

Factores importantes para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*: una revisión

Important factors involved in the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a review

Diana Lizzet Murrieta-León^{1,2}, Angel Ramos-Ligonio², y Aracely López-Monteon^{2*}

¹ Doctorado en Ciencias Biomédicas, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

² LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México

*Correspondencia: Correo electrónico: aralopez@uv.mx (Aracely López-Monteon)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v20i1.2160>

Recibido: 23 de noviembre de 2025; Aceptado: 18 de mayo de 2026

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado.

Editora de Sección: Dra. Susana Aideé González-Chávez

Resumen

El sistema de expresión en *Escherichia coli* se mantiene como el más utilizado para la producción de proteínas recombinantes debido a su bajo costo, su rápido crecimiento a alta densidad celular, su genética ampliamente caracterizada y la disponibilidad de múltiples herramientas que permiten alcanzar altos niveles de expresión heteróloga. No obstante, este sistema presenta limitaciones importantes, como la formación de cuerpos de inclusión, la ausencia de modificaciones postraduccionales, las dificultades en la correcta formación de enlaces disulfuro y los bajos rendimientos en la expresión de proteínas tóxicas o de membrana. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado estrategias que incluyen el uso de cepas y vectores modificados genéticamente. En este contexto, se realizó una revisión bibliográfica orientada por la siguiente pregunta: ¿qué factores influyen en la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*? La búsqueda se realizó en PubMed, Scopus, Web of Science y Google Scholar. Se incluyeron artículos en inglés y español publicados entre 2015 y 2026, correspondientes a estudios originales y revisiones; se excluyeron publicaciones fuera de este periodo, en otros idiomas o sin acceso a texto completo. En conjunto, esta revisión aborda los principales factores y estrategias para optimizar la expresión de proteínas heterólogas en sistemas procariotas.

Palabras clave: *E. coli*, proteínas recombinantes, plásmido, ADN

Abstract

The *Escherichia coli* expression system remains the most widely used for recombinant protein production due to its low cost, rapid growth at high cell density, extensive genetic characterization, and the availability of multiple tools that enable high levels of heterologous expression. However, this system has significant limitations, including the formation of inclusion bodies, the absence of post-translational modifications, difficulties in forming disulfide bonds correctly, and low yields in the expression of toxic or membrane proteins. To overcome these limitations, strategies have been developed that include the use of genetically modified strains and vectors. In this context, a literature review was conducted guided by the question: what factors influence the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*? The search was carried out in PubMed, Scopus, Web of Science and Google Scholar. Articles in English and Spanish published between 2015 and 2026 were included, corresponding to original studies and reviews; publications outside this period, in other languages or without access to full text, were excluded. Therefore, this review addresses the main factors and strategies for optimizing the expression of heterologous proteins in prokaryotic systems.

Keywords: *E. coli*, recombinant proteins, plasmid, DNA

1. Introducción

Las proteínas son biomoléculas importantes que desempeñan diversas funciones en los sistemas biológicos, desde las enzimáticas hasta las de transporte, homeostáticas y estructurales. El estudio de estas y sus diferentes aplicaciones biotecnológicas solía ser una actividad complicada, ya que, para su obtención, se utilizaban fuentes naturales que dificultaban los procesos de extracción y purificación, lo que daba lugar a bajos rendimientos (Ojima-Kato, 2025). Sin embargo, a principios de la década de 1970, Herbert Boyer y Stanley Cohen desarrollaron la tecnología del ADN recombinante, que revolucionó los procesos de clonación y expresión génica, permitiendo la obtención de proteínas recombinantes (PR) de interés biológico en cantidades suficientes para su estudio y aplicación en diversos sectores, como la biomedicina, la industria farmacéutica y la química. La insulina fue el primer producto terapéutico obtenido mediante la tecnología de ADN recombinante para tratar la diabetes (Home, 2021; Yang et al., 2025). En 1980, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el uso clínico de la insulina recombinante para el tratamiento de la diabetes, lo que abrió nuevas oportunidades para el desarrollo de PR con fines terapéuticos (Íncir y Kaplan, 2025). Desde entonces, se han desarrollado diferentes productos biotecnológicos con fines terapéuticos como la hormona del crecimiento humana, el interferón humano y el factor VIII antihemofílico, utilizando como células huésped tanto eucariotas como procariotas (Ouyang et al., 2025; Yang et al., 2025).

Actualmente, los sistemas de expresión más utilizados para la producción de PR incluyen huéspedes procariotas, como las bacterias *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) y *Escherichia coli* (*E. coli*), así como sistemas eucariotas, como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y *Komagataella phaffii* (antes *Pichia pastoris*). A pesar de esta diversidad, *E. coli* continúa siendo la célula huésped más empleada debido a sus múltiples ventajas, entre las que destacan su rápido crecimiento en fuentes de carbono de bajo costo, su facilidad de manipulación genética y el amplio conocimiento de su biología molecular y bioquímica. Además, se dispone de una amplia variedad de promotores, vectores y cepas bacterianas genéticamente modificadas que favorecen la producción de PR solubles y

biológicamente activas (Herynek et al., 2025). Sin embargo, la principal limitación de este sistema es la ausencia de modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, lo que puede dar lugar a proteínas mal plegadas (Chen et al., 2025). Ahora bien, uno de los principales desafíos asociados al uso de sistemas procariotas basados en *E. coli* es la sobreexpresión de proteínas heterólogas, que con frecuencia conduce a la formación de cuerpos de inclusión (*inclusion bodies*, IB). Estas estructuras corresponden a agregados proteicos densos e insolubles que se acumulan en el citoplasma bacteriano como consecuencia de un plegamiento inadecuado (Kimura et al., 2025). La presencia de IB complica significativamente los procesos de recuperación y purificación de la proteína de interés, ya que requiere etapas adicionales de solubilización, desnaturalización y replegamiento *in vitro*. Sin embargo, estos procesos suelen ser ineficientes y, en muchos casos, se traducen en una pérdida parcial o total de la actividad biológica de la PR (de Marco, 2025). No obstante, estas limitaciones pueden mitigarse mediante la optimización de diversos parámetros que abarcan desde la selección de la célula huésped hasta el ajuste de las condiciones de crecimiento y expresión. En este sentido, resulta fundamental considerar factores como la composición del medio de cultivo, el tipo y la concentración del agente inductor, el tiempo de inducción y la temperatura de expresión. Asimismo, en el diseño de la construcción génica, es importante seleccionar adecuadamente el vector de expresión y evaluar el uso de proteínas de fusión que faciliten tanto la expresión como la purificación de la PR. Por lo tanto, en la presente revisión se describen las características de *E. coli* como célula huésped, así como el impacto de los distintos parámetros involucrados en la expresión heteróloga de las PR en este sistema procariota, además de las estrategias desarrolladas para optimizar su producción (Ojima-Kato, 2025).

A pesar de su uso extendido como plataforma de expresión, *E. coli* continúa enfrentando limitaciones significativas en el plegamiento proteico, la ausencia de modificaciones postraduccionales y la baja capacidad predictiva para la expresión heteróloga. Asimismo, la creciente complejidad de las PR de interés biomédico ha puesto de manifiesto la necesidad de transitar de enfoques empíricos a estrategias más racionales e integrativas, que incorporen herramientas de biología sintética e inteligencia artificial (Yang et al., 2025). En este contexto, resulta necesaria una revisión crítica que analice tanto las limitaciones persistentes como las nuevas aproximaciones orientadas a optimizar este sistema de expresión.

En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de tipo narrativo, con un enfoque sistemático, con el objetivo de identificar y analizar los principales factores que influyen en la expresión de PR en *E. coli*. La revisión se estructuró en torno a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los principales factores que afectan la eficiencia de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* y cómo inciden en la solubilidad y el rendimiento proteico?

La búsqueda bibliográfica se realizó en las bases de datos PubMed, Scopus, Web of Science y Google Scholar. Se emplearon palabras clave en inglés, incluyendo: "recombinant protein expression", "*Escherichia coli*", "protein solubility", "codon usage", "expression systems", "protein folding" e "inclusion bodies". La estrategia de búsqueda general se construyó mediante operadores booleanos como AND/OR ("recombinant protein expression" AND "*Escherichia coli*") AND ("protein solubility" OR "inclusion bodies" OR "protein folding") AND ("codon usage" OR "expression optimization" OR "expression systems"), con ajustes específicos según la sintaxis de cada base de datos.

Se incluyeron artículos publicados en los últimos diez años (2015–2026), en inglés o español, excepto los artículos seminales necesarios para contextualizar, correspondientes a artículos originales y revisiones científicas enfocados en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Se excluyeron

estudios fuera de este periodo, en otros idiomas, resúmenes sin acceso a texto completo y aquellos centrados exclusivamente en otros sistemas de expresión sin análisis comparativo.

2. Proteínas recombinantes: componentes principales y aplicaciones biotecnológicas

Se denominan proteínas recombinantes (PR) a las proteínas expresadas en sistemas heterólogos, es decir, en organismos distintos del de su origen. La selección de la célula huésped depende de la complejidad y de las características de la proteína en cuestión (Schütz et al., 2023).

La expresión de proteínas en sistemas heterólogos tiene como objetivo producir a gran escala proteínas correctamente plegadas, solubles y con actividad biológica. Las PR se utilizan como base para la obtención de productos biofarmacéuticos, tales como anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, hormonas, vacunas, factores de coagulación, enzimas y péptidos, entre otros, por lo que se consideran fundamentales en el tratamiento de enfermedades importantes (Luo et al., 2025). Según reportes de mercado, el sector de las PR ha mostrado un crecimiento sostenido impulsado por su amplia aplicación en la industria biofarmacéutica, el desarrollo de biológicos y la investigación biomédica (Ojima-Kato, 2025).

La producción de PR depende fundamentalmente de la interacción entre dos componentes clave: la célula huésped y el vector de expresión. La compatibilidad entre ambos es esencial para garantizar el adecuado reconocimiento de los elementos regulatorios del vector por parte de la maquinaria celular de la célula huésped, lo que permite la correcta replicación del material genético, así como la eficiente transcripción y traducción del gen de interés. En este contexto, factores como el origen de replicación, los promotores, los sitios de unión al ribosoma y las señales de terminación deben optimizarse y adaptarse al sistema huésped para maximizar la eficiencia de expresión y la producción de la proteína recombinante (Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023).

2.1 Célula huésped

La selección de la célula huésped representa un paso crítico en la expresión de PR, ya que determina en gran medida la eficiencia y la calidad de la proteína final. Esta elección depende de múltiples factores, entre ellos el costo de producción, la fuente del gen heterólogo, la aplicación biotecnológica de la proteína, las características de la célula huésped y, principalmente, la complejidad estructural de la proteína recombinante objetivo (Eastwood et al., 2023). Durante muchos años se han utilizado células eucariotas y procariotas como sistemas de expresión de PR. Los sistemas eucariotas se utilizan principalmente para proteínas de mayor tamaño y complejidad estructural (>50 kDa). Estos sistemas comprenden microorganismos como los hongos filamentosos, levaduras, células de insecto, células de mamíferos y células vegetales. Entre ellos, las levaduras *S. cerevisiae* y *K. phaffii* representan alternativas debido a su bajo costo de producción, a su alta tasa de crecimiento y a la ausencia de endotoxinas, además de su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales importantes en la producción de PR con fines biotecnológicos (Barone et al., 2023; Yang et al., 2024; Under y Dagci, 2024).

