha sido empleada en la expresión transitoria de antígenos recombinantes con el sistema Algevir, por inducción con etanol absoluto. A nivel industrial, *Schizochytrium* sp. solo es utilizada para la producción de PUFA, especialmente DHA, utilizando la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo para generar un cambio metabólico que disminuye la producción de biomasa y mejora la acumulación de lípidos. Interesantemente, la suplementación con fuentes de amino nitrógeno, como el glutamato de sodio (GMS), reduce la producción de lípidos al eludir agotamiento del nitrógeno por sobrecompensación de nutrientes. Por esto, el objetivo de este trabajo fue el optimizar la producción de biomasa y de proteína total y recombinante en *Schizochytrium* sp. utilizando la sobrecompensación de nitrógeno con GMS y determinar el efecto de la suplementación durante la transformación transitoria con el sistema Algevir, para la expresión del antígeno recombinante ToxA. En este sentido, se diseñó el medio de cultivo ASWm y se evaluó el impacto del GMS en la producción de biomasa, proteína y lípidos, así como en las tasas de consumo de carbohidratos y nitrógeno, en cuatro niveles de suplementación en relación con la concentración de glucosa (Glu:GMS, 20:0, 20:10, 20:15, 20:20). El rendimiento máximo se obtuvo con la proporción de Glu:GMS 20:15, la biomasa total incrementó 1.65 veces a las 48 h y 2.2 veces a las 72 respecto al tratamiento sin GMS, respectivamente. La concentración de proteína total fue de 22.09 g PT/g BS a las 48 h y los lípidos totales disminuyeron 37% ($p < 0.05$) respecto al cultivo sin suplementación. Posteriormente, se utilizó la proporción Glu:GMS 20:15 durante la transformación con el sistema Algevir. En este caso, se logró detectar la presencia de ToxA en los extractos proteicos de *Schizochytrium* sp. Los rendimientos para ToxA recombinante a las 36 y 48 h post-inducción fueron de 319.02 y 374.70 $\mu\text{g ToxA/g BS}$, respectivamente; siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) con el medio ASWm respecto al YPD comercial. Finalmente, se realizó un diseño de Box-Behnken y los resultados de los experimentos independientes fueron utilizados para generar un gráfico de respuesta. El modelo RSM-BB predijo un punto óptimo de Glu:GMS 20:15.26, extracto de levadura de 0.90% y tiempo de cosecha de 60.92 h. En conclusión, el GMS puede ser utilizado como fuente de amino nitrógeno para incrementar la producción de proteína total y recombinante en *Schizochytrium* sp. cuando se usa el sistema Algevir.

Palabras clave: *Schizochytrium* sp., optimización, expresión transitoria, proteína recombinante, cambio metabólico, amino nitrógeno.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-0815>

Vo.Bo.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

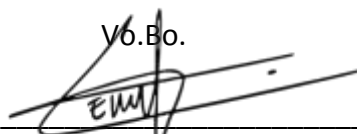
Summary

Heterotrophic microalgae have recently attracted the attention of many research groups because they are easy to manipulate and can adapt to standard genetic engineering techniques. Recombinant vaccines are a therapeutic option for animal, plant, and human diseases. This way, *Schizochytrium* sp. has been used to produce recombinant antigens through transient expression by ethanol induction under the Algevir system. At the industrial scale, *Schizochytrium* sp. is used for PUFA production, particularly DHA, in nitrogen starvation conditions to generate a metabolic shift, diminishing biomass generation but enhancing lipid accumulation. Interestingly, adding a nitrogen source, like sodium glutamate (GMS), decreases total lipid production and avoids nitrogen starvation by over-compensation of the nutrient, which redirects fatty acids biosynthetic pathways. According to this, the objective of this work was to optimize biomass, total and recombinant protein production in *Schizochytrium* sp. under nitrogen over-compensation strategy, using GMS as the primary nitrogen source, and determine the effect of the supplementation during the transient transformation of *Schizochytrium* sp. using the Algevir system for the expression of the ToxA antigen. For this, the medium of modified artificial seawater (ASWm) was designed, and the impact of the GMS in the production of total biomass, protein, and lipids as well in the consumption rate of total carbohydrate and nitrogen; was carried out in four supplementation levels regarding glucose concentration in the culture broth (Glu:GMS, 20:0, 20:10, 20:15, 20:20). Thus, maximum yields were achieved when the Glu:GMS (20:15) supplementation was used. Therefore, total biomass increased 1.65-fold at 48 h and 2.2-fold at 72 h to the treatment lack of GMS. The total protein concentration at 48 h was 22.09 g TP/g, and the nitrogen starvation was retarded, baiting a decrease of 37% ($p > 0.05$) in the total lipid content to the unsupplemented cultures. Posteriorly, the best rate of Glu:GMS (20:15) was used to perform the transient transformation with the Algevir System. In this case, ToxA was effectively detected by conventional and fluorescent immunoblotting in the protein extracts of *Schizochytrium* sp at different sample times. The yields of the recombinant protein at 36 and 48 h were 319.02 and 374.70 $\mu\text{g ToxA/g DB}$, respectively, and the production of ToxA using the ASWm medium was significantly ($p < 0.05$) higher than commercial YPD. Finally, the Box-Behnken design was performed using central values Glu:GMS (20:15), yeast extract concentration of 1%, and harvest time of 48 h, and the results of the independent experiment were used to obtain a response surface plot with R Studio. RSM-BB predicted an optimum point of Glu:GMS (20:15.26), yeast extract 0.90%, and harvest time of 60.92 h. In conclusion, GMS can be used as an amino nitrogen source to increase the total and recombinant protein production in *Schizochytrium* sp. when the Algevir System is used for the microalgae transformation.

Keywords: *Schizochytrium* sp., optimization, transitory expression, recombinant protein, metabolic shift, amino nitrogen.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-0815>

Vó.Bo.



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Director de Tesis

Dedicatoria

Para Anais, Paul y Jare.

*Gracias por el valioso tiempo cedido, la confianza y el apoyo,
esta tesis es trabajo de ustedes, gracias por ser el motor de vida
que me permite seguir soñando.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. 1081470) así como por el financiamiento del proyecto No. 60107 Inmunomodulación de las mucosas por nanovacunas.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por los cursos proporcionados y las instalaciones prestadas para el desarrollo de este proyecto. Así como a cada uno de los que facilitan el crecimiento del estudiante, principalmente a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos (Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Horacio Sandoval Gómez y a todo su equipo de trabajo) sin su esfuerzo no podríamos alcanzar nuestras metas, ¡gracias!

Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, por permitirme realizar este proyecto bajo su Dirección, por compartir su conocimiento en el desarrollo de vacunas, por ser un ejemplo de dedicación y perseverancia y, sobre todo, por esa gran paciencia que permite a sus alumnos alcanzar cada una de nuestras metas. Gracias por sus revisiones, correcciones y asesoría que me han permitido alcanzar más logros de los que creía posibles. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Elizabeth Monreal Escalante, por permitirme adquirir los conocimientos tan valiosos de técnicas tan complejas de una manera amena y sencilla. Gracias por todos los consejos para poder cumplir cada uno de los objetivos, por las correcciones en el laboratorio, por su paciencia, es un ejemplo de dedicación a seguir. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Reyna de Jesús Romero Geraldo, gracias por centrarme, ayudarme a visualizar mis metas verdaderas, por toda su experiencia compartida a lo largo de este proceso. Por haber sido mí tutora. Gracias por compartir esa experiencia tan valiosa que nos permite tomar decisiones. ¡Muchas gracias!

Al técnico Mtro. Margarito Rodríguez Álvarez y a todos los que trabajan en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de los experimentos.

Al técnico Guadalupe Sánchez Castro por su apoyo técnico en el Bioterio.

Al técnico Dr. Martín Ramírez Orozco por las facilidades para el uso de la liofilizadora.

Al cDr. Abel Ramos, gracias por todo el apoyo y asesoría en las técnicas de Laboratorio, gracias por compartir todas sus experiencias en el desarrollo de los métodos, por hacer ameno el trabajo y por ayudarnos a creer que siempre si se puede, ¡gracias!

Al grupo de Inmunología y Vacunología del CIBNOR, gracias por abrirme las puertas y confiar en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Martha Candelaria Reyes Becerril y al grupo de INMUNOPEQUES por permitirme la grata experiencia de compartir el conocimiento con niños de diferentes escuelas, es invaluable todo lo aprendido.

A Rosa e Imanol, por ser excelentes compañeros en este viaje, ¡gracias!

A mi madre y hermana, por apoyar cada uno de mis sueños.

Especialmente:

A mi esposa Anais, la razón de todo lo que hago, el motor de vida que me permite cada día soñar con algo nuevo, que con su apoyo y amor pareciera que nada es imposible. Esta tesis, así como cada uno de los logros que pudiera tener, son tuyos. ¡Mil Gracias!

A Paul y Jare, mis hijos, que espero y un día lean esta tesis y vean que el tiempo que han cedido fue valioso. ¡Mil Gracias!

A Dios, quien seas, gracias por ser mi guía.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Sistema de expresión Algevir	4
2.2 Antígenos y proteínas recombinantes producidas en <i>Schizochytrium sp.</i>	6
2.2.1 Producción de antígenos recombinantes mediante el sistema Algevir	6
2.2.2 Antígeno ToxA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.3 Optimización de la producción de proteínas recombinantes en <i>Schizochytrium sp.</i>	9
2.4 Uso de la relación C-N para la optimización de cultivos de microalgas	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Microorganismo, medio y condiciones de cultivo	21
6.2 Construcción del vector de expresión	21
6.3 Comprobación de la presencia del vector pAlgevir en las cepas de <i>A. tumefaciens</i>	22
6.4 Producción de sueros hiperinmunes contra ToxA	24
6.5 Transformación transitoria de <i>Schizochytrium sp.</i> ATCC 2888	25
6.6 Evaluación de parámetros cinéticos relacionados con la producción de proteína	26
6.6.1 Determinación de la biomasa total	26
6.6.2 Extracción de proteína total (PT)	26
6.6.3 Cuantificación de proteína	27
6.6.4 Determinación de carbohidratos residuales	27
6.6.5 Determinación espectrofotométrica amino nitrógeno libre residual (FAN)	27
6.6.6 Determinación de lípidos totales	28
6.7 Evaluación de los antígenos recombinantes por Dot blot y Western blot	28
6.7.1 Dot blot	28
6.7.2 Western blot	29
6.8 Evaluación de la producción de los antígenos recombinantes por ELISA cuantitativo	30
6.9 Diseño experimental	30
6.9.1 Evaluación de los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total en <i>Schizochytrium sp.</i> suplementada con GMS a escala laboratorio	30
6.9.2 Optimización de los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total en <i>Schizochytrium sp.</i> suplementada con GMS	32

6.9.3 Metodología para BB-RSM	33
6.10 Análisis Estadístico	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Recuperación y comprobación de cultivos criopreservados	36
7.2 Diseño del medio de cultivo Agua de Mar Sintética Modificada (ASWm)	38
7.3 Evaluación de los parámetros de crecimiento de <i>Schizochytrium</i> sp. en el medio ASWm con diferentes tratamientos de GMS.....	39
7.3.1 Curvas de crecimiento microbiano y producción de biomasa	39
7.3.2 Consumo de glucosa y amino nitrógeno libre asimilable	41
7.3.3 Producción de proteína total.....	42
7.3.4 Producción de lípidos totales	44
7.4 Producción de sueros hiperinmunes contra ToxA	46
7.5 Transformación transitoria de <i>Schizochytrium</i> sp. utilizando el medio ASWm	46
7.5.1 Efecto del GMS sobre la producción de biomasa de <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA	46
7.5.2 Efecto del GMS sobre la producción de proteína total de <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA	49
7.5.3 Detección del antígeno ToxA recombinante al utilizar el medio ASWm 20:15 durante la transformación transitoria de <i>Schizochytrium</i> sp.	52
7.5.4 Cuantificación de la producción de ToxA recombinante por ELISA cuantitativo.....	54
7.6 Optimización de la producción de proteína total y ToxA recombinante en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con pAlgevir::ToxA.....	55
8. DISCUSIÓN	60
8.1 Efecto del medio ASWm con GMS sobre el crecimiento de <i>Schizochytrium</i> sp.	60
8.2 Transformación transitoria de <i>Schizochytrium</i> sp. con AgToxA.....	62
8.3 Efecto del GMS sobre la producción de ToxA recombinante en <i>Schizochytrium</i> sp.	63
8.4 Optimización de los parámetros de crecimiento de <i>Schizochytrium</i> sp. asociados a la producción de proteína total y ToxA recombinante	66
9. CONCLUSIONES	68
10. LITERATURA CITADA	70
11. ANEXOS	79
Anexo A: Script RStudio para BB-RSM.....	79

Lista de figuras

Figura 1. Casete de expresión del plásmido Algevir. Mapa de 4783 pb de los componentes del casete de expresión, la región donde se ancla el gen de interés se encuentra flanqueada por los sitios de restricción <i>Sma</i> I (8622 pb) y <i>Sac</i> I (8973 pb)/ <i>Bam</i> HI (8999 pb). Los genes inducibles son <i>AlcA</i> y <i>AlcR</i> de <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Ori</i> y <i>Rep</i> de geminivirus, mientras que el promotor 35S pertenece al virus mosaico de la coliflor.....	5
Figura 2. Secuencia de la proteína ToxA expresada en <i>Schizochytrium</i> sp. Secuencia de aminoácidos codificados por el gen optimizado de ToxA para ser expresados en <i>Schizochytrium</i> sp. (~12.6 kDa). Los sitios de corte de las enzimas de restricción se muestran como banderas. .	23
Figura 3. Protocolo para la producción de sueros hiperinmunes. Esquema para la producción de sueros hiperinmunes en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad. La primera inoculación se realiza en el cojinete plantar y durante 3 semanas se dosifican los péptidos purificados de manera intraperitoneal.	25
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para ADN plasmídico extraído de <i>A. tumefaciens</i> . a) gel de calidad, se observan las estructuras: 1) circular relajada y 2) lineal completa del vector pAlgevir::ToxA en la cepa AgToxA. b) amplicones de la PCR punto final para las regiones NOSTer-Prom35S (~2000 pb, A1...A6) y para el gen ToxA (~150 pb, B1...B6).	36
Figura 5. Resultados para el análisis <i>in silico</i> con el software ApE. Los fragmentos teóricos para la digestión con las enzimas de digestión <i>Kpn</i> I y <i>Sac</i> I se muestran en el patrón de bandeo.....	37
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con la digestión de pAlgevir::ToxA con <i>Sac</i> I y <i>Kpn</i> I 37°C@15 min. El fragmento de ToxA corresponde a ~950 pb.	37
Figura 7. Curvas de crecimiento para <i>Schizochytrium</i> sp. bajo diferentes concentraciones de GMS. La media de tres réplicas independientes se presenta para cada tiempo de muestreo. La línea azul es la predicción del crecimiento a través de la ecuación logística generada por la librería growthrates en RStudio. Los tratamientos Glu:GMS corresponden a: A) 20:0, B) 20:10, C) 20:15 y D) 20:20.	39
Figura 8. Producción de biomasa total en <i>Schizochytrium</i> sp. bajo diferentes concentraciones de GMS. El signo * indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).....	40
Figura 9. Producción de biomasa en los tiempos significantes para la recuperación de proteína total y recombinante. * indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).....	41
Figura 10. Consumo de glucosa (a) y de amino nitrógeno libre (FAN, b). Las líneas suavizadas son el modelo ajustado para el consumo de glucosa y nitrógeno, respectivamente.	42
Figura 11. Producción de proteína total en <i>Schizochytrium</i> sp. bajo los diferentes tratamientos con GMS utilizando el medio ASWm. Cuantificado por el método de Bradford. La producción de proteína total es mayor en los tratamientos con GMS.....	43
Figura 12. Variación de la producción de proteína total de <i>Schizochytrium</i> sp. bajo los diferentes tratamientos de suplementación con GMS. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$	43
Figura 13. Producción de lípidos totales en <i>Schizochytrium</i> sp. bajo los diferentes tratamientos con GMS utilizando el medio ASWm. Cuantificado por el método de la SPV en microplaca. La producción de lípidos se ve disminuida en los tratamientos con GMS. La falta de suplementación (T1) generó un incremento significativo respecto al medio suplementado.....	45
Figura 14. Variación de la producción de lípidos totales en <i>Schizochytrium</i> sp. bajo los diferentes tratamientos de suplementación con GMS ($p < 0.05$).	45

Figura 15. Producción de biomasa de las líneas WT y ToxA de <i>Schizochytrium</i> sp. en los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. El tratamiento con GMS generó una tendencia positiva hacia la acumulación de biomasa tanto en la línea WT como en la transformada con ToxA.	47
Figura 16. Producción de biomasa en <i>Schizochytrium</i> sp. para la línea transformada con AgToxA utilizando los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$	48
Figura 17. Variación de la producción de biomasa seca en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación con AgToxA utilizando los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$	49
Figura 18. Producción de proteína total en <i>Schizochytrium</i> sp. al utilizar los medios ASWm 20:15 y YPD comercial, para las líneas WT y ToxA. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$	50
Figura 19. Producción de proteína total en <i>Schizochytrium</i> sp. al utilizar los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. Comparación de la productividad en la línea transformada con ToxA en ambos medios. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$	51
Figura 20. Dot blot y electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT y transformada de <i>Schizochytrium</i> sp. a) dot blot, las líneas marcan los <i>dots</i> positivos para ToxA recombinante y las flechas los controles de ToxA semipurificada y b) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% para los extractos proteicos ajustados a 300 μg PT/mL. Se indica la banda correspondiente al control de ToxA y la zona donde se encuentra ToxA recombinante de <i>Schizochytrium</i> sp.	52
Figura 21. Western blot de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT y transformada de <i>Schizochytrium</i> sp. A) Western blot en membrana de nitrocelulosa y revelado por DAB, las flechas marcan la región en la que se encuentran las bandas para ToxA y, B) Western blot en gel con detección con anti-IgG ligado a fluoresceína (FIC) para los extractos proteicos ajustados a 300 μg PT/mL.	53
Figura 22. Concentración de ToxA recombinante producida en <i>Schizochytrium</i> sp. transformada transitoriamente con AgToxA. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$	54
Figura 23. Producción de biomasa total en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.	56
Figura 24. Producción de proteína total en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.	57
Figura 25. Producción del antígeno recombinante ToxA en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.	59

Lista de tablas

Tabla 1. Antígenos recombinantes producidos con el sistema Algevir. Publicaciones existentes sobre el uso del sistema Algevir en microalgas y plantas.	8
Tabla 2. Patentes registradas para la optimización del cultivo de <i>Schizochytrium</i> sp., revisión realizada en las páginas de la World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EP) y United States Patent and Trademark Office (USPTO) se muestran las asociadas con la producción de biomoléculas como proteínas recombinantes, lípidos y glicomoléculas en <i>Schizochytrium</i> sp. y géneros relacionados taxonómicamente como <i>Labyrinthulomycetes</i> y <i>Aurantiochytrium</i>	12
Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de ToxA en DNA plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
Tabla 4. Protocolo para la detección del gen ToxA en ADN plasmídico de <i>A. tumefaciens</i>	24
Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación del efecto del GMS sobre el crecimiento de <i>Schizochytrium</i> sp. WT.	31
Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación del efecto del GMS sobre el crecimiento de <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con la cepa AgToxA.	32
Tabla 7. Variables seleccionadas para la optimización por el diseño de Box-Behnken y el Método de Superficie de Respuesta (BB-RSM).....	33
Tabla 8. Composición molar del medio ASWm.....	38
Tabla 9. Aporte de nitrógeno total asimilable (NTA) por componente en los medios de cultivo utilizados.	38
Tabla 10. Ensayo de ELISA en sueros hiperinmunes de ratones BALB/c. Se indican las absorbancias obtenidas al probar el suero hiperinmune de ratones inmunizados con extracto soluble de ToxA_BL21.	46
Tabla 11. Diseño experimental de Box-Behnken para la optimización de la producción de biomasa (peso seco, BS), proteína total (PT) y el antígeno recombinante ToxA (ToxA) en <i>Schizochytrium</i> sp. durante la transformación transitoria con AgToxA.....	55
Tabla 12. ANOVA para la producción de biomasa en <i>Schizochytrium</i> sp.	56
Tabla 13. ANOVA para la producción de proteína en <i>Schizochytrium</i> sp.	57
Tabla 14. ANOVA para la producción de ToxA recombinante en <i>Schizochytrium</i> sp.	58
Tabla 15. Puntos óptimos y eigen-análisis para los tratamientos de optimización. Los valores son los mejores resultados obtenidos por predicción a partir del modelo de segundo orden, realizado en RStudio con el paquete <i>rsm</i> de RStudio.	59

Abreviaturas

AGT	Ácidos grasos totales
AgToxA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado con ToxA
AHPND	Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
ASWm	Medio Agua de Mar Sintética Modificada
BB-RSM	Diseño de Box-Behnken y Metodología de Superficie de Respuesta
BH	Biomasa húmeda, biomasa peso húmedo
BS	Biomasa seca, biomasa peso seco
C:N	Relación carbono-nitrógeno
DHA	Ácido docosahexaenoico
DW	Peso seco
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GMS	Glutamato monosódico, glutamato de sodio
kDA	kilo Dalton, medida del peso molecular para proteínas
LT	Lípidos totales
NTA	Nitrógeno total asimilable
PST	Proteína soluble total
PT	Proteína total
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
TAG	Triacilglicéridos
ToxA	Toxina PirA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , monómero A
ToxB	Toxina PirB de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , monómero B
ToxAB	Toxina binaria PirAB de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
TMA	Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ToxA	Toxina recombinante PirA
WT	Cepa silvestre, sin modificación genética (<i>wild type</i>)

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo amplio de microorganismo de nutrición, pudiendo ser autótrofas, mixótrofas o heterótrofas dependiendo de la fuente de carbono disponible; por lo que su cultivo es potencialmente sencillo y de bajo costo (Rosales-Mendoza *et al.*, 2020a). De manera general, se pueden clasificar como cianobacterias (algas verde-azules), rodófitas (algas rojas), clorófitas (algas verdes) y cromófitas (otras algas) que pueden colonizar una extensa variedad de ecosistemas de agua dulce, marinos y terrestres (León-Bañares *et al.*, 2004; Specht *et al.*, 2017; Fossier Marchan *et al.*, 2018). Además, son de interés biotecnológico debido a los sistemas de tolerancia y resistencia que les permiten producir metabolitos secundarios únicos en condiciones de crecimiento mínimas (Specht *et al.*, 2017). Por otra parte, las microalgas autótrofas y mixótrofas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, son dependientes del control preciso de los fotoperíodos para generar el máximo rendimiento para la reconversión a biomasa (Verma *et al.*, 2020). Por lo cual, los fotobiorreactores necesitan adecuar componentes que minimicen los efectos causados por el autosombreado y que maximicen la homogeneización del cultivo, asegurando la correcta distribución de los nutrientes. En cambio, los cultivos de microalgas heterótrofas presentan la ventaja de poder utilizar fuentes de carbono simples y económicas para su crecimiento sin depender de fotoperíodos (Jareonsin and Pumas, 2021).

El género *Schizochytrium* se encuentra ampliamente distribuido en ambientes acuáticos en todo el mundo, debido a su nutrición heterótrofa y a la facilidad de adaptación a diferentes concentraciones de sal. Yokoyama y Honda (2007) reestructuraron el género *Schizochytrium* mediante la identificación taxonómica por secuenciación del gen 18s RNA, demostrando que pertenece al superfilo *Heterokonta*, dentro del orden *Thraustochytria* y a la familia *Thraustochytriidae*. Por lo cual, el género *Schizochytrium*, hasta el momento, únicamente cuenta con una especie aceptada (*S. aggregatum*) ya que especies como *S. mangrovei* o *S. limacinum* se han reclasificado al género *Aurantiochytrium*. De manera similar, Du et al. (2021) mencionaron que los géneros pertenecientes a esta familia, como *Aurantiochytrium* sp. y *Schizochytrium* sp., se caracterizan por no contar con plástidos y no poder realizar la fotosíntesis. Además, las cepas pertenecientes a estos géneros presentan características morfológicas comunes: 1) forma globosa, 2) presencia de β -carotenos, 3) multiplicación por

bipartición sucesiva para formar tétradas de zoosporangios, que eventualmente se dividen en zoosporas, reniformes y ovoides de aproximadamente 14 μm de diámetro, 5) generación de un pseudópodo ectoplásmico que les permite adquirir los nutrientes del medio, 6) producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y, 7) las células vegetativas pueden acumular ~50% del peso seco como lípidos, de los cuales una gran proporción corresponde a PUFA (Fossier Marchan *et al.*, 2018; Iwata y Honda, 2018). Interesantemente, la composición lipídica corresponde mayoritariamente a lípidos neutros (LN, 74.83%) cuyo componente principal son TAG (93%), y del cual el DHA es la fracción más abundante (27%) (Zhang *et al.*, 2016). Esta acumulación se encuentra asociada principalmente a las etapas de crecimiento del cultivo (Qu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016) y ha sido ampliamente explotada a nivel industrial para la generación de suplementos alimenticios de niños lactantes, debido a la importancia del DHA en el desarrollo fisiológico del ser humano (Jiang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2016).

Por lo anterior, *Schizochytrium* sp. se ha posicionado como un organismo modelo en la industria biotecnológica durante las últimas décadas, especialmente debido a su alta producción de lípidos (Jiang *et al.*, 2004; Ganuza y Izquierdo, 2007; Sun *et al.*, 2018). Además, esta microalga se considera como una plataforma flexible para la producción de proteínas recombinantes con modificaciones post-traduccionales similares a las realizadas por las líneas celulares de mamíferos (Bayne *et al.*, 2013; Rosales-Mendoza *et al.*, 2020b). Por ejemplo, antígenos recombinantes han sido producidos exitosamente en *Schizochytrium* sp. a través de biobalística (Bayne *et al.*, 2013) y por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Márquez-Escobar *et al.*, 2018; Ortega-Berlanga *et al.*, 2018). El uso de vectores virales inducibles ha permitido realizar la transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. con *A. tumefaciens* para producir proteínas recombinantes en el citoplasma de la microalga, sin que este se herede entre generaciones (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017). Sin embargo, la productividad de los cultivos de microalgas para la biosíntesis de proteínas recombinantes depende invariablemente de las condiciones de crecimiento, como las concentraciones de carbono, nitrógeno y oxígeno disueltos en el medio de cultivo (Geng *et al.*, 2019). En este sentido, una relación C-N reducida ha evitado el agotamiento de los nutrientes necesarios para la replicación del ADN y la biosíntesis de proteínas, lo que direcciona el metabolismo de la glucosa, disminuyendo la producción de lípidos (Ren *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2018, 2021). Interesantemente, el uso de amino

nitrógeno como fuente principal de nitrógeno, suplementado en proporción a la fuente de carbono, ha propiciado la acumulación de biomasa y proteína total en *Schizochytrium* sp. (Ganuza y Izquierdo, 2007; Ling *et al.*, 2015).

