



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD CUAJIMALPA

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

INGENIERÍA CELULAR COMO UNA ALTERNATIVA AL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Daniela Velazquez Gallegos

Director:
Alvaro Raúl Lara Rodríguez

Asesor:
Juan Carlos Sigala Alanís

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Cuajimalpa.

En colaboración con el Dr. Guillermo Gosset Lagarda del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los experimentos realizados para esta tesis se realizaron en:
Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Cuajimalpa.
Cd. de México, México.

Los experimentos fueron dirigidos y asesorados por Dr. Alvaro R. Lara y Dr. Juan C. Sigala, a quienes agradezco su amplio apoyo y confianza.

Se agradece al Dr. Guillermo Gosset y a su grupo de trabajo por su asesoramiento y apoyo en los experimentos realizados.

De igual forma, agradezco al jurado por su tiempo y disposición para la revisión de este trabajo.

Este trabajo contó con financiamiento CONACyT mediante el proyecto A1-S-8646; una beca de maestría (No. De referencia 003760) otorgada por CONACyT; apoyo para la participación en eventos de difusión, así como de inscripción trimestral otorgados por el Acuerdo 08/2020 del Rector General.

DECLARACION DE CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 22 de septiembre del 2020, el que suscribe, Daniela Velazquez Gallegos, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unida Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada “Ingeniería celular como una alternativa al cultivo por lote alimentado para la producción de proteína recombinante” realizada bajo la dirección del Alvaro Raúl Lara Rodríguez y como asesor Juan Carlos Sigala Alanís, y que cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico, de datos o de información general de esta obra, sin el permiso expreso de los directores del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a las direcciones siguientes: alara@correo.cua.uam.mx.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Daniela Velazquez Gallegos

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Daniela Velazquez Gallegos, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Daniela Velazquez Gallegos

DECLARACION DE NO LUCRO

La que suscribe, Daniela Velazquez Gallegos, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Daniela Velazquez Gallegos.



Daniela Velazquez Gallegos

RESUMEN

El sobreflujo metabólico es una limitación para alcanzar altas densidades celulares. Para evitarlo, se han diseñado varias estrategias, que van desde cultivos alimentados por lotes hasta ingeniería celular. En este trabajo se evaluó una biblioteca de 12 cepas de *E. coli* modificadas genéticamente derivadas de W3110 para la producción de GFP. Estas cepas tienen deleciones únicas o combinadas en genes que codifican para componentes del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (*manX*, *malX*, *nagE*, *bglF*, *ptsG*, *ptsHIcrr*), y también en genes no pertenecientes a este sistema (*galP* y *mglABC*). Tales mutaciones dan como resultado una importación de glucosa más lenta y, en consecuencia, una fuerte reducción de la producción de acetato. Todas las cepas se transformaron con el plásmido pWF14, que expresa constitutivamente GFP. Los cultivos en placas multipozo se realizaron en medio mineral adicionado con glucosa y extracto de levadura. La cepa denominada WHIC (*ptsHI*, Δ *mglABC*) mostró una fluorescencia específica de GFP 237 % mayor en comparación con la cepa parental. Se diseñó una estrategia de cultivo por lotes para la cepa WHIC, en la que las concentraciones de glucosa y extracto de levadura eran 100 y 50 g L⁻¹, respectivamente. Esto permitió una producción rápida de biomasa, seguida de una fase de crecimiento celular lento y alta expresión de GFP, que imita un cultivo de lote alimentado. Esta estrategia se comparó con un cultivo de alimentación por lotes de W3110. La producción de GFP fue un 77 % mayor en los cultivos de WHIC, mientras que se acumuló un 64 % menos de acetato, en comparación con los cultivos modo lote alimentado de W3110. Se demostró que la ingeniería celular es una alternativa sólida a los cultivos de lotes alimentados para la producción de proteínas recombinantes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 <i>E. coli</i> como fábrica celular.....	13
2.2 Cultivos de alta densidad celular.....	15
2.3 Sobreflujo metabólico y la acumulación de acetato.....	16
2. 4 Estrategias para evitar el sobreflujo metabólico.....	21
2.4.1 Cultivos por lote alimentado.....	21
2.4.2 Ingeniería metabólica para reducir la acumulación de acetato en <i>E. coli</i>	23
2.4.3 El PTS y su modificación para reducir el sobreflujo metabólico en <i>E. coli</i> ...	26
2.5 Cultivos por lote empleando cepas modificadas para alcanzar altas densidades celulares	31
2.6 Potencial biotecnológico de cepas con diferentes capacidades de transporte de glucosa.....	33
2.7 GFP como proteína modelo de producción.....	35
3. HIPÓTESIS.....	37
4. OBJETIVOS.....	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1 Microorganismos y plásmido utilizados.....	38
5.2 Preparación de células electrocompetentes.....	39
5.3 Transformación.....	40
5.4 Condiciones de cultivo.....	40
5.4.1 Cultivos en placas multipozos.....	40