Por otro lado, las células de mamífero como CHO y HEK293 son consideradas como el estándar para la producción de proteínas terapéuticas, ya que permiten una glicosilación similar a la humana. Sin embargo, presentan limitaciones asociadas a su lento crecimiento, elevado costo y variabilidad en la calidad del producto final (Hu et al., 2018; Tihanyi y Nyitray, 2020; Fu et al., 2024), estas limitaciones se pueden superar utilizando cepas de *K. phaffii* como SuperMan5 debido a diversas ventajas en términos de eficiencia, costo y escalabilidad. En primer lugar, *K. phaffii* presenta un crecimiento rápido y puede alcanzar densidades celulares altas en medios de cultivo relativamente simples y de bajo costo, lo que reduce significativamente los costos de producción en comparación con los sistemas basados en células CHO, que requieren medios de cultivo complejos y condiciones de cultivo más estrictas. Además, este sistema permite alcanzar altos niveles de expresión de PR y una secreción eficiente hacia el medio extracelular, lo que facilita su recuperación y purificación. A diferencia de las bacterias, *K. phaffii* es un organismo eucariota capaz de realizar ciertas modificaciones postraduccionales, como la formación de enlaces disulfuro y la glicosilación, lo cual resulta esencial para la producción de proteínas funcionales (Vijayakumar y Venkataraman, 2024).

Para la producción de proteínas de menor tamaño (<30 kDa), los sistemas procariotas, como las bacterias *E. coli* y *B. subtilis*, han sido ampliamente utilizados. No obstante, presentan diversas limitaciones, entre las que destacan la ausencia de modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, la dificultad para expresar proteínas tóxicas y la formación de cuerpos de inclusión derivados de un plegamiento proteico inadecuado (Rosano et al., 2019; Beygmoradi et al., 2023; Jiang et al., 2024). El sistema de *B. subtilis* ofrece ventajas como la ausencia de membrana externa y lipopolisacáridos (LPS), también llamados endotoxinas, lo que facilita el proceso de secreción de PR; además, *B. subtilis* es considerada segura por la FDA de acuerdo con el estatus de Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) (Cai et al., 2019; Neef et al., 2021; Nguyen y Phan, 2022; Gan et al., 2025).

La selección inadecuada de la célula huésped puede comprometer tanto el rendimiento como la calidad del producto final. Entre las principales consecuencias se incluyen el plegamiento incorrecto de la proteína, la formación de agregados insolubles, la ausencia o la alteración de modificaciones postraduccionales y, en consecuencia, la pérdida de actividad biológica. Asimismo, ciertos sistemas pueden resultar ineficientes para la expresión de proteínas complejas, de membrana o potencialmente tóxicas, lo que limita su aplicabilidad biotecnológica.

En sistemas procariotas como *E. coli*, uno de los principales desafíos asociados a la sobreexpresión de proteínas heterólogas es la formación de IB, que corresponden a agregados proteicos densos e insolubles derivados de un plegamiento inadecuado. Si bien estos agregados pueden proteger a la proteína de la degradación proteolítica, su presencia dificulta la obtención de una proteína funcional.

Para abordar estas limitaciones, se han desarrollado diversas estrategias orientadas tanto a prevenir la formación de IB como a recuperar proteínas funcionales a partir de ellos. Entre las estrategias preventivas destacan la optimización de las condiciones de expresión (temperatura, concentración del inductor y velocidad de síntesis proteica), el uso de cepas modificadas, la expresión de chaperonas y el uso de proteínas de fusión que favorecen la solubilidad. Por otro lado, las estrategias de recuperación incluyen el uso de agentes desnaturizantes (como urea o guanidina), seguidas de protocolos de replegamiento controlado que buscan restaurar la conformación nativa de la proteína.

A pesar de estas limitaciones, *E. coli* continúa siendo una de las plataformas más utilizadas por su versatilidad y capacidad para expresar proteínas que, en otros sistemas, pueden resultar difíciles de

producir. Su rápida tasa de crecimiento, facilidad de manipulación genética y alto rendimiento de expresión la convierten en una herramienta fundamental, particularmente en etapas iniciales de producción y en aplicaciones en las que no se requieren modificaciones postraduccionales complejas. En contraste, sistemas eucariotas como levaduras o células de mamíferos ofrecen ventajas en términos de procesamiento postraduccional, pero implican mayores costos y complejidad operativa, lo que resalta la importancia de una selección racional del sistema de expresión en función de las características específicas de la proteína de interés.

2.2 Vector plasmídico

Se denomina vector plasmídico a una molécula circular de ADN diseñada para integrar en su secuencia un gen que codifica una proteína de interés. Los vectores plasmídicos son diseñados con la finalidad de que el gen sea traducido en una proteína y que tengan la capacidad de replicarse de manera independiente dentro de la célula huésped (Cantoia et al., 2021; Eskandari et al., 2024).

En los últimos años, *E. coli* se ha consolidado como uno de los sistemas más utilizados para la producción de PR. En este contexto, los vectores de expresión desempeñan un papel central en la eficiencia del proceso, en particular mediante la selección del promotor, el origen de replicación y la arquitectura del constructo. Los sistemas basados en el promotor T7, como la familia pET, continúan siendo el estándar de referencia por su capacidad para alcanzar niveles muy altos de expresión; sin embargo, esta sobreexpresión a menudo se asocia con la formación de IB y con problemas de plegamiento proteico (Herynek et al., 2025; de Marco, 2025). En contraste, sistemas como pBAD permiten un control más fino y gradual de la expresión mediante la inducción con arabinosa, lo cual resulta particularmente útil para proteínas potencialmente tóxicas o difíciles de expresar, aunque a expensas de un menor rendimiento global (Íncir y Kaplan, 2024). Asimismo, los vectores basados en promotores híbridos, como tac o trc, ofrecen un equilibrio intermedio entre nivel de expresión y control, aunque presentan niveles basales de transcripción que pueden afectar la estabilidad celular (Jayakrishnan et al., 2024).

Por otro lado, el uso de etiquetas de fusión, como GST, MBP o His-tag, ha demostrado ser una estrategia efectiva para mejorar la solubilidad y facilitar la purificación de PR, mitigando parcialmente los problemas asociados a la agregación (Chen et al., 2025). Adicionalmente, la estabilidad plasmídica y el número de copias, determinados por el origen de replicación, influyen directamente en la carga metabólica de la célula huésped y, en consecuencia, en el rendimiento del sistema, por lo que los vectores de bajo número de copias son una alternativa relevante para la expresión de proteínas tóxicas (Zainuddin et al., 2026). En conjunto, la evidencia reciente sugiere que no existe un sistema universalmente óptimo, sino que la selección del vector debe ajustarse de manera específica a las características de la proteína de interés, considerando un equilibrio entre el nivel de expresión, la solubilidad, la estabilidad y la viabilidad celular (de Marco, 2025; Ocorbin et al., 2025). En la tabla 1 se describen los principales vectores plasmídicos utilizados para la expresión de PR en *E. coli*.

En la Fig. 1 se muestra la estructura común de un vector de expresión, constituido por un promotor, un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), una secuencia que codifica para etiquetas de afinidad o fusión, un gen marcador de selección (resistencia a un antibiótico), una secuencia terminadora y una secuencia para la eliminación de la etiqueta de fusión (Chen et al., 2024; Eskandari et al., 2024).

Tabla 1. Características comparativas de los vectores de expresión utilizados para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Table 1. Comparative features of expression vectors used for recombinant protein production in *E. coli*

Plásmido	Promotor	Capacidad de inserto	No. de copias	Nivel de expresión	Ventajas	Limitaciones
Estabilidad moderada						
pET	T7	≈5-10 kb	Alto	Muy alto	Expresión masiva, control inducible (IPTG), compatible con etiquetas	Cuerpos de inclusión, toxicidad
Vectores His-tag (derivados de pET)	T7	≈5-10 kb	Alto	Alto-Muy alto	Purificación sencilla (Ni-NTA), ampliamente utilizados	Posible agregación
Estabilidad alta						
pBAD	araBAD	≈5-10 kb	Medio-Alto	Medio	Regulación fina, baja expresión basal, útil para proteínas tóxicas	Menor rendimiento
pGEX	tac	≈5-10 kb	Alto	Medio	Fusión GST, facilita purificación y solubilidad	Necesidad de remover etiqueta
pMAL	tac	≈5-10 kb	Alto	Medio	Mejora solubilidad (MBP), útil para proteínas insolubles	Puede interferir con función
pTrc/pKK223	trc/tac	≈5-10 kb	Alto	Medio	Sistema simple, expresión controlada con IPTG	Expresión basal
pACYC184	Variable	≈5-10 kb	Bajo	Bajo	Menor carga celular, útil para proteínas tóxicas	Bajo rendimiento

Referencia: Tomada y modificada de Ojima-Kato et al., 2025; Chen et al., 2025; de Marco, 2025; Herynek et al., 2025; Kimura et al., 2025; Yang et al., 2025.

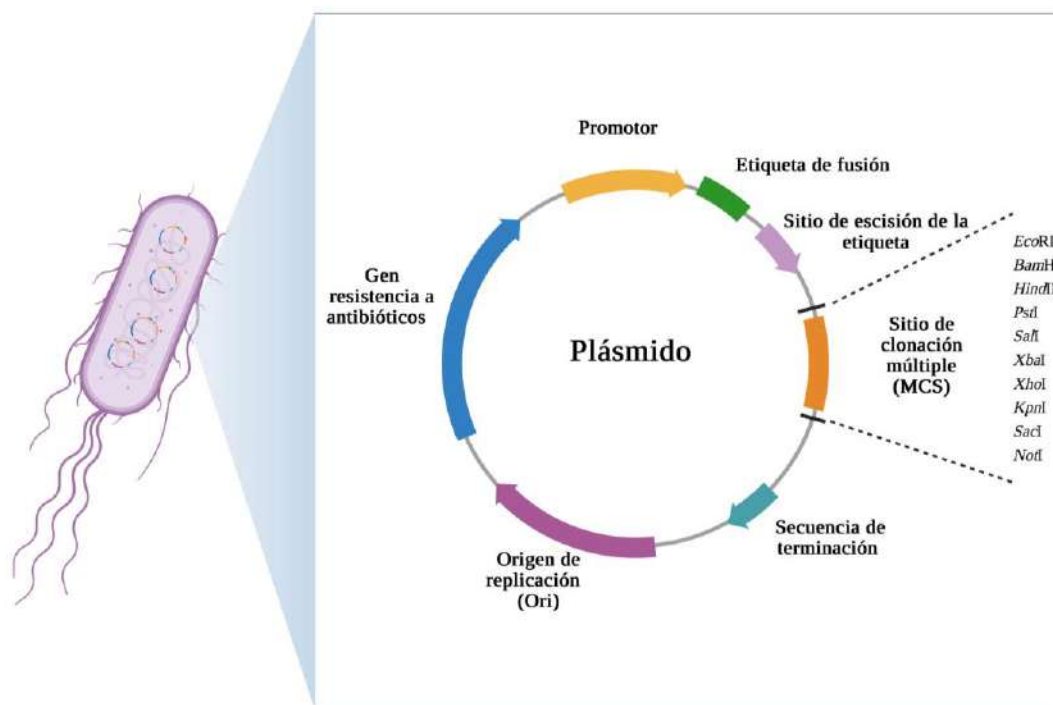


Figura 1. Componentes principales de un vector de expresión de *E. coli*. Creada en BioRender.
<https://BioRender.com/8efxv2p>

Figure 1. Main components of an *E. coli* expression vector. Created with BioRender.
<https://BioRender.com/8efxv2p>

Cada uno de los componentes que constituyen el vector de expresión modulan la eficiencia de la expresión de PR en sistemas procariotas como el de *E. coli*. Por ello, resulta importante comprender a detalle la función de cada componente del vector; en la Tabla 2 se describen brevemente las características de estos componentes (Lozano Terol et al., 2021).