Debido a esto, en el presente trabajo se realizó el diseño del medio de cultivo ASWm (agua de mar sintética modifica) suplementado con glutamato de sodio como fuente principal de nitrógeno, que se utilizó para la producción del antígeno recombinante ToxA de *Vibrio parahaemolyticus* en *Schizochytrium* sp. transformada transitoriamente con *A. tumefaciens*. En ambos casos, la productividad de la proteína recombinante y su integridad se evaluó por técnicas de inmunoensayo. Además, la optimización de los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total y recombinante se realizó al direccionar las rutas metabólicas por sobrecompensación de nitrógeno a través de la metodología de superficie de respuesta (RSM). Finalmente, el medio ASWm permitió incrementar la generación de biomasa, cuando fue optimizado a través de la RSM. En conclusión, se obtuvo un medio basal de bajo costo que permite incrementar la producción de proteína total y recombinante. El antígeno ToxA se produjo en *Schizochytrium* sp. utilizando el medio ASWm y presentó inmunorreactividad en los ensayos realizados. Los resultados obtenidos permitirán escalar los cultivos de *Schizochytrium* sp. para la producción de antígenos recombinantes de manera rentable.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema de expresión Algevir

Como se ha abordado anteriormente, las microalgas pueden ser transformadas genéticamente a través de la transferencia de un vector recombinante que codifica para una proteína de interés, adaptando técnicas físicas, químicas o biológicas de la ingeniería genética de plantas, tales como la biobalística, electroporación, perlas de vidrio o la transformación mediada por *A. tumefaciens* (TMA) (Ramos-Vega *et al.*, 2018). En este último caso, la TMA requiere del uso de un vector binario, como pBI121, que se transfiere por conjugación entre la bacteria y la microalga, generando una recombinación homóloga aleatoria en el material genético nuclear (Cheng *et al.*, 2012). Curiosamente, el proceso de transferencia por *A. tumefaciens* no se encuentra totalmente descrito. Este tipo de vectores conlleva retos asociados al silenciamiento génico, dado que no es posible controlar el sitio de recombinación, lo que puede derivar en la delección o apagado de genes necesarios para la sobrevivencia de la microalga (Pratheesh *et al.*, 2014). En este sentido, la aplicación de vectores virales, es decir, plásmidos generados a partir de material genético de virus que infectan plantas, permiten la replicación de vectores en el citoplasma de la microalga de manera transitoria, sin necesidad de una transformación nuclear. Además, los vectores virales no se incorporan al cromosoma de la microalga, por lo que no se conservan tras varias generaciones del cultivo (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017). Por lo tanto, la biosíntesis de las proteínas recombinantes no se encuentra asociada a un evento de replicación nuclear, sino que puede ser inducida a través de señales externas o ambientales y, el rendimiento dependerá de la cantidad de vectores efectivamente transferidos al ambiente citoplasmático de la microalga.

En este contexto, Bañuelos-Hernández *et al.* (2017) desarrollaron un sistema para la transformación mediada por *Agrobacterium* de *Schizochytrium* sp. que utiliza el primer vector viral inducible en microalgas, denominado Algevir. El sistema utiliza el plásmido pAlgevir de 17 953 pb, basado en el vector binario pBI121. Cuenta con un casete de expresión de 4 783 pb (Fig. 1) que incorpora los siguientes elementos: 1) Promotor 35S del virus mosaico de la coliflor, 2) promotor *AlcR* de *Aspergillus nidulans* (inducible por alcohol), 3) terminador NOS, 4) *Ori* del

geminivirus *Ageratum enation virus*, 5) promotor *AlcA* de *A. nidulans* (inducible por alcohol), 6) sitios de restricción *SmaI*, *PstI* y *BamHI*, 7) terminador 35S, 8) *Ori* como sitio repetido, 9) promotor *AlcA* y 10) proteína Rep ORF. Interesantemente, la subunidad B de la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* (LTB, ~12.5 kDa) y la proteína GP1 del *Zaire ebolavirus* (~60 kDa) se ha producido usando el sistema pAlgevir con rendimientos de 0.12 mg/g BPH y 12 mg/g BPH, respectivamente.

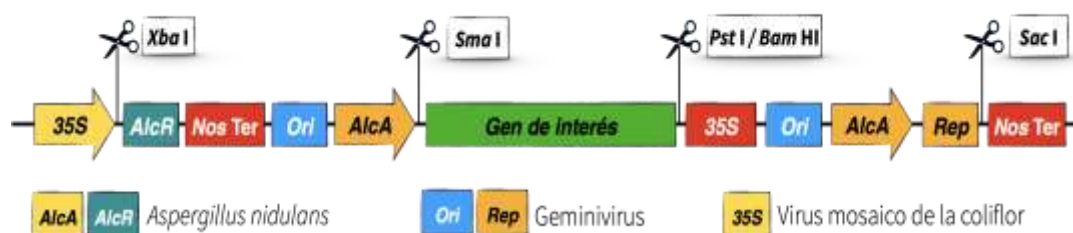


Figura 1. Casete de expresión del plásmido Algevir. Mapa de 4783 pb de los componentes del casete de expresión, la región donde se ancla el gen de interés se encuentra flanqueada por los sitios de restricción *SmaI* (8622 pb) y *SacI* (8973 pb)/*BamHI* (8999 pb). Los genes inducibles son *AlcA* y *AlcR* de *Aspergillus nidulans*, *Ori* y *Rep* de geminivirus, mientras que el promotor 35S pertenece al virus mosaico de la coliflor.

En particular, la TMA de *Schizochytrium* sp. a través del sistema Algevir requiere la infección con *A. tumefaciens* previamente transformado con la construcción de pAlgevir, que incorpora el gen de interés en la sección flanqueada por las enzimas *SmaI* y *PstI/BamHI*. La infección de la microalga por *A. tumefaciens* se logra al adicionar acetosiringona en el medio de cultivo como agente de virulencia, que propicia la adherencia de *A. tumefaciens* sobre la pared celular de *Schizochytrium* sp., promoviendo la transferencia del vector desde la bacteria hacia la microalga (Cheng *et al.*, 2012; Pratheesh *et al.*, 2014). En este sentido, la transformación mediada por *A. tumefaciens* se ha reportado para diversas microalgas, como *C. reinhardtii* y *Dunalliella* sp., con eficiencias variables dependientes del pH, la temperatura, la densidad microbiana o la concentración de material genético (Gutiérrez y Lauersen, 2021; Sreenikethanam *et al.*, 2022). Una vez transferido el pAlgevir a *Schizochytrium* sp., los sitios *AlcA* y *AlcR* son inducidos por la presencia de etanol absoluto en el medio de cultivo, lo que genera la replicación del vector mediante el mecanismo de círculo rodante. Este mecanismo consiste en el reconocimiento sitio especie-específico por la proteína *Rep* de la secuencia *Ori* cuando los genes *AlcA* y *AlcR* se ven

inducidos, produciendo un segmento iniciador con terminación 3'-OH que sirve de anclaje para la DNA polimerasa de la microalga. La replicación del plásmido genera una molécula circular de dsDNA y una ssDNA. Esta última servirá como nuevo templado para la DNA polimerasa, dando como resultado dos nuevos plásmidos en cada ciclo de replicación (Ruiz-Masó *et al.*, 2015). Por lo tanto, el sistema no se encuentra sujeto a la recombinación nuclear y puede generar, teóricamente, una cantidad ilimitada de copias del vector mientras no se genere una presión negativa sobre la microalga, derivando en un incremento en la concentración de proteína recombinante que puede ser acumulada en el interior de la célula, o bien, ser expulsada al ambiente extracelular.

2.2 Antígenos y proteínas recombinantes producidas en *Schizochytrium sp.*

2.2.1 Producción de antígenos recombinantes mediante el sistema Algevir

El sistema Algevir ha sido utilizado exitosamente para la expresión de antígenos recombinantes de patologías humanas y animales, con rendimientos prometedores para la producción a gran escala de biofármacos (Tabla 1). Sin embargo, no existen trabajos relacionados con la escala piloto o mayores. La producción de antígenos recombinantes en *Schizochytrium sp.* se ha centrado en la generación, optimización y evaluación del rendimiento a escala de laboratorio y su inmunogenicidad en modelos murinos, principalmente. Por ejemplo, Ortega-Berlanga *et al.* (2018) lograron expresar el antígeno RAGE del Alzheimer ligado a LTB (LTB:RAGE, 18 kDa) con rendimientos de 380 µg/g BPH, mostrando termoestabilidad en tratamientos a 60°C por 2 h. De manera similar, Márquez-Escobar *et al.* (2018) realizaron la expresión del antígeno recombinante ZK compuesto de tres epítomos de la proteína E del virus del Zika unidos a LTB de *E. coli* utilizando un enlazador de prolina, además de la incorporación de la secuencia SEKDEL de retención a retículo endoplasmático. En este caso, la cepa transformada de *Schizochytrium sp.* produjo una proteína inmunorreactiva de 30 kDa con un rendimiento máximo de 241 µg/g BPH a las 72 h. Interesantemente, el peso molecular del antígeno recombinante fue considerablemente mayor al predicho (26 kDa), lo cual se asocia a modificaciones postraduccionales, como la glicosilación o la fosforilación, las cuales se han reportado como beneficiosas para el desarrollo de biofármacos, ya que otorgan estabilidad térmica y heterogeneidad de la molécula recombinante, lo que puede potenciar la actividad

inmunogénica y la vida media del producto (Walsh y Jefferis, 2006). Recientemente, Hernández-Ramírez et al. (2020) expresaron el gen del cáncer de mama (BCB) en *Schizochytrium* sp. a través del sistema Algevir. Para esto, el gen del BCB se insertó en la región río abajo del promotor *AlcA* de pAlgevir, que al ser inducido con etanol absoluto al 1% permitió la recuperación de la proteína recombinante inmunorreactiva en diferentes tiempos de muestreo post-inducción, obteniendo un rendimiento máximo de 637 µg/g BPH a las 24 h. También, péptidos antigénicos relacionados con la esclerosis múltiple (MS) ligados a la secuencia 2A de picornavirus (que permite producir péptidos individuales durante la traducción) se han producido con un rendimiento máximo de 5 µg de péptidos de MS-2A por gramo de hojas frescas de *Nicotiana tabacum* (Arévalo-Villalobos et al., 2020). Por lo tanto, el sistema Algevir ofrece resultados prometedores para la recuperación de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, como vacunas orales, sin embargo, es necesario se realicen los esfuerzos para establecer los protocolos de escalamiento y maximizar la recuperación de los antígenos recombinantes.

2.2.2 Antígeno ToxA de *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria halófila Gram negativa y se considera como el agente etiológico de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones, la cual causa altas tasas de mortalidad en acuicultura (Lee et al., 2015; Campa-Córdova et al., 2017; Tran et al., 2020). Otras especies de *Vibrio* también pueden causar la AHPND, como *Vibrio owensii*, *Vibrio campbelli* y *Vibrio harveyi* (Kumar et al., 2020). Además, *V. parahaemolyticus* provoca gastroenteritis agudas en seres humanos, donde la expresión de hemolisinas termoestables, termolábiles y relacionadas (TDH, TRH y TLH) son las principales toxinas asociadas a los eventos de enfermedad (Li et al., 2019). Interesantemente, no se cuentan con reportes que indiquen que la cepa causante de la AHPND en camarones provoque cuadros de gastroenteritis en seres humanos, debido a que no porta los genes codificantes a las hemolisinas (Kondo et al., 2015). Las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de la AHPND portan el plásmido pVA1 (~70 kpb) que codifica para las toxinas ToxA y ToxB y que se unen para formar la toxina binaria ToxAB (Kondo et al., 2015; Tran et al., 2020). De manera interesante, solo las toxinas ToxAB y ToxB generan daño celular en las células resortivas del hepatopáncreas (HP), en las células Blister (B), fibrilares y embrionarias, lo que deriva en una contracción de las

células epiteliales del túbulo y en el desprendimiento de la luz del lumen del hepatopáncreas (Lai *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2019).

Tabla 1. Antígenos recombinantes producidos con el sistema Algevir. Publicaciones existentes sobre el uso del sistema Algevir en microalgas y plantas.

Antígeno	Rendimiento	Hospedero/Modelo/Vía	Principales hallazgos	Referencia
Zaire ebolavirus GP1 y Subunidad B <i>E. coli</i> (LTB)	GP1 1.25 mg/g BH LTB 0.12 mg/g BH	<i>Schizochytrium</i> sp./ND/ND	Desarrollo del vector Algevir, con promotores inducibles por etanol, su replicación es por círculo rodante.	Bañuelos-Hernández <i>et al.</i> , 2017
Zika virus, ZK (1,2 y 3)	241 µg/g BH	<i>Schizochytrium</i> sp./Murino/Oral vs subcutáneo	La administración vía oral demostró incrementar los niveles de IgG e IgA para los diferentes epítomos, pudiendo inducir una respuesta sistémica específica.	Márquez-Escobar <i>et al.</i> , 2018
Alzheimer LTB:RAGE	DO 1.0: 380 µg/g BH, DO 0.5: 180 µg/g BH	<i>Schizochytrium</i> sp./Microalga/ND	Expresión de una proteína funcional de 18 kDa LTB:RAGE inmunorreactiva a pruebas de western blot.	Ortega-Berlanga <i>et al.</i> , 2018
BCB (TAAs) Cáncer de mama	637 µg/g BH	<i>Schizochytrium</i> sp./Murino/subcutáneo	El sistema permitió producir la proteína recombinante IRR en todas las etapas evaluadas.	Hernández-Ramírez <i>et al.</i> , 2020
MS-2A	0.5 µg/g de hojas fresca	<i>Nicotiana tabacum</i> /Murino/Oral	Se expresó un antígeno IRR de MS-2A en inmunizaciones de ratones con 50 mg de extracto seco de tabaco administrado vía oral.	Arevalo-Villalobos <i>et al.</i> , 2020

IRR, inmunorreactivo; ND, no descrito; BH, biomasa peso húmedo.

De manera similar, la administración de ToxB provoca ligera mortandad (10%) en camarones (Lee *et al.*, 2015), mientras que se ha reportado que ToxA no induce los síntomas de la enfermedad, pero si genera respuesta del sistema inmune innato (Reyes-Becerril *et al.*, 2016). Interesantemente, la aplicación de ToxA recombinante (rToxA) induce respuestas inmunes en ratones y peces sometidos a retos microbianos. Inicialmente, la rToxA se utilizó en protocolos experimentales de inmunización por inmersión en camarones, protegiéndolos contra el reto

infeccioso con *V. parahaemolyticus* con una mortalidad menor (1.66%) respecto al control (48.33%) (Campa-Córdova *et al.*, 2017). Por otra parte, la aplicación intraperitoneal de rToxA en peces (huachinango, *Lutjanus peru*; y dorada, *Sparus aurata*) aumentó la actividad anti-proteasa y catalasa de las mucosas de la piel, las cuales se encuentran relacionadas con la defensa por infección bacteriana y el balance redox, respectivamente (Reyes-Becerril *et al.*, 2016, 2017). Recientemente, la rToxA se expresó en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los ratones inmunizados con el liofilizado de tabaco aumentaron los títulos de IgA e IgG anti-ToxA (Monreal-Escalante *et al.*, 2019). En síntesis, el uso de ToxA producida de manera heteróloga presenta una alternativa para la protección de cultivos de camarón ante la AHPND y un posible candidato vacunal contra la infección causada por *V. parahaemolyticus* (Campa-Córdova *et al.*, 2017; Monreal-Escalante *et al.*, 2019).

2.3 Optimización de la producción de proteínas recombinantes en *Schizochytrium sp.*

El crecimiento celular es un evento de señalización y división periódica, en el cual ocurre la acumulación de masa y su posterior disminución al generar las células hijas, por lo que cualquier cambio o variación en las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes, se verá reflejado en la activación, disminución o inactivación de rutas metabólicas asociadas al crecimiento (Shahrezaei y Marguerat, 2015). Entonces, el rendimiento en la producción de proteína (g/L de cultivo o g/g de biomasa) y su productividad ($\text{g/L}\cdot\text{h}^{-1}$) es dependiente de la composición del medio y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el microorganismo, especialmente las relacionadas con la fuente de carbono, de nitrógeno y la temperatura de crecimiento (Reihani y Khosravi-Darani, 2019). De igual manera, la producción de una proteína recombinante, el mantenimiento del plásmido y el mantener un alto nivel de expresión de la proteína de interés, generan una carga metabólica adicional en el microorganismo; lo que puede provocar una respuesta de estrés similar a la ocasionada por los cambios en las condiciones ambientales, dando como resultado la degradación del producto, el plegamiento incorrecto de la proteína heteróloga o en la formación de cuerpos de inclusión (Bäcklund *et al.*, 2011). Además, la producción de proteínas recombinantes presenta limitaciones de acuerdo con el sitio donde ocurre la traducción. Por ejemplo, la traducción de plásmidos en el citosol puede generar altas concentraciones de la proteína recombinante, pero

presenta limitaciones asociadas al plegamiento, purificación y la presencia de proteasas (Bäcklund *et al.*, 2011). Como resultado, la transformación transitoria se encuentra condicionada por múltiples factores, entre ellos se tienen la densidad inicial del cultivo, la concentración de ADN disponible para la transformación y las condiciones de cultivo (nutricionales y ambientales) deben ser las adecuadas para permitir el proceso de transformación y la replicación de la célula transformada (Greene *et al.*, 2021).

En general, los esfuerzos de las investigaciones existentes se han centrado en la optimización de la producción de los lípidos totales y PUFA (Yokochi *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2007; Manikan *et al.*, 2014; Panchal *et al.*, 2016; Trovão *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2020) así como para la obtención de β -carotenos (Aasen *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2019; Chang *et al.*, 2020). La Tabla 2 muestra algunas de las patentes registradas para el uso de microalgas pertenecientes a los órdenes *Labyrinthulidae* y *Traustochytriidae* de los cuales se desprenden los géneros relacionados o reclasificados como *Schizochytrium*. Como se observa, la producción de proteínas recombinantes en *Schizochytrium* sp. es un campo particularmente inexplorado. Lamentablemente, solo existen algunas patentes centradas en la producción de proteínas heterólogas, específicamente en el desarrollo de vectores de expresión que permiten producir la proteína de interés como cuerpos extracelulares que mantienen su actividad, que pueden funcionar como anticuerpos o como estimuladores de células T, así como mejorar el sistema de excreción y adherencia de la proteína al retículo endoplasmático (APT *et al.*, 2017; Caiazza *et al.*, 2017; Bayne *et al.*, 2019). Diversos grupos de colaboración se han centrado en el mejoramiento de los cultivos de *Schizochytrium* sp. para maximizar la producción de PUFA, principalmente DHA. Remarcablemente, el grupo de colaboración de Ren Lujing de la Universidad de Tecnología de Nanjing, China; han realizado una serie de experimentos desde el año 2010 sobre la optimización de los cultivos de *Schizochytrium* sp. con el fin de mejorar la producción de ácido docosahexanoico (Ren *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021) y pigmentos como β -carotenos y astaxantina (Tang *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022), a través de procesos como la adaptación evolutiva de laboratorio en altas temperaturas (Hu *et al.*, 2021), control de eficiente de la aireación (Ren *et al.*, 2010) o a través de la regulación del proceso de fermentación al evaluar el efecto de nutrientes específicos suplementados en el medio de cultivo (Ren *et al.*, 2014b; a; Sun *et al.*, 2014). De manera interesante, estos trabajos han logrado establecer que el suministro de amino

nitrógeno, como glutamato de sodio (GMS), permite evadir la producción de lípidos saturados, promoviendo una sobre utilización de la glucosa para la generación de biomasa y derivando en un incremento en la biomasa total final al tiempo que se disminuye la proporción de lípidos por gramo de biomasa seca. A continuación, se sintetizan los trabajos más relevantes al respecto:

En primer lugar, Ren et al. (2010) establecieron dos experimentos en los que se suministraron dos niveles de aireación de 0.6 vvm y 0.4 vvm a un cultivo por lotes alimentado con glucosa a 20 g/L. En condiciones de baja aireación el agotamiento del GMS se alcanzó a las 44 h, generando un incremento sostenido de la biomasa inversamente proporcional a la tasa de utilización de nitrógeno, donde la acumulación de lípidos se disparó una vez que el GMS había sido agotado en el medio de cultivo. Por otra parte, la aireación con 0.6 vvm indujo un consumo más rápido del GMS (32 h) en comparación con el de 0.4 vvm, provocando una acumulación más rápida de lípidos y una mayor tasa de utilización de glucosa, acelerando la producción de biomasa, pero generando una mayor acumulación de lípidos que en el sistema de baja aireación. En un estudio de seguimiento, Ren et al. (2014) compararon el efecto de suministrar GMS en cultivos por lote alimentado con un volumen de trabajo de 4 500 L, obteniendo que un suministro de 20 g/L de GMS incrementa la concentración final de biomasa (48.03 g/L) pero disminuye el contenido de lípidos. Mientras que el sulfato de amonio a una concentración de 3.5 g/L disminuye la habilidad de utilizar la glucosa del medio de cultivo, derivando en un decremento de la concentración de biomasa y genera un aumento en la concentración de los lípidos totales. Más recientemente, Sun et al. (2018) realizaron la optimización del cultivo de *Schizochytrium* sp. HX-308 al suplementar el caldo de fermentación con ácido fúlvico y EDTA. En este sentido, el efecto del ácido fúlvico logró incrementar la concentración de biomasa en un 23% cuando se adicionaba 20 mg/L, respecto al cultivo no suplementado; mientras que el EDTA adicionado en concentraciones de 0.1 a 1.0 g/L incrementó la disponibilidad de los nutrientes y la adquisición del ácido fúlvico por *Schizochytrium* sp. HX-308, generando un incremento en la producción de lípidos de 0.52 g/L·h⁻¹ respecto al cultivo no suplementado. Adicionalmente, cuando se realizó la fermentación de *Schizochytrium* sp. HX-308 en un cultivo por lotes con una suplementación de 20 mg/L de ácido fúlvico y 1.0 g/L de EDTA se alcanzó un rendimiento de 130.7 g/L de biomasa seca (BS) que se traduce a 36.4% más elevado que el grupo control.

Tabla 2. Patentes registradas para la optimización del cultivo de *Schizochytrium* sp., revisión realizada en las páginas de la World Intellectual Property Organization (WIPO), European Patent Office (EP) y United States Patent and Trademark Office (USPTO) se muestran las asociadas con la producción de biomoléculas como proteínas recombinantes, lípidos y glicomoléculas en *Schizochytrium* sp. y géneros relacionados taxonómicamente como *Labyrinthulomycetes* y *Aurantiochytrium*.

Objetivo patente	Cepa	Escala - Rendimiento	Condiciones de cultivo	Hallazgos principales	No. Patente/Estatus	Referencia
Cultivo con alto rendimiento de proteína.	<i>Schizochytrium limacinum</i>	ND	Medio complejo a base de melaza de soya. Inc.: 72-120 h.	Desarrollo de un proceso de fermentación que genera biomasa rica en proteína de bajo costo.	CN 114214212 A Pendiente	Shusong <i>et al.</i> , 2022
DHA y PUFA para cosméticos y medicamentos.	<i>Aurantiochytrium limacinum</i> * <i>Schizochytrium</i>	1 L Aceite total 40% (p/v)	Medio simple (C: 1 – 15%, N: 0.1 – 4%) Inc.: 20 – 32°C, 1 a 3 días, 600 rpm. pH: 7.0	Desarrollo de un método de manufactura para la obtención de un aceite rico en DHA.	US2021/0071101 A1 Inactiva	Takayoshi <i>et al.</i> , 2021
Aceite rico en PUFA (EPA, DHA, DPA) para sustituir el aceite de pescado.	<i>Schizochytrium</i> sp.	300 L BS 13.80 kg (4 días) Aceite total 5.05 kg DHA 27.67% EPA 9.44% n6DPA 11.02% n3DPA 1.87%	Medio definido (glucosa 90 – 120 g/L, GMS 16 – 32 g/L, YE 2 – 16 g/L) con alimentación de 40 g/L de glucosa a las 48 h. Inc.: 23-29°C, 96 h, 200-500 rpm. pH: 7.0 aireación: 0.5-2 vvm	Optimización del proceso de fermentación con sobre compensación de nitrógeno (GMS, YE), propicia la acumulación de biomasa y la producción de PUFA.	US2020/037078A 1, Activa	Zehua <i>et al.</i> , 2020
Producción de polipéptidos heterólogos en la microalga y en cuerpos extracelulares.	<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	1 L ND	Medio no limitante con suplementación mixta de N (glucosa 10 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g/L, GMS 3 g/L) Inc.: 27°C, 48 h, 200 rpm. pH: 6.5	Desarrollo de un vector de expresión y de un método para utilizar los cuerpos extracelulares producidos por la microalga como vehículo para mantener la función y actividad de la proteína heteróloga.	EP 3505632 A1 Activa	Bayne <i>et al.</i> , 2019

Continuación Tabla 2

Glicomoléculas con baja sulfatación (Ig).	<i>Labyrinthomyces (Schizochytrium sp.)</i>	ND	ND	Producción de la oligosacaril transferasa heteróloga para la producción de anticuerpos con glicosilación similar a la de mamíferos.	WO2019/213069A1 Pendiente	Caiazza <i>et al.</i> , 2019
DHA.	<i>Schizochytrium sp.</i>	1 L DHA 25 g/L	Medio no limitante con suplementación inorgánica de N (glucosa 4-8 g/L y amonio 28%). Inc.: 25-28°C, 2 a 3 días, 180-220 rpm. pH: 6.0-6.5	Producción de DHA por cultivo sólido de <i>Schizochytrium</i> y fermentación líquida, limita el uso de agua y la generación de residuos asociados.	US10006067 B2 Activa	Jinqing <i>et al.</i> , 2018
Biomasa rica en DHA, Alimento para animales o humanos.	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	7000 L DHA>35% TAG AP>40% TAG	Medio no limitante con suplementación orgánica de N (glucosa 6 kg, GMS 4.49 kg, YE 0.45 kg). Sistema fed-batch de tres etapas.	Cultivo en condiciones heterotróficas. Después de la fermentación se requiere de una pasteurización para inhibir la degradación de los lípidos. El producto final se suministra en tabletas, cápsulas o polvo.	US2018/01605A1 Inactiva	Comini y Pora, 2018
Proteínas recombinantes (pCAB) anti-CD19, CD3, CD38 o PSMA.	<i>Labyrinthomyces (Schizochytrium sp.)</i>	>10 L PST 5 mg/L/ 24 h	ND	Construcción de un casete de expresión para proteínas heterólogas que pueden funcionar como anticuerpos o como potenciadores de células T.	WO2017/161005 A1 Pendiente	Caiazza <i>et al.</i> , 2017

Continuación Tabla 2.

Objetivo patente	Cepa	Escala - Rendimiento	Condiciones de cultivo	Hallazgos principales	No. Patente/Estatus	Referencia
Diseño de plásmidos para la producción de proteínas recombinantes.	<i>Labyrinthomyces (Schizochytrium sp. ATCC 20888)</i>	ND	Medio M2B (glucosa 10 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.8 g/L) Inc.: 27°C, 72-168 h, 150 rpm. pH: ND	Diseño de los vectores pSchizE1 y pSchiz-sGr capaces de expresar la proteína eGFP que se adhiere a RE y una parte es excretada.	US2017/0145461 A1 Inactiva	APT <i>et al.</i> , 2017
DHA y Astaxantina, Producción industrial de DHA y astaxantina.	<i>Schizochytrium (mixotrófica)</i>	1 – 2 L DHA 40 – 60% LT Astaxantina 0.1 – 0.2% peso seco	Inc.: 26°C, 250 – 600 rpm. aireación: 0.25-1 vvm.	Cultivo de <i>Schizochytrium sp.</i> con iluminación intermitente de 30 – 400 µmol·m ⁻² ·s ⁻¹ como un flash de 2 a 200 veces por hora. Promueve el incremento de la producción de PUFA y carotenoides.	US2015/0037838 A1 Activa	Romari <i>et al.</i> , 2015
PUFA, Aceite rico en DHA para uso como suplemento, cosméticos y medicamentos.	<i>Schizochytrium limacinum</i> HX-308	500 mL a gran escala (ND) DHA 5.0 g/L AGT 10 g/L	Medio no limitante (glucosa 40 g/L, YE 2 g/L, GMS 10 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 6 g/L, Glicina betaína 10 – 100 mmol/L). Inc.: 25°C, 170 rpm, 24 h hasta agotamiento de glucosa.	Método simple y eficiente para incrementar el rendimiento de la producción de PUFA.	US2013/0217085 A1 Inactiva	Huang <i>et al.</i> , 2013
Producción de polipéptidos de hemaglutinina-neuraminidasa (HN).	<i>Schizochytrium sp. ATCC 20888</i>	1 L ND	Medio no limitante con suplementación inorgánica de N (glucosa 20 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 17.5 g/L) Inc.: 20-30°C, 200 rpm pH: 5.5-9.5	Desarrollo de un método para la expresión de HN heteróloga en microalgas (<i>Schizochytrium sp.</i>) de manera extracelular y su recuperación a partir del medio de cultivo.	US2011/0195480 A1 Activa	Bayne <i>et al.</i> , 2011

Finalmente, Guo et al. (2020) investigaron el uso de la alimentación intermitente y continua durante la fermentación de *Schizochytrium* sp. HX-308 con el fin de establecer la eficiencia de la producción de DHA, utilizando un medio de agua de mar artificial suplementado con 70 g/L de glucosa y 20 g/L de GMS con una proporción C:N de 3.5:1. En este sentido, los autores reportaron que la alimentación intermitente causa el cambio de la actividad metabólica y transcripcional de *Schizochytrium* sp. debido a la fluctuación de las condiciones ambientales y nutricionales (presión osmótica y concentración de sustrato). Esto contrastó significativamente con la alimentación continua, donde la utilización del sustrato permaneció relativamente constante. Mejor aún, los mayores rendimientos para biomasa, contenido de lípidos y DHA se obtuvieron durante la alimentación continua, alcanzando 117.58 g/L, 68.74 g/L y el 54.68% de LT, respectivamente. En contraste, la alimentación intermitente ocasionó un daño celular significativo y el contenido de DHA fue 4.68% menor que la alimentación continua. En síntesis, los trabajos previamente descritos sobre la optimización de los cultivos de *Schizochytrium* sp. realizados por el grupo de la Universidad de Tecnología de Nanjing pueden dar el soporte para establecer una ruta para la producción de proteínas totales y recombinantes, al encontrar una concentración idónea de amino nitrógeno que permita el recambio metabólico de la biosíntesis de lípidos hacia la producción de proteína total o recombinante. Estableciendo una estrategia de transformación eficiente con un diseño optimizado del medio de cultivo que contemple relaciones C:N bajas, es decir, en altas concentraciones de nitrógeno. Por otra parte, la optimización de cultivos de *Schizochytrium* sp. para su uso a escalas industriales se ha desarrollado ampliamente para la producción de ácidos grasos saturados e insaturados, en la **Tabla 2** se listan algunas de las patentes registradas para la obtención de biomoléculas diversas a partir de *Schizochytrium* sp.