5.4.2 Cultivos modo lote alimentado.....	41
5.4.3 Cultivos modo lote a altas concentraciones iniciales de glucosa.....	42
5.5 Herramientas analíticas.....	42
5.5.1 Determinación de la concentración celular.....	42
5.5.2 Cuantificación de proteína.....	43
5.5.3 Medición de fluorescencia de GFP fuera de línea.....	44
5.5.4 Análisis de metabolitos extracelulares.....	44
5.6 Cálculos cinéticos y estequiométricos.....	45
5.7 Análisis estadístico.....	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1 Cribado de la colección de cepas mutantes en diferentes concentraciones de glucosa.....	47
6.2 Evaluación de WHIC pWF14 en cultivos de alta densidad de celular.....	66
6.2.1 Caracterización del crecimiento de WHIC pWF14.....	66
6.2.2 Comparación de WHIC pWF14 con la cepa silvestre W3110 pWF14 en cultivos de alta densidad celular.....	69
7. CONCLUSIONES.....	74
8. PERSPECTIVAS.....	75
9. BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato en <i>E. coli</i>	17
Figura 2. Tasa de producción específica de acetato y tasa de consumo específico de sustrato.....	21
Figura 3. Proteínas involucradas con el transporte y fosforilación de <i>E. coli</i>	27
Figura 4. Mecanismos de represión catabólica en <i>E. coli</i>	30
Figura 5. Representación de la estructura terciaria de la proteína verde fluorescente de <i>A. victoria</i>	36
Figura 6. Diagrama de pWF14.....	39
Figura 7. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 1 g L ⁻¹ de glucosa y 0.4 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	48
Figura 8. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 10 g L ⁻¹ de glucosa y 4 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	50
Figura 9. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 20 g L ⁻¹ de glucosa y 8 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	52
Figura 10. Luz dispersa de biomasa al final de los cultivos con 1, 10 y 20 g L ⁻¹ de glucosa.....	56
Figura 11. Fluorescencia de GFP al final de los cultivos con 1, 10 y 20 g L ⁻¹ de glucosa.....	57
Figura 12. Fluorescencia de GFP específica de los cultivos con 1, 10 y 20 g L ⁻¹ de glucosa.....	59
Figura 13. Tasa de fluorescencia específica de GFP de los cultivos con 1, 10 y 20 g L ⁻¹ de glucosa.....	60
Figura 14. Correlación entre la fluorescencia y la concentración de GFP obtenida.....	62
Figura 15. Fluorescencia de NADH a lo largo de los cultivos con 10 y 20 g L ⁻¹ de glucosa de W3110, WHIC, WGM y WGMB.....	63
Figura 16. Crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato en duplicados WHIC pWF14 con 120 g L ⁻¹ de glucosa y 48 g L ⁻¹	66
Figura 17. Crecimiento y consumo de glucosa en duplicados WHIC pWF14 con 100 g L ⁻¹ de glucosa y 50 g L ⁻¹	67
Figura 18. Crecimiento, acumulación de acetato, producción de GFP y concentración específica de GFP a lo largo de los cultivos de W3110 pWF14 en modo lote alimentado por duplicado y WHIC pWF14 en modo lote por triplicado.....	70
Figura 19. Concentraciones de biomasa y GFP final, rendimiento GFP-biomasa ($Y_{GFP/X}$) y tasa de producción específica de GFP (q_{GFP}) de los cultivos en modo lote alimentado de W3110 pWF14 y modo lote de WHIC pWF14.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos ejemplos de moléculas de interés industrial producidas en <i>E. coli</i>	14
Tabla 2. Colección de cepas mutantes de <i>E. coli</i> generadas por Fuentes, <i>et al.</i> , 2013.....	34
Tabla 3. Tasas específicas de crecimiento global (μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 1 g L ⁻¹ de glucosa y 0.4 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	49
Tabla 4. Tasas de crecimiento específico de cada fase y global (μ_1 , μ_2 , μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 10 g L ⁻¹ de glucosa y 4 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	51
Tabla 5. Tasas de crecimiento específico de cada fase y global (μ_1 , μ_2 , μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 20 g L ⁻¹ de glucosa y 8 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	53
Tabla 6. Cuantificación de GFP en los cultivos con 20 g L ⁻¹ de glucosa y 8 g L ⁻¹ de extracto de levadura.....	61
Tabla 7. Distribución de aminoácidos en la proteína total del extracto de levadura (Laboratorios Britania, S/A) y de <i>E. coli</i> (Beck, <i>et al.</i> 2020). Concentraciones de aminoácidos presentes en el medio mineral enriquecido con 50 g L ⁻¹ de extracto de levadura y cantidad teórica de biomasa formada.....	68

NOMENCLATURA Y ABREVIATURAS

AcCoA	Acetil coenzima A
Ack	Acetato cinasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
CRP	Proteína receptora de AMPc
DO _{600nm}	Densidad óptica medida a 600 _{nm}
g	Gramos
G6P	Glucosa 6-fosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
GFP _r	Estándar de proteína verde fluorescente recombinante
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
L	Litros
min	Minutos
NAD(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP(H)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
OOA	Oxaloacetato
OTR _{max}	Tasa de transferencia de oxígeno máxima
PEP	Fosfoenolpiruvato
PoxB	Piruvato oxidasa
Pta	Fosfotransacetilasa
PTS	Sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa
q_{Ace}	Velocidad específica de producción de acetato
q_{GFP}	Velocidad específica de producción de GFP
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato
rpm	Revoluciones por minuto
S	Concentración de sustrato
t	Tiempo
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
VHb	Hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i>
X	Concentración de biomasa
$Y_{Ace/S}$	Rendimiento acetato-biomasa
$Y_{GFP/X}$	Rendimiento GFP-biomasa
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa-sustrato
μ	Velocidad específica de crecimiento

1. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes es una tecnología bien establecida a nivel industrial. En los casos en que no se requieren modificaciones post-traduccionales complejas, la bacteria *Escherichia coli* es la primera opción para producir proteínas recombinantes. Las mayores productividades se logran en cultivos de alta densidad celular (*v. gr.* concentración de biomasa seca de al menos 40 g L⁻¹), para los cuales se requieren grandes cantidades de sustrato. Generalmente, en los cultivos industriales de *E. coli* se utiliza un medio adicionado con glucosa ya que es la fuente de carbono preferida por esta bacteria.

Una vez en el periplasma, la glucosa es internalizada en el citoplasma mediante el sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PTS). Cuando el PTS se encuentra saturado, la tasa de importe de glucosa supera la capacidad de oxidación de la misma por las células, lo que trae como consecuencia su oxidación parcial a acetato, el cual es exportado al medio (Eiteman & Altman, 2006). La acumulación de acetato es altamente negativa para el bioproceso, por lo que no es común utilizar altas concentraciones de glucosa inicial. Una estrategia tradicional para evitar este fenómeno de “sobreflujo metabólico” es la adición de glucosa a una tasa baja, lo que constituye el principio de operación del lote alimentado. Sin embargo, los procesos por lote alimentado requieren equipo y sistemas de control adicionales, además de favorecer la aparición de gradientes de glucosa como resultado de mezclado deficiente (Lara et al., 2006).

En el presente proyecto, se propone abordar un enfoque de ingeniería celular para alcanzar altas densidades celulares y productividades de proteína recombinante en modo lote con altas concentraciones de glucosa inicial. En particular, se evaluó una librería de mutantes del sistema de transporte de *E. coli* W3110 que despliegan un amplio espectro de velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento. Las cepas mutantes presentan inactivaciones de uno o varios genes codificantes para proteínas relacionadas con el importe de glucosa. Las cepas se transformaron con un plásmido que expresa de manera constitutiva la proteína verde fluorescente (GFP) como proteína modelo.