Aunque los vectores de expresión han demostrado ser herramientas esenciales para la producción de proteínas recombinantes, aún persisten limitaciones que afectan tanto la eficiencia como la funcionalidad de las proteínas obtenidas. Entre los principales avances destacan la incorporación de promotores regulables, secuencias de optimización de codones y etiquetas de solubilización, lo que ha favorecido la estabilidad y el rendimiento de las proteínas en huéspedes bacterianos. Sin embargo, su eficiencia depende de factores como la célula huésped, las características estructurales y el objetivo de la proteína recombinante. En este sentido, aunque en los últimos años se han desarrollado nuevos vectores optimizados para la producción de proteínas, su elección requiere un análisis crítico que considere todos estos factores, así como su aplicación biotecnológica. Cabe destacar que los vectores no son plataformas universales.

Tabla 2. Componentes de un vector de expresión.**Table 2.** Components of an expression vector.

Componente	Característica
Origen de replicación	Secuencia de nucleótidos en el ADN donde se inicia la replicación.
Promotor	Sitio de unión de la ARN polimerasa con el ADN para iniciar la transcripción del gen que codifica para la proteína recombinante.
Etiquetas de fusión	Secuencias peptídicas o proteínas completas que se agregan al extremo amino o carboxilo terminal de las proteínas recombinantes con la finalidad de aumentar la solubilidad, replegamiento y optimizar el proceso de purificación.
Codón de iniciación	Es una secuencia de ARN de tres nucleótidos (es decir, un codón) que indica a la maquinaria celular el lugar de la cadena en el que comienza la traducción del ARN mensajero.
Sitio de escisión de proteasa	Secuencia codificante para la eliminación de etiquetas de afinidad. Por ejemplo; el factor Xa, la trombina, la proteasa SUMO y la proteasa TEV.
Sitio de clonación múltiple (MCS)	Secuencia de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción para la inserción del gen de interés.
Codón de terminación	Secuencia de tres nucleótidos que indica la terminación de la síntesis proteica en la célula.
Marcador de selección	Gen que confiere resistencia a un antibiótico para la selección de las células que incorporan el vector recombinante. Por ejemplo, la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina.

Referencia: tomada y modificada de: Kaur et al., 2018; Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023.

3. Componentes clave del vector de expresión que influyen en la producción y solubilidad proteica

3.1 Promotor de expresión

El promotor es el elemento principal del vector de expresión, ya que su función principal es regular el inicio de la transcripción génica mediante la unión de la ARN polimerasa al ADN. La fuerza del promotor es uno de los principales factores que determinan la carga metabólica y a su vez, la eficiencia de expresión, induciendo hasta más del 30 % de la expresión de las proteínas celulares totales. Un promotor idóneo debe tener una alta afinidad por la ARN polimerasa y, a su vez, minimizar la expresión basal de las proteínas antes de la inducción y aumentar significativamente la síntesis de ARNm tras la adición del inductor (Cazier y Blazeck, 2021). En este contexto, los promotores derivados del operón lac (PT7lac, P_{trc} y P_{tac}) operan mediante una regulación negativa mediada por el represor LacI, siendo inducibles por lactosa o por su análogo sintético isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Mientras que los promotores P_{trc} y P_{tac} se consideran promotores fuertes y bien caracterizados, el sistema PT7 sobresale por su potencia transcripcional, dependiente

de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, presente en cepas bacterianas como *E. coli* BL21(DE3), la cual es cinco veces mayor que la polimerasa endógena (Du et al., 2021; Schuster y Reisch, 2022). En contraste, el promotor PBAD se considera como un promotor de fuerza intermedia con una menor tasa de expresión en comparación con PT7lac, Ptrc y Ptac permitiendo un control más robusto de la transcripción (Lozano Terol et al., 2021). En definitiva, la selección del promotor no debe basarse únicamente en su fuerza, ya que promotores fuertes como PT7 pueden generar una sobrecarga metabólica significativa en el huésped, lo que afecta el crecimiento bacteriano y, por consiguiente, el correcto plegamiento de las PR. Por otro lado, promotores de fuerza media como PBAD a pesar de tener una menor tasa de expresión, ofrecen un control más estricto de la expresión, reduciendo la inestabilidad plasmídica y evitando la acumulación de proteínas mal plegadas o tóxicas (Íncir y Kaplan, 2024).

3.2 Etiquetas de fusión

Las etiquetas de fusión, también denominadas proteínas de fusión constituyen herramientas muy eficientes para la identificación, producción y purificación de proteínas. Estas etiquetas son moléculas compuestas por aminoácidos (AA) exógenos que se agregan al extremo amino (N) o extremo carboxilo (C) de la proteína de interés con una alta afinidad por un ligando químico o biológico específico. Su incorporación puede cumplir diversas funciones, como aumentar la solubilidad de la proteína, reducir su toxicidad en la célula huésped, favorecer el correcto plegamiento proteico y optimizar su purificación (Zhao et al., 2019; Mishra, 2020; Beygmoradi et al., 2023; Arakawa y Akuta, 2025). Entre las etiquetas de mayor tamaño se encuentran la proteína de unión a maltosa (MBP), el glutatión S-transferasa (GST), el modificador pequeño relacionado con la ubiquitina (SUMO), tioredoxina A (TrxA), NusA (sustancia A que utiliza N), proteína disulfuro isomerasa I (DsbA), las cuales aumentan la solubilidad de la PR en sistemas como el de *E. coli* y en algunos casos también favorecen la purificación de la PR (Nemergut et al., 2021; Lamer y Vederas, 2023; Okoto et al., 2023).

Por otro lado, existen etiquetas de menor tamaño, como las de polihistidinas (polyHis) o poliarginina (polyArg), que interfieren menos con la PR. La etiqueta de polyArg está constituida por 5 o 6 residuos de arginina, dicha etiqueta permite la purificación de la proteína mediante intercambio catiónico (Sánchez et al., 2022; Yildiz et al., 2024). No obstante, la etiqueta de polihistidinas (polyHis) es la más utilizada debido a su baja inmunogenicidad y a que no interfiere con la actividad biológica de la PR. La purificación con polyHis se realiza mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), en la que se forman enlaces de coordinación con iones de transición como Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} inmovilizados en una matriz (Loughran et al., 2023). Entre las resinas más empleadas en la purificación por IMAC se encuentran la agarosa de carboximetil-aspartato (Talon, de ClonTech) y la agarosa de ácido Ni (II)-nitrilotriacético (Ni-NTA). Sin embargo, el uso de la resina de Ni-NTA ofrece mayores ventajas, ya que se trata de una matriz económica con alta capacidad de unión a los residuos de histidina. La resina Ni-NTA permite la elución de las proteínas en condiciones suaves mediante un gradiente de imidazol (Mooney et al., 2015; Freitas et al., 2022; Kanoh et al., 2023).

La incorporación de etiquetas de fusión en PR es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la purificación y la solubilidad de las proteínas en sistemas como *E. coli*. No obstante, la elección de la etiqueta adecuada depende de la proteína a producir y de las condiciones experimentales, como MBP o GST ha demostrado ser efectivo incrementando la solubilidad y el plegamiento de las

proteínas, pero también pueden interferir en la actividad biológica o dificultar su eliminación posterior (Pina et al., 2021). En contraste, las etiquetas pequeñas, como la polyArg o la His-tag, suelen interferir menos con la estructura de la proteína y, en el contexto inmunológico, ofrecen ventajas por su baja inmunogenicidad en comparación con proteínas de fusión de mayor tamaño, como la GST, lo cual representa una ventaja en el estudio de vacunas a partir de PR (Sánchez et al., 2022; Yildiz et al., 2024).

3.3 Uso de codones

El código genético incluye 61 codones (secuencias de 3 nucleótidos) que codifican 20 aminoácidos diferentes. Mayoritariamente, los AA están codificados por múltiples codones sinónimos, por lo que se dice que el código genético es "degenerado". La preferencia por codones distintos entre organismos parece ser un fenómeno común, denominado sesgo de uso de codones. Esta preferencia varía según el microorganismo y está relacionada con las cantidades de ARNt presentes. Este fenómeno interfiere con la eficiencia de la traducción al ajustar la tasa de elongación del proceso, es decir, la velocidad a la que el ribosoma avanza a lo largo del ARNm (añadiendo AA a la cadena polipeptídica) no es constante y puede acelerarse o desacelerarse según los codones que encuentra (Quax et al., 2015; Lipinszki et al., 2018). El sesgo en el uso de codones afecta la expresión de proteínas recombinantes en el sistema procariota de *E. coli* cuando el ARNm del gen recombinante contiene codones raros que difieren del patrón de uso de codones de la bacteria. Es probable que la presencia de un codón raro en un gen heterólogo pueda generar desplazamientos en el marco de la traducción, causando la terminación prematura de la síntesis de proteínas, la omisión de codones, incorporación de AA de forma incorrecta y una traducción lenta del ARNm, lo que provoca una disminución en la expresión de la PR de interés (Quax et al., 2015; Zhong et al., 2017; Roots et al., 2025).