Notablemente, para la producción de biomasa, proteínas o polipéptidos, se prefiere el uso de medios no limitantes que presentan una suplementación mixta de fuente de nitrógeno y, generalmente, que incorporan sulfato de amonio y glutamato de sodio para la fermentación a escala industrial de *Schizochytrium* sp. (Bayne et al., 2011, 2019; Huang et al., 2013; Comini y Pora, 2018; Jinqing et al., 2018; Zehua et al., 2020). En este caso, el uso del GMS permite una sobreproducción de DHA aunado a la intensificación de la producción de biomasa (Ling et al., 2015). Además, las condiciones de cultivo a escalas superiores de los 300 L como pH (5.5-7.5),

temperatura (25-30°C), agitación (150-600 rpm) y aireación (0.5-2 vvm) se mantienen en comparación con el nivel laboratorio a volúmenes menores de diez litros (Caiazza *et al.*, 2017; Comini y Pora, 2018; Zehua *et al.*, 2020). Específicamente, el cambio en la proporción C-N y el tipo de fuente seleccionada (orgánica o inorgánica) impactan de forma directa sobre la concentración final de biomasa y, por lo tanto, de proteína. Esto se aborda en la sección siguiente.

2.4 Uso de la relación C-N para la optimización de cultivos de microalgas

La adición de componentes específicos en el medio de cultivo puede direccionar las rutas metabólicas de los microorganismos hacia la generación de un producto deseado. En *Schizochytrium* sp. se ha determinado que el uso de glutamato monosódico (GMS) permite incrementar la producción de biomasa durante la fermentación alimentada (Ren *et al.*, 2014b). Este efecto ha sido observado en otras microalgas, por ejemplo, el uso de urea como fuente de nitrógeno en cultivos de *Tetrademus bernardii* generó, cuando la concentración de glucosa se mantuvo de 10 a 40 g/L, una mayor producción de biomasa en comparación con la utilización de nitrato de sodio (Gao *et al.*, 2021). De manera similar, Ju *et al.* (2020) evaluaron el efecto del nitrógeno sobre el crecimiento celular de *Schizochytrium* sp. ABC101. En este caso, los autores describieron que, durante la fermentación en lotes, con regulación del nivel de glucosa de 10 a 40 g/L, la deficiencia de nitrógeno impedía el crecimiento celular. Sin embargo, un suministro de nitrógeno por encima de los 4000 mg/L no generó un incremento significativo en la tasa de generación de biomasa. Desde luego, la preferencia por un tipo de fuente de carbono y nitrógeno se relaciona con el microorganismo y las rutas biosintéticas presentes.

En este sentido, el α -cetoglutarato funciona como punto de unión de la glucólisis, del flujo de nitrógeno y del ciclo TCA (Lozano Terol *et al.*, 2019). Diversos trabajos se han centrado en la optimización de la producción de lípidos totales y PUFAS al limitar la concentración de nitrógeno respecto a la fuente de carbono, para direccionar las rutas biosintéticas y promover una mayor producción de ácidos grasos, especialmente al generar el estado de agotamiento de nitrógeno y direccionar el acetil-CoA hacia los sistemas FAS y PKS (Ren *et al.*, 2014b; Yang *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Ju *et al.*, 2020). Sin embargo, al agotarse el nitrógeno asimilable, solo una porción de la glucosa presente es transformada a biomasa, lo que detiene el crecimiento celular y da

preferencia a las rutas de mantenimiento interno. En este sentido, estudios como los de Nazir et al. (2018) y Trovão et al. (2020) realizados sobre las cepas *Aurantochytrium* sp. SW1 y AF0043, respectivamente, han buscado optimizar la producción de biomasa y la generación de DHA a través de una mejor suplementación de amino nitrógeno asimilable. En ambos casos se observó que el glutamato de sodio genera un efecto positivo sobre la producción de biomasa cuando se adiciona como fuente mayoritaria en el medio de cultivo. Sin embargo, la proporción ideal depende del tipo de cepa seleccionada, por lo que es indispensable realizar un proceso previo de estandarización y optimización antes de utilizar el medio de cultivo para la producción final.

Por otra parte, los métodos para valorar las respuestas hacia cambios experimentales en el cultivo de *Schizochytrium* sp., y otras microalgas, son diversos. En este sentido, la metodología de superficie de respuesta (RSM) es ampliamente utilizada en combinación con los diseños experimentales de composición central (CC), Box-Behnken (BB) o de Plackett-Burman (PB) para la optimización de la producción de metabolitos de interés comercial. Por ejemplo, aplicando la RSM con un diseño de PB, Kujawska et al. (2021) determinaron que el uso de glicerol residual de la producción de biodiesel es una alternativa como fuente de carbono en el crecimiento de *Schizochytrium* sp. en un proceso de fermentación por etapas. De manera similar, al aplicar la RSM para la producción de biodiésel, Fawzy y Alharthi (2021) optimizaron el crecimiento de *Dunaliella parva*, obteniendo 1.2 veces mayor cantidad de biomasa que respecto al medio convencional sin optimización. Sin embargo, no existen trabajos reportados sobre la optimización para la producción de macromoléculas, como proteínas recombinantes, en microalgas heterótrofas, por lo que es atractivo el explorar la optimización de los componentes del medio de cultivo, en condiciones de transformación genética.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de microalgas como plataformas para la producción de biomoléculas es una alternativa rentable, de fácil instalación, operación y escalabilidad en comparación con plataformas comunes, como plantas y líneas celulares de mamíferos. Además, las microalgas heterótrofas como *Schizochytrium* sp. presentan ventajas significativas sobre otros organismos modelo, debido a los bajos requerimientos nutricionales, una expresión eficiente de genes heterólogos y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. Interesantemente, *Schizochytrium* sp. produce biomoléculas que naturalmente presentan propiedades inmunoestimulantes, como el DHA y polisacáridos, que pueden potenciar el efecto de los antígenos recombinantes producidos de manera heteróloga. De igual manera, algunas proteínas recombinantes pueden actuar como inmunomoduladores del sistema inmune innato y adaptativo; y, además, pueden ser utilizadas para el entrenamiento y estimulación del sistema innato de organismos que no cuentan con respuesta adaptativa. Recientemente, el antígeno recombinante ToxA (PirA de *Vibrio parahaemolyticus*) se ha expresado en *Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1 y la proteína purificada se ha probado en modelo murino y la inmunización con ToxA recombinante ha inducido la producción de anticuerpos IgA, IgM e IgG, convirtiéndola en un prototipo potencial para la producción de vacunas orales. Por otra parte, la transformación genética de *Schizochytrium* sp. a través del sistema Algevir requiere que el cultivo de la microalga se encuentre en una densidad óptica de 1.0, la misma que se alcanza a las 72 h post-inducción, sin embargo, este tiempo coincide con el agotamiento del nitrógeno disponible en el medio de cultivo, lo que promueve la biosíntesis y acumulación de ácidos grasos, frenando la producción de biomasa y con ello la producción de proteínas totales. En este caso, el uso de fuentes orgánicas de nitrógeno, como el glutamato de sodio, propician la generación de biomasa y reducen la biosíntesis de lípidos. A su vez, la producción de proteínas totales y recombinantes es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno en el medio. Por lo anterior, se planteó la siguiente pregunta científica: ¿La producción de antígenos recombinantes en *Schizochytrium* sp. estará relacionada con los parámetros de crecimiento, cuando se utiliza una proporción alta de amino nitrógeno, como el GMS, respecto a la fuente de carbono?

4. HIPÓTESIS

Si *Schizochytrium* sp. ha sido transformada eficientemente para la obtención de antígenos recombinantes a través del sistema Algevir a nivel laboratorio, entonces, será posible optimizar el rendimiento de la expresión del antígeno recombinante ToxA al modificar la relación de C:N en el medio de cultivo, incrementando la concentración de amino nitrógeno libre respecto al valor estándar presente en el medio de cultivo tradicional, lo que disminuirá la producción de lípidos totales al evitar el agotamiento de nitrógeno en el medio y mejorar la utilización de la fuente de carbono.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar las condiciones de cultivo que maximizan la producción del antígeno ToxA recombinante *Schizochytrium* sp.

5.2 Objetivos particulares

1. Transformar *Schizochytrium* sp. con la construcción genética que codifica para el ToxA mediante el sistema Algevir.
2. Evaluar los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total y del antígeno recombinante ToxA en *Schizochytrium* sp. a nivel laboratorio utilizando GMS como fuente de nitrógeno.
3. Optimizar los parámetros de crecimiento asociados a la producción del antígeno recombinante ToxA en *Schizochytrium* sp. utilizando GMS como fuente de nitrógeno.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Microorganismo, medio y condiciones de cultivo

La cepa *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 se mantuvo en agar YPD (20 g/L peptona, 20 g/L glucosa, 10 g/L extracto de levadura, 30 g/L NaCl) a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, realizando pases seriados durante el tiempo en que se desarrollaron los experimentos. Los cultivos semillas se obtuvieron al inocular dos a tres colonias aisladas de *Schizochytrium* sp. en caldo YPD y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{650} de 1.0. Posteriormente, los ensayos de crecimiento se realizaron en alta disponibilidad de amino nitrógeno. Para esto, el medio agua de mar sintética modificada (ASWm, NaCl 30 g/L, base ASWm, glucosa 40 g/L, extracto de levadura 0.4 g/L) suplementado con glutamato de sodio (0, 5, 10, 15 y 20 g/L) se inoculó con 4% v/v del cultivo semilla de *Schizochytrium* sp. El cultivo de *Schizochytrium* sp. en ASWm se mantuvo a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm por 96 h, tomando muestras cada 12 h.

Para los ensayos de transformación transitoria se transfirió un volumen del 4% (v/v) del cultivo semilla a un matraz de 500 mL conteniendo 300 mL de caldo YPD o ASWm. El cultivo se incubó a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm hasta alcanzar una DO_{650} de 0.7 y, en este punto, se procedió a la transformación mediada por *A. tumefaciens* (Márquez-Escobar et al., 2018a). Las cepas de *A. tumefaciens* con la construcción genética pAlgevir-ToxA y se recuperó a partir de un vial en criopreservación (YM 25% glicerol, -80°C). Para esto se tomaron 10 μL del cultivo stock, se sembraron en agar LB con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 h. Posteriormente, a partir de éstas se realizó la confirmación de la presencia del plásmido y del gen codificante para ToxA. Las cepas de *A. tumefaciens* confirmadas con la construcción se mantuvo en LB con kanamicina hasta su uso.

6.2 Construcción del vector de expresión

El gen codificante para el antígeno ToxA se insertó previamente en el vector pAlgevir (Monreal-Escalante et al., 2019). Brevemente, en este caso, se realizó la optimización de codones sobre el gen sintético diseñado para favorecer la expresión en *Schizochytrium* sp., y fue sintetizado por la compañía GenScript (New Jersey, USA). El gen sintético se subclonó en el vector pAlgevir

previamente descrito por Bañuelos-Hernández et al. (2017), utilizando los sitios de restricción *Sma*I y *Bam*HI/*Pst*I para obtener la construcción pAlgevir-ToxA, de acuerdo con lo descrito por Márquez-Escobar et al. (2018a). Posteriormente, la construcción se transfirió por electroporación a *A. tumefaciens* GV3101 de acuerdo con el protocolo descrito por Cangelosi et al. (1991); las cepas transformadas se sembraron en medio LB con kanamicina (50 mg/mL) y se seleccionaron las clonas positivas, confirmadas por PCR y secuenciación; una vez confirmado el vector se recuperaron en medio YM con kanamicina y se mantuvo en criopreservación a -80°C en glicerol al 25%.

6.3 Comprobación de la presencia del vector pAlgevir en las cepas de *A. tumefaciens*

De 3 a 5 colonias aisladas de la cepa AgToxA se sembraron en medio YM (400 mg/L extracto de levadura, 10 g/L manitol, 100 mg/L NaCl, 200 mg/L MgSO₄, K₂HPO₄, pH 7.0) con kanamicina 50 mg/mL, y se incubaron a 28°C a 200 rpm por 24 h. Posteriormente, la biomasa del cultivo líquido (3 mL) se recuperó y se concentró por centrifugación a 13,000 rpm por 10 min. A partir del pellet se extrajo el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Birnbom, H. C. 1983, Ríos-Huerta et al., 2017). Para esto, 150 µL de solución BD I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8.0) y 20 µL de RNAsa se adicionaron, se agitó en vortex por 15 s y se adicionaron 300 µL de solución BD II (0.2 N NaOH, 1% SDS). Enseguida se mezcló por inmersión suave y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después, 225 µL de solución BD III (5 M acetato de potasio, 2 M ácido acético más 28.5 mL agua) se adicionaron, se mezcló por inversión fuerte y se incubó en congelación a -20°C por 5 min. La solución se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo con 700 µL de isopropanol y 10% de acetato de sodio 3 M pH 5.2, y se incubó por 20 min a -80°C. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70% con buffer TE agitando suavemente. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. Finalmente, el sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en 20 µL de buffer TE 1x calentando suavemente a 40°C hasta disolución total. El ADN se conservó en congelación hasta su uso.

Posterior a la extracción, la relación 260/280 y 260/230 (Nanodrop 2200) se determinó y los datos de calidad y concentración se utilizaron para ajustar las reacciones de PCR. Adicionalmente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para esto se tomaron 2.5 µL

de ADN que se mezclaron con un volumen igual de buffer de carga SYBER Safe. El volumen se depositó en el gel y se corrió a 80 volts por 30 min. El gel se reveló por exposición a luz UV en el fotodocumentador y se estableció la calidad de la extracción.

Para corroborar la presencia del gen de ToxA en las construcciones de pAlgevir se realizó la digestión del ADN plasmídico y la PCR punto final. Primeramente, el ADN plasmídico se digirió con las enzimas *KpnI* y *SacI*. Para esto, se preparó un volumen de reacción de 10 μ L que contenía 2 μ L de buffer de corte (Neb Biolabs Inc, New England), 0.3 μ L de cada enzima, 3.7 μ L agua destilada y 4 μ L de ADN plasmídico, en mezclas independientes por par de enzimas utilizado y por construcción. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Concluida la digestión se adicionaron 3 μ L de buffer de carga y se corrió en un gel de agarosa al 1.2% a 80 volts por 1 h. En la Fig. 2, se muestra la secuencia de aminoácidos para el gen de ToxA y los sitios de corte utilizados para la digestión del plásmido pAlgevir::ToxA.

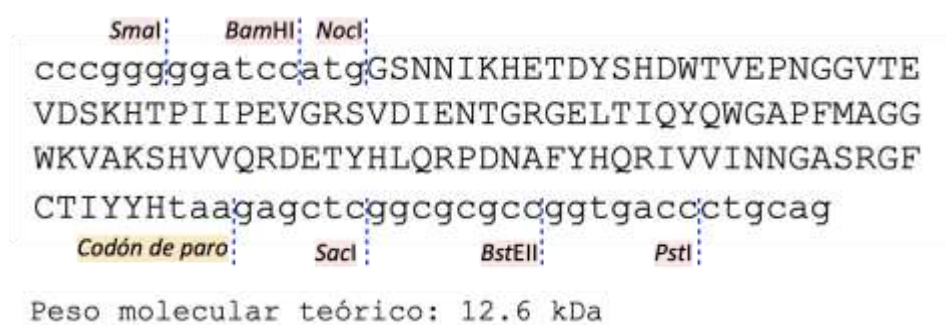


Figura 2. Secuencia de la proteína ToxA expresada en *Schizochytrium* sp. Secuencia de aminoácidos codificados por el gen optimizado de ToxA para ser expresados en *Schizochytrium* sp. (~12.6 kDa). Los sitios de corte de las enzimas de restricción se muestran como banderas.

Adicionalmente, una PCR punto final se realizó a partir del ADN plasmídico obtenido de *A. tumefaciens*. Para esto se preparó una mezcla de reacción de 25 μ L (2.5 μ L buffer PCR, 1.5 μ L $MgCl_2$, 0.5 μ L dNTPs, 0.3 μ L cebadores, 0.25 μ L Taq polimerasa, 18.95 μ L agua grado biología molecular y 1 μ L ADN). Los primers utilizados se listan en la Tabla 3 y el protocolo utilizado para la PCR punto final se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación de ToxA en DNA plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens*.

Código	Secuencia 5'-...-3'	Longitud	% CG	Tm (°C)	Producto
ToxA-F	CTAAGAGCCACGTCGTTTCAG	20 nt	55	58	142 pb
ToxA-R	GCGCCGAGCTCTTAATGATA	20 nt	50	58	
NosTer	TTTATTGCCAAATGTTTGAACG	22 nt	32	59	2000 pb
Prom35S	GAGCATCGTGGA AAAAGAAGAC	22 nt	45	64	

Tabla 4. Protocolo para la detección del gen ToxA en ADN plasmídico de *A. tumefaciens*.

Paso	Condición
Desnaturalización I	95°C, 5 min
Desnaturalización II	95°C, 30 s
Alineamiento	59°C, 30 s para ToxA 56°C, 30 s para NosTer x 35
Elongación I	72°C, 1 min
Elongación II	72°C, 5 min
Enfriamiento	4°C, 2 min

6.4 Producción de sueros hiperinmunes contra ToxA

Para la evaluación de los niveles de expresión e integridad del antígeno recombinante ToxA, se produjeron sueros hiperinmunes anti-ToxA. Para esto, ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (n = 3, Fig. 3) se inmunizaron con la proteína purificada ToxA de un extracto proteico de *Escherichia coli* BL21. El esquema de inmunización consistió en: día 1, inmunización con 10 µg de ToxA semipurificada emulsionado con 10 µL de adyuvante de Freud completo; días 8, 15 y 21, inmunización con 50 µg de ToxA semipurificada emulsionados en un volumen igual de adyuvante de Freud incompleto. El día 21, posterior a la inmunización, los ratones fueron sangrados para cuantificar la producción de anticuerpos anti-ToxA. Para esto, se realizó una incisión en la base de la cola y se recuperó la sangre en un tubo eppendorf. El suero se separó por centrifugación y se realizó un análisis de ELISA para cuantificar los títulos de anticuerpos anti-ToxA. Posteriormente, el día 30 se realizó el sangrado de los ratones para la recuperación del suero hiperinmune y la eutanasia de los animales por dislocación lumbar, evitando en todo momento el sufrimiento de los animales durante el proceso de producción del fluido (Ríos-Huerta *et al.*, 2017).

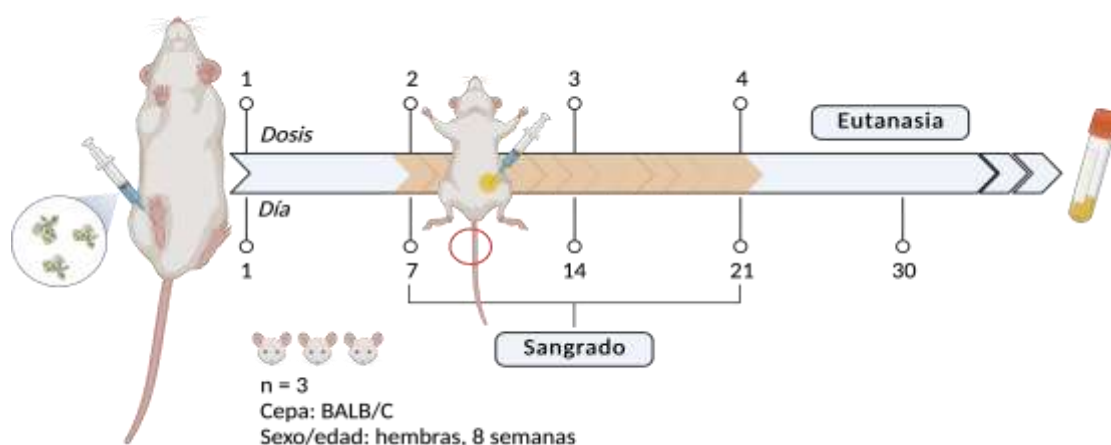


Figura 3. Protocolo para la producción de sueros hiperinmunes. Esquema para la producción de sueros hiperinmunes en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad. La primera inoculación se realiza en el cojinete plantar y durante 3 semanas se dosifican los péptidos purificados de manera intraperitoneal.

6.5 Transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. ATCC 2888

Previo a la transformación, una colonia aislada de la cepa AgToxA se sembró en medio YM con kanamicina (50 mg/mL). Los cultivos semilla se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una $\text{DO}_{650\text{nm}}$ de 1.0. Una vez que se alcanzó la DO se procedió a la transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. de acuerdo con el protocolo propuesto por Bañuelos-Hernández et al. (2017). El cultivo de *Schizochytrium* sp. en caldo YPD ($\text{DO}_{650\text{nm}} = 0.7$) se inoculó con el 1% del cultivo de *A. tumefaciens*::ToxA (AgToxA, v/v) y el co-cultivo se mantuvo por 16 h a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm adicionando 100 μM de acetosiringona para inducir la infección por *A. tumefaciens* de las células de *Schizochytrium* sp. Después del crecimiento en co-cultivo se adicionó cefotaxima (250 mg/L) para inhibir el desarrollo de *A. tumefaciens*, y luego se incubó por 4 h más a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 200 rpm. Posteriormente, se adicionó etanol absoluto (1% v/v) para inducir la expresión del plásmido transferido a *Schizochytrium* sp. A partir de este punto se tomaron alícuotas de 50 mL en tubos cónicos (previamente tarados) a los tiempos 0 h (pre-inducción) 12 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h post-inducción. Posteriormente, el caldo y la biomasa se separaron por centrifugación a 7,000 g por 10 min y se transfirieron 20 mL del sobrenadante libre de células (SLC) a un tubo cónico nuevo. Una vez retirado el resto del sobrenadante, la biomasa se congeló a -20°C hasta su uso. Además, a la par del cultivo transformado se mantuvo un cultivo de *Schizochytrium* sp.

WT como control, del cual se tomaron muestras a los mismos tiempos y en las mismas condiciones.

6.6 Evaluación de parámetros cinéticos relacionados con la producción de proteína

Las tasas de utilización de las fuentes de carbono y nitrógeno se determinaron, así como la generación de proteína (total y recombinante) durante el crecimiento de *Schizochytrium* sp. WT y transformada en el medio ASWm y suplementado con GMS a diferentes concentraciones (ver inciso 0 6.9 Diseño experimental).

6.6.1 Determinación de la biomasa total

La biomasa total se estimó gravimétricamente a partir del peso seco de cada muestra tomada. Para esto, la biomasa recolectada de cada punto de muestreo se liofilizó por 8 h a -80°C , y se registró el incremento del peso respecto al peso de la biomasa húmeda para cada tiempo de muestreo. La biomasa liofilizada se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

6.6.2 Extracción de proteína total (PT)

La PT se extrajo a partir de la biomasa liofilizada de acuerdo con el protocolo descrito por Franklin et al. (2002). En síntesis, 50 mg de la biomasa liofilizada fueron resuspendidos en 200 μL de buffer de extracción (750 mM Tris-HCl, pH 8, 15% sacarosa, 100 mM β -mercaptoetanol y 1mM de PMSF), se mezcló vigorosamente y se sonicó cuatro veces en pulsos de 4 s con espacios de 4 s entre pulsos en un procesador ultrasónico a una amplitud del 24%. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 20 min y se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos. Después, a 100 μL del extracto anterior se adicionó TCA 10% frío en una proporción 1:1. La mezcla se dejó precipitar a -80°C por 15 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. El sobrenadante se eliminó, se lavó la pastilla con etanol absoluto y se mezcló por inmersión suave. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante, los remanentes de etanol fueron retirados por evaporación en una centrífuga al vacío a 45°C . Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 μL de buffer de extracción de sacarosa. El extracto proteico se almacenó en congelación hasta su uso.

6.6.3 Cuantificación de proteína

La concentración de PT se determinó en los extractos proteicos por el método de Bradford (Waterborg y Matthews, 1994). Para esto se construyó una curva estándar a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de 2 mg/mL de la que se realizaron diluciones seriadas con PBS 1x. Las muestras por triplicado se diluyeron 1:100 o 1:1000 en PBS 1x y se transfirieron 160 μ L a un pozo de una microplaca de ELISA. Luego se añadieron 40 μ L de la solución de Bradford (Biorad, No. Cat. 500-0006) y se incubó en oscuridad por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la absorbancia se leyó a 595 nm y se estimó la concentración de proteína presente en cada muestra por interpolación a partir de la ecuación de la recta (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017; Márquez-Escobar *et al.*, 2018).

6.6.4 Determinación de carbohidratos residuales

La determinación de carbohidratos residuales se realizó por el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959) y adaptado a microplaca (Gonalves *et al.*, 2010; Negrulescu *et al.*, 2012) en el sobrenadante, con modificaciones mínimas. Brevemente, 25 μ L del sobrenadante diluido 1:50 con agua destilada se transfirieron a un pozo de una microplaca de ELISA y se adicionaron 25 μ L de solución DNS 1% (1 g DNS, 30 g tartrato de sodio y potasio, 20 mL NaOH 2 M, en 100 mL con agua destilada). La microplaca tapada se transfirió a un baño de agua y se calentó por 4 min en horno de microondas convencional a intensidad media baja (100°C – 105°C). Posteriormente, la placa se enfrió por 2 min en una cama de hielo y se agregaron 250 μ L de agua destilada. La absorbancia se leyó a 450 nm. La concentración de carbohidratos residuales se estimó por comparación directa contra una curva patrón de glucosa de 2 mg/mL.

6.6.5 Determinación espectrofotométrica amino nitrógeno libre residual (FAN)

La determinación del FAN se realizó a partir del sobrenadante utilizando el protocolo descrito por Spedding (2013) con modificaciones. En concreto, 2 μ L de la muestra diluida 1:50 con agua destilada se transfirieron a un pozo de una microplaca resistente a altas temperaturas y se mezclaron con 100 μ L de solución de ninhidrina (8 g ninhidrina, 300 mL etilenglicol, 100 mL

buffer acetato de sodio 4 N pH 5.5 [54.4 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40 mL ácido acético glacial, 100 mL H_2O] y 25 μL de SnCl_2 [1.6 mg/mL en etilenglicol]). La microplaca se selló con adhesivo térmico y se calentó durante 4 min en baño de agua a 90°C – 95°C . Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente en cama de hielo. La concentración de FAN se estimó por comparación directa contra una curva patrón de glicina 10 mM equivalente a 140 mg N/L.