2. ANTECEDENTES

Dentro de la gran variedad de productos biotecnológicos, los biofármacos tienen una gran relevancia debido a su importancia en el sector de salud humana, además de su impacto económico. En los últimos años se ha observado un incremento continuo en el valor de mercado de los biofármacos. Reportes financieros de La Merie indican que las ventas acumuladas durante el 2014 y el 2017 alcanzaron los 651 billones de dólares (<http://www.lamerie.com>).

La producción de biofármacos a base de proteínas es uno de los motores económicos de la industria farmacéutica. De 2006 a 2015, el 67% de las farmacéuticas tuvieron un aumento de sus utilidades anuales. Incluso contabilizando los costos de investigación y desarrollo las empresas biofarmacéuticas, tuvieron un retorno de 5.4% de 2016 a 2018.

Durante el periodo de enero de 2014 y julio de 2018, se aprobaron 155 biofármacos en Estados Unidos y la Unión Europea. De estos, el 52% fueron nuevos ante el mercado, mientras que el resto se trata de biosimilares, productos reformulados o con indicaciones diferentes y productos previamente aprobados en otros lugares. Dentro de los productos nuevos se cuenta con 71 ingredientes activos diferentes, de los cuales 62 son proteínas recombinantes. 52 de estas proteínas recombinantes son expresadas en líneas celulares de mamíferos, 1 se expresa en un sistema transgénico de mamífero, 5 se producen en *E. coli* y 4 en *S. cerevisiae* (Walsh, 2018). Es probable que los productos biofarmacéuticos a base de proteínas sigan predominando en la industria en el futuro, por lo que es importante que continúe el desarrollo de fábricas celulares con capacidad de producción eficiente y a gran escala.

2.1 *E. coli* como fábrica celular

Algunos de los organismos más utilizados como fábricas celulares incluyen a *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* (Keasling, 2010), así como las líneas celulares 3T3, HeLa, BHK, HepG2, HEK y CHO, las cuales son

células derivadas de embrión de ratón suizo albino, cáncer cérvico-uterino, cáncer de hígado humano, riñón embrionario humano y ovario de hámster chino, respectivamente (Jayapal et al., 2007), siendo las dos últimas las más utilizadas (Rue et al., 2019). Otros organismos utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen a hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*; células de insectos como *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*; así como animales y plantas transgénicas (Demain y Vaishnav, 2009).

A pesar de que *E. coli* típicamente no es utilizada para la producción de proteínas complejas o proteínas que requieran modificaciones postraduccionales, sigue siendo la fábrica celular más empleada a nivel académico e industrial, debido a que existe un gran conocimiento acumulado sobre su genoma, metabolismo y fisiología, aunado a su rápido crecimiento en medios simples y con altos niveles de producción de proteína recombinante (Demain y Vaishnav, 2009). En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de biomoléculas de interés industrial producidas en *E. coli*. La insulina humana producida en *E. coli* por Genentech fue la primera proteína recombinante aprobada para su uso en humanos (Lara, 2011), aunque actualmente las células CHO constituyen el sistema preferencial para la producción de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales (Demain y Vaishnav, 2009).

Tabla 1. Algunos ejemplos de moléculas de interés industrial producidas en *E. coli*.

Cepa de <i>E. coli</i>	Producto	Referencia/ compañía
<i>Interés alimenticio, cosmético y químico</i>		
BT03	Trealosa sintasa	Chen et al., 2012
XH001	L-treonina	Yang et al., 2011
BL21(DE3)	Ácido glutacónico	Djurdjevic et al., 2010
NZN111; SBS110MG	Ácido succínico	Vemuri et al., 2002; Sánchez et al., 2005
FBR11 (B)	Ácido láctico	Dien et al., 2001
ALS848	ácido 3-hidroxi-propanoico	Suthers y Cameron, 2005; Selifonova et al., 2002
<i>Biocombustibles, biopolímeros y productos de bajo valor agregado</i>		

JLX7	Ácido poliláctico (PLA) y P(3HB-co-LA)	Jung et al., 2010; Jung et al., 2011
BW25113	Butanol	Atsumi et al., 2008
DH10B	Isopentanol	Withers et al., 2007
KO11	Etanol	Underwood et al., 2002
<i>Biofármacos aprobados</i>		
	Admelog (inyección de insulina)	Sanofi (Bridgewater, NJ, USA), 2017
	Accretropin (somatropina)	Emergent Biosolutions (Rockville, MD, USA) Cangene (Winnipeg, MB, Canada), 2008
	Natpar (hormona paratiroidea)	Shire Pharmaceuticals Ireland (Dublin), 2017
	Infergen (interferon alfacon-1)	Kadmon Pharmaceuticals (Warrendale, PA, USA), 1997
	Trumenba (vacuna meningocócica del grupo B)	Pfizer (Philadelphia), 2014

2.2 Cultivos de alta densidad celular

Para maximizar los rendimientos de biomasa, así como las productividades de metabolitos o de proteína recombinante, se utilizan cultivos de alta densidad celular (Blunt et al., 2019). Con este tipo de cultivos se puede reducir el volumen de cultivo, el consumo de agua y facilitar la purificación (Lee, 1996), además de ser económicamente viables para su introducción en el mercado (Lara y Ramírez, 2012). Se consideran cultivos de alta densidad celular si se alcanzan concentraciones de biomasa de al menos

40 g L⁻¹ (Borja et al., 2014). Este tipo de cultivos tiene desventajas tales como la inhibición por sustrato, transferencia de oxígeno limitada, formación de productos inhibitorios del crecimiento y disipación de calor limitada (Lee, 1996).