Para contrarrestar el sesgo en el uso de codones, los investigadores han recurrido a dos estrategias principales. La primera consiste en sustituir los codones raros por codones de uso frecuente en *E. coli* al sintetizar el gen modificado. La otra alternativa consiste en utilizar una cepa de *E. coli* modificada genéticamente que puede traducir eficientemente estos codones, como, por ejemplo, la cepa Rosetta (Novagen, EE. UU.) que suministra ARNt para los codones raros como AGG, AGA, AUA, CUA, CCC y GGA en un plásmido compatible resistente al cloranfenicol. La optimización del uso de codones es un enfoque utilizado en ingeniería genética para mejorar la expresión de genes heterólogos, mediante la sustitución de codones sinónimos según el sesgo de uso de codones de un organismo (Zhong et al., 2017; Ortega et al., 2022; Paremskaia et al., 2024). Por ejemplo, una alta velocidad de traducción puede favorecer una mayor producción en cantidad, pero, a la par, podría comprometer la conformación, la estabilidad y la funcionalidad de la PR final. En este sentido, el principal reto es integrar la optimización de codones con otros parámetros, como el sistema de expresión, el diseño del vector y las condiciones de cultivo, para alcanzar un equilibrio entre el rendimiento y la calidad de la proteína a producir en un sistema procariota como *E. coli*.

4. Optimización de diferentes factores para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de *E. coli*

La producción de proteínas en sistemas procariotas es un proceso complejo que plantea múltiples desafíos, entre los cuales la formación de IB es el más común, debido al plegamiento incorrecto de la proteína. Los IB suelen ocasionar la pérdida de la relación estructura-función de una PR (Hashemzadeh et al., 2021). Por lo tanto, para poder aumentar la eficiencia en la producción de PR utilizando este sistema, es necesario el desarrollo de estrategias que permitan estandarizar o ajustar diversas etapas mediante la modificación de distintos parámetros como: el vector de expresión, la cepa huésped, el promotor, tipo y concentración del inductor, expresión con chaperonas, la composición y las condiciones del medio de cultivo, el uso de etiquetas de fusión, entre otros, que se describirán a continuación.

4.1 Optimización del vector de expresión

La selección adecuada del vector de expresión es clave para el nivel de expresión de la proteína de interés. Los vectores plasmídicos desempeñan un papel destacado en la clonación molecular, ya que se emplearon en los primeros estudios sobre ADN recombinante. Desde entonces hasta la fecha, los plásmidos son una de las plataformas más utilizadas para la ingeniería genética y la expresión de genes recombinantes en sistemas bacterianos (Green y Sambrook, 2021; de Lorenzo y Martínez-García, 2025). Un vector de expresión plasmídico está constituido por componentes esenciales para que un gen de interés clonado sea transcrito y/o traducido en una célula huésped. Los distintos componentes de un vector plasmídico (Fig. 1) pueden diseñarse y optimizarse estratégicamente para maximizar la expresión de proteínas recombinantes. La elección y combinación adecuadas de estos componentes permiten modular tanto el nivel de expresión como la estabilidad y funcionalidad de la proteína producida (Fig. 2).

Actualmente, la ingeniería de vectores ha permitido el diseño de una amplia diversidad de construcciones plasmídicas comerciales que optimizan cada uno de sus componentes, con el objetivo de mitigar las limitaciones metabólicas en la producción de PR en sistemas procariotas como *E. coli*. Entre los componentes más relevantes se encuentran el replicón y el promotor, que regulan directamente el número de copias del plásmido y la tasa de iniciación transcripcional, respectivamente. En este sentido, el equilibrio entre ambos componentes es fundamental, debido a que una excesiva tasa transcripcional satura la maquinaria biosintética de la célula huésped, desencadena estrés celular y favorece la agregación de la proteína en IB, o también genera toxicidad celular. Es importante destacar que una "máxima expresión" no es sinónimo de una "expresión óptima" por lo que, en términos ideales, la optimización de un vector de expresión en *E. coli* no radica en maximizar un solo parámetro, sino en buscar un equilibrio entre todos los elementos que conforman al plásmido como el replicón, promotor, etiquetas de fusión, marcadores de selección, secuencias reguladoras con el fin de garantizar el rendimiento y calidad de la PR.

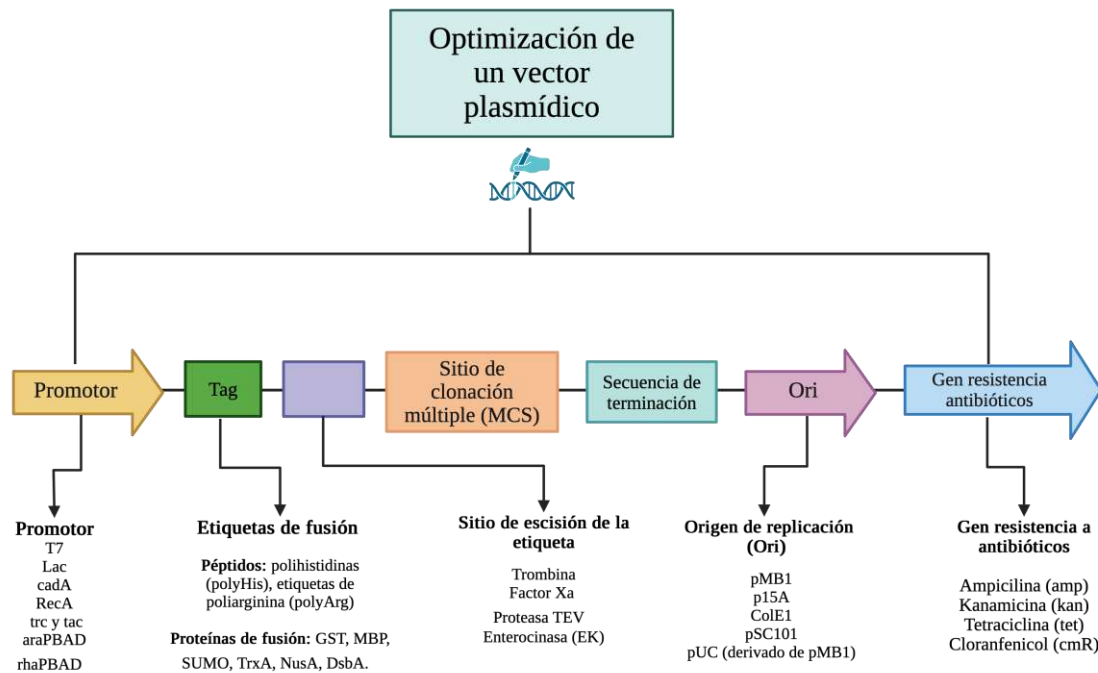


Figura 2. Alternativas para la optimización de un vector de expresión de proteínas recombinantes en el sistema de *E. coli*. Creada en BioRender. <https://BioRender.com/tijm818>

Figure 2. Alternatives for optimizing a recombinant protein expression vector in the *E. coli* system. Created with BioRender. <https://BioRender.com/tijm818>

4.2 Optimización del replicón

Los plásmidos se caracterizan por tener un replicón en su estructura que desempeña un papel importante en el control del número de copias de plásmidos que se pueden generar. Un replicón es una secuencia completa de ADN capaz de replicarse de manera autónoma a partir de un único origen de replicación y de los elementos de control *cis* que lo acompañan (Ekundayo y Bleichert, 2019; Ramiro-Martínez et al., 2025). Por esta razón, uno de los puntos clave a considerar durante la elección del vector de expresión, es el número de copias del plásmido controlado por el replicón. Cabe destacar que el uso de plásmidos con un alto número de copias para la expresión de proteínas no implica un mayor rendimiento de la PR. Lo anterior se debe a que un aumento en el número de copias del plásmido representa una mayor carga metabólica para el sistema y, en consecuencia, la tasa de crecimiento bacteriano se ve afectada, provocando inestabilidad del plásmido, dando como resultado un menor rendimiento en la expresión de la PR (Joshi et al., 2022). Otro factor a considerar es la compatibilidad entre los plásmidos, que está relacionada con su mecanismo de replicación. Aquellos plásmidos con una relación filogenética cercana tienden a presentar una mayor incompatibilidad, lo que significa que no pueden replicarse simultáneamente en la misma célula, ya que compiten entre sí por reclutar factores de replicación (Rouches et al., 2022). Algunos de los orígenes de replicación y los plásmidos comúnmente utilizados se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Orígenes de replicación más utilizados en el sistema de expresión de *E. coli*.**Table 3.** Most used origins of replication in the *E. coli* expression system.

Replicón	Plásmido	Número de copias	Mecanismo de regulación de la cantidad de copias del plásmido	Referencias
pMB1	pBR322	15-60	Controla el procesamiento del pre-ARNII en el cebador.	Rossi et al., 1996 Parada y Mariani, 1991
colE1	colE1	15-20	Utiliza un sistema de replicación dependiente de ARNII para regular el número de copias en la célula.	Camps, 2010
pMB1 modificado	pUC	500-700	La ARNII es el pre-iniciador que desencadena la replicación del plásmido.	Sutcliffe, 1978
p15A	pACYC	18-22	Secuestradores de la proteína RepA	Chang y Cohen, 1978
pSC101	pSC101	<5	Secuestradores de la proteína RepA	Ingmer et al., 2001 Manen y Caro, 1991

Referencia: tomada y modificada de: Kaur et al., 2018; Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023; Eskandari et al., 2024.

4.3 Optimización del promotor

Dado que el promotor desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, su selección es un factor clave en la producción de proteínas en sistemas procariotas. El sistema de *E. coli* generalmente requiere promotores fuertes y estrictamente controlados para aumentar la eficiencia de la producción de proteínas heterólogas, reduciendo la toxicidad o la carga metabólica del sistema durante la fase de crecimiento. En este sentido, el vector de expresión pET (derivado del plásmido pBR322) basado en el promotor T7 del bacteriófago T7 es el sistema de expresión más utilizado en *E. coli* (Khananisho et al., 2023). En este plásmido, el gen de interés se clona bajo el control del promotor T7, que es reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 (T7 ARNP) bajo el control transcripcional de un promotor *lac* UV5. Por ello, el promotor puede inducirse mediante la adición de lactosa o de un análogo como el IPTG. Sin embargo, algunas de las desventajas de este sistema se asocian con una alta tasa de transcripción, que puede provocar destrucción ribosómica y muerte celular. La expresión del nivel basal de la ARN polimerasa T7 se puede regular con la adición de glucosa entre 0.5 a 1 % al medio y con la coexpresión de lisozima T7 proporcionada por un plásmido compatible (pLysS o pLysE) con el objetivo de unirse a la ARN polimerasa T7 e inhibir la transcripción del gen recombinante (Shilling et al., 2020; Singh, 2020). Además del promotor T7, existen otros promotores ampliamente utilizados en el sistema de *E. coli*, que se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Promotores más utilizados en la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.**Table 4.** Promoters most used in the expression of recombinant proteins in *E. coli*.