6.6.6 Determinación de lípidos totales

La biomasa remanente del proceso de extracción de proteínas totales se utilizó para la determinación de lípidos. Para esto, 100 μL de la suspensión de biomasa se ajustaron a 1 mL con NaCl al 0.73%. Los lípidos totales se extrajeron con 400 μL de cloroformo: metanol 2:1 por cada 100 μL de muestra ajustada. Para ello se agitó con vórtex por 15 s y se centrifugó a 4,000 rpm por 2 min. Posteriormente, la fase orgánica (fondo) se recuperó en un tubo eppendorf nuevo y se evaporó el solvente por centrifugación al vacío a 60°C por 1 h (Axelsson y Gentili, 2014). Previo al análisis por el método de sulfo-fosfo vainillina (SPV), el extracto lipídico se resuspendió en 100 μL de metanol y se transfirieron 30 μL de cada muestra a un pozo de una microplaca NUNC de 96 pozos y se calentó a 90°C por 20 min hasta la evaporación total del solvente. Después, 100 μL de H_2SO_4 se adicionaron y se incubó a 90°C por 30 min. La microplaca se enfrió en hielo por 2 min hasta temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 540 nm y las lecturas se registraron como ruido de fondo. Posteriormente, se adicionaron 50 μL de reactivo fosfo-vainillina (1.2 mg/mL vainillina, 18 mL agua destilada, 2 mL etanol absoluto, 80 mL H_2PO_4 85%). La mezcla se incubó a 37°C por 10 min y 150 rpm. Después, las absorbancias se leyeron a 540 nm nuevamente y se sustrajo el ruido de fondo. La concentración de lípidos totales en la muestra de biomasa se estimó a partir de una curva patrón de ácido oleico de 2 mg/mL.

6.7 Evaluación de los antígenos recombinantes por Dot blot y Western blot

6.7.1 Dot blot

La presencia de los antígenos recombinantes ToxA se determinó en los extractos proteicos mediante la técnica de Dot blot para cada tiempo de muestreo. 10 μL del extracto proteico crudo se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa lentamente, dejando que se

adsorbiera hasta que se colocó todo el volumen. Esto se repitió para cada muestra y para el extracto ajustado a 1000 µg PT/mL. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y se bloqueó con leche descremada SVELTY al 5% disuelta en PBS-T 1x por 1 h. Las membranas se incubaron con suero hiperinmune anti-ToxA (1:500) toda la noche. Tras la incubación, las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron con anti-IgG de ratón a una dilución 1:2000 por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se revelaron por lavado con 2.5 mL de solución DAB (diaminobencidina, H₂O₂ y acetato de sodio 50 mM) incubándolas en oscuridad y agitación constante. La reacción se detuvo 20 min después al sumergir la membrana en agua destilada. La proteína ToxA (250 ng) purificada de *E. coli* recombinante se utilizó como control positivo (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017).

6.7.2 Western blot

Por otra parte, la integridad del antígeno recombinante se evaluó por Western blot. Primero se tomaron 40 µL de cada extracto proteico, se mezclaron con 10 µL de buffer de carga reductor 5x, y se desnaturalizó a 95°C por 5 min. De manera similar, 10 µL del control positivo de ToxA se mezcló con 10 µL de buffer de carga reductor 1x y se desnaturalizó en las mismas condiciones que las muestras. Después, 15 – 20 µL de los extractos desnaturalizados se cargaron en dos geles SDS-PAGE al 12% o 15% (acrilamida 30% y bis-acrilamida 0.8%) y se corrió a 120 volts por 2 h. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com>) con ayuda de un electroblotter (Bio-Rad). El casete de transferencia se sumergió en buffer de transferencia base metanol y se corrió durante 2 h a 150 V. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% disuelta en PBS-T 1x por 1 h y luego se incubó con suero hiperinmune anti-ToxA a una dilución 1:500 por toda la noche. Tras la incubación, la membrana se lavó con PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución 1:2000 por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron por lavado con 2.5 mL de solución DAB (diaminobencidina, H₂O₂ y acetato de sodio 50 mM) incubándolas en oscuridad y agitación constante. La reacción se detuvo 20 min después al sumergir la membrana en agua destilada. La proteína ToxA (250 ng) purificada de *E. coli* recombinante se utilizó como control positivo (Márquez-Escobar *et al.*, 2018).

6.8 Evaluación de la producción de los antígenos recombinantes por ELISA cuantitativo

El rendimiento de la producción de ToxA recombinante se evaluó por análisis de ELISA cuantitativo de acuerdo con lo descrito por Ríos-Huerta et al. (2017). Para esto, 20 μL del extracto proteico y 80 μL de buffer de carbonatos (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH = 9.6) se colocaron en una placa de ELISA de 96 pozos (Microwell Nunc™, Thermo Scientific™) y se dejó sensibilizar a 4°C durante toda la noche. Después, los pozos se lavaron tres veces con PBS-Tween y se fijaron con leche descremada al 5% diluida en PBS-Tween durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, los pozos se lavaron con PBS-Tween tres veces y se adicionó el suero hiperinmune de ratón anti-ToxA diluido 1:500 en PBS 1x, se incubaron toda la noche a 4°C y se lavaron con PBS-Tween tres veces. Al día siguiente se adicionó un volumen de 50 μL de anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 con PBS 1x, se incubó a 25°C por 2 h y se lavó con PBS-Tween. Finalmente, la inmunodetección se reveló mediante la incubación con el sustrato 3,3',5,5' Tetrametilbencidina (TMB) más 0,1 mM de H_2O_2 durante 5 min. La reacción enzimática se detuvo con 50 μL de ácido sulfúrico 1 M (H_2SO_4) y se registró la densidad óptica (OD) a $\lambda = 450 \text{ nm}$ en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash Multimode Reader, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La concentración de ToxA recombinante en las muestras se estimó por comparación contra las curvas estándar del antígeno purificado. Para la construcción de las curvas estándar se partió de una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se realizaron diluciones seriadas al transferir 50 μL de la solución al pozo siguiente utilizando buffer de carbonatos como diluyente, en las mismas condiciones que las muestras (Monreal-Escalante *et al.*, 2019).

6.9 Diseño experimental

6.9.1 Evaluación de los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total en *Schizochytrium sp.* suplementada con GMS a escala laboratorio

El efecto del glutamato de sodio se evaluó al suplementarse como fuente principal de amino nitrógeno libre asimilable en el medio de cultivo ASWm para el crecimiento de *Schizochytrium sp.* WT. Para esto, se utilizó un arreglo cuadrado con cuatro tratamientos (niveles de GMS) y cuatro réplicas por tratamiento, de acuerdo con lo mostrado en la **Tabla 5**. Para cada muestra

tomada de cada tratamiento se determinó la biomasa seca total, proteína total, carbohidratos residuales, FAN y lípidos totales. Además, se establecieron las cinéticas correspondientes. De la misma manera, el efecto del GMS se evaluó en *Schizochytrium* sp. transformada transitoriamente mediante la cepa AgToxA. Para esto se comparó el medio ASWm con Glu:GMS 20:0, Glu:GMS 20:15, el medio YPD de acuerdo con el diseño experimental indicado en la **Tabla 6**. Para cada muestra tomada de cada tratamiento se determinó la biomasa seca total, proteína total, carbohidratos residuales, FAN y lípidos totales y se establecieron las cinéticas correspondientes. Además, la producción de los antígenos recombinantes ToxA se determinó por dot blot, western blot y ELISA cuantitativo.

Tabla 5. Diseño experimental para la evaluación del efecto del GMS sobre el crecimiento de *Schizochytrium* sp. WT.

Tx	Nivel Glu:GMS*	Muestreo (h)	Vol. muestra (ml)	Réplicas
1	20:0 Glu(20):YE(0.4):GMS(0)	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	4
2	20:10 Glu(20):YE(0.4):GMS(10)	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	4
3	20:15 Glu(20):YE(0.4):GMS(15)	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	4
4	20:20 Glu(20):YE(0.4):GMS(20)	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	4

Abreviaciones: Tx, Tratamiento; Glu, Glucosa; YE, extracto de levadura; GMS, glutamato de sodio.

- Se utiliza como medio base ASWm y se suplementa con las proporciones indicadas de cada componente.
- Las condiciones del cultivo fueron: volumen 350 mL, agitación 200 rpm, temperatura $28 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.0 ± 0.2 .

Tabla 6. Diseño experimental para la evaluación del efecto del GMS sobre el crecimiento de *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con la cepa AgToxA.

Tx	Nivel	Muestreo (h)	Vol. muestra (ml)	Réplicas
ASWm + GMS				
1	20:0 Glu(20):YE(0.4):GMS(0) <i>Schizochytrium</i> sp. WT	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3
2	20:0 <i>Schizochytrium</i> sp. ToxA	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3
3	20:15 Glu(20):YE(0.4):GMS(15) <i>Schizochytrium</i> sp. WT	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3
4	20:15 <i>Schizochytrium</i> sp. ToxA	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3
YPD				
5	Glu(100):NT(1)* <i>Schizochytrium</i> sp. WT	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3
6	Glu(100):NT(1)* <i>Schizochytrium</i> sp. ToxA	0, 12, 24, 36, 48, 72 y 96	50	3

Abreviaciones: Tx, Tratamiento; Glu, Glucosa; YE, extracto de levadura; GMS, glutamato de sodio.

*De acuerdo con la composición comercial del YPD (Sigma-Aldrich, Y1375), considerando un 12% promedio de nitrógeno en el extracto de levadura y en la bacto peptona.

Las condiciones del cultivo fueron: volumen 350 mL, agitación 200 rpm, temperatura $28 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.0 ± 0.2 .

6.9.2 Optimización de los parámetros de crecimiento asociados a la producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. suplementada con GMS

A partir de los experimentos previos se seleccionaron las siguientes variables que impactan en la producción de proteína total y sobre la expresión del plásmido pAlgevir::*ToxA*: 1) concentración de GMS, 2) concentración del inductor y 3) tiempo de cosecha (recuperación del antígeno recombinante). La proporción en la que deben ser adicionadas al medio (x_1 y x_2) y el tiempo en el que se obtiene la mayor cantidad de biomasa y proteína (x_3) se estimó por la metodología de superficie de respuesta basada en el diseño de Box-Behnken. Los niveles para las variables son los mostrados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Variables seleccionadas para la optimización por el diseño de Box-Behnken y el Método de Superficie de Respuesta (BB-RSM)

Variable	-1	0	1
Concentración GMS	20:10	20:15	20:20
Concentración etanol absoluto	0.5%	1%	1.5%
Tiempo de cosecha	36 h	48 h	60 h

6.9.3 Metodología para BB-RSM

En el anexo 120 se muestran los scripts utilizados para la metodología de BB-RSM. El diseño de BB se realizó para las variables seleccionadas en los niveles bajo, central y alto, utilizando el software RStudio (v2022.07.1+554, macOS 12.4.0) con la librería “rsm”, para $k = 3$ con 3 niveles por factor ($n = 3$) para un arreglo completamente aleatorio. Las variables GMS, YE y tiempo se codificaron como:

$$x_1 \sim (GMS - 15)/5 \quad (1)$$

$$x_2 \sim (YE - 1)/0.5 \quad (2)$$

$$x_3 \sim (time - 48)/12 \quad (3)$$

Los factores en unidades originales para los puntos predichos por el modelo de BB se estimaron al despejar el valor de la variable a partir de la matriz del diseño de BB, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$x_1 \leftarrow 5 * bb_doe\$x1 + 15 \quad (4)$$

$$x_2 \leftarrow 0.5 * bb_doe\$x2 + 1 \quad (5)$$

$$x_3 \leftarrow 12 * bb_doe\$x3 + 48 \quad (6)$$

Dónde el bb_doe es la matriz de BB estimada a partir de la codificación de k y n . Para cada corrida predicha por el modelo de BB se realizó la transformación transitoria y se determinaron las concentraciones de biomasa seca, proteína total y ToxA recombinante. Los datos de las respuestas se vaciaron en la matriz de BB y se analizaron con el software Rstudio. Para esto, los valores (x_1 , x_2 , y x_3) se codificaron para poder realizar el modelo de superficie de respuesta como la interacción de los factores evaluados contra la respuesta de interés, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$opt_model1 \leftarrow rsm(biomasa \sim SO(x_1, x_2, x_3), data = opt_data) \quad (7)$$

$$opt_model2 \leftarrow rsm(proteina \sim SO(x_1, x_2, x_3), data = opt_data) \quad (8)$$

$$opt_model1 \leftarrow rsm(toxa \sim SO(x_1, x_2, x_3), data = opt_data) \quad (9)$$

Dónde opt_data es la base de datos que contiene los valores de las respuestas experimentales, opt_model1 , 2 y 3 son las variables contenedoras para el modelo de superficie de respuesta (rsm) y SO es la aplicación del modelo de segundo orden, que corresponde a la siguiente ecuación:

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (10)$$

Los coeficientes β corresponden a los coeficientes estimados por el modelo de SO para la región lineal (primer orden, términos sin exponente), la región de interacción de dos vías (términos mixtos) y la región puramente cuadrática (términos con exponente). Posteriormente, se realizó la gráfica de superficie de respuesta (*perspectiva*) de dos factores para una respuesta específica con un punto de corte de 1 factor fijo (constante). En cada caso se realizó el ANOVA de 2 vías para los datos predichos, donde la región o término de la expresión con un menor valor de p es la que presentó una mayor interacción para la producción de biomasa, proteína total o ToxA recombinante, respectivamente.

6.10 Análisis Estadístico

Todos los análisis y mediciones se realizaron por triplicado y se expresan como la media \pm desviación estándar de las réplicas independientes. Todos los análisis y gráficos se realizaron con el software RStudio (v2022.07.1+554, macOS 12.4.0). Se aplicaron pruebas de normalidad y homocedasticidad sobre los datos obtenidos. Posteriormente, se realizó un análisis de ANOVA de dos vías por grupos segmentados y se aplicó la prueba de Tukey y para grupos complejos la prueba de Sidak para establecer la significancia entre grupos. Se consideraron como significantes cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Recuperación y comprobación de cultivos criopreservados

Las cepas de *Schizochytrium* sp. ATCC 2888 y *A. tumefaciens*:ToxA (AgToxA) fueron recuperadas de cultivos criopreservados en glicerol al 25% utilizando agar YPD y agar LB con kanamicina, respectivamente. En ambos casos, los cultivos mostraron las características típicas esperadas. La calidad del producto de la extracción de ADNp se muestra en la Fig. 3A. Las bandas características se observan para la forma lineal y circular relajada de pAlgevir. Además, en la Fig. 3B se muestran los amplicones de la PCR punto final, con los productos de ~150 pb para el gen de ToxA y de ~2000 pb para la región flanqueada por NosTer y Prom35S en pAlgevir.

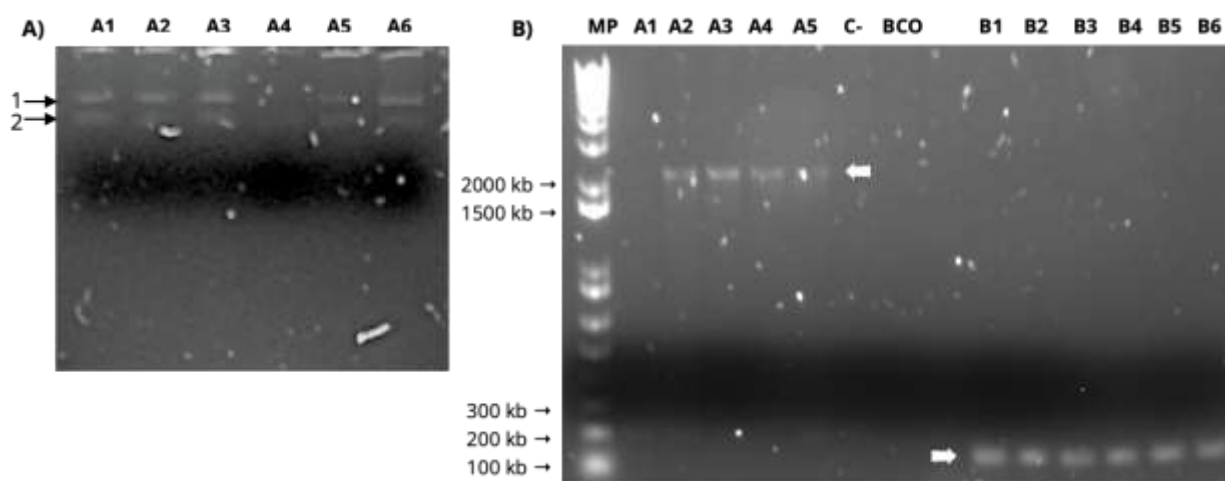


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para ADN plasmídico extraído de *A. tumefaciens*. a) gel de calidad, se observan las estructuras: 1) circular relajada y 2) lineal completa del vector pAlgevir::ToxA en la cepa AgToxA. b) amplicones de la PCR punto final para las regiones NOSTER-Prom35S (~2000 pb, A1...A6) y para el gen ToxA (~150 pb, B1...B6).

La concentración de ADNp se cuantificó con las relaciones 260/280 y 260/230, las cuales fueron ~1.9 y ~2.3, respectivamente. La digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* generaron tres fragmentos, con un tamaño de ~950 pb que comprende del punto de corte de *KpnI*...*SacI* y que contienen la región codificante al gen ToxA. En la Fig. 4, se observan los productos de la digestión realizada *in silico* con el software ApE y en la Fig. 5 la digestión con las enzimas de restricción seleccionadas, donde se obtuvieron las bandas predichas por el software.

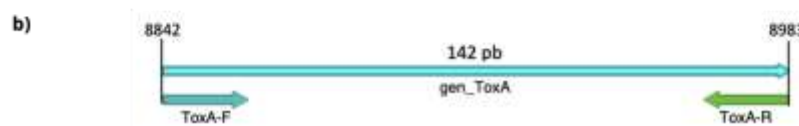
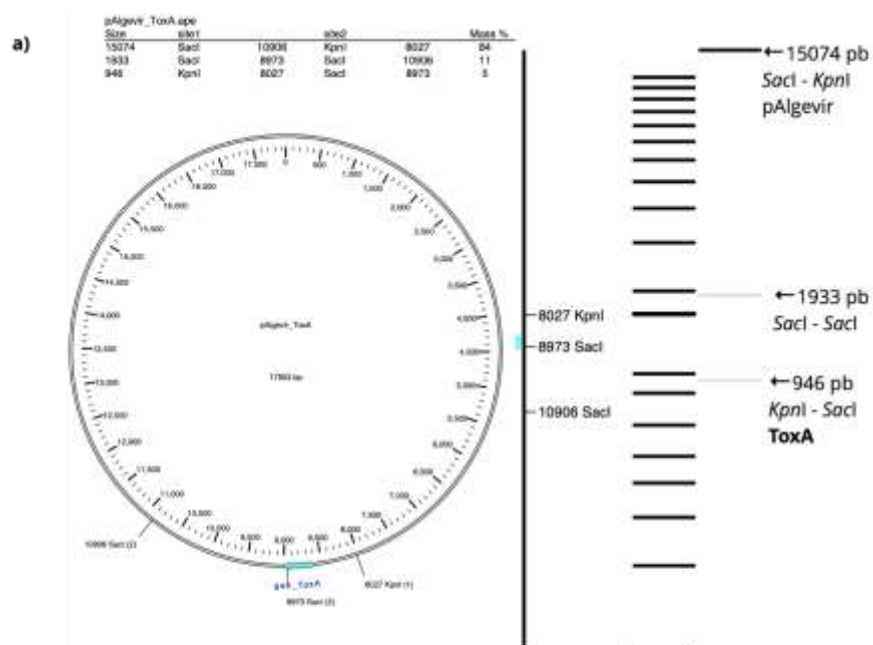


Figura 5. Resultados para el análisis *in silico* con el software ApE. Los fragmentos teóricos para la digestión con las enzimas de digestión *KpnI* y *SacI* se muestran en el patrón de bandeos.

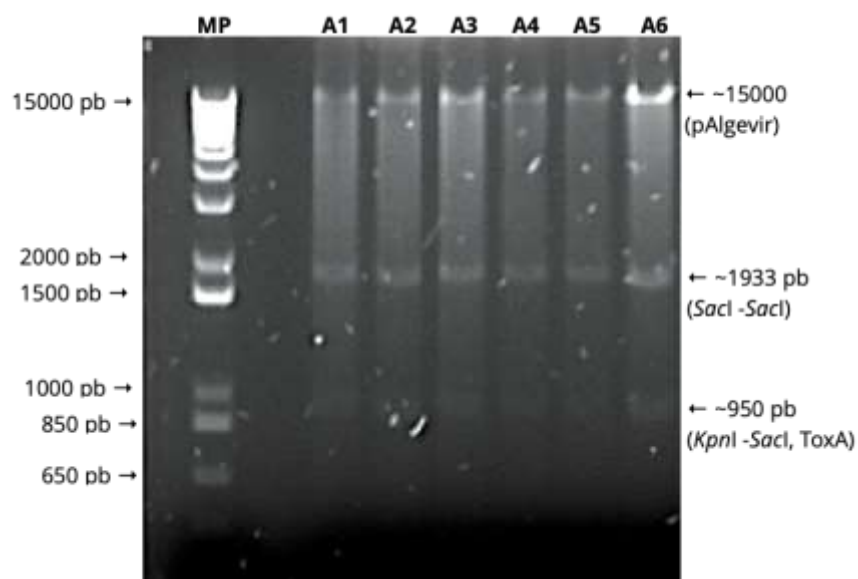


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con la digestión de pAlgevir::ToxA con *SacI* y *KpnI* 37°C@15 min. El fragmento de ToxA corresponde a ~950 pb.

7.2 Diseño del medio de cultivo Agua de Mar Sintética Modificada (ASWm)

En la **Tabla 8** se muestran los componentes seleccionados para la preparación del medio ASWm, y sus proporciones molares por litro de medio líquido. El contenido de amino nitrógeno teórico asimilable (NTA) se determinó a partir de la concentración suplementada de GMS y de YE (**Tabla 9**). En este sentido, el YPD comercial contiene una mayor cantidad de amino nitrógeno asimilable (3232 mg N eq/L) respecto al medio ASWm con 15 partes de GMS (2843.60 mg N eq/L).

Tabla 8. Composición molar del medio ASWm.

Componente	g/L	Concentración molar
Agua de mar sintética modificada*		
NaCl	30	500 mM
MgSO ₄	3.072	25 mM
Na ₂ SO ₄	4.09	28 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.36	10 mM
KCl	0.695	10 mM
NaHCO ₃	0.2	2 mM
H ₃ BO ₃	0.0207	300 μM
KH ₂ PO ₄	0.0136	100 μM
Fuente de carbono y nitrógeno		
Glucosa	40	200 mM
Extracto de levadura	0.4	
Glutamato de sodio**		
pH a 25°C: 7.8 – 8.4		

* Adaptado de: Ren et al. (2009), Ling et al. (2015) y ASTM D1141-98.

** En proporción de la concentración de glucosa.

Tabla 9. Aporte de nitrógeno total asimilable (NTA) por componente en los medios de cultivo utilizados.

Fuente de N	ASWm		YPD	
	g/L	eq. mg N/L	g/L	eq. mg N/L
YE	0.4	36.72	10	918
Peptona	--	--	20	3232
GMS			--	--
20:0	0	--		
20:5	10	827.86		
20:10	20	1655.73		
20:15	30	2843.60		
20:20	40	3311.45		

YE, extrado de levadura; GMS, glutamato de sodio.

Abreviaciones: ASWm, agua de mar sintética modificada; YPD, caldo papa dextrosa y extracto de levadura; N, nitrógeno; YE, extracto de levadura; GMS, glutamato de sodio.

7.3 Evaluación de los parámetros de crecimiento de *Schizochytrium* sp. en el medio ASWm con diferentes tratamientos de GMS

7.3.1 Curvas de crecimiento microbiano y producción de biomasa

La Fig. 7 muestra las curvas de crecimiento microbiano ajustadas por la ecuación logística. El tratamiento Glu:GMS 20:10 presentó la mayor μ_{\max} (0.0645 h^{-1}) con un coeficiente de carga de 5.2639 g BS/L , con un tiempo de duplicación de 15.50 h . De manera similar, la μ_{\max} para el tratamiento Glu:GMS 20:15 fue de 0.0636 h^{-1} alcanzando un coeficiente de carga de 5.7618 g BS/L . El tratamiento con Glu:GMS 20:15 tuvo la tasa de duplicación más alta, correspondiente a 33.67 h , con μ_{\max} de 0.0297 h^{-1} y un coeficiente de carga de 4.5423 g BS/L . Es importante resaltar que el medio ASWm mantuvo en fase exponencial los cultivos de *Schizochytrium* sp. tras realizar el escalamiento por transferencia del 10% del volumen. En ninguno de los tratamientos se observó la fase lag.

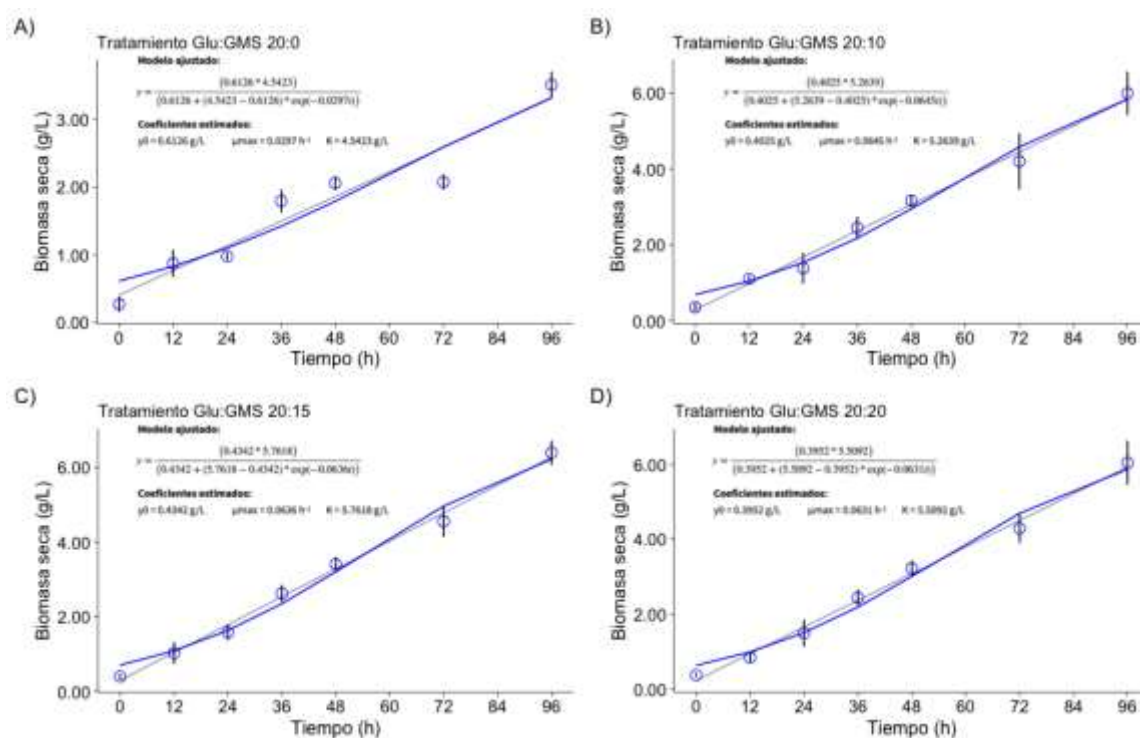


Figura 7. Curvas de crecimiento para *Schizochytrium* sp. bajo diferentes concentraciones de GMS. La media de tres réplicas independientes se presenta para cada tiempo de muestreo. La línea azul es la predicción del crecimiento a través de la ecuación logística generada por la librería growthatres en RStudio. Los tratamientos Glu:GMS corresponden a: A) 20:0, B) 20:10, C) 20:15 y D) 20:20.