Como ya se mencionó, la transferencia de oxígeno suele ser una limitante en los cultivos de alta densidad celular debido a la baja solubilidad de éste, así como las restricciones operacionales del sistema. La demanda de oxígeno en los cultivos de alta densidad celular excede por mucho la tasa de transferencia de oxígeno máxima (OTR_{max}, por sus siglas en inglés) de los biorreactores convencionales. Sin embargo, el suministro de oxígeno se puede aumentar mediante el incremento en la velocidad de agitación y/o la tasa de aireación, el enriquecimiento del aire con oxígeno, o bien, el suministro de oxígeno puro (Lee, 1996). Otra estrategia que se ha implementado de manera exitosa es el uso de reactores presurizados, pues estos permiten incrementar la tasa de transferencia de oxígeno máxima (Knoll et al., 2005; Matsui et al., 2006). Al aplicar una sobrepresión de 11 bar, la OTR_{max} incrementó un 74 % (Knoll et al., 2007).

Por otro lado, para lograr una alta densidad celular se requieren grandes concentraciones de sustrato (generalmente glucosa). Sin embargo, para *E. coli* no suele utilizarse una concentración que exceda los 20 g L⁻¹ pues, debido a un fenómeno conocido como sobreflujo metabólico en el que se genera un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarbónicos, esta alta concentración de glucosa resulta en una acumulación de acetato tóxica para la célula (Eiteman y Altman, 2006). A pesar de las limitaciones que presentan, los cultivos de alta densidad celular son la mejor opción para la producción industrial, sin embargo, es necesario desarrollar herramientas para combatir las limitaciones ya mencionadas.

2.3 Sobreflujo metabólico y la acumulación de acetato

Existen varias interpretaciones respecto al sobreflujo metabólico. Una de ellas establece que ocurre debido a que la tasa de síntesis de acetil coenzima A (AcCoA) sobrepasa la capacidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) para consumir el metabolito. Debido a esto, la cantidad de AcCoA no consumida por el TCA es llevada a la ruta de

fosfotranscetilasa (Pta)-acetato cinasa (Ack) en donde se sintetiza acetato (Delgado y Liao, 1997). Otra vía de formación de acetato es mediante la enzima piruvato oxidasa (PoxB), la cual cataliza la conversión de piruvato a acetato y CO₂. Se ha propuesto que la acumulación de acetato ocurre por la represión catabólica de la expresión AcCoA sintetasa bajo condiciones de altas tasas de importe de glucosa (Valgepea et al., 2010). Se estima que la acumulación de acetato puede llegar a ser hasta el 15% (en masa) de la glucosa suministrada (estudios realizados en la cepa ML308, derivada de K-12) (Wolfe, 2005). En la figura 1 se muestran las rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato de *E. coli*.

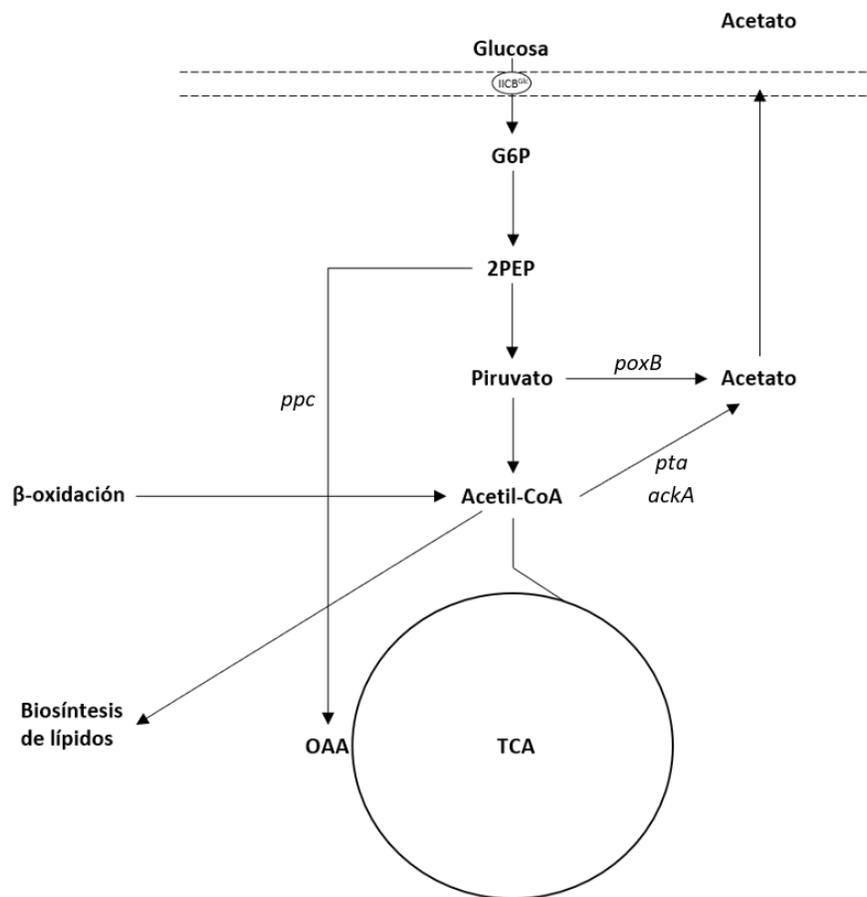


Figura 1. Rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato en *E. coli* y su relevancia con el resto del metabolismo. En la glicólisis, por cada mol de glucosa se generan dos de PEP. Uno de estos es utilizado por el PTS para la fosforilación y el transporte de la glucosa mediante la permeasa IICB^{Glc}. A partir del catabolismo de ácidos grasos se produce acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para la producción de acetato. G6P, glucosa 6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; *ppc*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *poxB*, piruvato oxidasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *ackA*, acetato cinasa.

El sobreflujo metabólico se presenta en una variedad de bacterias, levaduras y células de mamífero (Paczia et al., 2012). En levaduras, al sobreflujo metabólico se le denomina efecto Crabtree y este se define como la represión de la respiración, bajo condiciones aerobias, inducida por la presencia de azúcares como fuente de carbono (Samper, 2019). Similar al sobreflujo metabólico en *E. coli*, el efecto Crabtree representa una desviación de carbono a la producción de etanol al utilizar concentraciones altas de sustrato (Childers et al., 2016). Se ha discutido que este fenómeno es parte de una estrategia de supervivencia de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* para competir con otros microorganismos en el consumo rápido de sustrato (Rozpędowska et al., 2011).