Promotor	Origen	Inductor	Característica	Referencias
Lac	<i>E. coli</i>	IPTG	Es un promotor débil que forma parte del operón <i>lac</i> , es regulado con la degradación de la lactosa.	Giordano et al., 1989 Gronenborn, 1976
trc y tac	<i>E. coli</i>	IPTG, térmico	Es un promotor de alto nivel de expresión. Sirve para controlar y aumentar el nivel de expresión de genes de interés.	Amann y Brosius, 1985 de Boer et al., 1983
T7	Fago T7	IPTG o lactosa	Promotor que utiliza la ARN polimerasa T7. Para el control de proteínas tóxicas, necesita el sistema T7 <i>lac</i> para un control estricto de la inducción.	Studier y Moffatt, 1986
Promotor del fago pL	Fago <i>lambda</i>	Térmico	Requiere de una cepa huésped sensible a los cambios de temperatura. Niveles medios de expresión sin el uso de inductores.	Menart et al., 2003 Elvin et al., 1990
araPBAD		Arabinosa	El promotor PBAD impulsa la producción de la ARN polimerasa T7. Es un promotor ideal para la expresión de proteínas tóxicas.	Giacalone et al., 2006 Guzman et al., 1995
rhaPBAD		L-ramnosa	Promotor regulado por dos activadores, RhaS y RhaR. RhaS junto con L-ramnosa se une a su vez al promotor rhaP BAD y al promotor rhaP T y activa la transcripción de los genes.	Wegerer et al., 2008 Egan y Schleif, 1993
proU	<i>E. coli</i>	Osmolaridad	Codifica un sistema de transporte de glicina betaína de alta afinidad que es osmóticamente inducible.	Mellies et al., 1994
RecA	<i>E. coli</i>	Ácido nalidíxico	RecA estimula la relajación del ADN al interactuar posiblemente con la topoisomerasa I.	Reckinger et al., 2007 Keller et al., 1990

phoA	<i>E. coli</i>	Falta de fosfato	Promotor derivado de la fosfatasa alcalina de <i>E. coli</i> (phoA), que permite una expresión alta y estrictamente controlada de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	Wang et al., 2005 Lübke et al., 1995
cadA	<i>E. coli</i>	pH	Un promotor sensible al cadmio.	Yoon y Silver, 1991
nar	<i>E. coli</i>	Condiciones anaeróbicas, presencia de nitrato.	Un promotor dependiente de oxígeno disuelto (DO).	Hwang et al., 2017

Referencia: tomada y modificada de Rosano et al., 2019; Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023.

A pesar de que la mayoría de los promotores disponibles se activan con inductores químicos, existen otros sistemas de expresión con promotores que se activan a partir de cambios de pH o temperatura en un sistema de expresión de *E. coli*. Un ejemplo de sistema de expresión termoinducible, es el basado en los promotores pL y/o pR, que son regulados por el represor termolábil mutante cI857 del fago lambda λ . Este sistema induce la expresión de la proteína heteróloga cuando se eleva la temperatura del medio de cultivo por encima de 37 °C (Restrepo-Pineda et al., 2022). Por el contrario, el promotor cspA es inducido por un choque frío, consistente en el descenso de la temperatura del medio de cultivo a 15 °C. Una de las principales ventajas del promotor cspA es la alta estabilidad del ARNm del gen de interés, lo que favorece la transcripción y la solubilidad de la PR a bajas temperaturas (Bartolo-Aguilar et al., 2022). El sistema de plásmidos pCold tiene una estructura principal derivada de pUC118 que utiliza el promotor cspA, estos plásmidos se han utilizado ampliamente por su alto nivel de expresión de proteínas solubles en sistemas bacterianos de *E. coli* (Li et al., 2018). Actualmente, se han desarrollado modificaciones en la estructura de los plásmidos pCold para optimizar los procesos de purificación mediante el uso de etiquetas como GST, la etiqueta de 6 histidinas (6xHis) y la etiqueta SUMO (Li et al., 2018; Nemergut et al., 2021; Lamer y Vederas, 2023; Okoto et al., 2023).

Finalmente, la optimización del promotor es un aspecto importante para lograr una producción adecuada de PR en *E. coli*. A pesar de que se cuenta con promotores fuertes como los T7 o tac los cuales se caracterizan por inducir niveles altos de transcripción, su uso de manera errónea puede generar consecuencias negativas como la saturación metabólica de la célula huésped, lo que compromete la solubilidad de la proteína. Por el contrario, promotores regulables o híbridos, como los plásmidos pCold ofrecen la posibilidad de modular la expresión de manera más controlada y precisa (Qiao et al., 2019; Boontip et al., 2021). De forma que, la selección del promotor no debe enfocarse exclusivamente en maximizar la transcripción, sino en lograr un equilibrio entre los distintos parámetros que consideren la estructura de la proteína, el nivel de expresión requerido, las condiciones de cultivo y las aplicaciones biotecnológicas o terapéuticas de la PR.

4.4 Optimización de la célula huésped: *E. coli*

El sistema de expresión en *E. coli* es uno de los más importantes para la producción de proteínas recombinantes en bacterias. A partir de las cepas de *E. coli* K-12 y BL21 se han diseñado nuevas cepas con modificaciones genéticas que se describen en la Tabla 5. Cada una de estas cepas modificadas tiene un objetivo específico, por ejemplo: brindar mayor estabilidad del ARNm, un control estricto de la expresión génica, ausencia de proteasas, mayor estabilidad del plásmido recombinante, aumentar la capacidad para formar enlaces disulfuro, mayor capacidad para expresar genes de tipo eucariota y la optimización de la expresión de proteínas tóxicas o con codones raros (Hayat et al., 2018; Rosano et al., 2019; Lozano Terol et al., 2021).

Tabla 5. Cepas de *E. coli* más utilizadas en la producción de proteínas recombinantes
Table 5. *E. coli* strains most used in the production of recombinant proteins

Cepa	Derivación	Característica	Referencias
BL21	B834	Expresión de proteínas de alto nivel y fácil inducción. Deficiente en proteasas <i>Lon</i> y <i>OmpT</i>	Gottesman, 1996
BL21(DE3)	BL21	Expresión de proteínas bajo el control del promotor de T7/deficiencia de proteasas <i>Lon</i> y <i>OmpT</i> .	Daegelen et al., 2009 Du et al., 2021 Heyde y Nørholm, 2021
BL21 trxB	BL21	Cepa mutante trxB deficiente de las proteasas <i>Lon</i> y <i>OmpT</i> que facilita la formación de enlaces disulfuro citoplasmáticos.	Makino et al., 2011
BL21-pLys	BL21	Contiene el plásmido pLysS con el gen de la lisozima, un inhibidor de la ARN polimerasa de T7, reduce la actividad basal y permite que se establezcan genes relativamente tóxicos en la misma célula bajo el control de un promotor de T7.	Studier, 1991 Agrawal et al., 2024
BL21-Codón Plus (DE3)-RI(P)L	BL21	El plásmido pRI(P)L mejora la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA).	Ojima-Kato, 2025
HMS174	K-12	Mutante recA para aumentar la estabilidad del plásmido recombinante.	Disela et al., 2023
JM83	K-12	Induce la secreción de proteínas recombinantes en el periplasma.	Campbell et al., 1978
Lemo21	BL21	Ajusta los niveles de expresión de proteínas mediante suplementación con ramnosa.	Morão et al., 2022

Origami	K-12	La mutación en los genes <i>trxB</i> y <i>gor</i> promueve la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma en presencia de condiciones más oxidantes.	Makino et al., 2011 Kaplan et al., 2016
Rosetta	BL21	Es deficiente de proteasas y aumenta la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raros en <i>E. coli</i> (AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC y GGA).	Chumjan et al., 2023 Íncir y Kaplan, 2024
Rosetta-gami	BL21	Mejora la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raros y la mutante <i>trxB/gor</i> promueve la formación de enlaces disulfuro citoplasmáticos.	Zarkar et al., 2020 Morão et al., 2022 Hajihassan et al., 2025
SoluBL21	BL21	Se utiliza para la expresión de proteínas solubles de mamíferos.	Deatherage et al., 2012 Hata et al., 2013
C41(DE3)	BL21	Cepa mutante diseñada para la sobreexpresión de proteínas tóxicas y de membrana.	Schlegel et al. 2015 Ni et al., 2020
C43(DE3)	BL21	Doble mutante diseñada para la expresión de proteínas de membrana. Tiene un represor <i>LacI</i> mutado que se une más tiempo al operador <i>lac</i> retrasando la transcripción de T7ARNP.	Kwon et al., 2015 Hsieh et al., 2017

Referencia: tomada y modificada de Rosano et al., 2019; Pouresmaeil y Azizi-Dargahlou, 2023.

Sistemas híbridos, como la cepa Rosetta-gamiTM combinan las características de las cepas Rosetta y Origami, permitiendo tanto la provisión de ARNt para codones poco frecuentes como la expresión de proteínas con enlaces disulfuro (Zarkar et al., 2020). Actualmente, la cepa BL21(DE3) continúa siendo el huésped más utilizado para la expresión de PR, gracias a sus múltiples ventajas, como la ausencia de proteasas que degradan la PR expresada. Sin embargo, uno de los principales retos en el uso de estos sistemas procariotas es la elevada carga metabólica asociada a la sobreexpresión, que disminuye la tasa de crecimiento bacteriano, causando una disminución en el rendimiento de la proteína recombinante. En conclusión, a pesar de la amplia variedad de cepas bacterianas disponibles en el mercado, es importante recalcar que no existe una cepa que sea considerada como universal, ya que la eficiencia en la producción de PR en el sistema de *E. coli* depende de una elección basada en un análisis en el cual se consideran elementos como el tipo de vector de expresión, el tipo de promotor y la capacidad metabólica de la célula huésped.

4.5 Optimización de las condiciones de cultivo

La optimización de las condiciones de cultivo es un factor crucial para mejorar la expresión de PR en *E. coli*. Diversos estudios han demostrado que la regulación precisa de la disponibilidad de oxígeno, del pH, de la fuente de carbono, de la composición del medio y de la tasa de crecimiento puede aumentar significativamente la eficiencia de producción de una PR (Zhang et al., 2022; Eskandari et al., 2024). La alta densidad celular y un ambiente de restricción de oxígeno en un cultivo de *E. coli* altera el metabolismo de la bacteria y se forman productos de degradación no deseados como el acetato y etanol, que aumentan la toxicidad y afectan el crecimiento celular (Millard et al., 2021; Qi et al., 2023).

El medio Luria-Bertani, también conocido como LB, es el más utilizado para el cultivo de *E. coli*. Es un medio rico en aminoácidos catabolizables, carece de azúcares recuperables y su osmolaridad es idónea para el crecimiento bacteriano en la fase logarítmica temprana (Wang et al., 2023). No obstante, su capacidad para alcanzar altas densidades celulares es limitada, por lo que es necesaria la adición de otros componentes, como el extracto de levadura, peptona, glucosa, glicerol, así como sodio y cloruro de magnesio ($MgCl_2$), para obtener densidades celulares finales más altas (Ganjave et al., 2021). A pesar de que el medio LB es el más utilizado en la industria, existen otras alternativas, como el medio TB (Terrific Broth), SB (Super Broth) y el medio mínimo M9, que son superiores al LB para alcanzar densidades celulares más altas (Packiam et al., 2020; Eskandari et al., 2024; Snoeck et al., 2024).