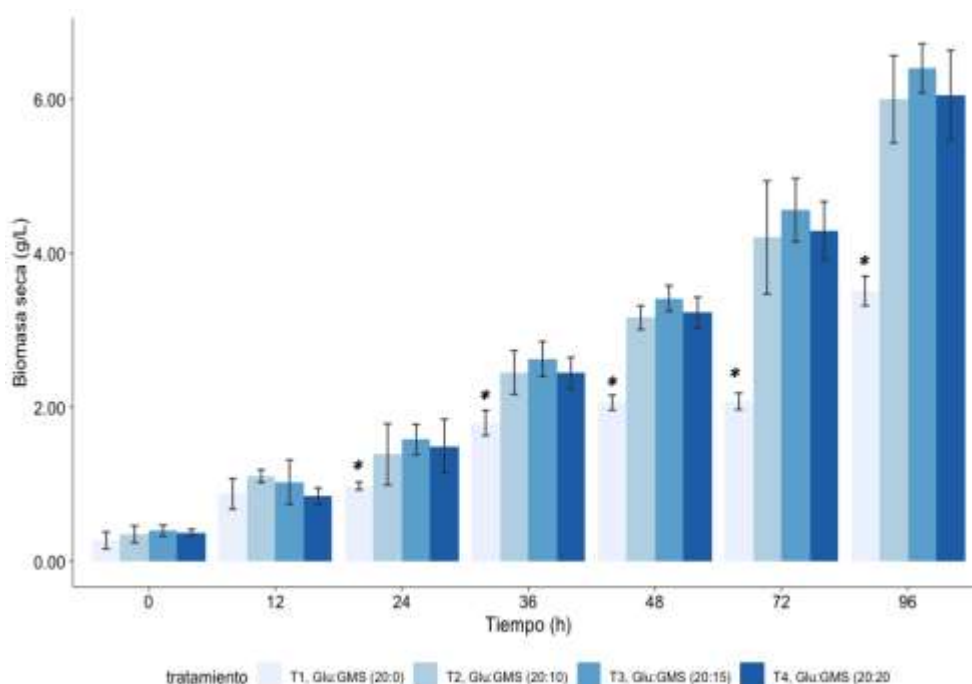


Figura 8. Producción de biomasa total en *Schizochytrium* sp. bajo diferentes concentraciones de GMS. El signo * indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

La máxima producción de biomasa (6.4 g BS/L) se alcanzó a las 96 h utilizando el medio ASWm suplementado con una relación de Glu:GMS 20:15. En el mismo tiempo, los tratamientos con 10 y 20 partes alcanzaron un valor de 5.99 y 6.05 g BS/L. El tratamiento con 15 partes de GMS generó un incremento del 6% respecto a los tratamientos 20:10 y 20:20. Este mismo comportamiento se observó desde las 24 h y se sostuvo hasta las 96 h (Fig. 8). Sin embargo, únicamente se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tratamiento sin GMS. Por otra parte, la Fig. 9 muestra los diagramas de cajas y bigotes para la producción de biomasa en *Schizochytrium* sp. Las diferencias significativas solo se observaron a partir de las 24 h de incubación ($p < 0.05$). La mayor variación entre el tratamiento sin GMS y los tratamientos con glutamato se observó para el tiempo de 72 h (Fig. 9c). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tres suplementaciones de GMS utilizadas ($p > 0.05$), aunque el tratamiento Glu:GMS 20:15 mostró una tendencia hacia una mayor producción de biomasa (Fig. 9b, c y d).

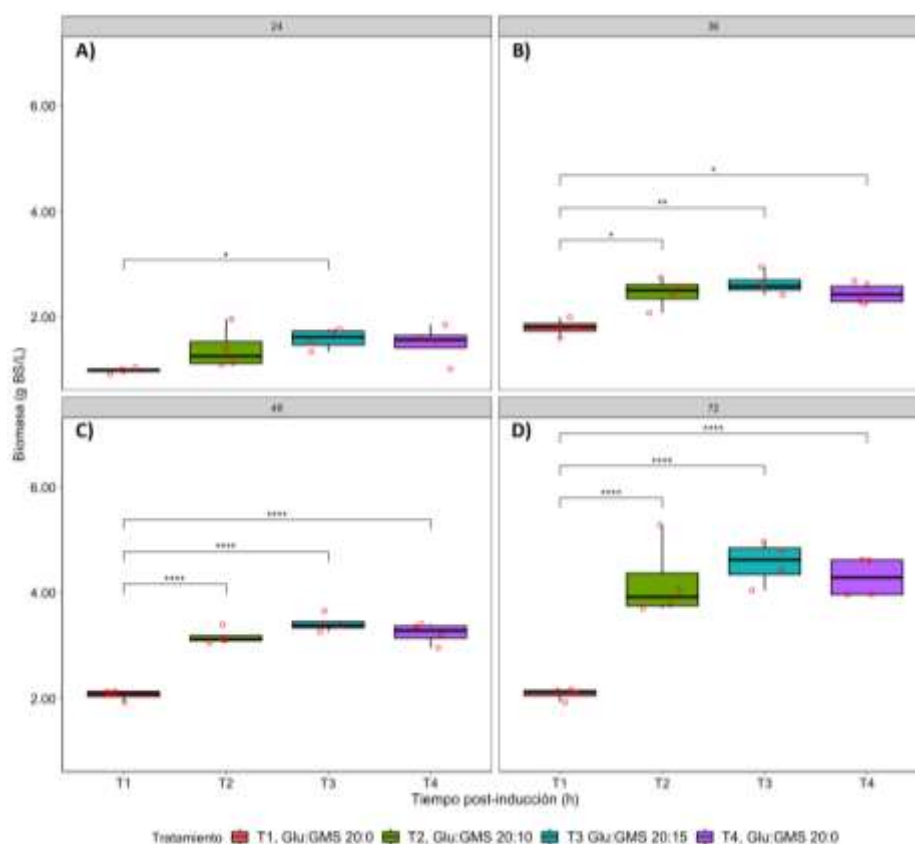


Figura 9. Producción de biomasa en los tiempos significantes para la recuperación de proteína total y recombinante. * indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El rendimiento neto para la producción de biomasa fue de 0.10, 0.29, 0.35, y 0.32 g BS/g Glu para los tratamientos Glu:GMS 20:0, 20:10, 20:15 y 20:20, respectivamente. El tratamiento con Glu:GMS (20:15) provocó un mayor rendimiento en la producción de biomasa, correspondientes al 71.43%, 17.14%, y 8.57% con relación a los tratamientos Glu:GMS 20:0, 20:10 y 20:20, respectivamente.

7.3.2 Consumo de glucosa y amino nitrógeno libre asimilable

El consumo de glucosa y amino nitrógeno libre (FAN) se determinó en el medio ASWm. Las curvas de utilización de sustrato respecto al tiempo se muestran en la Fig. 10. En la Fig. 10a se observa que el consumo de glucosa con el tratamiento Glu:GMS 20:15 se ve mejorado respecto a los tratamientos 20:0, 20:10 y 20:20. Las suplementaciones con 10 y 20 partes de GMS presentaron un comportamiento similar, además que el medio sin suplementación presenta un consumo lento. El consumo de FAN se muestra en la Fig. 10b, donde el consumo de amino

nitrógeno fue similar entre tratamientos con GMS mientras que el tratamiento sin GMS presentó un agotamiento temprano del nitrógeno disponible.

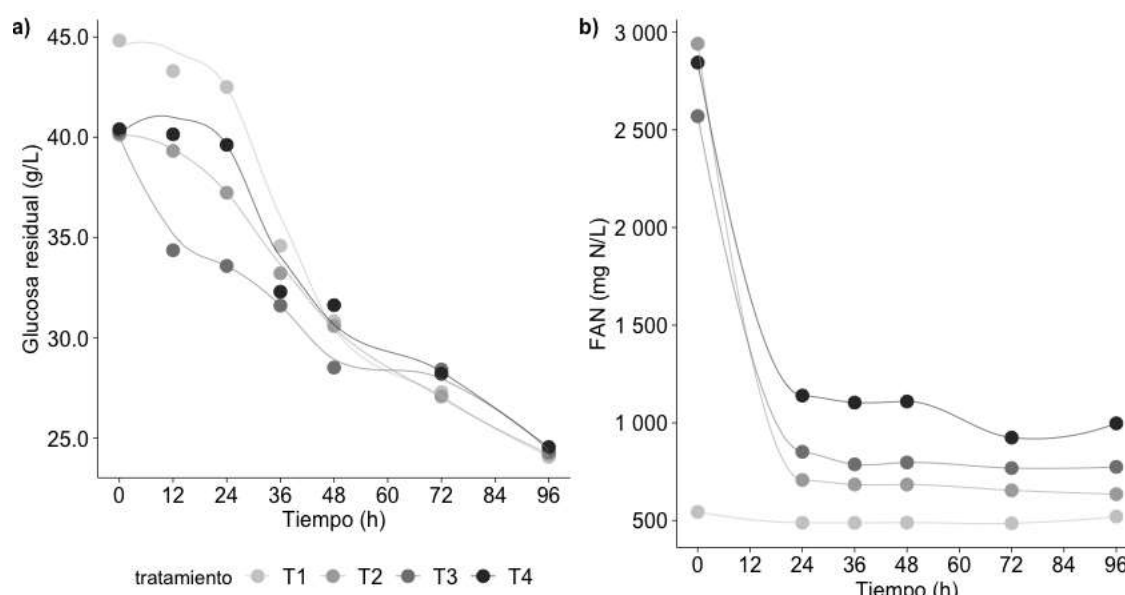


Figura 10. Consumo de glucosa (a) y de amino nitrógeno libre (FAN, b). Las líneas suavizadas son el modelo ajustado para el consumo de glucosa y nitrógeno, respectivamente.

7.3.3 Producción de proteína total

La producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. se muestra en la Fig. 11. El tratamiento Glu:GMS 20:20 generó un rendimiento máximo de proteína total a las 36 h de 279.54 ± 56.87 mgPT/gBS. Los tratamientos Glu:GMS 20:10 y 20:15 tuvieron el pico de producción a las 36 h (259.11 ± 26.8 gPT/gBS) y 48 h (237.94 ± 14.6 gPT/gBS), respectivamente. Por otra parte, el tratamiento Glu:GMS 20:0 alcanzó rápidamente el máximo de producción con 201.5 ± 28.14 gPT/gBS para después presentar una disminución constante en la producción de proteína total. El tratamiento Glu:GMS 20:10 tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) a las 24 h post-inoculación respecto a los tratamientos Glu:GMS 20:15 y 20:20 (Fig. 12). Sin embargo, la concentración de proteína disminuyó de manera sostenida hasta las 72 h. En cambio, para el tratamiento Glu:GMS 20:15 se observó un aumento sostenido hasta las 48 h, pero este fue menor que el tratamiento Glu:GMS 20:20 ($p < 0.05$). A las 48 h y 60 h no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

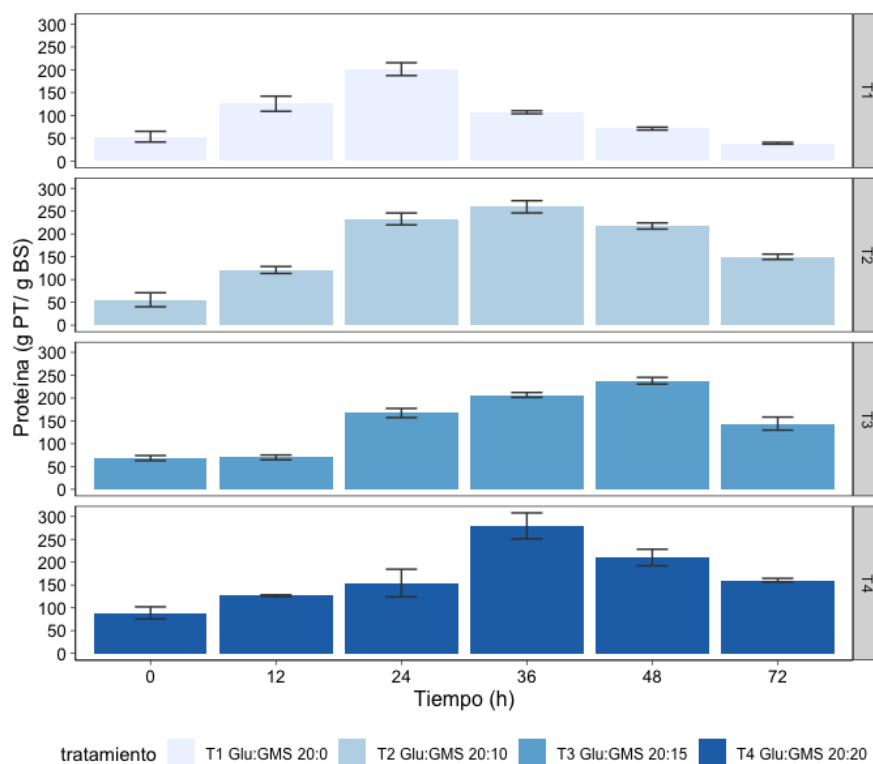


Figura 11. Producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. bajo los diferentes tratamientos con GMS utilizando el medio ASWm. Cuantificado por el método de Bradford. La producción de proteína total es mayor en los tratamientos con GMS.

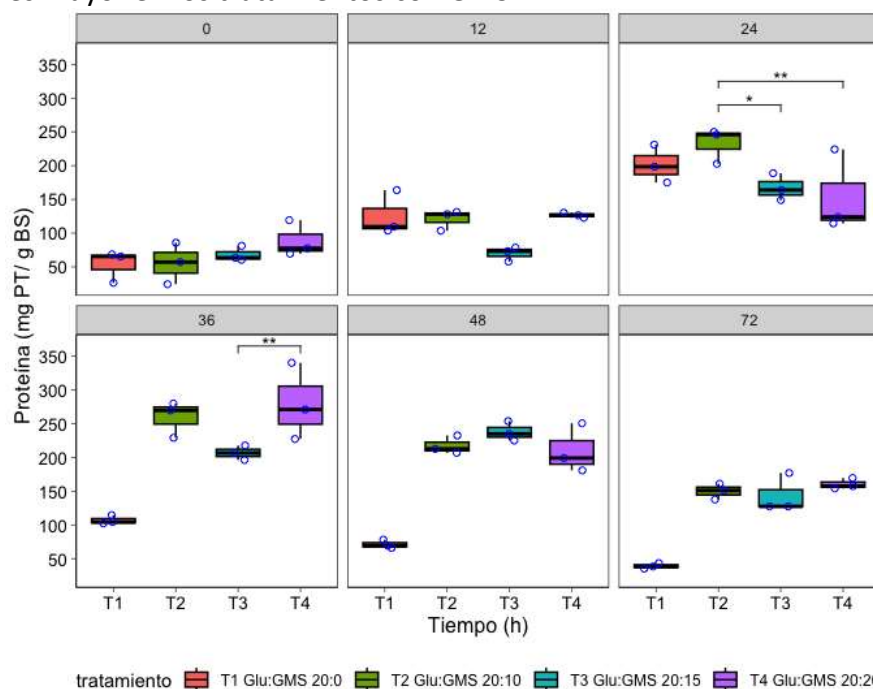


Figura 12. Variación de la producción de proteína total de *Schizochytrium* sp. bajo los diferentes tratamientos de suplementación con GMS. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

7.3.4 Producción de lípidos totales

La concentración de lípidos por gramo de biomasa seca de *Schizochytrium* sp. se muestra en la Fig. 13. El tratamiento Glu:GMS 20:0 mantuvo una producción mayor de lípidos totales durante todos los tiempos muestreados, respecto a los tratamientos Glu:GMS 20:10, 20:15 y 20:20 ($p < 0.05$). La mayor concentración fue a las 72 h post-inoculación con 300.89 ± 47.8 mg LT/g BS. Los tratamientos Glu:GMS 20:10, 20:15 y 20:20 mostraron una producción similar por debajo de la alcanzada en el medio sin GMS. Interesantemente, el cultivo de *Schizochytrium* sp. con el tratamiento Glu:GMS 20:15 logró una producción de 94.93 ± 3.16 mg LT/g BS, lo que se traduce en una reducción del 55.6% respecto al tratamiento Glu:GMS 20:0 en el mismo tiempo de muestreo. La tendencia en la reducción de la producción de lípidos totales en los cultivos con suplementación de amino nitrógeno se observó en todos los tratamientos Glu:GMS a diferencia ($p < 0.05$) del tratamiento sin suplementación. Los tiempos 12 a 48 h presentaron una mayor disminución en la producción de lípidos y, a partir de las 48 h de cultivo se produjo un incremento generalizado sin importar el tipo de tratamiento utilizado (Fig. 14).

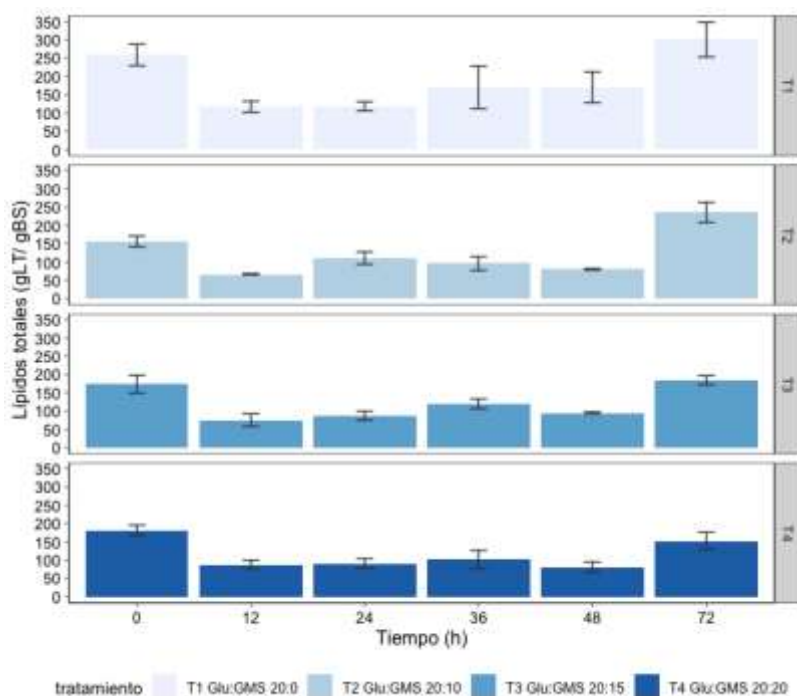


Figura 13. Producción de lípidos totales en *Schizochytrium* sp. bajo los diferentes tratamientos con GMS utilizando el medio ASWm. Cuantificado por el método de la SPV en microplaca. La producción de lípidos se ve disminuida en los tratamientos con GMS. La falta de suplementación (T1) generó un incremento significativo respecto al medio suplementado.

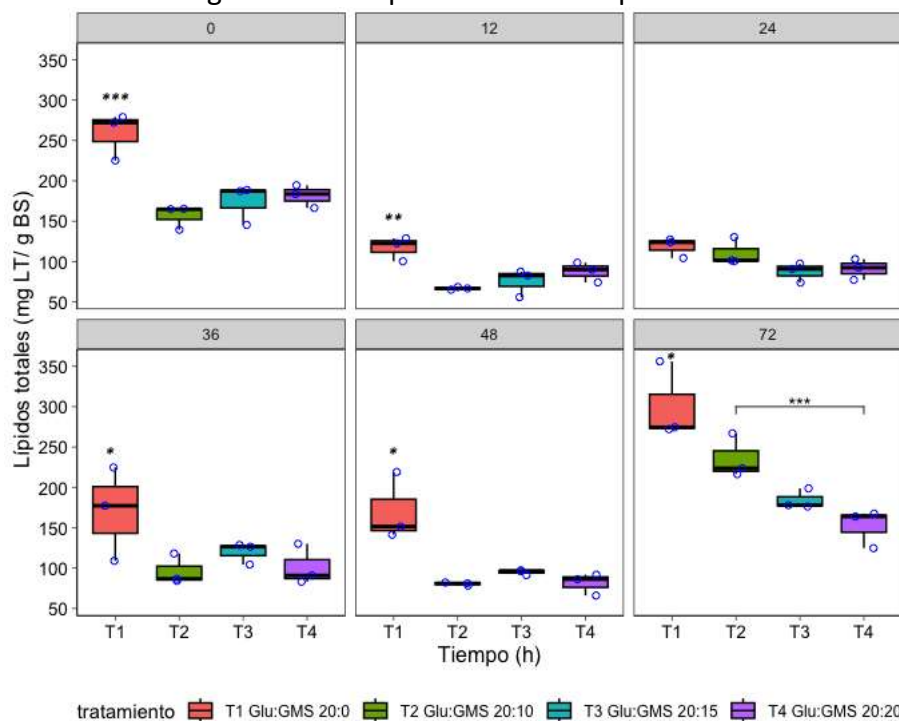


Figura 14. Variación de la producción de lípidos totales en *Schizochytrium* sp. bajo los diferentes tratamientos de suplementación con GMS ($p < 0.05$).

7.4 Producción de sueros hiperinmunes contra ToxA

La respuesta de los sueros hiperinmunes generados en ratones BALB/c contra la ToxA recombinante se muestra en la **Tabla 10**. La mayor absorbancia a 450 nm se detectó en la dilución 1:640 para el suero correspondiente al ratón 2. De estos resultados se seleccionó una dilución 1:500 que permitiera una detección adecuada de la proteína recombinante producida durante el ensayo de transformación de *Schizochytrium* sp. con la AgToxA.

Tabla 10. Ensayo de ELISA en sueros hiperinmunes de ratones BALB/c. Se indican las absorbancias obtenidas al probar el suero hiperinmune de ratones inmunizados con extracto soluble de ToxA_{BL21}.

Dilución	Abs a 450 nm		
	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3
1:80	1.156	1.223	1.215
1:160	1.162	1.111	1.108
1:320	1.018	1.170	1.059
1:640	1.102	1.168	0.994

7.5 Transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. utilizando el medio ASWm

7.5.1 Efecto del GMS sobre la producción de biomasa de *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA

La producción de biomasa y las curvas de crecimiento para las líneas WT y ToxA de *Schizochytrium* sp. cultivada en los medios ASWm con Glu:GMS 20:15 (ASWm 20:15) y YPD comercial se muestran en la Fig. 15. En esta se observa como el GMS genera un efecto positivo sobre el incremento de biomasa con una tendencia exponencial tanto en el cultivo WT como en el transformado con ToxA. El incremento es gradual y sostenido durante el tiempo de muestreo, mostrando una diferencia no significativa a las 72 h para la línea transformada. Al contrario, el crecimiento de *Schizochytrium* sp. WT en el medio YPD presente un crecimiento errático con picos de producción a las 60 y 72 h, mientras que para la línea ToxA el crecimiento es sostenido con el máximo de producción a las 72 h.

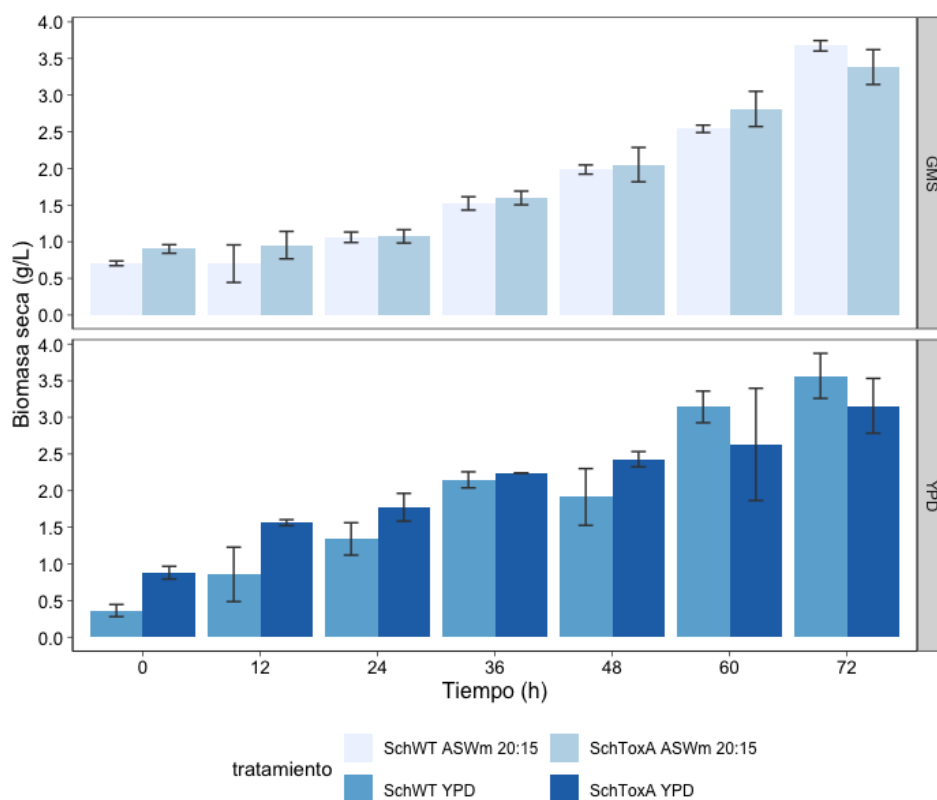


Figura 15. Producción de biomasa de las líneas WT y ToxA de *Schizochytrium* sp. en los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. El tratamiento con GMS generó una tendencia positiva hacia la acumulación de biomasa tanto en la línea WT como en la transformada con ToxA.

Por otra parte, la Fig. 16 muestra la producción de biomasa al utilizar los medios ASWm y YPD. No se encontraron diferencias significativas a partir de las 48 h de cultivo ($p < 0.05$) entre ambos medios. Por otra parte, la Fig. 17 muestra la variación de la biomasa para los cuatro tratamientos evaluados. Aquí se puede observar que el suministro de GMS generó un incremento significativo ($p < 0.05$) respecto al cultivo WT.