Aún bajo condiciones aerobias, las células de mamífero presentan un alto flujo de glucosa a lactato (Hu et al., 1987). La acumulación de lactato lleva a una disminución indeseable de pH, además de reducir la tasa de crecimiento y la productividad específica de anticuerpos (Glacken et al., 1986). En células cancerígenas y otras células proliferantes o en desarrollo, la tasa de consumo de glucosa incrementa y se forma lactato aún en la presencia de oxígeno, a este fenómeno se le conoce como el efecto Warburg (Liberti y Locasale, 2016).

Bulté y colaboradores (2020) demostraron que el transporte de piruvato a la mitocondria condiciona la eficiencia de la oxidación de la glucosa en células CHO. En este estudio se sobreexpresaron las dos subunidades del transportador de piruvato mitocondrial para facilitar su incorporación a las vías oxidativas, con lo que obtuvieron una reducción del 50 % en la producción de lactato, aunado a un aumento en la tasa de crecimiento específico y en la concentración máxima de células viables. De acuerdo con los resultados, la sobreexpresión de este transportador resultó en un incremento en el flujo metabólico a través de la membrana mitocondrial, así como una reducción del efecto Warburg, sin comprometer la tasa de consumo de glucosa ni la concentración máxima de biomasa.

A pesar de que el sobreflujo metabólico se encuentra descrito, no se cuenta con una explicación completa de su regulación. Enjalbert y colaboradores (2017) realizaron un análisis dinámico del flujo metabólico- ^{13}C , el cual reveló un intercambio bidireccional de acetato entre *E. coli* y su ambiente, donde la ruta Pta-AckA es central para ambas

direcciones de flujo. La modelación cinética de esta ruta predijo que su flujo se encuentra controlado de manera termodinámica por la concentración de acetato extracelular *in vivo*. A partir de una validación experimental se confirmó que es posible reducir, e incluso revertir, la producción de acetato dependiendo de su concentración extracelular.

Paczia y colaboradores (2012) realizaron análisis cuantitativos sobre los exometabolomas de *E. coli*, *C. glutamicum*, *B. licheniformis* y *S. cerevisiae* en cultivos en reactor bajo condiciones controladas. En todos los casos se encontraron con un fenómeno que determinaron como sobreflujo metabólico “extendido”, en el cual se acumulan subproductos primarios tales como etanol o acetato, pero, a diferencia del sobreflujo metabólico, también se acumulan intermediarios metabólicos centrales, los cuales se transportan fuera de la célula posteriormente. Es posible que la conversión de carbono a biomasa o producto se encuentre obstaculizada por las actividades enzimáticas máximas, restricciones termodinámicas y por regulaciones metabólicas del TCA y glicólisis, lo cual puede llevar a una acumulación de intermediarios.

Zhuang y colaboradores (2011) modificaron el modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* ya existente (Feist et al, 2007) para incluir una restricción de la membrana citoplasmática, basada en la hipótesis de que existe una competencia en el espacio membranal entre transportadores de glucosa y proteínas relacionadas con la cadena respiratoria. En este estudio reveló una utilización diferencial de los citocromos y un consumo de glucosa mayor bajo condiciones anaerobias comparado con condiciones aerobias. A partir de las simulaciones realizadas, propusieron que las bacterias modifican la composición de su membrana citoplasmática de tal forma que se mantenga una producción de ATP óptima mediante el cambio entre la fosforilación oxidativa y el nivel de sustrato.

Szenk y colaboradores (2017) propusieron la hipótesis de la membrana inmobiliaria (*Real Estate Membrane*), la cual sugiere que el sobreflujo metabólico en *E. coli* se debe a que el crecimiento rápido hace que las células sean más grandes, reduciendo la relación de superficie/volumen. Esto provoca una disminución del área de membrana disponible para las proteínas respiratorias a pesar de la demanda de oxígeno. Esta limitación requiere que se produzca ATP mediante la producción de acetato, ya que de esta forma se

produce más ATP por unidad de área de membrana. Este estudio demuestra que el comportamiento celular se encuentra limitado por los tamaños y formas de las proteínas de la célula.

Un estudio realizado por Molenaar y colaboradores (2009) sugirió que el sobreflujo metabólico es el resultado de una asignación global de recursos celulares, en donde se consideran tanto las eficiencias enzimáticas, como el rendimiento global de las rutas metabólicas para obtener un crecimiento óptimo sujeto a diferentes condiciones. Esto da noción a que el proceso fermentativo puede ser más eficiente en términos del proteoma, que la respiración. Basan y colaboradores (2015) propusieron y validaron que el costo proteómico de la generación de energía por respiración supera el de la fermentación, lo cual lleva a la producción de acetato bajo condiciones de alto crecimiento. Esta teoría fue incorporada al análisis de balances de flujo, obteniendo un modelo capaz de predecir de manera cuantitativa el inicio y el alcance del sobreflujo metabólico en varias cepas de *E. coli* (Zeng y Yang, 2019).

Bajo condiciones aerobias, *E. coli* presenta una alta tasa de consumo específico de sustrato (q_s) así como una alta tasa de crecimiento específico (μ) y, sin importar la disponibilidad de oxígeno, la bacteria tiene una tasa de consumo de oxígeno límite (Varma y Palsson, 1994), la cual corresponde a la tasa de crecimiento específico y tasa de consumo específico de sustrato críticas en donde comienza la acumulación de acetato (μ_{crit} y q_{scrit} , respectivamente) debido al sobreflujo metabólico (Fig. 2).

La producción de acetato en *E. coli* es indeseable debido a que, además de representar un desperdicio de carbono, concentraciones ca. 1 g L^{-1} resultan perjudiciales para la producción de biomasa y de proteína recombinante (Continero et al., 2000). El acetato tiene un impacto negativo en la estabilidad de proteínas intracelulares, induce respuestas de estrés (Han & Eiteman, 2019) y su acumulación lleva a una acidificación del medio lo que podría llevar a la lisis celular (Cherrington, 1991). Para solucionar el problema de la producción problema se han explorado estrategias como la alimentación controlada y la modificación genética de cepas. También se han generado cepas mutantes con la capacidad de importar glucosa reducida con la finalidad de reducir la producción de acetato (Chou y Bennet, 1994).