En 2005 surgió uno de los grandes avances en la composición de los medios: se incorporaron los medios de autoinducción (Studier, 2005). Estos sistemas de autoinducción tienen varias ventajas sobre los métodos clásicos para la expresión de proteínas recombinantes, dado que se elimina la necesidad de interrumpir el cultivo o de utilizar inductores externos como el IPTG, un compuesto que puede ejercer efectos citotóxicos en las células hospedadoras y que, económicamente, es más caro que la lactosa (Studier, 2014; Dvorak et al., 2015; Tahara et al., 2021). En su lugar, estos sistemas emplean una combinación precisa y optimizada de fuentes de carbono basadas en glucosa, lactosa y glicerol. Durante la fase inicial de crecimiento, la glucosa actúa como la fuente de carbono preferida, inhibiendo el consumo de lactosa hasta su agotamiento, que normalmente ocurre en la parte media o final de la fase logarítmica. Una vez agotada la glucosa, la célula comienza a metabolizar el glicerol y la lactosa, siendo esta última responsable de la inducción de la expresión proteica regulada por el operón *lac* (Kim et al., 2022). Este enfoque no solo evita la necesidad de monitorear y manipular la biomasa para la adición manual del inductor, sino que también ofrece una inducción altamente reproducible y eficiente (Tahara et al., 2021; Abedin et al., 2024).

La optimización de la agitación y la aireación es fundamental en un cultivo de *E. coli*. Como se mencionó anteriormente, la limitación de oxígeno en el sistema puede desencadenar toxicidad y afectar el crecimiento celular. Sin embargo, esto se puede solucionar a través del aumento de la velocidad de agitación. Además, el volumen de un cultivo de *E. coli* debe ser menor o igual al 10 % de la capacidad del matraz de agitación (Takahashi y Aoyagi, 2020). Uno de los principales problemas en la expresión de proteínas, en especial las de origen viral y eucariota, es la formación de IB. Las proteínas que se expresan como IB en *E. coli* son inactivas e insolubles, y tienen enlaces disulfuro intramoleculares e intermoleculares erróneos (Singh et al., 2015; Kopp et al., 2023; Zhang et al., 2022). Una de las múltiples estrategias para evitar la formación de los IB en el sistema de *E. coli*

es reducir la temperatura del medio de cultivo entre 15 °C y 25 °C. La disminución de la temperatura favorece el plegamiento correcto de las proteínas recién sintetizadas, lo que les confiere mayor estabilidad (Singh et al., 2015). De hecho, algunos estudios han reportado la expresión exitosa de proteínas a temperaturas de hasta 4 °C y en procesos prolongados de hasta 72 horas, logrando así un plegamiento adecuado y minimizando la agregación proteica (Bhatwa et al., 2021). Cabe destacar que los ajustes relacionados con la adición de inductores, cambios de temperatura, pH o aditivos a la composición inicial del medio de cultivo dependen totalmente de las características de la proteína de interés, así como del sistema de expresión y la cepa huésped previamente seleccionada.

6. Conclusiones

El sistema de expresión procariota de *E. coli* se ha demostrado como uno de los más eficaces y versátiles para la producción de PR, y es ampliamente utilizado en diversos sectores por su bajo costo y su simplicidad. Como se analizó en la presente revisión, la obtención de PR funcionales y solubles depende de un equilibrio entre la célula huésped, la estructura del vector y las condiciones de cultivo. La evolución de sistemas de inducción clásicos a estrategias más sofisticadas como medios de cultivo basados en la autoinducción, incorporación de etiquetas de fusión y la ingeniería de codones, ha permitido disminuir limitaciones como el sesgo de codones y la formación de agregados proteicos insolubles. Sin embargo, la deficiencia de modificaciones postraduccionales complejas y la constante formación de IB confirma que el sistema de expresión de *E. coli* no es un sistema universal, sino una plataforma que requiere realizar ajustes dependiendo de la proteína de interés a expresar, mediante la optimización del diseño de vectores, la selección de cepas especializadas y la optimización de bioprocesos, con la finalidad de transformar dicho sistema en una plataforma de producción robusta y escalable para las próximas generaciones de productos biotecnológicos.

Agradecimientos

El autor de correspondencia expresa su agradecimiento a todos los que participaron en la creación de este texto, especialmente a Diana Lizzet Murrieta-León, becaria de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (1055447) en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Veracruzana. Este artículo forma parte del proyecto DGI:28043202479 registrado en SIREL.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses relacionado con la publicación de este artículo.

Nomenclatura

AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Extremo carboxi terminal
cspA	Promotor de choque frío
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
GST	Glutación-S-transferasa
IB	Cuerpos de inclusión
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
LB	Medio Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MBP	Proteína de unión a maltosa
MCS	Sitio de clonación múltiple
N	Extremo amino terminal
Ni-NTA	Agarosa de ácido Ni(II)-nitrilotriacético
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés, open reading frame)
ori	Origen de replicación
pCold	Vector de expresión por choque frío
pET	Vector de expresión
pH	Potencial de hidrógeno
PR	Proteína recombinante
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SB	Super caldo
SUMO	Modificador pequeño relacionado con ubiquitina
T7	Promotor del bacteriófago T7
T7ARNP	ARN polimerasa del bacteriófago T7
TB	Medio líquido excelente
TrxA	Tioredoxina A
β	Beta

7. Referencias

- Abedin, S., Ranjbari, J., Haeri, A., Vahidi, H., & Moghimi, H. R. (2024). Design and characterization of an osmotic pump system for optimal feeding and pH control in *E. coli* culture to increase biomass. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 23(1), e138677. <https://doi.org/10.5812/ijpr-138677>
- Agrawal, S., Padmaswari, M. H., Stokes, A. L., Maxenberger, D., Reese, M., Khalil, A., & Nelson, C. E. (2024). Optimizing recombinant Cas9 expression: insights from *E. coli* BL21(DE3) strains for

- enhanced protein purification and genome editing. *Biomedicines*, 12(6), 1226. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061226>
- Amann, E., & Brosius, J. (1985). "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 40(2-3), 183–190. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90041-1)
- Arakawa, T., & Akuta, T. (2025). Beyond purification: Evolving roles of fusion tags in biotechnology. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(9), 768. <https://doi.org/10.3390/cimb47090768>
- Barone, G. D., Emmerstorfer-Augustin, A., Biundo, A., Pisano, I., Coccetti, P., Mapelli, V., & Camattari, A. (2023). Industrial production of proteins with *Pichia pastoris*-*Komagataella phaffii*. *Biomolecules*, 13(3), 441. <https://doi.org/10.3390/biom13030441>
- Bartolo-Aguilar, Y., Chávez-Cabrera, C., Flores-Cotera, L. B., Badillo-Corona, J. A., Oliver-Salvador, C., & Marsch, R. (2022). The potential of cold-shock promoters for the expression of recombinant proteins in microbes and mammalian cells. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 20(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00455-9>
- Beygmoradi, A., Homaei, A., Hemmati, R., & Fernandes, P. (2023). Recombinant protein expression: Challenges in production and folding related matters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233, 123407. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123407>
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
- Boontip, T., Waditee-Sirisattha, R., Honda, K., & Napathorn, S. C. (2021). Strategies for Poly(3-hydroxybutyrate) Production using a cold-shock promoter in *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 666036. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.666036>
- Cai, D., Rao, Y., Zhan, Y., Wang, Q., & Chen, S. (2019). Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1632–1642. <https://doi.org/10.1111/jam.14192>
- Campbell, J. L., Richardson, C. C., & Studier, F. W. (1978). Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(5), 2276–2280. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.5.2276>
- Camps, M. (2010). Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 4(1), 58–73. <https://doi.org/10.2174/187221510790410822>
- Camps, S., Padmaswari, M. H., Stokes, A. L., Maxenberger, D., Reese, M., Khalil, A., & Nelson, C. E. (2024). Optimizing recombinant Cas9 expression: insights from *E. coli* BL21(DE3) strains for enhanced protein purification and genome editing. *Biomedicines*, 12(6), 1226. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061226>
- Cantoia, A., Aguilar Lucero, D., Ceccarelli, E. A., & Rosano, G. L. (2021). From the notebook to recombinant protein production in *Escherichia coli*: Design of expression vectors and gene cloning. *Methods in Enzymology*, 659, 19–35. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.008>
- Cazier, A. P., & Blazeck, J. (2021). Advances in promoter engineering: Novel applications and predefined transcriptional control. *Biotechnology Journal*, 16(10), e2100239. <https://doi.org/10.1002/biot.202100239>
- Chang, A. C., & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of Bacteriology*, 134(3), 1141–1156. <https://doi.org/10.1128/jb.134.3.1141-1156.1978>

- Chen, A., Dong, Y., Jiang, H., Wei, M., Ren, Y., & Zhang, J. (2024). Application of plasmid stabilization systems for heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 939. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09881-z>
- Chen, S., Shan, B., Luo, Y., Mo, G., Rasheed, U., Lv, L., Yang, X., & Lu, Q. (2025). Molecular chaperone effects on recombinant yield and binding characteristics of an ABA-specific scFv in *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13, 1643833. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1643833>
- Chumjan, W., Sangchalee, A., Somwang, C., Mookda, N., Yaikeaw, S., & Somsakeesit, L. O. (2023). Outer membrane protein N expressed in Gram-negative bacterial strain of *Escherichia coli* BL21 (DE3) Omp8 Rosetta strains under osmoregulation by salts, sugars, and pHs. *PloS One*, 18(8), e0288096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288096>
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.022>
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., & Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1), 21–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.21>
- de Lorenzo, V., & Martínez-García, E. (2025). On the choice of the right plasmid vector(s) in the times of synthetic biology. *Microbial Biotechnology*, 18(12), e70273. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70273>
- de Marco, A. (2025). Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>
- Deatherage, C. L., Hadziselimovic, A., & Sanders, C. R. (2012). Purification and characterization of the human γ -secretase activating protein. *Biochemistry*, 51(25), 5153–5159. <https://doi.org/10.1021/bi300605u>
- Disela, R., Bussy, O. L., Geldhof, G., Pabst, M., & Ottens, M. (2023). Characterisation of the *E. coli* HMS174 and BLR host cell proteome to guide purification process development. *Biotechnology Journal*, 18(9), e2300068. <https://doi.org/10.1002/biot.202300068>
- Du, F., Liu, Y. Q., Xu, Y. S., Li, Z. J., Wang, Y. Z., Zhang, Z. X., & Sun, X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 14, 201. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Eastwood, T. A., Baker, K., Streather, B. R., Allen, N., Wang, L., Botchway, S. W., Brown, I. R., Hiscock, J. R., Lennon, C., & Mulvihill, D. P. (2023). High-yield vesicle-packaged recombinant protein production from *E. coli*. *Cell Reports Methods*, 3(2), 100396. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100396>
- Egan, S. M., & Schleif, R. F. (1993). A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. *Journal of Molecular Biology*, 234(1), 87–98. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1565>
- Ekundayo, B., & Bleichert, F. (2019). Origins of DNA replication. *PLoS Genetics*, 15(9), e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008320>
- Elvin, C. M., Thompson, P. R., Argall, M. E., Hendry, P., Stamford, N. P., Lilley, P. E., & Dixon, N. E. (1990). Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 87(1), 123–126. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90503-j](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90503-j)