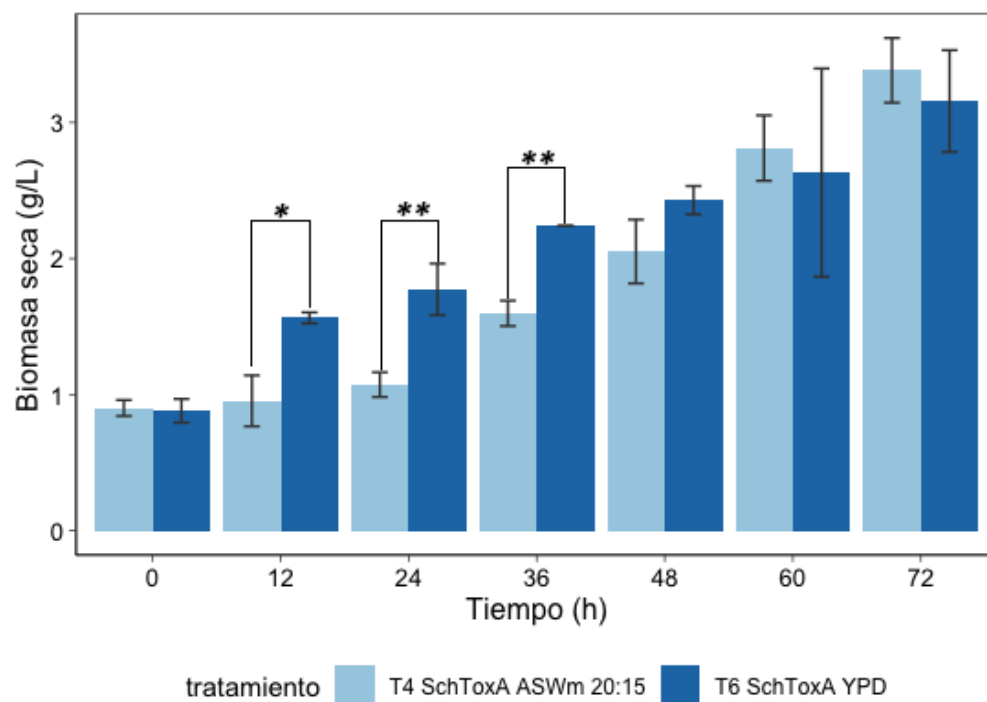


Figura 16. Producción de biomasa en *Schizochytrium* sp. para la línea transformada con AgToxA utilizando los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

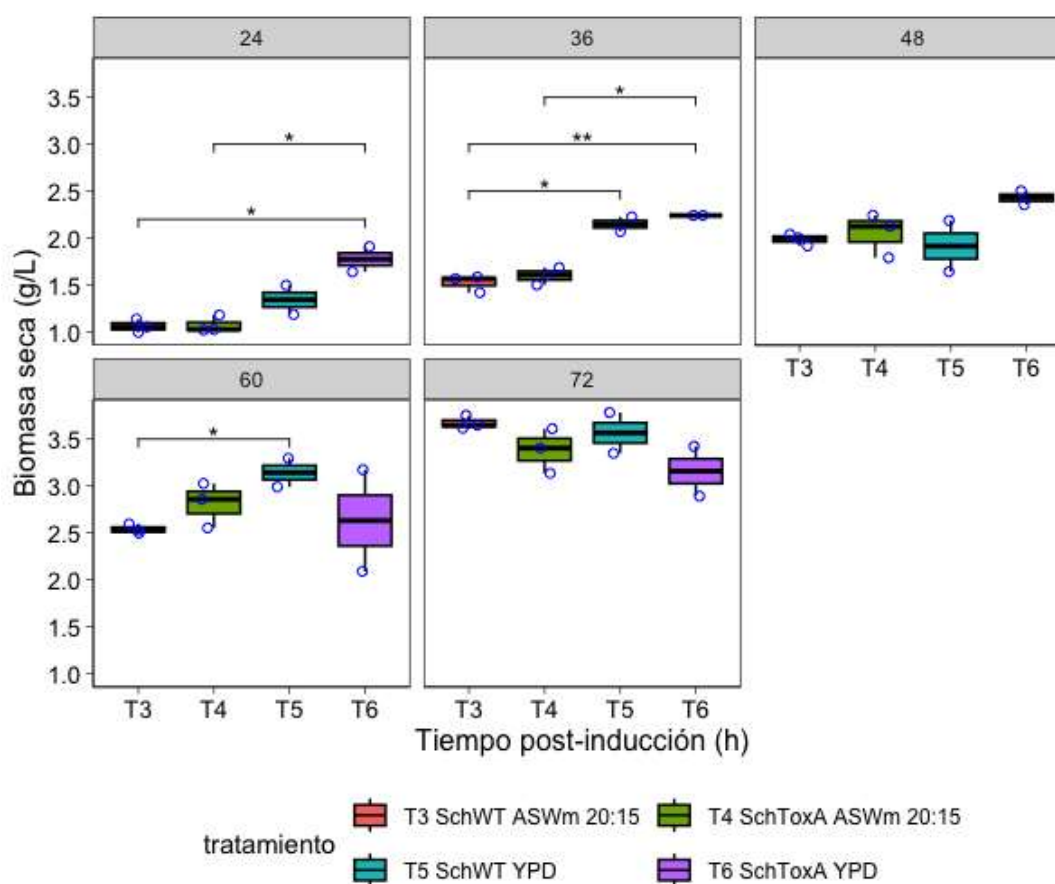


Figura 17. Variación de la producción de biomasa seca en *Schizochytrium* sp. durante la transformación con AgToxA utilizando los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

7.5.2 Efecto del GMS sobre la producción de proteína total de *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA

Al utilizar el medio ASWm con el tratamiento Glu:GMS 20:15 durante la transformación transitoria de *Schizochytrium* sp. con el sistema Algevir se obtuvo un máximo de producción de proteína a las 60 h para la línea transformada (477.57 ± 28.44 mgPT/gBS), mientras que, en el mismo tiempo, la línea WT en ASWm 20:15 produjo 224.47 ± 30.89 mgPT/gBS y la línea transformada en YPD alcanzó los 369.88 ± 0.9 mgPT/gBS. La línea transformada en medio ASWm 20:15 presentó un aumento sostenido en la producción de biomasa desde el tiempo cero y hasta las 60 h para posteriormente reducirse. En cambio, los tratamientos la línea WT en el medio ASWm 20:15 y los cultivos en YPD comercial mostraron un incremento variable a lo largo del experimento (Fig. 18).

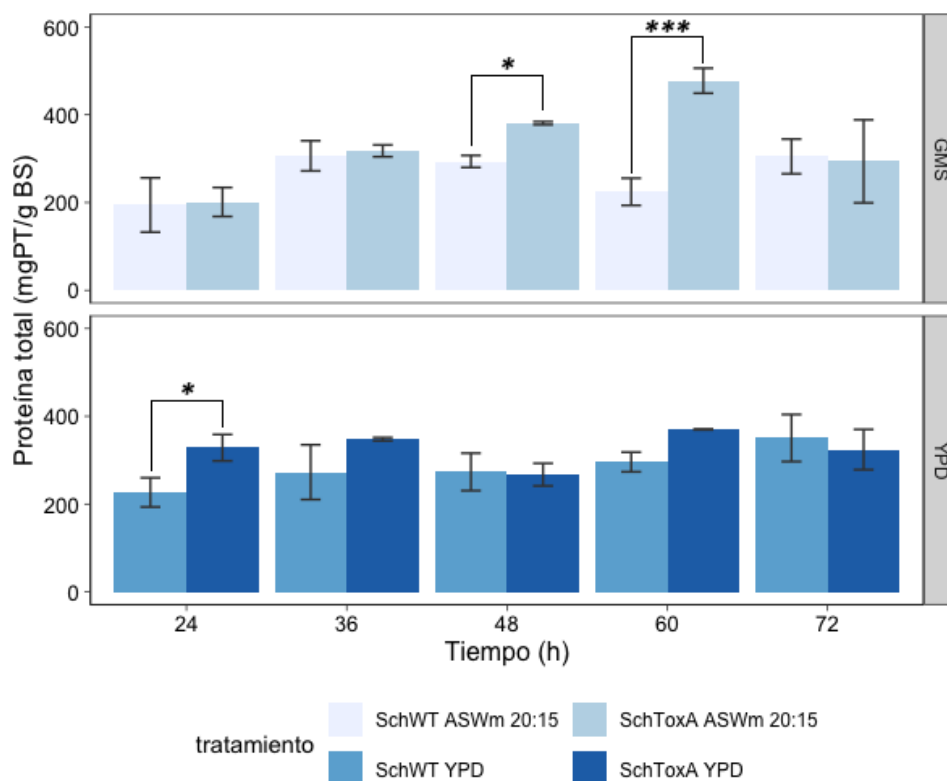


Figura 18. Producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. al utilizar los medios ASWm 20:15 y YPD comercial, para las líneas WT y ToxA. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

De manera similar, la Fig. 19a muestra la comparación de la producción de la proteína total para la línea transformada creciendo en los medios ASWm 20:15 y YPD. En este caso, los tiempos 24, 48 y 60 h presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en la producción de proteína total. A las 24 h post-inducción, el medio YPD generó 328.38 mg PT/g BS, es decir, un 63% más que el medio ASWm 20:15. Sin embargo, a las 48 h y 60 h la producción de YPD disminuyó mientras que la de ASWm 20:15 aumentó en un 42.6% y 29.1%, respectivamente.

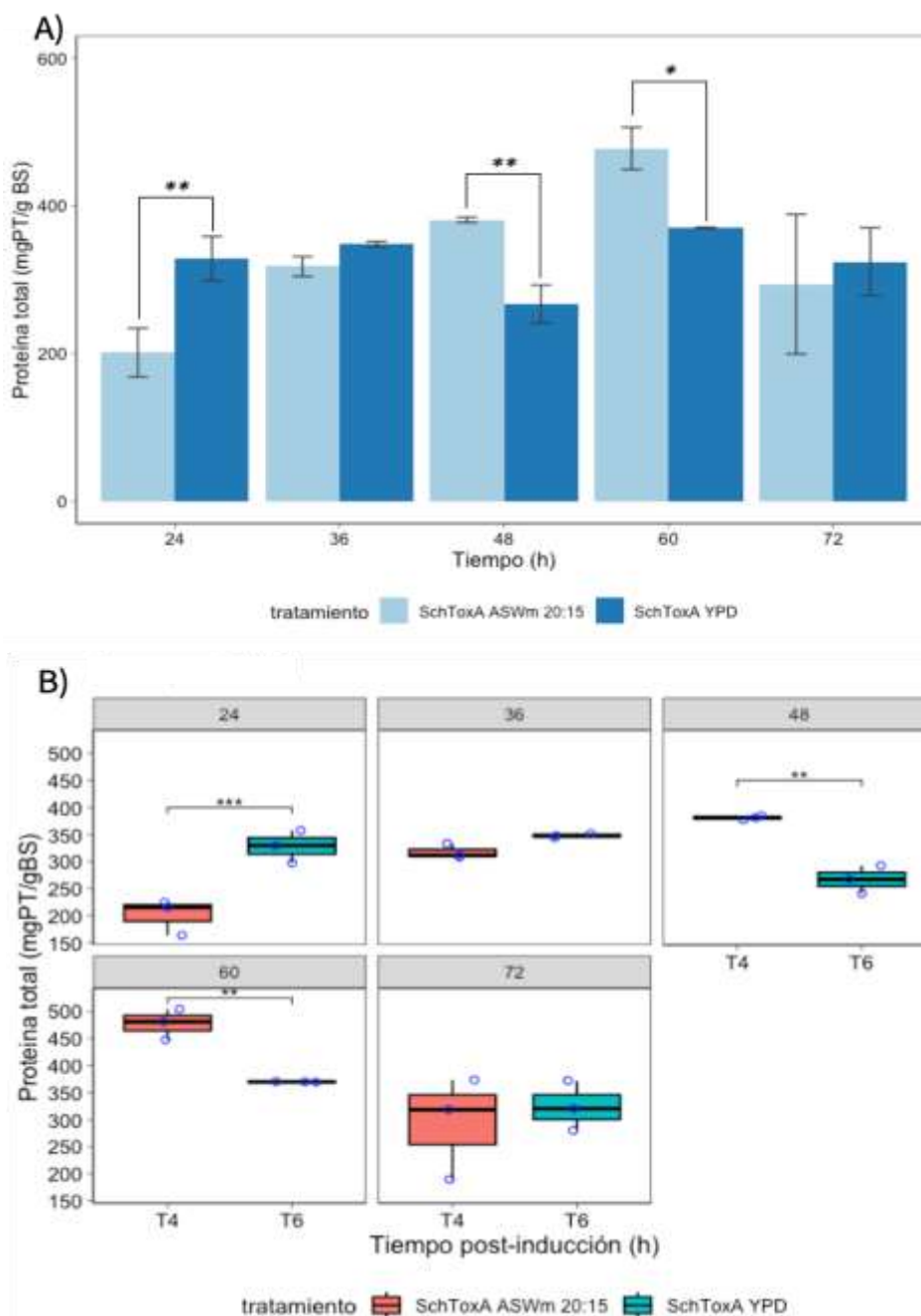


Figura 19. Producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. al utilizar los medios ASWm 20:15 y YPD comercial. Comparación de la productividad en la línea transformada con ToxA en ambos medios. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Por otra parte, la variación de la producción de proteína total se muestra en la Fig. 19b. En esta se observa que el desplazamiento de la producción es mayor para el medio ASWm 20:15 en los tiempos de 48 h y 60 h, siendo ambos significativos respecto al medio comercial.

7.5.3 Detección del antígeno ToxA recombinante al utilizar el medio ASWm 20:15 durante la transformación transitoria de *Schizochytrium* sp.

La producción del antígeno recombinante ToxA producido al utilizar el medio ASWm y YPD comercial se detectó por las técnicas de dot blot y western blot. La aparición de los *dots* positivos a ToxA recombinante al utilizar el suero hiperinmune anti-ToxA y revelar por DAB. En este sentido, al ajustar el extracto proteico a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con buffer de extracción se detectaron *dots* para el medio ASWm desde las 24 h post-inducción y en todos los tiempos probados; e incluso de una intensidad mayor a los obtenidos en los extractos proteicos de la línea cultivada en YPD. Además, como se observa en la Fig. 20a, al utilizar el medio YPD únicamente se detectaron *dots* positivos a ToxA a partir de las 48 h.

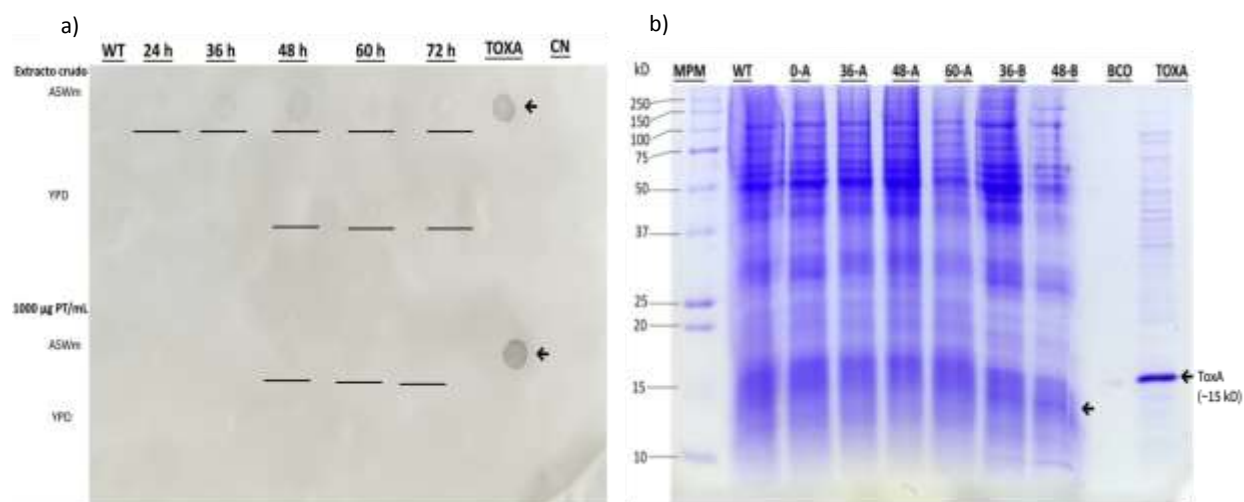


Figura 20. Dot blot y electroforesis SDS-PAGE de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT y transformada de *Schizochytrium* sp. a) dot blot, las líneas marcan los *dots* positivos para ToxA recombinante y las flechas los controles de ToxA semipurificada y b) SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% para los extractos proteicos ajustados a 300 μg PT/mL. Se indica la banda correspondiente al control de ToxA y la zona donde se encuentra ToxA recombinante de *Schizochytrium* sp.

La calidad de los extractos se evaluó previo a realizar la transferencia a la membrana de celulosa. La Fig. 20b, muestra la fotografía del resultado de la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%, en el cual se observa un patrón de bandeado definido tanto para las muestras de extractos proteicos como para el control de ToxA semipurificado. En este sentido, el ajuste a 300 μg PT/mL permitió obtener bandas de la misma intensidad, por lo que la

intensidad en él bandeo al momento de transferir a la membrana de nitrocelulosa corresponderá a la concentración de la proteína recombinante. En la Fig. 20b se indica la región en la que se esperó encontrar a ToxA recombinante.

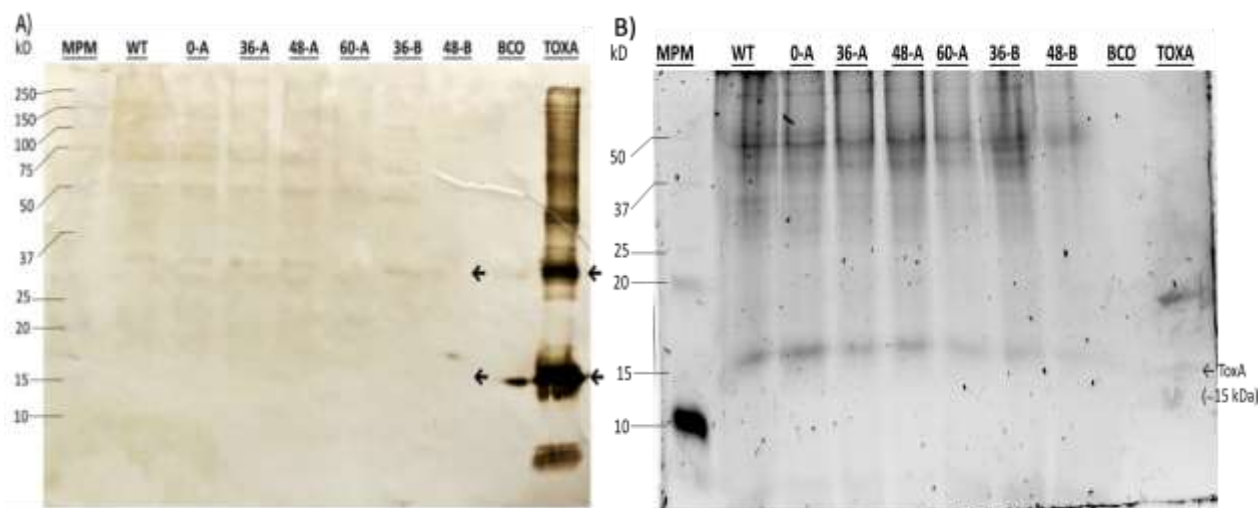


Figura 21. Western blot de los extractos proteicos obtenidos de las líneas WT y transformada de *Schizochytrium* sp. A) Western blot en membrana de nitrocelulosa y revelado por DAB, las flechas marcan la región en la que se encuentran las bandas para ToxA y, B) Western blot en gel con detección con anti-IgG ligado a fluoresceína (FIC) para los extractos proteicos ajustados a 300 μ g PT/mL.

Los resultados del Western blot se muestran en la Fig. 21. Al realizar la transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se esperaba encontrar un bandeo en \sim 15 kD o por debajo de este peso, correspondiente a ToxA recombinante. Sin embargo, como se indica en la Fig. 21a, solo se alcanzan a observar bandas difusas y de muy baja intensidad en la región donde se esperaba encontrar la proteína recombinante. Por otra parte, al realizar el western blot en gel y la detección de ToxA por fluorescencia se observaron bandas del peso esperado para ToxA (\sim 15 kD, Fig. 21b). Además, las bandas para 36, 48 y 60 h de los extractos correspondientes al medio ASWm (indicados con A en la Fig. 21b) presentan una mayor intensidad que las correspondientes para los tiempos de 36 y 48 h en YPD (indicadas con B en la Fig. 21b).

7.5.4 Cuantificación de la producción de ToxA recombinante por ELISA cuantitativo

La producción del antígeno recombinante ToxA fue significativamente mayor a los tiempos 36 h y 48 h ($p < 0.05$) al utilizar el medio ASWm 20:15, respecto al medio YPD comercial (Fig. 22). A estos tiempos, el rendimiento por gramo de biomasa seca fue de 319.02 y 374.79 $\mu\text{g ToxA/g BS}$, respectivamente. En el medio ASWm 20:15 se observó un incremento sostenido de ToxA desde las 24 h post-inducción y decayó a las 60 h. Por otra parte, en el medio YPD se observó una tendencia similar, pero a menor producción, donde el pico se alcanzó a las 60 h post-inducción. Del mismo modo, la línea WT presentó una respuesta inespecífica al suero hiperinmune presentando elevación de los títulos para la cuantificación de ToxA, sin embargo, nunca fue mayor que en las líneas transformadas con los tratamientos con GMS o en el medio YPD. Por lo que se consideró como respuesta basal inespecífica al suero hiperinmune.

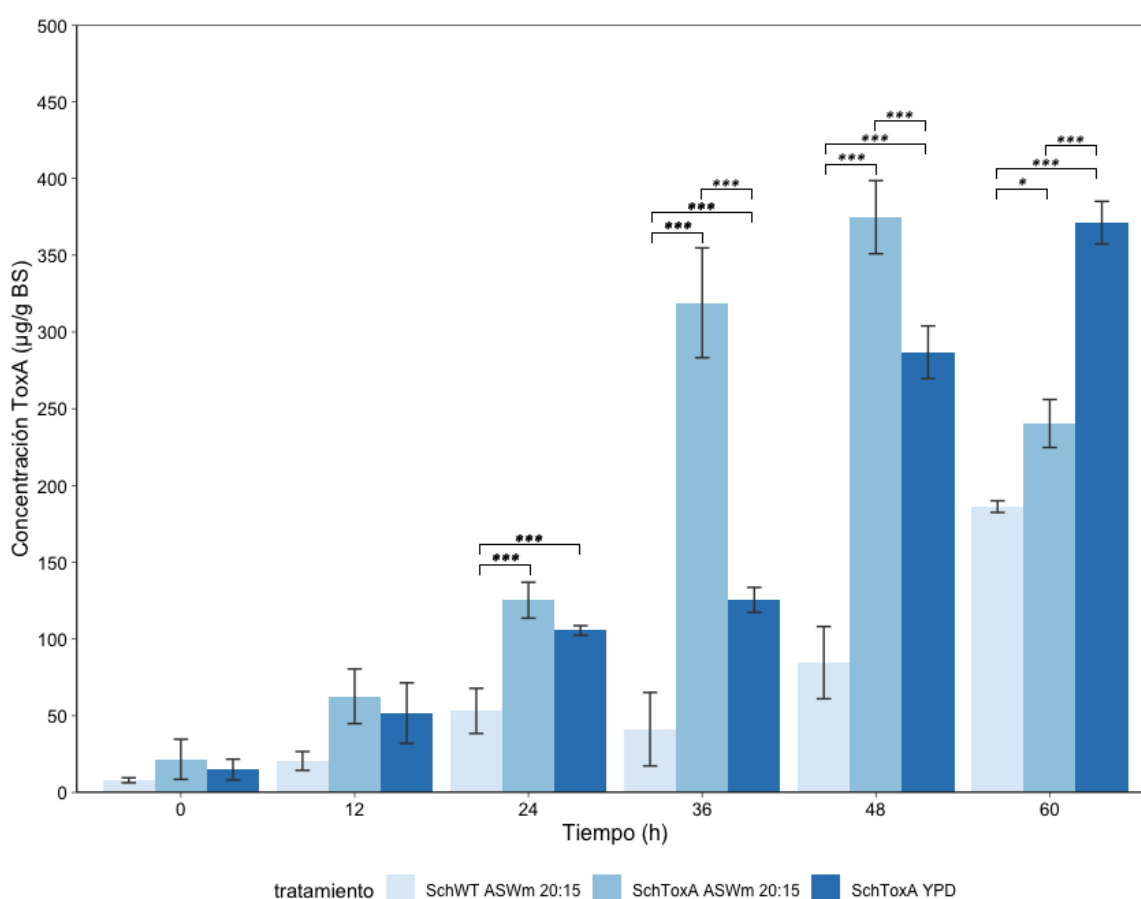


Figura 22. Concentración de ToxA recombinante producida en *Schizochytrium* sp. transformada transitoriamente con AgToxA. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

7.6 Optimización de la producción de proteína total y ToxA recombinante en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con pAlgevir::ToxA

Los niveles probados para las variables GMS, YE y tiempo post-inducción se estimaron por la metodología de Box-Behnken (BB). Los resultados de tres muestras independientes para cada punto evaluado se muestran en la **Tabla 11**. El diseño arrojó un total de 18 experimentos para las tres variables seleccionadas (GMS = x_1 , YE = x_2 y tiempo = x_3), de los cuales seis fueron para el punto central correspondiente a los utilizados en los experimentos previos para la determinación del efecto de GMS sobre el crecimiento de *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA (Glu:GMS 20:15, 1% de extracto de levadura y el tiempo de cosecha a las 48 h post-inducción). Los valores de las respuestas evaluadas (y_1 = biomasa, y_2 = proteína total y y_3 = concentración de ToxA recombinante) se muestran para los valores experimentales y predichos por las ecuaciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, respectivamente.

Tabla 11. Diseño experimental de Box-Behnken para la optimización de la producción de biomasa (peso seco, BS), proteína total (PT) y el antígeno recombinante ToxA (ToxA) en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA.

No. Corrida	Variable codificada			Variable natural			Respuesta experimental			Respuesta predicha		
	x_1	x_2	x_3	GMS	YE	Tiempo	BS	PT	ToxA	BS	PT	ToxA
1	-1	-1	0	10	0.5	48	0.93	341.23	82.22	0.8537	322.21	98.53
2	+1	-1	0	20	0.5	48	1.04	305.41	118.24	0.9412	314.63	114.69
3	-1	+1	0	10	1.5	48	0.87	324.33	139.41	0.9687	315.11	142.96
4	+1	+1	0	20	1.5	48	0.79	279.39	149.32	0.8662	298.41	133.01
5	-1	0	-1	10	1	36	0.91	268.52	124.28	0.9400	276.01	108.37
6	+1	0	-1	20	1	36	0.84	296.36	113.18	0.8925	275.61	117.13
7	-1	0	+1	10	1	60	0.86	253.55	147.63	0.8075	274.30	143.68
8	+1	0	+1	20	1	60	0.87	257.91	125.21	0.8400	250.42	141.13
9	0	-1	-1	15	0.5	36	0.77	295.29	80.86	0.8162	306.82	80.46
10	0	+1	-1	15	1.5	36	1.24	304.62	174.97	1.1112	306.35	187.33
11	0	-1	+1	15	0.5	60	0.87	306.27	197.99	0.9987	304.55	185.62
12	0	+1	+1	15	1.5	60	0.79	293.24	141.09	0.7437	281.71	141.49
13	0	0	0	15	1	48	2.12	324.98	357.96	1.8416	347.75	319.14
14	0	0	0	15	1	48	2.24	353.91	391.62	1.8416	347.75	319.14
15	0	0	0	15	1	48	1.79	357.08	374.79	1.8416	347.75	319.14
16	0	0	0	15	1	48	1.49	359.76	215.72	1.8416	347.75	319.14

17	0	0	0	15	1	48	1.62	359.76	311.29	1.8416	347.75	319.14
18	0	0	0	15	1	48	1.79	330.99	263.51	1.8416	347.75	319.14

De manera interesante, los resultados con mayor concentración de biomasa, proteína total y ToxA recombinante se encuentran cerca del punto central seleccionado. De la **Tabla 14** se observó que la falta de ajustes es relativamente alta (0.95) por lo que el modelo se ajusta a los datos de ToxA. Por otro lado, para la biomasa y la proteína total la falta de ajuste fue de 0.82 y 0.138. Para todas las respuestas, el modelo cuadrático puro (PQ) tuvo la mayor influencia sobre la curvatura de los datos, así como el punto central previamente seleccionado.

Tabla 12. ANOVA para la producción de biomasa en *Schizochytrium* sp.

	GL	SC	MSC	F	Pr>F
FO(x1, x2, x3)	3	0.0180	0.00601	0.0981	0.95889
TWI((x1, x2, x3)	3	0.0862	0.02875	0.4692	0.71194
PQ(x1, x2, x3)	3	3.5645	1.18818	19.3925	0.00049
Residuales	11	0.4902	0.06127		
Falta de ajuste	6	0.0759	0.02529	0.3052	0.82120
Error Puro	5	0.4143	0.08286		

$$Y = 1.8417 - 0.0038x_1 + 0.01x_2 - 0.0463x_3 - 0.0475x_1x_2 + 0.02x_1x_3 - 0.1375x_2x_3 - 0.4908x_1^2 - 0.4433x_2^2 - 0.4808x_3^2 \quad (11)$$

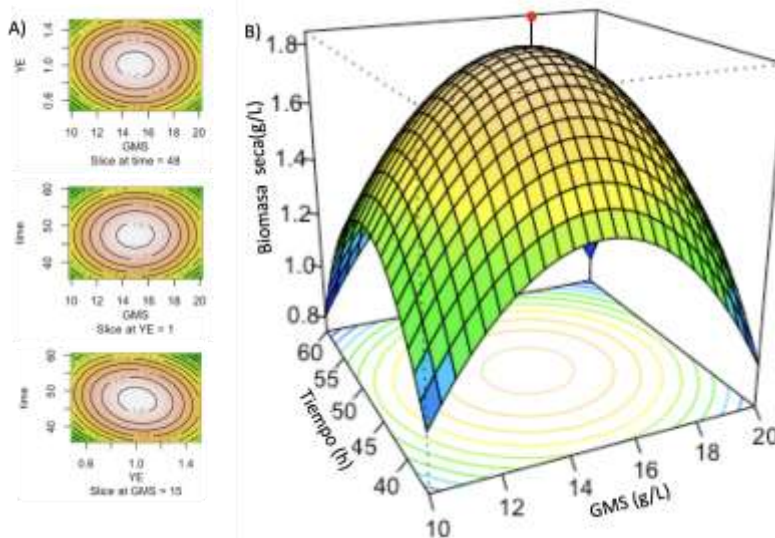


Figura 23. Producción de biomasa total en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.