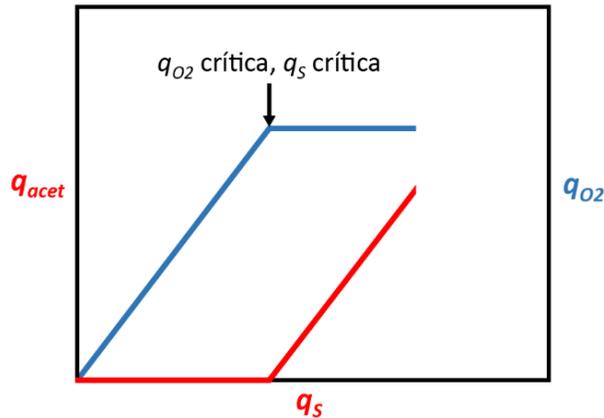


Figura 2. La tasa de producción específica de acetato (q_{acet}) en *E. coli* incrementa cuando la bacteria presenta una tasa de consumo específico de sustrato por arriba de un valor determinado (q_{Scrit}). La q_{Scrit} también corresponde a la tasa de consumo de oxígeno límite q_{O_2crit} . Adaptado de Eiteman y Altman, 2006.

2. 4 Estrategias para evitar el sobreflujo metabólico

2.4.1 Cultivos por lote alimentado

Es difícil llegar a altas densidades celulares en cultivos por lote, pues la elevada concentración de glucosa requerida con llevaría la acumulación de acetato (Lara et al., 2008). Una de las opciones para evitar los efectos negativos del acetato en el medio, es el uso de reactores con diálisis o de membrana para eliminar el metabolito tóxico producido. Märkl y colaboradores (1993) demostraron el potencial de este tipo de reactores en cultivos de alta densidad celular de *E. coli*, con los que llegaron a una concentración de biomasa de 171 g L^{-1} . Sin embargo, una gran cantidad de sustrato se perdió en el efluente dializado.

Otra estrategia para realizar cultivos de alta densidad celular y evitar el sobreflujo metabólico es la operación en modo lote alimentado. En este modo de operación el sobreflujo metabólico se puede evitar mediante el control de la μ , ya que ésta se puede disminuir al limitar nutrientes esenciales tales como la fuente de carbono o de nitrógeno (Riesenberg et al., 1991).

Los cultivos por lote alimentado consisten en una fase lote de corta duración y posteriormente una fase de alimentación de sustrato o medio completo. En estos cultivos, la tasa de alimentación determina tanto la μ como la q_s ; esta tasa puede ser constante o con un incremento ya sea lineal o exponencial de tal forma que se evite el sobreflujo metabólico. En la alimentación exponencial, la tasa de alimentación incrementa en proporción al crecimiento celular, de tal forma que se mantenga a una μ determinada y que la concentración de sustrato en el medio sea igual a cero (Korz et al., 1995). Esta tasa de alimentación se puede determinar mediante la siguiente ecuación (Ec. 1) (Doran, 1995):

$$F = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{x/s}} + m_s \right) \frac{xV e^{\mu_{set}(t)}}{S_i} \quad (Ec. 1)$$

Donde F es la tasa de alimentación, μ_{set} es la tasa de crecimiento específica deseada, $Y_{x/s}$ es el rendimiento biomasa-sustrato, m_s se refiere al coeficiente de mantenimiento, x y V son la concentración de biomasa y el volumen actuales respectivamente, t es el tiempo y S_i es la concentración de sustrato en la entrada.

A pesar de que este modo de cultivo se ha implementado de manera exitosa en la industria, presenta algunas desventajas como una larga duración debido a los bajos valores de q_s y μ , lo cual puede llevar a una baja productividad global, además de requerir esquemas de control adicionales y equipo suplementario. De igual forma, pueden existir gradientes de glucosa debido a un mezclado imperfecto, lo que lleva a una serie de respuestas fisiológicas indeseables, ya que podrían impactar de manera negativa al proceso (Lara et al., 2008).

Generalmente los cultivos por lote alimentado se realizan en reactores instrumentados. Sin embargo, se han desarrollado estrategias que permiten simular un lote alimentado en matraces agitados y en placas multipozo. La empresa Enpresso GmbH (Berín, Aelmania) desarrolló un medio de cultivo en el cual la glucosa se libera de manera controlada mediante la adición de la enzima glucoamilasa (Panula-Perälä et al., 2008).

Con este medio se han alcanzado concentraciones celulares de hasta 15 g L⁻¹, y se han obtenido mayores rendimientos de proteínas recombinantes y ADN plasmídico (ADNp) comparado con otros medios comúnmente utilizados (Krause et al., 2010; Ramírez et al., 2016; Galindo et al., 2016; Chrast et al., 2018).

Una estrategia similar en la que no se requiere un equipamiento adicional para realizar la alimentación controlada, es el uso de discos de elastómero de silicona que contienen cristales de glucosa. Estos fueron desarrollados por Jeude y colaboradores (2006), y los estudiaron en cultivos de *Hansenula polymorpha*, obteniendo rendimientos de biomasa similares a reactores equipados con bomba de alimentación. Utilizando este mismo sistema, Habicher y colaboradores (2019) evaluaron la producción de proteasas en *B. licheniformis* bajo limitación de glucosa y de nitrógeno simulando un lote alimentado. Con esta estrategia se alcanzó una DO_{600nm} máxima de 14.5 y se evitó la represión de producción de proteasas por amonio y glucosa, además de incrementar los rendimientos producto-sustrato entre 1.5 y 2.1 veces comparados con los cultivos por lote.

2.4.2 Ingeniería metabólica para reducir la acumulación de acetato en *E. coli*

Además del uso de estrategias operacionales tales como los cultivos en lote alimentado, la producción de acetato se puede reducir mediante la modificación genética de rutas relacionadas con su síntesis (Eiteman y Altman, 2006). Las cepas B de *E. coli* tienen activado la ruta del glioxilato, por lo que producen menos acetato que las cepas derivadas de K-12 (Phue y Shiloach, 2004). Existen tres estrategias principales para reducir la producción de acetato: la primera es un enfoque en el cual se disminuye directamente el consumo de glucosa, la segunda es reducir el flujo de carbono hacia el acetato y la tercera aborda los mecanismos metabólicos y regulatorios que llevan a la producción de acetato (Eiteman y Altman, 2006).