- Eskandari, A., Nezhad, N. G., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N. (2024). Essential factors, advanced strategies, challenges, and approaches involved for efficient expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 206(4), 152. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03871-2>
- Freitas, A. I., Domingues, L., & Aguiar, T. Q. (2022). Tag-mediated single-step purification and immobilization of recombinant proteins toward protein-engineered advanced materials. *Journal of Advanced Research*, 36, 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.010>
- Fu, Y., Han, Z., Cheng, W., Niu, S., Wang, T., & Wang, X. (2024). Improvement strategies for transient gene expression in mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 480. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13315-y>
- Gan, T., Liu, Y., Qiao, Y., Dong, Y., Feng, J., Chen, X., & Zhu, L. (2025). Translation regulation in *Bacillus subtilis* and its applications in heterologous protein expression: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 311(Part 1), 143653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143653>
- Ganjave, S. D., Dodia, H., Sunder, A. V., Madhu, S., & Wangikar, P. P. (2021). High cell density cultivation of *E. coli* in shake flasks for the production of recombinant proteins. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 33, e00694. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00694>
- Giacone, M. J., Gentile, A. M., Lovitt, B. T., Berkley, N. L., Gunderson, C. W., & Surber, M. W. (2006). Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. *BioTechniques*, 40(3), 355–364. <https://doi.org/10.2144/000112112>
- Giordano, T. J., Deuschle, U., Bujard, H., & McAllister, W. T. (1989). Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the lac repressor-operator system. *Gene*, 84(2), 209–219. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90494-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90494-0)
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 30, 465–506. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.465>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). Cloning and transformation with plasmid vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(11), 10.1101/pdb.top101170. <https://doi.org/10.1101/pdb.top101170>
- Gronenborn, B. (1976). Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 148(3), 243–250. <https://doi.org/10.1007/BF00332898>
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121–4130. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4121-4130.1995>
- Hajihassan, Z., Yaseri, A., & Yazdi, M. (2025). Optimization of recombinant neurturin expression in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 47(2), 36. <https://doi.org/10.1007/s10529-025-03575-7>
- Hashemzadeh, M. S., Mohammadi, M., Ghaleh, H. E. G., Sharti, M., Choopani, A., & Panda, A. K. (2021). Expression, solubilization, refolding and final purification of recombinant proteins as expressed in the form of "classical inclusion bodies" in *E. coli*. *Protein and Peptide Letters*, 28(2), 122–130. <https://doi.org/10.2174/0929866527999200729182831>
- Hata, S., Kitamura, F., & Sorimachi, H. (2013). Efficient expression and purification of recombinant human μ -calpain using an *Escherichia coli* expression system. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 18(9), 753–763. <https://doi.org/10.1111/gtc.12071>
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>

- Herynek, Š., Svoboda, J., Huličiak, M., Peleg, Y., Škultétová, L., Mikulecký, P., & Schneider, B. (2025). Increasing recombinant protein production in *E. coli* via FACS-based selection of N-terminal coding DNA libraries. *The FEBS Journal*, 292(5), 1070–1085. <https://doi.org/10.1111/febs.17376>
- Heyde, S. A. H., & Nørholm, M. H. H. (2021). Tailoring the evolution of BL21(DE3) uncovers a key role for RNA stability in gene expression toxicity. *Communications Biology*, 4(1), 963. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02493-4>
- Home, P. (2021). The evolution of insulin therapy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 175, 108816. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.108816>
- Hsieh, S. K., Yu, Y. J., Tang, N. Y., Lin, J. R., & Jinn, T. R. (2017). Expression of Mastoparan B, a venom peptide, via *Escherichia coli* C43 (DE3) coupled with an artificial oil body-cyanogen bromide technology platform. *Protein and Peptide Letters*, 24(11), 1021–1029. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170724161900>
- Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human embryonic kidney 293 cells: A vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. *Cells, Tissues, Organs*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000485501>
- Hwang, H. J., Kim, J. W., Ju, S. Y., Park, J. H., & Lee, P. C. (2017). Application of an oxygen-inducible nar promoter system in metabolic engineering for production of biochemicals in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(2), 468–473. <https://doi.org/10.1002/bit.26082>
- İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2024). *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expression and Purification*, 219, 106463. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106463>
- İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2025). *Escherichia coli* in the production of biopharmaceuticals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 72(2), 528–541. <https://doi.org/10.1002/bab.2664>
- Ingmer, H., Miller, C., & Cohen, S. N. (2001). The RepA protein of plasmid pSC101 controls *Escherichia coli* cell division through the SOS response. *Molecular Microbiology*, 42(2), 519–526. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02661.x>
- Jayakrishnan, A., Wan Rosli, W. R., Tahir, A. R. M., Razak, F. S. A., Kee, P. E., Ng, H. S., Chew, Y.-L., Lee, S.-K., Ramasamy, M., Tan, C. S., & Liew, K. B. (2024). Evolving paradigms of recombinant protein production in pharmaceutical industry: A rigorous review. *Sci*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.3390/sci6010009>
- Jiang, R., Yuan, S., Zhou, Y., Wei, Y., Li, F., Wang, M., Chen, B., & Yu, H. (2024). Strategies to overcome the challenges of low or no expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 75, 108417. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108417>
- Joshi, S. H., Yong, C., & Gyorgy, A. (2022). Inducible plasmid copy number control for synthetic biology in commonly used *E. coli* strains. *Nature Communications*, 13(1), 6691. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34390-7>
- Kanoh, S., Shiraki, K., Wada, M., Tanaka, T., Kitamura, M., Kato, K., & Hirano, A. (2023). Chromatographic purification of histidine-tagged proteins using zirconia particles modified with phosphate groups. *Journal of Chromatography. A*, 1703, 464112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464112>
- Kaplan, O., Zárubová, J., Mikulová, B., Filová, E., Bártová, J., Bačáková, L., & Brynda, E. (2016). Enhanced Mitogenic Activity of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor VEGF₁₂₁ Expressed in *E. coli* Origami B (DE3) with Molecular Chaperones. *PloS One*, 11(10), e0163697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163697>

- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Keller, J., Gerber, R., Del Tito, B. J., Jr, Vannicolo, D., & Arcuri, E. J. (1990). Effects of mutations altering SOS regulation on a nalidixic acid-inducible system for the production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology*, 6(3), 199–206. <https://doi.org/10.1007/BF01577697>
- Khananisho, D., Cumming, A. J., Kulakova, D., Shilling, P. J., & Daley, D. O. (2023). Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. *Current Genetics*, 69(4-6), 277–287. <https://doi.org/10.1007/s00294-023-01276-0>
- Kim, H. J., Jeong, H., & Lee, S. J. (2022). Glucose Transport through *N*-Acetylgalactosamine Phosphotransferase System in *Escherichia coli* C Strain. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1047–1053. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05059>
- Kimura, S., Yamamoto, W., Miyamoto, A., Imamura, K., & Futami, J. (2025). Pre-folding purification procedures for inclusion body-derived non-tagged cationic recombinant proteins with multiple disulfide bonds for efficient refolding. *Biotechnology Progress*, 41(3), e3532. <https://doi.org/10.1002/btpr.3532>
- Kopp, J., Bayer, B., Slouka, C., Striedner, G., Dürkop, M., & Spadiut, O. (2023). Fundamental insights in early-stage inclusion body formation. *Microbial Biotechnology*, 16(5), 893–900. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14117>
- Kwon, S. K., Kim, S. K., Lee, D. H., & Kim, J. F. (2015). Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific Reports*, 5, 16076. <https://doi.org/10.1038/srep16076>
- Lamer, T., & Vederas, J. C. (2023). Simplified cloning and isolation of peptides from "sandwiched" SUMO-peptide-intein fusion proteins. *BMC Biotechnology*, 23(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00779-5>
- Li, J., Han, Q., Zhang, T., Du, J., Sun, Q., & Pang, Y. (2018). Expression of soluble native protein in *Escherichia coli* using a cold-shock SUMO tag-fused expression vector. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 19, e00261. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00261>
- Lipinszki, Z., VERNYIK, V., Farago, N., Sari, T., Puskas, L. G., Blattner, F. R., Posfai, G., & Gyorfy, Z. (2018). Enhancing the translational capacity of *E. coli* by resolving the codon bias. *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2656–2664. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00332>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Luo, X., Ma, Y., & Xiang, Q. (2025). New frontiers in the production of functional recombinant proteins. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 12(4), 351. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12040351>
- Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2023). Poly-Histidine-tagged protein purification using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). In: Loughran, S.T., Milne, J.J. (eds) Protein Chromatography. *Methods in Molecular Biology* (Humana, New York, NY.), 2699, 193–223. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_11
- Lübke, C., Boidol, W., & Petri, T. (1995). Analysis and optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* using the inducible pho A promoter of the *E. coli* alkaline

- phosphatase. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(10):923–928. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00130-j](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00130-j)
- Makino, T., Skretas, G., & Georgiou, G. (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 10, 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-32>
- Manen, D., & Caro, L. (1991). The replication of plasmid pSC101. *Molecular Microbiology*, 5(2), 233–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02103.x>
- Mellies, J., Brems, R., & Villarejo, M. (1994). The *Escherichia coli* proU promoter element and its contribution to osmotically signaled transcription activation. *Journal of Bacteriology*, 176(12), 3638–3645. <https://doi.org/10.1128/jb.176.12.3638-3645.1994>
- Menart, V., Jevsevar, S., Vilar, M., Trobis, A., & Pavko, A. (2003). Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR, PL promoters from phage lambda. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 181–190. <https://doi.org/10.1002/bit.10660>
- Millard, P., Enjalbert, B., Uttenweiler-Joseph, S., Portais, J. C., & Létisse, F. (2021). Control and regulation of acetate overflow in *Escherichia coli*. *eLife*, 10, e63661. <https://doi.org/10.7554/eLife.63661>
- Mishra, V. (2020). Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protein & Peptide Science*, 21(8), 821–830. <https://doi.org/10.2174/1389203721666200606220109>
- Mooney, J. T., Fredericks, D. P., Christensen, T., Bruun Schiødt, C., & Hearn, M. T. (2015). N-terminal processing of affinity-tagged recombinant proteins purified by IMAC procedures. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 28(7), 401–412. <https://doi.org/10.1002/jmr.2456>
- Morão, L. G., Manzine, L. R., Clementino, L. O. D., Wrenger, C., & Nascimento, A. S. (2022). A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PloS One*, 17(7), e0271403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271403>
- Neef, J., van Dijk, J. M., & Buist, G. (2021). Recombinant protein secretion by *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*: pathways, applications, and innovation potential. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 187–195. <https://doi.org/10.1042/EBC20200171>
- Nemergut, M., Škrabana, R., Berta, M., Plückthun, A., & Sedláč, E. (2021). Purification of MBP fusion proteins using engineered DARPin affinity matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.117>
- Nguyen, H. D., & Phan, T. T. P. (2022). A protocol to enhance soluble protein expression in the cytoplasm of *Bacillus subtilis*. In: Garcia Fruitós, E., Arís Giralt, A. (eds) Insoluble Proteins. *Methods in Molecular Biology* (Humana, New York, NY.), 2406, 233–243. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2_14
- Ni, Z., Li, Z., Wu, J., Ge, Y., Liao, Y., Yuan, L., Chen, X., & Yao, J. (2020). Multi-path optimization for efficient production of 2'-fucosyllactose in an engineered *Escherichia coli* C41 (DE3) derivative. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 611900. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.611900>
- Oscorbin, I. P., Kunova, M. S., & Filipenko, M. L. (2025). Optimization of conditions for production of soluble *E. coli* poly(A)-polymerase for biotechnological applications. *Biology*, 14(1), 48. <https://doi.org/10.3390/biology14010048>
- Ojima-Kato, T. (2025). Advances in recombinant protein production in microorganisms and functional peptide tags. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 89(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae147>
- Okoto, P. S., Sonniata, S., Sakhel, B., Muhoza, D., Adams, P., & Kumar, T. K. S. (2023). A simple purification method for heat-stable recombinant low molecular weight proteins and peptides via