Por otra parte, los modelos para la interacción de los factores y su impacto sobre las respuestas no fueron significativos sobre el modelo de superficie ($p < 0.05$). El análisis de los eigen-valores permite estimar la factibilidad de encontrarse cerca del punto óptimo o del punto estacionario de la superficie de respuesta, para lo que se esperarían tener valores negativos grandes en cada factor. En este sentido, los eigen-valores para las tres respuestas (y) se muestran en la **Tabla 15** y todos son valores negativos, por lo que todos los modelos, aun cuando la falta de ajuste para la biomasa y proteína es baja, se ajustan al punto estacionario para cada respuesta evaluada.

Tabla 13. ANOVA para la producción de proteína en *Schizochytrium* sp.

	GL	SC	MSC	F	Pr>F
FO(x_1, x_2, x_3)	3	928.5	309.5	0.7288	0.5579
TWI((x_1, x_2, x_3))	3	283.6	94.5	0.2257	0.8759
PQ(x_1, x_2, x_3)	3	15624.5	5208.2	12.4318	0.0022
Residuales	11	3351.5	418.9		
Falta de ajuste	6	2138.7	712.9	2.9389	0.1380
Error Puro	5	1212.8	242.6		

$$Y = 347.7467 - 6.0700x_1 - 5.8275x_2 - 6.7275x_3 - 2.28x_1x_2 - 5.87x_1x_3 - 5.59x_2x_3 - 32.9633x_1^2 - 2.1933x_2^2 - 45.6983x_3^2 \quad (12)$$

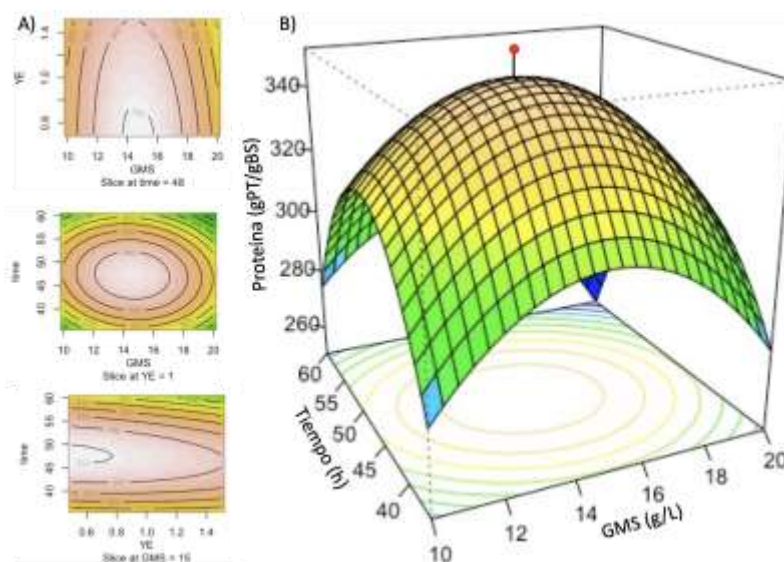


Figura 24. Producción de proteína total en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.

La gráfica de superficie de respuesta para la biomasa (Fig. 23) presenta una curvatura positiva debido a los términos cuadráticos significantes ($p < 0.05$) donde la mejor respuesta para la producción de biomasa se encuentra en la parte superior de la gráfica (1.8429 g/L, indicador rojo). La Fig. 24 muestra una distribución similar de la superficie de respuesta, pero presenta un domo más corto debido al desplazamiento de los factores de tiempo y el porcentaje de YE, respectivamente, mismo que se visualiza en la Fig. 24a en las gráficas de contorno para los cortes de tiempo = 48 h y GMS = 15. La mejor predicción para la proteína total (indicador rojo en la Fig. 24b) fue de 351.6931 mg PT/g BS. Por último, la producción de ToxA tuvo la mejor respuesta predicha de 320.2682 $\mu\text{g/g}$ BS y el modelo de segundo orden generó una curvatura positiva en la superficie de respuesta (Fig. 25).

Tabla 14. ANOVA para la producción de ToxA recombinante en *Schizochytrium* sp.

	GL	SC	MSC	F	Pr>F
FO(x1, x2, x3)	3	3747	1249	0.3979	0.758318
TWI((x1, x2, x3)	3	5903	1968	0.6269	0.617600
PQ(x1, x2, x3)	3	140369	46790	14.9067	0.001223
Residuales	8	25111	3139		
Falta de ajuste	3	1401	467	0.0985	0.957463
Error Puro	5	23709	4742		

$$Y = 319.1483 + 1.5512x_1 + 15.6850x_2 + 14.8288x_3 - 6.5275x_1x_2 - 2.83x_1x_3 - 37.7525x_2x_3 - 109.0017x_1^2 - 87.8492x_2^2 - 82.5717x_3^2 \quad (13)$$

Los puntos de óptimos de GMS, YE y tiempo de cosecha post-inducción se muestran en la **Tabla 15**. En este caso, una concentración de Glu:GMS 20:15, YE 1.04% y un tiempo de cosecha post-inducción con etanol absoluto de 49 h permitirán recolectar la mayor cantidad de proteína recombinante ToxA, a partir de la cepa transformada de *Schizochytrium* sp. bajo las condiciones indicadas en este trabajo y de acuerdo con los procesos de extracción mencionados previamente.

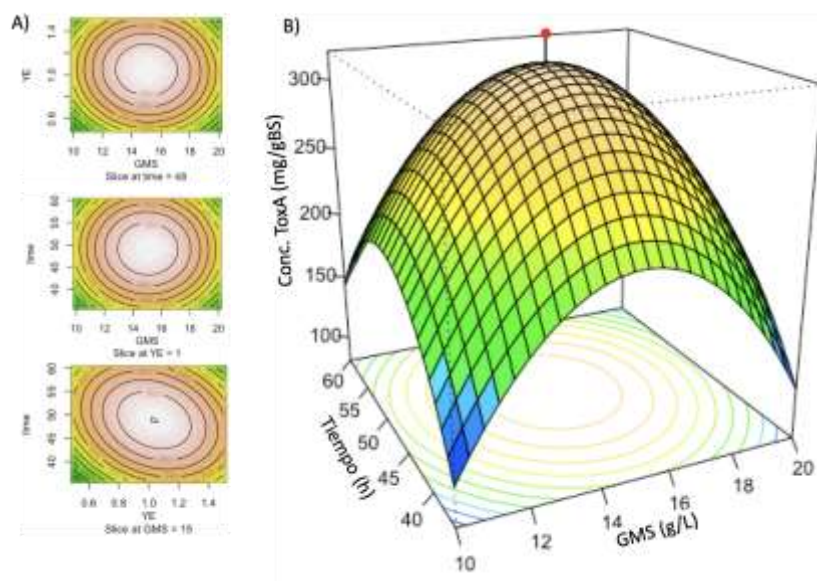


Figura 25. Producción del antígeno recombinante ToxA en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA. A) Gráficos de contorno y B) Gráfico de superficie de respuesta para YE = 1%. El punto rojo indica el máximo predicho por el modelo.

Tabla 15. Puntos óptimos y eigen-análisis para los tratamientos de optimización. Los valores son los mejores resultados obtenidos por predicción a partir del modelo de segundo orden, realizado en RStudio con el paquete *rsm* de RStudio.

	Biomasa	Proteína	ToxA	Óptimo
Óptimo GMS (x_1 , g/L)	14.9709	14.7628	15.0198	20:15
Óptimo YE (x_2 , % p/p)	1.0097	0.3417	1.03672	1.04%
Óptimo Tiempo (x_3 , h post-inducción)	47.3879	48.1194	48.8752	49 h
Mejor respuesta (y)	1.8429 g/L	351.6931 mg/g BS	320.2682 μ g/g BS	
Eigen-análisis	-0.3849	-2.1933	-66.1235	
(x_1, x_2, x_3)	-0.4956	-32.9633	-102.5079	
	-0.5344	-45.6983	-110.7911	

8. DISCUSIÓN

8.1 Efecto del medio ASWm con GMS sobre el crecimiento de *Schizochytrium* sp.

La optimización de los componentes de medios de cultivo es una estrategia utilizada para maximizar la producción de una molécula específica. Se busca el sustituir una fuente de carbono o nitrógeno definida por otras de mayor facilidad de uso con el fin de incrementar la tasa de crecimiento o la tasa de producción de un metabolito de interés (Singh *et al.*, 2017). En este sentido, los resultados de la evaluación del GMS, como fuente de amino nitrógeno no limitante, demostraron mejorar la producción de biomasa en comparación con el uso del medio comercial YPD. En trabajos previos se ha descrito que *Schizochytrium* sp. presenta preferencias por sustratos orgánicos, como el extracto de levadura y el glutamato de sodio, que permiten una mayor tasa de acumulación de biomasa comparada con el uso de fuentes inorgánicas, como el sulfato de amonio, ya que generan un efecto limitante en el desarrollo de la microalga (Jiang *et al.*, 2017; Humhal *et al.*, 2019). La suplementación con Glu:GMS 20:15 tuvo un efecto significativo sobre la producción de biomasa, alcanzando un máximo de 6.4 g BS/L a las 96 h en cultivo por lotes. Un comportamiento similar fue descrito por Ren *et al.* (2014b) donde se alcanzó un máximo de biomasa seca de 48.03 g BS/L durante la fermentación alimentada de *Schizochytrium* sp. En este caso, la alimentación intermitente de una solución de glucosa/GMS prolongó el periodo de producción de biomasa, sin embargo, se produjo la reducción de los lípidos totales. En trabajos recientes se ha descrito que la adición de GMS permite evadir el ambiente restrictivo del agotamiento temprano del nitrógeno (fase de *depleción*) apagando las rutas biosintéticas de los sistemas PKS y FAS, lo cual permite que la glucosa captada del medio y el amino nitrógeno excedente se direccionen a la formación de bloques estructurales (Xu *et al.*, 2021). El efecto principal de este recambio metabólico es la disminución de los ácidos grasos saturados y un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el DHA (Ren *et al.*, 2014b). En los experimentos realizados se observó la disminución de los lípidos totales respecto a la cepa cultivada en deficiencia de nitrógeno, lo que corrobora la utilidad de la suplementación con amino nitrógeno para el direccionamiento de las rutas biosintéticas en la cepa de *Schizochytrium* sp. utilizada.

Por otra parte, en los ensayos con GMS se observó un incremento significativo de la cantidad de proteína total respecto a los cultivos sin suplementación, un efecto que podría ser positivo para el mejoramiento de la producción de proteínas recombinantes. Este efecto del GMS ha sido descrito por diversos trabajos en los últimos años, donde la adquisición del aminoácido se da por la ruta biosintética de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa. Aquí, el glutamato interiorizado por transporte activo o pasivo puede ser direccionado al ciclo TCA o bien es convertido a glutamina por la glutamina sintetasa y de ahí es redistribuido por aminotransferasas hacia otros bloques estructurales, principalmente hacia 4-aminobutirato y, posteriormente a succinato. Este último ingresa al ciclo TCA derivando en un incremento de acetil-CoA y NADH. En condiciones de agotamiento de nitrógeno, la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) genera la desaminación del adenosín monofosfato (AMP) dando una señal para direccionar el acetil-CoA hacia la formación de ácidos grasos. Sin embargo, en presencia del glutamato/glutamina se ve sobre-compensado el sistema PKS sobre el sistema FAS, lo que promueve la formación de ácidos grasos poliinsaturados y disminuye la biosíntesis de ácidos grasos saturados. Por otra parte, la presencia de glutamato/glutamina en una relación alta respecto a la glucosa provoca la activación de la acetil-CoA carboxilasa y de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, direccionando hacia el metabolismo de la glucosa, incrementando su tasa de adquisición y favoreciendo la biosíntesis de biomasa, de bloques estructurales y la reconversión hacia aminoácidos de almacenamiento de nitrógeno, a través de la transaminación del α -cetoglutarato a aspartato y alanina y posteriormente a asparagina y arginina (Ren *et al.*, 2014b; Ling *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Ju *et al.*, 2020).

La determinación de las tasas específicas de crecimiento para los diferentes tratamientos con GMS ha demostrado que al incrementar la concentración de glutamato en el medio aumenta la tasa de adquisición de glucosa y la biomasa, mientras se reduce el tiempo de duplicación celular. Un comportamiento similar fue reportado por Jiang *et al.* (2017) donde la suplementación con GMS mejora las tasas de producción de biomasa. De manera similar, los resultados para la determinación de proteína total sugieren que la suplementación con relaciones altas de Glu:GMS incrementan la biosíntesis de proteínas. Esta tendencia hacia una mejor producción de proteína se debe, en gran medida, a que el glutamato/glutamina es un precursor de la biosíntesis de proteína y que permite direccionar el metabolismo al potenciar la

glucólisis y, por reconversión, la generación de nuevos aminoácidos lo que incrementa la disponibilidad de bloques estructurales para nuevos componentes proteicos (Walker y van der Donk, 2016; Chen *et al.*, 2017).

8.2 Transformación transitoria de *Schizochytrium sp.* con AgToxA

Diversos antígenos han sido expresados a través del Sistema Algevir en *Schizochytrium sp* y en *N. tabacum*. La detección de las moléculas heterólogas, en cada caso, se ha realizado a través de ensayos de ELISA y técnicas de inmunodetección como dot blot y western blot, para la cuantificación de la expresión y la integridad de la proteína recombinante, respectivamente. En este sentido, se considera como una transformación exitosa de *Schizochytrium sp.* cuando, a través de estas técnicas, es posible detectar la expresión de la proteína de interés. Por ejemplo, Hernández-Ramírez *et al.* (2020) realizaron la inmunodetección del antígeno multiepitópico BCB a través de dot blot lo que confirmó la capacidad antigénica de la proteína producida en la microalga. De manera similar, al utilizar el sistema Algevir en plantas de *N. tabacum* y realizar la inmunodetección por dot blot, Arévalo-Villalobos (2020) han logrado identificar a la proteína recombinante MS-2A hasta las 96 h post-inducción con etanol, la cual mostró antigenicidad al utilizar sueros hiperinmunes. En este trabajo, se logró identificar la presencia de ToxA recombinante por inmunodetección por dot blot hasta 72 h post-inducción, al utilizar sueros hiperinmunes producidos a partir del péptido semipurificado. En este sentido, el Sistema Algevir permite la producción de antígenos recombinantes funcionales durante varias horas después de la inducción, sin embargo, el pico de producción se encuentra entre las 48 y 72 h después de la adición del inductor. Un comportamiento similar se observa al identificar la proteína recombinante por la técnica de Western blot, por ejemplo, Márquez-Escobar *et al.* (2018) produjeron el antígeno ZK contra el virus del Zika y al realizar la inmunodetección por Western blot detectaron la proteína recombinante hasta 72 h post-inducción, pero con un máximo de producción a las 48 h. De igual forma, la proteína ToxA recombinante fue detectada hasta las 72 h, pero al evaluar los diferentes tiempos muestreados el pico de producción se encontró entre las 48 y 60 post-inducción, posiblemente debido al efecto de la suplementación con GMS, este impacto del amino nitrógeno sobre la producción de la proteína recombinante se aborda en el siguiente apartado.

Por otra parte, el uso de la ELISA cuantitativa depende de la generación de sueros hiperinmunes. En este sentido, la producción del suero está sujeta a una correcta manipulación de los animales de experimentación y, en mayor medida, de la calidad, concentración y pureza del péptido utilizado para la generación de estos. El uso del adyuvante permite generar una respuesta de mayor potencia y sostenida durante un mayor tiempo, lo que asegura que se produzcan una mayor cantidad de anticuerpos específicos contra el antígeno utilizado, sin embargo, al ser una producción policlonal pueden existir interferencias durante la detección final. En particular, se ha observado que los extractos proteicos de *Schizochytrium* sp. para las líneas WT y los tiempos previos a la adición del inductor (T_0) muestran valores de absorbancia por debajo de las líneas transformadas. Tal es el caso de la detección del antígeno MS-2A, donde se detectó una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en T_0 y esta fue similar a lo detectado en T_1 (Arévalo-Villalobos, *et al.*, 2020). También, Hernández-Ramírez, *et al.* (2020) observaron un comportamiento similar para los mismos tiempos al evaluar la proteína recombinante BCB por ELISA. De manera similar, para ToxA se obtuvo una respuesta basal para la línea WT y los tiempos T_0 , sin embargo, al igual que en los trabajos previamente comentados, esta se mantuvo por debajo de los valores observados para la línea transformada y los tiempos mayores, respectivamente. Es interesante, que los extractos crudos de *Schizochytrium* sp. presenten antigenicidad para las líneas WT, lo cual confirma la presencia de diversos compuestos inmunomoduladores, posiblemente asociados a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados y proteínas inmunorreactivas (Yang *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019; Chang *et al.*, 2020)

8.3 Efecto del GMS sobre la producción de ToxA recombinante en *Schizochytrium* sp.

El uso de los vectores de expresión virales es relativamente nuevo en microalgas heterótrofas, siendo pAlgevir el primero en diseñarse (Bañuelos-Hernández *et al.*, 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos, *Schizochytrium* sp. fue transformada transitoriamente con el co-cultivo de *A. tumefaciens* al utilizar el medio ASWm 20:15 para la producción del antígeno ToxA, con un rendimiento de 374.79 $\mu\text{g}/\text{g}$ BS a las 48 h post-inducción. Previamente, el uso de dos medios de cultivo diferentes se ha reportado con el Sistema Algevir: los medios 679BY (1 g/L YE, 1 g/L peptona, 5 g/L glucosa y 35 g/L NaCl) y 10 UPS (1 g/L YE, 1 g/L peptona, 5 g/L glucosa y 10 g/L NaCl). En el medio 679BY, Bañuelos-Hernández *et al.* (2017) y Márquez-Escobar *et al.* (2018)

produjeron la proteína GP1 del *Zaire ebolavirus* y un antígeno multiepitópico del virus del Zika (ZK), respectivamente. Los rendimientos a las 48 h post-inducción fueron de 1250 $\mu\text{g/g}$ BF para la proteína GP1 y de 241 $\mu\text{g/g}$ BF para el antígeno ZK. Por otra parte, con el medio 10 UPS Ortega-Berlanga et al. (2018) y Hernández-Ramírez et al. (2020) produjeron las proteínas recombinantes LTB:RAGE de Alzheimer y el antígeno multiepitópico BCB del cáncer de mama. El máximo rendimiento para LTB:RAGE fue de 380 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ BF, mientras que para BCB se alcanzó a las 24 h con 643 $\mu\text{g/g}$ BF de la proteína recombinante. Interesantemente, los trabajos reportados hasta el momento no incluyen el rendimiento con respecto al peso de la biomasa seca, pudiendo sobreestimar la proporción real de la proteína recombinante en la biomasa total por efecto del agua ligada. Por otra parte, Monreal-Escalante et al. (2022) han obtenido rendimientos de 350 $\mu\text{g/g}$ BS del antígeno multiepitópico EPI contra *V. parahaemolyticus* al utilizar el medio ASWm (datos no publicados) por lo que el medio ASWm permite la expresión de diferentes antígenos recombinantes con rendimientos superiores a los 300 $\mu\text{g/g}$ BS a las 48 h post-inducción.

Un efecto observado sobre la producción de ToxA en *Schizochytrium* sp. al ser cultivada en el medio ASWm 20:15 es la detección temprana de la proteína recombinante. La producción de ToxA recombinante se detectó en el tiempo cero, tanto en el medio ASWm y YPD, con títulos inferiores a los de los tiempos mayores. En este sentido, un ambiente celular rico en amino nitrógeno genera el direccionamiento metabólico de *Schizochytrium* sp. hacia la producción de biomasa y proteína, dado a la existencia de aminoácidos proteínogénicos de fácil adquisición celular con un costo energético reducido, lo que prioriza, a nivel metabólico, la interiorización de estos sobre otras fuentes de nitrógeno presentes en el medio (Korneli et al., 2012; Ren et al., 2014b). Los aminoácidos proteínogénicos han demostrado tener una influencia directa sobre la producción de proteínas recombinantes, entre ellos la glutamina como glutamato, dado que al ser rápidamente utilizados por la célula se alcanza la deficiencia de nitrógeno durante la fase temprana del crecimiento celular. Esto genera la interrupción de las rutas biosintéticas de proteínas, especialmente por la sobrerregulación de las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa que favorecen la transferencia del grupo amino hacia las reacciones de mantenimiento celular; y con ello disminuyen los rendimientos netos de la biosíntesis de nuevos aminoácidos como la arginina, lisina, valina y alanina en los que su producción se encuentra

estrechamente ligada a la ruta metabólica del glutamato y, que forman los bloques estructurales proteicos (Korneli *et al.*, 2012). Por lo que, la detección temprana de ToxA puede encontrarse ligada a una expresión basal del vector de expresión, dado que una gran parte del vector corresponde a la secuencia original del plásmido pBI121 y solo el casete de expresión (Algevir) presenta los sitios de inducción. Es probable que la expresión basal se deba a la capacidad que tiene el vector de direccionar el crecimiento al ejercer presión metabólica sobre el sistema intracelular. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para poder confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, la presencia de un vector de expresión genera una presión negativa sobre el metabolismo del microorganismo transformado, dado que se incrementan las necesidades de precursores metabólicos. Por lo tanto, durante la traducción del gen heterólogo se puede observar la aparición de perfiles de concentración proteicos distintos a los de las líneas WT (Ramírez y Bentley, 1993). En este sentido, al evaluar la expresión de la proteína recombinante en el medio sin suplementación, se observó que la cantidad de proteína difirió significativamente respecto a la línea sin transformar en el mismo medio. Donde, el mayor rendimiento se observó en la cepa sin transformar (300 mg/g BS), por lo que sin suplementación de nitrógeno el vector de expresión genera una presión negativa en el metabolismo de *Schizochytrium sp.* El impacto de la producción de proteínas recombinantes sobre el metabolismo celular y crecimiento microbiano ha sido escasamente reportado en los últimos años. En *S. cerevisiae* se ha reportado que la producción de la proteína recombinante β -aminopeptidasa (BapA) generó un impacto considerable sobre el estado fisiológico de la levadura. Esencialmente, provocó un requerimiento extra sobre el ciclo TCA debido al incremento evidente de la demanda energética para satisfacer la expresión del vector, lo que indujo la regeneración del NADH y la producción de ATP a partir de acetil-CoA, ocasionando la disminución del crecimiento y una limitada biosíntesis de proteínas (Heyland *et al.*, 2011). También, Bonomo y Gill (2005) describieron que la longitud de la secuencia aminoacídica de la proteína heteróloga, así como el tipo y contenido de aminoácidos presentes en la misma, generan una carga metabólica extra sobre *Escherichia coli* BL21 durante la expresión del polipéptido pET-3d de manera basal e inducida. Los autores reportaron que la expresión basal no generó un efecto significativo sobre el crecimiento

bacteriano. En contraste, la inducción del vector afectó drásticamente el tiempo de duplicación (Bonomo y Gill, 2005).

8.4 Optimización de los parámetros de crecimiento de *Schizochytrium* sp. asociados a la producción de proteína total y ToxA recombinante

El diseño de experimentos (DoE) es ampliamente utilizado para la optimización de procesos industriales y biotecnológicos, esencialmente para la generación de mejores medios de cultivo con el fin de maximizar la producción de los metabolitos de interés. Además, el uso de gráficos de superficie permite visualizar las relaciones de los factores encontradas durante el análisis experimental, así como la respuesta de la variable dependiente respecto a estas interacciones, para poder establecer la mejor combinación de componentes del medio de cultivo y los parámetros de crecimientos óptimos que aseguren la mayor producción del metabolito de interés (Bajwa *et al.*, 2019). El DoE de Box-Behnken acoplado a RSM permitió predecir el punto de máxima producción de biomasa para *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con AgToxA que correspondió a 1.8429 g BS/L. La respuesta cuadrática para los factores presentó un impacto significativo sobre la producción de biomasa. Sin embargo, la interacción de los factores ($\beta_{x_1x_2x_3}$) no la tuvo, por lo que la estimación del valor estacionario y del punto máximo se realizó con la mejor aproximación con base a los seis puntos centrales evaluados. De manera similar, para la producción de proteína el término de mayor impacto sobre la respuesta fue el cuadrático, por lo que la interacción de los factores GMS, YE y tiempo postcosecha solo es significativa cerca del punto central que se evaluó. Al igual que con la optimización de la biomasa la bondad de ajuste fue relativamente baja. En ambos casos, la desviación estándar juega un papel central en el desarrollo del modelo, ya que permite calcular el error propio del diseño de BB y ajustar el modelo de RSM. Sin embargo, las desviaciones estándar fueron elevadas para los tiempos de 72 y 96 h, lo que ocasiona el desplazamiento del error y la pérdida de ajuste del modelo. En este sentido, la falta de ajuste para el modelo de biomasa indica una baja correlación de las estimaciones estadísticas para cada punto de corrida respecto al modelo de los datos experimentales. No obstante, el valor negativo de los resultados del eigen-análisis indicó que los puntos evaluados se encuentran cercanos al punto estacionario. En este sentido, el diseño de BB considera los puntos equidistantes en tres niveles

para los diferentes factores estudiados, todos circunscritos en una esfera, por lo que no existen puntos fuera de la misma y el arreglo no se considera factorial. Por lo tanto, para valores que puedan existir fuera de la esfera el modelo puede encontrarse sobreestimado, generando la pérdida en la bondad de ajuste (Pereira *et al.*, 2021).

La optimización de la proteína ToxA recombinante se predijo para el punto de GMS 20:15, YE de 1.04% y 49 h postcosecha, para una respuesta máxima de 320.23 $\mu\text{g/g}$ BS. En este punto, la respuesta de la producción de proteína recombinante en *Schizohcytrium* sp. fue dependiente de la concentración de GMS y extracto de levadura presente en el medio de cultivo. Interesantemente, un incremento por encima de la relación 20:15 generó un impacto negativo sobre la producción de ToxA, por lo que es probable se dé una inhibición por sustrato. Este mismo se refleja en las gráficas de producción para proteína total y ToxA, donde después del tiempo de 48 h post-inducción se observa la caída de la concentración de manera pronunciada. La gráfica de superficie también mostró que la región cercana al punto central inicial es la zona de mayor productividad. De manera similar, Nazir *et al.* (2018) realizaron el DoE para la optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el crecimiento de *Aurantiochytrium* sp. así como la producción de lípidos totales y DHA. En este caso, la producción de biomasa puede ser optimizada por el método de RSM. El impacto de los parámetros seleccionados se pudo observar como parte del coeficiente cuadrático que generó la curvatura de la superficie, lo cual se traduce a que el impacto neto de cada factor evaluado sobre la variable respuesta respecto a cada otro factor, lo que permite establecer cuál de ellos es el que tiene una mayor influencia sobre la variable respuesta.

9. CONCLUSIONES

Se logró optimizar la producción de la proteína total y recombinante en *Schizochytrium* sp. durante la transformación transitoria con el Sistema Algevir al modificar la fuente de carbono y generar el direccionamiento de las rutas metabólicas, evitando la sobreproducción de lípidos durante hasta 60 h posteriores a la inducción con etanol absoluto, lo que permitió incrementar la cantidad de proteína total en los extractos proteicos de la microalga y detectar, en mayor proporción que al utilizar el medio comercial, al antígeno ToxA recombinante. Esto demuestra que es posible utilizar una estrategia combinada de ingeniería genética y metabólica para incrementar los niveles de expresión de una proteína heteróloga.

En este trabajo se ha determinado que el glutamato de sodio es capaz de sobre compensar la presión negativa generada por el vector de expresión Algevir en el metabolismo de *Schizochytrium* sp. y permitir una producción sostenida de la proteína heteróloga.

El antígeno recombinante ToxA se recuperó de los cultivos transformados, con niveles de hasta 374 µg ToxA/g BS en 48 h post-inducción, lo que demuestra que el medio ASWm con GMS permite la transformación transitoria de *Schizochytrium* sp., además de una recuperación integra de las proteínas totales al disminuir la concentración de lípidos, generando extractos más limpios.