El ciclo de los ácidos tricarbóxicos juega un papel muy importante en la formación de acetato. A partir de que se forma el piruvato, el flujo de carbono puede ser dirigido al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, o bien, a la producción de acetato mediante los genes de las enzimas acetato cinasa (*ackA*), fosfotransacetilasa (*pta*), acetil-CoA sintasa (*acs*) y piruvato oxidasa (*poxB*) (De Mey et al., 2006). Un enfoque directo para reducir la formación de acetato es eliminar las enzimas fosfotransacetilasa y/o la acetato cinasa

(Bauer et al., 1990). Otro enfoque se basa en el uso de ARN antisentido para bloquear de manera parcial la síntesis de las enzimas fosfotransacetilasa y acetato cinasa (Kim y Cha, 2003).

El acetato también puede ser dirigido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante la enzima piruvato carboxilasa. Esta enzima no se encuentra de manera nativa en *E. coli* y puede carboxilar directamente el piruvato a oxaloacetato (Gokarn et al., 2001). March y colaboradores (2002) produjeron un 68% más de proteína modelo (β -galactosidasa) y observaron una disminución alrededor del 60% en la producción de acetato en una cepa que expresa la enzima piruvato carboxilasa.

Veit y colaboradores (2007) identificaron que las enzimas succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, aconitasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, las cuales forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, así como el operón *acs-yjch-actP*, se correlacionan de manera negativa con la formación de acetato. En función de estos resultados, generaron una cepa de *E. coli* con una mayor actividad específica de las enzimas succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa. Esta cepa mantuvo una alta tasa de consumo de glucosa, a la vez que produjo una menor cantidad de acetato y presentó un mayor flujo de carbono a la formación de CO₂, comparada con la cepa parental MG1655.

El NAD⁺ tiene un papel importante en el metabolismo, ya que es una coenzima para más de 300 reacciones redox. El NAD⁺ es utilizado como coenzima durante la glicólisis y se convierte en NADH+H⁺. Mediante la reducción del oxígeno o de otro producto oxidante, la célula regenera el NAD⁺ a partir del NADH+H⁺ producido (De Mey et al., 2006). Tanto la glicólisis como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos generan NADH, mientras que en la síntesis de acetato se consume, por lo que es posible que la acumulación de NADH a altas tasas de consumo de glucosa, conduzca a la célula a formar acetato para modular el equilibrio redox (Vemuri et al., 2006a). El cociente NADH+H⁺/NAD⁺ regula la expresión de algunas enzimas tales como alcohol deshidrogenasa, al igual que la actividad de otras como el complejo de piruvato deshidrogenasa (Berríos-Rivera et al., 2002). Vemuri y colaboradores revelaron que la formación de acetato debido al sobreflujo metabólico ocurre cuando se llega al cociente NADH+H⁺/NAD⁺ crítico de 0.06. La expresión de una

NADH oxidasa heteróloga, junto con la eliminación de *arcA* resultó en un incremento en el flujo glicolítico y, de manera sorprendente, se eliminó la producción de acetato a pesar de presentar una q_s de $1.5 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, siendo la q_s^{crit} de la cepa nativa de $0.9 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La acetilación de proteínas en residuos de lisina es un fenómeno ampliamente observado, sin embargo, su entendimiento es escaso. Esta modificación proteica se ha relacionado principalmente a la regulación transcriptómica. Las enzimas involucradas en la acetilación y desacetilación de proteínas ya se han descrito en una amplia variedad de bacterias (Castaño-Cerezo et al., 2014). Varios estudios de proteómica han revelado que la acetilación es abundante en *E. coli* (Zhang, et al., 2009). CobB fue la primera desacetilasa bacteriana descrita y es la única conocida en *E. coli* (Castaño-Cerezo, et al., 2014), ésta es capaz de desacetilar residuos de acetil-lisina utilizando NAD^+ como sustrato (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

Castaño-Cerezo y colaboradores (2014) analizaron el acetiloma en mutantes de *E. coli* *cobB*⁻ y *patZ*, este último gen codifica para una acetiltransferasa. Se identificaron y cuantificaron más de 2000 péptidos acetilados pertenecientes a 809 proteínas, de las cuales cerca del 65% están relacionadas al metabolismo. En este estudio demostraron que CobB regula a la enzima acetil-CoA sintetasa (*acs*), la cual es más activa en su forma desacetilada. El efecto de eliminar *cobB* y *patZ* depende del fondo genético. La eliminación de *cobB* en *E. coli* K-12 y BL21 incrementó la producción de acetato, mientras que la eliminación de *patZ* resultó en una eliminación de sobreflujo de acetato en BL21, sin embargo, K-12 no presentó este efecto. Esto puede deberse, entre otros factores, a que la actividad de acetil-CoA sintetasa se encuentra mejor regulada por la acetilación en BL21 que en K-12 y a que la expresión de *acs* durante el crecimiento exponencial no se encuentra reprimida en BL21 debido a una producción de AMPc (Castaño-Cerezo, et al., 2015).

Como ya se mencionó, el sobreflujo metabólico no está únicamente relacionado con la q_s , pues también interviene la capacidad de la célula para oxidar completamente la glucosa en CO_2 (Perrenoud y Sauer, 2005), lo cual se ve reflejado en la tasa de consumo específico de oxígeno (q_{O_2}). La hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) expresada en *E. coli*, es una proteína transmembranal que captura el oxígeno y lo transfiere a oxidasas

terminales (Hwang et al., 2001). La característica principal de esta hemoglobina es que, a pesar de que su constante de asociación de O₂ es similar a la de otras hemoglobinas, su constante de disociación es considerablemente más alta (Wei y Chen, 2008) lo que indica que VHb es capaz de entregar de manera eficiente el O₂ a los citocromos, mejorando la respiración aerobia, lo que provocará una regeneración de NAD⁺ más rápida, activando el ciclo de los ácidos tricarbónicos y disminuyendo la producción de acetato (Pablos et al., 2014).

2.4.3 El PTS y su modificación para reducir el sobreflujo metabólico en *E. coli*

Debido a que las altas tasas de transporte de glucosa están estrechamente relacionadas con la producción de acetato, una de las estrategias para reducir su acumulación se basa en limitar el consumo de sustrato, un enfoque similar a los cultivos por lote alimentado. El sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) está involucrado en el transporte y fosforilación de varios carbohidratos, en la quimiotaxis y en la regulación de varias rutas metabólicas (De Mey et al., 2006).