- GST-fusion products. In: Sousa, Â., Passarinha, L. (eds) *Advanced Methods in Structural Biology. Methods in Molecular Biology* (Humana, New York, NY.), 2652, 147–169. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3147-8_8
- Ortega, C., Oppezzo, P., & Correa, A. (2022). Overcoming the solubility problem in *E. coli*: Available approaches for recombinant protein production. In: Garcia Fruitós, E., Arís Giralt, A. (eds) *Insoluble Proteins. Methods in Molecular Biology* (Humana, New York, NY.), 2406, 35–64. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2_2
- Ouyang, R., Gu, H., Yuan, J., Sun, Y., & Zhao, X. (2025). Global trends in recombinant human growth hormone for the treatment of idiopathic short stature: a bibliometric analysis. *Frontiers in Medicine*, 12, 1577396. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1577396>
- Packiam, K. A. R., Ramanan, R. N., Ooi, C. W., Krishnaswamy, L., & Tey, B. T. (2020). Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), 3253–3266. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10454-w>
- Parada, C. A., & Mariani, K. J. (1991). Mechanism of DNA A protein-dependent pBR322 DNA replication. DNA A protein-mediated trans-strand loading of the DNA B protein at the origin of pBR322 DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(28), 18895–18906. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55148-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55148-6)
- Paremskaia, A. I., Kogan, A. A., Murashkina, A., Naumova, D. A., Satish, A., Abramov, I. S., Feoktistova, S. G., Mityaeva, O. N., Deviatkin, A. A., & Volchkov, P. Y. (2024). Codon-optimization in gene therapy: promises, prospects and challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1371596. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1371596>
- Pina, A. S., Batalha, Í. L., Dias, A. M. G. C., & Roque, A. C. A. (2021). Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: An overview. In: Labrou, N.E. (eds) *Protein Downstream Processing. Methods in Molecular Biology* (Humana, New York, NY.), 2178, 107–132. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0775-6_10
- Pouresmaeil, M., & Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Archives of Microbiology*, 205(5), 212. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03541-9>
- Qi, W., Jonker, M. J., Teichmann, L., Wortel, M., & Ter Kuile, B. H. (2023). The influence of oxygen and oxidative stress on de novo acquisition of antibiotic resistance in *E. coli* and *Lactobacillus lactis*. *BMC Microbiology*, 23(1), 279. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03031-4>
- Qiao, J., Li, W., Lin, S., Sun, W., Ma, L., & Liu, Y. (2019). Co-expression of Cas9 and single-guided RNAs in *Escherichia coli* streamlines production of Cas9 ribonucleoproteins. *Communications Biology*, 2, 161. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0402-x>
- Quax, T. E. F., Claassens, N. J., Söll, D., & van der Oost, J. (2015). Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Molecular Cell*, 59(2), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.035>
- Ramiro-Martínez, P., de Quinto, I., Lanza, V. F., Gama, J. A., & Rodríguez-Beltrán, J. (2025). Universal rules govern plasmid copy number. *Nature Communications*, 16(1), 6022. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61202-5>
- Reckinger, A. R., Jeong, K. S., Khodursky, A. B., & Hiasa, H. (2007). RecA can stimulate the relaxation activity of topoisomerase I: Molecular basis of topoisomerase-mediated genome-wide transcriptional responses in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 35(1), 79–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl981>
- Restrepo-Pineda, S., Rosiles-Becerril, D., Vargas-Castillo, A. B., Ávila-Barrientos, L. P., Luviano, A., Sánchez-Puig, N., García-Hernández, E., Pérez, N. O., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N.

- A. (2022). Induction temperature impacts the structure of recombinant HuGM-CSF inclusion bodies in thermoinducible *E. coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 59. <https://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/2022.08.004>
- Roots, C. T., Hill, A. M., Wilke, C. O., & Barrick, J. E. (2025). Codon usage modulates the relationship between the burden and yield of protein overexpression. *Journal of Biological Engineering*, 19(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13036-025-00521-z>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rossi, M., Brigidi, P., Gonzalez Vara y Rodriguez, A., & Matteuzzi, D. (1996). Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Research in Microbiology*, 147(3), 133–143. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80213-0](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80213-0)
- Rouches, M. V., Xu, Y., Cortes, L. B. G., & Lambert, G. (2022). A plasmid system with tunable copy number. *Nature Communications*, 13(1), 3908. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31422-0>
- Sánchez, J. M., Carratalá, J. V., Serna, N., Unzueta, U., Nolan, V., Sánchez-Chardi, A., Voltà-Durán, E., López-Laguna, H., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., & Vazquez, E. (2022). The poly-Histidine tag H6 mediates structural and functional properties of disintegrating, protein-releasing inclusion bodies. *Pharmaceutics*, 14(3), 602. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030602>
- Schlegel, S., Genevaux, P., & de Gier, J. W. (2015). De-convoluting the genetic adaptations of *E. coli* C41(DE3) in Real Time reveals how alleviating protein production stress improves yields. *Cell Reports*, 10(10), 1758–1766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.029>
- Schuster, L. A., & Reisch, C. R. (2022). Plasmids for controlled and tunable high-level expression in *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(22), e00939-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00939-22>
- Schütz, A., Bernhard, F., Berrow, N., Buyel, J. F., Ferreira-da-Silva, F., Haustraete, J., van den Heuvel, J., Hoffmann, J. E., de Marco, A., Peleg, Y., Suppmann, S., Unger, T., Vanhoucke, M., Witt, S., & Remans, K. (2023). A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protocols*, 4(4), 102572. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1), 214. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>
- Singh, A. (2020). Design of improved pET expression plasmids. *Nature Methods*, 17(7), 655. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0904-y>
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14, 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Snoeck, S., Guidi, C., & De Mey, M. (2024). "Metabolic burden" explained: stress symptoms and its related responses induced by (over)expression of (heterologous) proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02370-9>
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90855-z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-z)
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>

- Studier, F. W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. In: Chen, Y. (eds) Structural Genomics. *Methods in Molecular Biology* (Humana Press, Totowa, NJ.), 1091, 17–32. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_2
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Sutcliffe, J. G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(8), 3737–3741. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.8.3737>
- Tahara, N., Tachibana, I., Takeo, K., Yamashita, S., Shimada, A., Hashimoto, M., Ohno, S., Yokogawa, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., & Ebihara, A. (2021). Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with Glucose and Lactose Additives. *Protein and Peptide Letters*, 28(10), 1180–1190. <https://doi.org/10.2174/0929866528666210805120715>
- Takahashi, M., & Aoyagi, H. (2020). Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. *AMB Express*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01013-7>
- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today. Technologies*, 38, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- Unver, Y., & Dagci, I. (2024). *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) as a powerful yeast expression system for biologics production. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 16(2), 19. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1602019>
- Vijayakumar, V. E., & Venkataraman, K. (2024). A systematic review of the potential of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as an alternative host for biologics production. *Molecular Biotechnology*, 66(7), 1621–1639. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00803-1>
- Wang, H., Guo, J., Chen, X., & He, H. (2023). The metabolomics changes in Luria-Bertani broth medium under different sterilization methods and their effects on *Bacillus* growth. *Metabolites*, 13(8), 958. <https://doi.org/10.3390/metabo13080958>
- Wang, Y., Ding, H., Du, P., Gan, R., & Ye, Q. (2005). Production of *phoA* promoter-controlled human epidermal growth factor in fed-batch cultures of *Escherichia coli* YK537 (pAET-8). *Process Biochemistry*, 40(9):3068–3074. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.010>
- Wegerer, A., Sun, T., & Altenbuchner, J. (2008). Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnology*, 8, 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-2>
- Yang, S., Song, L., Wang, J., Zhao, J., Tang, H., & Bao, X. (2024). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of recombinant proteins. *Engineering Microbiology*, 4(1), 100122. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2023.100122>
- Yang, Y., Shahinozzaman, M., Shin, H., Bupp, S., & Sourbier, C. (2025). Impact of structure and formulation changes on the function of insulin products. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1601119. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1601119>
- Yildiz, A. N., Kasapbasi, E. E., Yurtsever, Z., & Yurtsever, M. (2024). DFT study on the His-tag binding affinity of metal ions in modeled hexacationic metal complexes. *ACS Omega*, 9(46), 45920–45925. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05422>
- Yoon, K. P., & Silver, S. (1991). A second gene in the *Staphylococcus aureus* cadA cadmium resistance determinant of plasmid pI258. *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7636–7642. <https://doi.org/10.1128/jb.173.23.7636-7642.1991>

- Zainuddin, H. S., Murali, S. K., & Mansell, T. J. (2026). Engineered stable, antibiotic-free, high-level protein expression in the probiotic chassis *Escherichia coli* Nissle 1917. *Biotechnology and Bioengineering*, 123(3), 776–784. <https://doi.org/10.1002/bit.70130>
- Zarkar, N., Nasiri Khalili, M. A., Khodadadi, S., Zeinoddini, M., & Ahmadpour, F. (2020). Expression and purification of soluble and functional fusion protein DAB389 IL-2 into the *E. coli* strain Rosetta-gami (DE3). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(2), 206–212. <https://doi.org/10.1002/bab.1833>
- Zhang, Z. X., Nong, F. T., Wang, Y. Z., Yan, C. X., Gu, Y., Song, P., & Sun, X. M. (2022). Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01917-y>
- Zhao, M., Vandersluis, M., Stout, J., Haupts, U., Sanders, M., & Jacquemart, R. (2019). Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine*, 37(36), 5491–5503. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.090>
- Zhong, C., Wei, P., & Zhang, Y. -H.P. (2017). Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21(DE3) by selective introduction of synonymous rare codons. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(5), 1054–1064. <https://doi.org/10.1002/bit.26238>

2026 TECNOCIENCIA CHIHUAHUA.

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>