Como recomendaciones se tienen las siguientes:

Los cultivos por lotes alimentados permiten obtener una mayor cantidad del metabolito de interés. En trabajos recientes, han demostrado que alimentaciones intermitentes de amino nitrógeno tienen la capacidad de mantener un estado metabólico adecuado para la generación de un producto de interés. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de sistemas alimentados de biorreactores con fluidos con relaciones Glu:GMS:YE para una producción sostenida de la proteína heteróloga a gran escala se vuelve interesante. Es probable que al utilizar este sistema se pueda incrementar el tiempo en el que se produce la proteína recombinante, es decir, no el tiempo total de producción sino el periodo metabólico dedicado a la biosíntesis proteica, dado que al tener una concentración homogénea de los nutrientes se

esperaría una producción sostenida. Sin embargo, se tendrían que evaluar efectos propios del sistema como los tiempos de residencia, el efecto de lavado del producto y el recambio de los volúmenes de reacción. De tal manera, se podrían generar lotes de producción con una mayor cantidad del producto de interés. Por último, como el sistema Algevir ha demostrado en diversos trabajos generar una transformación transitoria eficiente, podría utilizarse para la expresión de enzimas endógenas de la microalga con el fin de direccionar el metabolismo de una manera más eficiente, aplicando una estrategia combinada de ingeniería genética y metabólica. Por ejemplo, haciendo uso de las herramientas de la ingeniería metabólica que, al combinarse con la expresión de antígenos recombinantes, podría volverse una alternativa para la transferencia tecnológica para la generación de vacunas complejas con biosíntesis autorregulada desde el mismo vector de expresión, en medios optimizados, con tiempos relativamente cortos de generación y producciones sostenidas.

10. LITERATURA CITADA

- Aasen, I.M., Ertesvåg, H., Heggeset, T.M.B., Liu, B., Brautaset, T., Vadstein, O. y Ellingsen, T.E. (2016). Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene, and carotenoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10): 4309-4321. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7498-4>
- APT, K.E., Lippmeier, C.J., Simpson, D., Wang, J., Wynn, J.P. y Zirkle, R. (2017). Protein production in microorganisms of the phylum *labyrinthulomycota* (EP2408795B1). European Patents Office. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/042731038/publication/EP2408795B1?q=EP2408795B1>.
- Arevalo-Villalobos, J.I., Govea-Alonso, D.O., Bañuelos-Hernández, B., González-Ortega, O., Zarazúa, S. y Rosales-Mendoza, S. (2020). Inducible expression of antigens in plants: a study focused on peptides related to multiple sclerosis immunotherapy. *Journal of Biotechnology*, 318: 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.013>
- Axelsson, M. y Gentili, F. (2014). A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS ONE*, 9(2): 17-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089643>
- Bäcklund, E., Ignatushchenko, M. & Larsson, G. (2011). Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10(35): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-35>
- Bajwa, K., Bishnoi, N.R., Kirrolia, A., Gupta, S. y Silambarasan, T. S. (2019). Response surface methodology as a statistical tool for optimization of physio-biochemical cellular components of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* for biodiesel production. *Applied Water Science*, 9(5). <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0969-x>.
- Bañuelos-Hernández, B., Monreal-Escalante, E., González-Ortega, O., Angulo, C. y Rosales-Mendoza, S. (2017). Algevir: An expression system for microalgae based on viral vectors. *Frontiers in Microbiology*, 8(1100): 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01100>.
- Bayne, A.C v., Boltz, D., Owen, C., Betz, Y., Maia, G., Azadi, P., Archer-Hartmann, S., Zirkle, R. y Lippmeier, J.C. (2013). Vaccination against influenza with recombinant hemagglutinin expressed by *Schizochytrium* sp. confers protective immunity. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061790>.
- Bayne, A.C. v., Lippmeier, C.J., APT, K.E., Guo, X. y Pritchard, J.A. (2011). Production of hemagglutinin-neuraminidase protein in microalgae (US9012197B2). U.S. Patent and Trademark Office. <https://patentcenter.uspto.gov/applications/12980320>.
- Bayne, A.C v., Lippmeier, C.J., APT, K.E. y Zirkle, R.E. (2019). Production of heterologous polypeptides in microalgae, microalgal extracellular bodies, compositions, and methods of making and uses thereof. <https://patentcenter.uspto.gov/applications/12980319>.
- Bonomo, J. y Gill, R.T. (2005). Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1): 116-126. <https://doi.org/10.1002/bit.20436>.
- Caiazza, N.C., Urano, J. y Boles, K. (2017). Production of Proteins in Labyrinthulomycetes. World Intellectual Property Organization. WO2017/161005. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2017161005>.

- Caiazza, N.C., Urano, J. y Kamborakis, S. (2019). Recombinant organisms and methods for producing glycomolecules with low sulfation. World Intellectual Property Organization. WO2019213069.
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019213069>
- Campa-Córdova, A.I., León-Gallo, A.F., Romero-Maldonado, A., Ibarra-Serrano, A.C., Rosales-Mendoza, S., Hirono, I. y Angulo, C. (2017). Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, 40(11): 1725-1729.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12625>.
- Cangelosi, G.A., Best, E.A., Martinetti, G. y Nester, E.W. (1991). Genetic analysis of agrobacterium. *Methods in Enzymology*, 204: 384-397. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04020-o](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04020-o).
- Chang, M., Zhang, T., Guo, X., Liu, Y., Liu, R., Jin, Q. y Wang, X. (2020). Optimization of cultivation conditions for efficient production of carotenoid-rich DHA oil by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochemistry*, 94: 190-197.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.007>.
- Chen, H., Zheng, Y., Zhan, J., He, C. y Wang, Q. (2017). Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1).
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0839-4>.
- Cheng, R., Ma, R., Li, K., Rong, H., Lin, X., Wang, Z., Yang, S. y Ma, Y. (2012). Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological Research*, 167(3): 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.003>
- Comini, S. y Pora, B. (2018). Biomass of the microalgae *Schizochytrium mangrovei* and method for preparing same (US 2018/0016605 A1). U.S. Patent and Trademark Office.
<https://patentcenter.uspto.gov/applications/14766141>.
- Du, F., Wang, Y.Z., Xu, Y.S., Shi, T.Q., Liu, W.Z., Sun, X.M. y Huang, H. (2021). Biotechnological production of lipid and terpenoid from thraustochytrids. *Biotechnology Advances*, 48(3): 107725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107725>.
- Du, H., Liao, X., Gao, Z., Li, Y., Lei, Y., Chen, W., Chen, L., Fan, X., Zhang, K., Chen, S., Ma, Y., Meng, C. y Li, D. (2019). Effects of methanol on carotenoids as well as biomass and fatty acid biosynthesis in *Schizochytrium limacinum* B4D1. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01243-19>.
- Fawzy, M.A. y Alharthi, S. (2021). Use of Response Surface Methodology in optimization of biomass, lipid productivity and fatty acid profiles of marine microalga *Dunaliella parva* for biodiesel production. *Environmental Technology and Innovation*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101485>.
- Fossier Marchan, L., Lee Chang, K.J., Nichols, P.D., Mitchell, W.J., Polglase, J.L. y Gutierrez, T. (2018). Taxonomy, ecology, and biotechnological applications of thraustochytrids: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1): 26-46.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.003>.
- Franklin, S., Ngo, B., Efuet, E. y Mayfield, S.P. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 30(6): 733-744.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01319.x>.

- Ganuza, E. y Izquierdo, M.S. (2007). Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5): 985-990. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1019-4>.
- Gao, B., Wang, F., Huang, L., Liu, H., Zhong, Y. y Zhang, C. (2021). Biomass, lipid accumulation kinetics, and the transcriptome of heterotrophic oleaginous microalga *Tetrademus bernardii* under different carbon and nitrogen sources. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01868-9>
- Geng, L., Chen, S., Sun, X., Hu, X., Ji, X., Huang, H. y Ren, L. (2019). Fermentation performance and metabolomic analysis of an engineered high-yield PUFA-producing strain of *Schizochytrium* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(1): 71-81. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2015-z>
- Gonalves, C., Rodriguez-Jasso, R.M., Gomes, N., Teixeira, J.A. y Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12): 2046-2048. <https://doi.org/10.1039/c0ay00525h>.
- Greene, E., Cazacu, D., Tamot, N., Castellano, S., Datar, A., Kronkaitis, A., Gebhard, D., Reed, J., Mawson, P., Florin, L., Rossi, N., Lauer, A., Juckem, L., Nixon, A., Wenger, T. y Sen, S. (2021). Optimization of a transient antibody expression platform towards high titer and efficiency. *Biotechnology Journal*, 16(4). <https://doi.org/10.1002/biot.202000251>.
- Guo, D.S., Tong, L.L., Ji, X.J., Ren, L.J. y Ding, Q.Q. (2020). Development of a strategy to improve the stability of culture environment for docosahexaenoic acid fermentation by *Schizochytrium* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(3): 881-894. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03298-7>.
- Gutiérrez, S. y Lauersen, K.J. (2021). Gene delivery technologies with applications in microalgal genetic engineering. *Biology*, 10(4):265. doi: 10.3390/biology10040265.
- Hernández-Ramírez, J., Wong-Arce, A., González-Ortega, O. y Rosales-Mendoza, S. (2020). Expression in algae of a chimeric protein carrying several epitopes from tumor associated antigens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147: 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.250>
- Heyland, J., Fu, J., Blank, L.M. y Schmid, A. (2011). Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8): 1942-1953. <https://doi.org/10.1002/bit.23114>
- Hu, X., Tang, X., Bi, Z., Zhao, Q. y Ren, L. (2021). Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium* sp. under high temperature for efficient production of docosahexaenoic acid. *Algal Research*, 54 (167): 102212. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102212>
- Huang, H., Tong, Q., Ren, L., Ji, X., Xiao, A., Wei, P., You, J., Qu, L., Gong, D. y Zhu, J. (2013). Methods for improving fermentation yield of polyunsaturated fatty acids (US 2013/0217085 A1). U.S. Patent and Trademark Office.
- Humhal, T., Kronusová, O., Kaštánek, P., Potočár, T., Kohoutková, J. y Brányik, T. (2019). Influence of nitrogen sources on growth of thraustochytrids in wastewater from the demineralization of cheese whey. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(5): 383-390. <https://doi.org/10.17221/172/2018-CJFS>
- Iwata, I. y Honda, D. (2018). Nutritional intake by ectoplasmic nets of *Schizochytrium aggregatum* (Labyrinthulomycetes, Stramenopiles). *Protist*, 169(5): 727-743. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.06.002>

- Jareonsin, S. y Pumas, C. (2021). Advantages of heterotrophic microalgae as a host for phytochemicals production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628597>
- Jiang, X., Zhang, J., Zhao, J., Gao, Z., Zhang, C. y Chen, M. (2017). Regulation of lipid accumulation in *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 in response to different nitrogen sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10): 1700025. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700025>.
- Jiang, Y., Fan, K.W., Wong, R.T.Y. y Chen, F. (2004). Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5): 1196-1200. <https://doi.org/10.1021/jf035004c>.
- Jinqing, C., Fangfang, C., Junhuang, C., Chao, L. y Meiqiong, W. (2018). Method for producing DHA through solid culture and liquid fermentation of *Schizochytrium* sp. (US 2015/0361461 A1). U.S. Patent and Trademark Office.
- Ju, J.H., Ko, D.J., Heo, S.Y., Lee, J.J., Kim, Y.M., Lee, B.S., Kim, M.S., Kim, C.H., Seo, J.W. y Oh, B.R. (2020). Regulation of lipid accumulation using nitrogen for microalgae lipid production in *Schizochytrium* sp. ABC101. *Renewable Energy*, 153: 580-587. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.047>.
- Kondo, H., Van, P.T. y Dang, L.T. (2015). Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announcements*, 3(5): 2014-2015. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00978-15>.
- Korneli, C., Bolten, C.J., Godard, T., Franco-Lara, E. y Wittmann, C. (2012). Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions-targeted precursor feeding designed from metabolomics. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6): 1538-1550. <https://doi.org/10.1002/bit.24434>.
- Kujawska, N., Talbierz, S., Dębowski, M., Kazimierowicz, J. y Zieliński, M. (2021). Optimizing docosahexaenoic acid (Dha) production by *Schizochytrium* sp. grown on waste glycerol. *Energies*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/en14061685>.
- Kumar, R., Ng, T.H. y Wang, H.C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12(3): 1867-1880. <https://doi.org/10.1111/raq.12414>.
- Kumar, V., Nguyen, D.V., Baruah, K. y Bossier, P. (2019). Probing the mechanism of VP AHPND extracellular proteins toxicity purified from *Vibrio parahaemolyticus* AHPND strain in germ-free *Artemia* test system. *Aquaculture*, 504(4):414-419. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.029>.
- Lai, H.C., Ng, T.H., Ando, M., Lee, C te., Chen, I.T., Chuang, J.C., Mavichak, R., Chang, S.H., Yeh, M de., Chiang, Y.A., Takeyama, H., Hamaguchi, H o., Lo, C.F., Aoki, T. y Wang, H.C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2): 1006-1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>.
- Lee, C te., Chen, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Lin, S.S., Lightner, D v., Wang, H.C., Wang, A.H.J., Wang, H.C., Hor, L.I. y Lo, C.F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>.

- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A. y Fernández, E. (2004). Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends in Biotechnology*, 22(1): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.11.003>.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y. y Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222: 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.003>.
- Li, L., Tang, X., Luo, Y., Hu, X. y Ren, L. (2022). Accumulation and conversion of β -carotene and astaxanthin induced by abiotic stresses in *Schizochytrium* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(5): 911-920. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02709-9>.
- Li, Z., Chen, X., Li, J., Meng, T., Wang, L., Chen, Z., Shi, Y., Ling, X., Luo, W., Liang, D., Lu, Y., Li, Q. y He, N. (2018). Functions of PKS genes in lipid synthesis of *Schizochytrium* sp. By gene disruption and metabolomics analysis. *Marine Biotechnology*, 20(6): 792-802. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9849-x>.
- Ling, X., Guo, J., Liu, X., Zhang, X., Wang, N., Lu, Y. y Ng, I.S. (2015). Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310. *Bioresource Technology*, 184: 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.130>.
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R.A., Cánovas Díaz, M. y de Diego Puente, T. (2019). Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1202-1>.
- Manikan, V., Sahaid Kalil, M., Mohd Isa, M.H. y Abdul Hamid, A. (2014). Improved prediction for medium optimization using factorial screening for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* SP. SW1. *American Journal of Applied Sciences*, 11(3): 462-474. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2014.462.474>.
- Márquez-Escobar, V.A., Bañuelos-Hernández, B. y Rosales-Mendoza, S. (2018). Expression of a Zika virus antigen in microalgae: Towards mucosal vaccine development. *Journal of Biotechnology*, 282(July): 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.025>.
- Monreal-Escalante, E., Rosales-Mendoza, S., Govea-Alonso, D.O., Campa-Córdova, Á.I. y Angulo, C. (2019). Genetically-engineered plants yield an orally immunogenic PirA-like toxin from *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137: 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.159>.
- Nazir, Y., Shuib, S., Kalil, MS., Song, Y. y Hamid, A.A. (2018). Optimization of culture conditions for enhanced growth, lipid and docosahexaenoic acid (DHA) production of *Aurantiochytrium* SW1 by response surface methodology. *Scientific Reports*, 8(1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27309-0>.
- Negrulescu, A., Patrulea, V., Mincea, M.M., Ionascu, C., Vlad-Oros, B.A. y Ostafe, V. (2012). Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12): 2176-2182. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>.
- Ortega-Berlanga, B., Bañuelos-Hernández, B. y Rosales-Mendoza, S. (2018). Efficient expression of an alzheimer's disease vaccine candidate in the microalga *Schizochytrium* sp. using the Algevir System. *Molecular Biotechnology*, 60(5): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0077-4>.

- Panchal, B.M., Padul, M v. y Kachole, M.S. (2016). Optimization of biodiesel from dried biomass of *Schizochytrium limacinum* using methanesulfonic acid-DMC. *Renewable Energy*, 86: 1069-1074. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.027>.
- Pereira, L.M.S., Milan, T.M. y Tapia-Blácido, D.R. (2021). Using response surface methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biomass Bioenergy*, 151(08):106166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106166>.
- Pratheesh, P.T., Vineetha, M. y Kurup, G.M. (2014). An efficient protocol for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*, 56(6): 507-515. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9720-2>.
- Qu, L., Ren, L.J., Sun, G.N., Ji, X.J., Nie, Z.K. y Huang, H. (2013). Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. For producing docosahexaenoic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(12): 1905-1912. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0966-7>.
- Ramírez, D.M. y Bentley, W.E. (1993). Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(5): 557-565. <https://doi.org/10.1002/bit.260410508>.
- Ramos-Vega, A., Rosales-Mendoza, S., Bañuelos-Hernández, B. y Angulo, C. (2018). Prospects on the use of *Schizochytrium* sp. to develop oral vaccines. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02506>.
- Reihani, S.F.S. y Khosravi-Darani, K. (2019). Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 37:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.11.005>.
- Ren, L., Ji, X.J., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q.Q. y Ouyang, P.K. (2010a). Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5): 1649-1656. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2639-7>.
- Ren, L., Sun, X., Zhang, L., Huang, H. y Zhao, Q. (2020). Exergy analysis for docosahexaenoic acid production by fermentation and strain improvement by adaptive laboratory evolution for *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122562>.
- Ren, L.J., Huang, H., Xiao, A.H., Lian, M., Jin, L.J. y Ji, X.J. (2009). Enhanced docosahexaenoic acid production by reinforcing acetyl-CoA and NADPH supply in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6): 837-843. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0310-4>.
- Ren, L.J., Ji, X.J., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q.Q. y Ouyang, P.K. (2010b). Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5): 1649-1656. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2639-7>.
- Ren, L.J., Sun, G nan., Ji, X.J., Hu, X chao. y Huang, H. (2014a). Compositional shift in lipid fractions during lipid accumulation and turnover in *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*, 157: 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.078>.
- Ren, L.J., Sun, L.N., Zhuang, X.Y., Qu, L., Ji, X.J. y Huang, H. (2014b). Regulation of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.: Effect of nitrogen addition.

- Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(5): 865-872. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1057-5>.
- Reyes-Becerril, M., Guluarte, C., Ceballos-Francisco, D., Angulo, C. y Esteban, M.Á. (2017). Enhancing gilthead seabream immune status and protection against bacterial challenge by means of antigens derived from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 60: 205-218. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.053>.
- Reyes-Becerril, M., Maldonado-García, M., Guluarte, C., León-Gallo, A., Rosales-Mendoza, S., Ascencio, F., Hirono, I. y Angulo, C. (2016). Evaluation of ToxA and *Vibrio parahaemolyticus* lysate on humoral immune response and immune-related genes in Pacific red snapper. *Fish and Shellfish Immunology*, 56: 310-321. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.014>.
- Ríos-Huerta, R., Monreal-Escalante, E., Govea-Alonso, D.O., Angulo, C. y Rosales-Mendoza, S. (2017). Expression of an immunogenic LTB-based chimeric protein targeting *Zaire ebolavirus* epitopes from GP1 in plant cells. *Plant Cell Reports*, 36(2): 355-365. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2088-6>.
- Romari, K., le Monnier, A., Rols, C., Merlet, C., Pagliardini, J., Celleja, P. y Gudin, C. (2015). Production of astaxanthin and docosahexanoic acid in mixotrophic mode using *Schizochytrium*. US 2015/0037838 A1. U.S. Patent and Trademark Office.
- Rosales-Mendoza, S., García-Silva, I., González-Ortega, O., Sandoval-Vargas, J.M., Malla, A. y Vimolmangkang, S. (2020a). The potential of algal biotechnology to produce antiviral compounds and biopharmaceuticals. *Molecules*, 25(18): 1-25. <https://doi.org/10.3390/molecules25184049>.
- Rosales-Mendoza, S., Solís-Andrade, K.I., Márquez-Escobar, V.A., González-Ortega, O. y Bañuelos-Hernandez, B. (2020b). Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(7): 751-766. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643>.
- Ruiz-Masó, J.A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M. y del Solar, G. (2015). Plasmid rolling-circle replication. *Microbiology Spectrum*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0035-2014>.
- Sekiguchi, T., Okita, Y. y Nishizawa, Y. (2021). Docosahexanoic acid-containing oil and method for producing same. US 2021/0071101 A1. U.S. Patent and Trademark Office.
- Shahrezaei, V. y Marguerat, S. (2015). Connecting growth with gene expression: of noise and numbers. *Current Opinion in Microbiology*. 25(6):127-135. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.012>.
- Shusong, W., Jiatai, G., Zhihui, L., Baizhen, L. y Yixuan, J. (2022). Fermentation process for culturing *Schizochytrium limacinum* with high protein content (CN114214212A). European Patent Office. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/080706535/publication/CN114214212A?q=pn%3DCN114214212A>.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M. y Tripathi, C.K.M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*. 7(1):2087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>.
- Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L. y Guo, N. (2007). Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88

- using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 42(10): 1391-1397. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.014>.
- Specht, E.A., Karunanithi, P.S., Gimpel, J.A., Ansari, W.S. y Mayfield, S.P. (2017). Host organisms: algae. En: Whittmann C, Liao, J.C. (eds.) *Industrial Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 605-641.
- Spedding, G., (2013) the world's most popular assay? A review of the ninhydrin-based free amino nitrogen reaction (fan assay) emphasizing the development of newer methods and conditions for testing alcoholic beverages, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71:2, 83-89, <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2013-0411-01>.
- Sreenikethanam, A., Raj, S., J, RB., Gugulothu, P. y Bajhaiya, A.K. (2022). Genetic engineering of microalgae for secondary metabolite production: recent developments, challenges, and future prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10(3):836056. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.836056>.
- Sun, L., Ren, L., Zhuang, X., Ji, X., Yan, J. y Huang, H. (2014). Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*, 159: 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.106>.
- Sun, X.M., Ren, L.J., Ji, X.J. y Huang, H. (2018a). Enhancing biomass and lipid accumulation in the microalgae *Schizochytrium* sp. by addition of fulvic acid and EDTA. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0681-5>.
- Sun, X.M., Ren, L.J., Ji, X.J. y Huang, H. (2018b). Enhancing biomass and lipid accumulation in the microalgae *Schizochytrium* sp. by addition of fulvic acid and EDTA. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0681-5>.
- Tang, X., Man, Y., Hu, X., Xu, X. y Ren, L. (2022). Identification of carotenoids biosynthesis pathway in *Schizochytrium* sp. and utilization in astaxanthin biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 156: 110018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110018>.
- Tran, P.T.N., Kumar, V. y Bossier, P. (2020). Do acute hepatopancreatic necrosis disease-causing PirABVP toxins aggravate vibriosis? *Emerging Microbes and Infections*, 9(1): 1919-1932. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1811778>.
- Trovão, M., Pereira, H., Costa, M., Machado, A., Barros, A., Soares, M., Carvalho, B., Silva, J.T., Varela, J. y Silva, J. (2020). Lab-scale optimization of *Aurantiochytrium* sp. culture medium for improved growth and DHA production. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/app10072500>.
- Verma, R., Kumari, KVLK., Srivastava, A. y Kumar, A. (2020). Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5): 104149. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104149>.
- Walker, M.C. y van der Donk, W.A. (2016). The many roles of glutamate in metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 43:419-430. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1665-y>.
- Walsh, G. y Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, 24(10): 1241-1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>.
- Wang, K., Sun, T., Cui, J., Liu, L., Bi, Y., Pei, G., Chen, L. y Zhang, W. (2018). Screening of chemical modulators for lipid accumulation in *Schizochytrium* sp. S31. *Bioresource Technology*, 260: 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.104>.

- Wang, Q., Han, W., Jin, W., Gao, S. y Zhou, X. (2021). Docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.: review and prospect. *Food Biotechnology*, 35:111-135. <https://doi.org/10.1080/08905436.2021.1908900>.
- Waterborg, J.H. y Matthews, H.R. (1994). The Lowry method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 32: 1-4. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:1>.
- Xu, Q., Hou, G., Chen, J., Wang, H., Yuan, L., Han, D., Hu, Q. y Jin, H. (2021). Heterotrophically ultrahigh-cell-density cultivation of a high protein-yielding unicellular alga chlorella with a novel nitrogen-supply strategy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.774854>.
- Yang, S., Wang, W., Wei, H., van Wychen, S., Pienkos, P.T., Zhang, M. y Himmel, M.E. (2016). Comparison of nitrogen depletion and repletion on lipid production in yeast and fungal species. *Energies*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/en9090685>.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. y Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(1): 72-76. <https://doi.org/10.1007/s002530051139>.
- Yokoyama, R. y Honda, D. (2007). Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium sensu lato* based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. *Mycoscience*. 48(4): 199-211. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0362-0>.
- Zehua, C., Yong, Z., Jian, T., Yonghua, W., Zheng, X., Chenfeng, J. y Dong, L. (2020). Method of Producing Oil Containing Polyunsaturated Fatty Acids by Using *Schizochytrium* sp. US 2020/0370078 A1. U.S. Patent and Trademark Office.
- Zhang, T., Lou, F., Tao, G., Liu, R., Chang, M., Jin, Q. y Wang, X. (2016). Composition and structure of single cell oil produced by *Schizochytrium limacinum* SR31. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(10): 1337-1346. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2881-y>

11. ANEXOS

Anexo A: Script RStudio para BB-RSM

```

pacman::p_load(dplyr, rsm)

#modelo de Box-Behnken, tres factores, tres factores por nivel
#y seis puntos centrales
bbd_sch <- bbd(3, n0 = 6, block = FALSE, randomize = FALSE,
  coding = list(
    x1 ~ (GMS - 15)/5,
    x2 ~ (YE - 1)/0.5,
    x3 ~ (time - 48)/12
  ))
bbd_sch$GMS <- 5+bbd_sch$x1 + 15
bbd_sch$YE <- 0.5+bbd_sch$x2 + 1
bbd_sch$time <- 12+bbd_sch$x3 + 48

write_csv(bbd_sch, "bbd_sch.csv")

#recuperación de datos experimentales
opt_data <- read_csv("bbd_sch.csv")

#codificación de datos experimentales
opt_data <- coded_data(
  opt_data,
  formulas = list(
    x1 ~ (GMS - 15)/5,
    x2 ~ (YE - 1)/0.5,
    x3 ~ (time - 48)/12
  )
)
head(opt_data)
opt_data <- opt_data%>%
  rename(proteina = proteina_mggBS)%>%
  rename(toxa = ToxA_uggBS)

#generación de las ecuaciones para la respuesta Y, considerando
#un modelo de segundo orden [50]
opt_model1 <- rsm(biomasa ~ 50(x1, x2, x3), data = opt_data)
summary(opt_model1)

opt_model2 <- rsm(proteina ~ 50(x1, x2, x3), data = opt_data)
summary(opt_model2)

opt_model3 <- rsm(toxa ~ 50(x1, x2, x3), data = opt_data)
summary(opt_model3)

#Generación de gráficos de contorno y superficie
par(mfrow = c(2,2))
contour(
  opt_modelN,
  ~ x1 + x2 + x3,
  image = TRUE)

par(mfrow = c(2,2))
persp(
  opt_modelN,
  ~x1 + x2 + x3,
  col = topo.colors(100),
  contours = "colors")

#determinación del punto optimo
opt_point <- summary(opt_modelN)$canonical$x
opt_point

#determinación del punto optimo en unidades reales
opt_point_ru <- code2val(
  opt_point,
  codings = codings(opt_data)
)
opt_point_ru

#predicción para la mejor respuesta predicha por el modelo de rsm
opt_point_df <- data.frame(
  x1 = opt_point[1],
  x2 = opt_point[2],
  x3 = opt_point[3]
)

best_response <- predict(
  opt_modelN,
  opt_point_df)

names(best_response) <- "Best Yield"
best_response

#predicción para la mejor respuesta para cada punto de la matriz BB
best_rs <- predict(opt_model1, opt_data, interval = "confidence")

rs_predic <- data.frame(cbind(y1=opt_data$biomasa, best_rs))
rs_predic <- mutate(rs_predic, res=y1-fit)
rs_predic <- rs_predic[, c(1, 2, 3, 4)]
rs_predic

```