Al igual que otras bacterias gram-negativas, *E. coli* cuenta con dos membranas concéntricas que rodean al citoplasma. La forma en la que *E. coli* puede controlar el flujo de moléculas a su interior y exterior es mediante la síntesis de proteínas que forman canales. Las proteínas de membrana externa OmpC y OmpF son las más abundantes bajo condiciones típicas de laboratorio (Nikaido, 1996) y bajo condiciones de limitación de glucosa, la síntesis de la glicoporina LamB es inducida (Death, et al., 1993) (figura 3). La glucosa es el sustrato más utilizado en la industria para cultivos de *E. coli* ya que es la fuente de carbono preferida por esta bacteria. Una vez dentro del periplasma, la glucosa puede ser internalizada en el citoplasma mediante el PTS.

El PTS se compone de una proteína soluble y no azúcar-específica enzima I (EI) y de la proteína acarreadora de fosfohistidina (Hpr). Esta última mueve el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) a las enzimas IIA y IIB. También se encuentran otros componentes como el IIC y IID que constituyen permeasas que transportan moléculas de azúcar, las cuales son fosforiladas por el componente IIB (Gosset, 2005). La glucosa es importada mediante el complejo enzimático de glucosa II (II^{Glc}), el cual incluye la enzima IIA^{Glc} y la permeasa IICB^{Glc} (Misset, et al., 1983). Se ha reportado que el complejo

de manosa (II^{Man}) también es capaz de transportar glucosa. Este complejo está compuesto por la enzima IIAB^{Man} y por la permeasa IICD^{Man} (Curtis y Epstein, 1975) (figura 3).

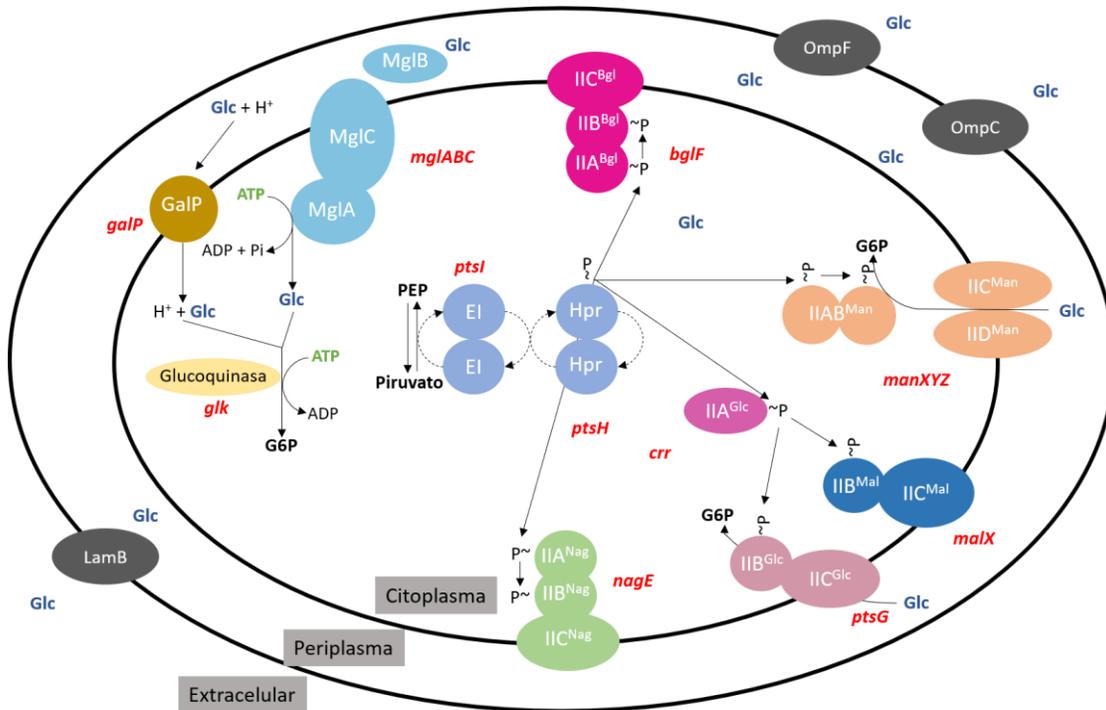


Figura 3. Proteínas involucradas con el transporte y fosforilación de *E. coli*. OmpF, OmpC y LamB son proteínas de la membrana externa. GalP, galactosa: H^+ simporter; MglABC, componentes del transportador ABC de alta afinidad de galactosa/glucosa. EII, enzima I; Hpr, proteína acarreadora de fosfohistidina; IICB^{Glc} , glucosa permeasa; $\text{IIABC}^{\text{Bgl}}$, componentes del complejo PTS beta-glucósido; IIAB^{Man} y IICD^{Man} , componentes del complejo PTS manosa; IIBC^{Mal} , componentes del completo PTS maltosa; $\text{IIABC}^{\text{Nag}}$, componentes del complejo PTS N-acetilglucosamina; adaptado de Fuentes et al., 2013.

La eliminación de genes pertenecientes al PTS elimina la producción de acetato, sin embargo, reduce la tasa de crecimiento máxima un 40% o más (Sigüenza et al., 1999). La disminución de la tasa de crecimiento en cepas con deleciones en genes PTS se puede contrarrestar mediante la mejora simultánea de algún sistema de transporte de glucosa alternativo, por ejemplo, la sobreexpresión del gen *galP*, el cual codifica para una galactosa permeasa (De Anda et al., 2006).

Otra forma de modificar la función del PTS es mediante la regulación del gen *ptsG*, el cual codifica para la enzima específica para glucosa IIA^{Glc}. El regulador ArcA reprime la expresión de *ptsG*, por lo que la delección de *arcA* incrementó alrededor de dos veces la expresión del gen *ptsG*. Por otro lado, la sobreexpresión de *arcA* disminuyó el consumo de glucosa lo cual llevó a una disminución en la acumulación de acetato (Jeong et al., 2004).

Un enfoque más es sobreexpresar la proteína Mcl, la cual es un regulador global del consumo de carbohidratos y reprime el PTS (Kimata et al., 1998; Kim et al., 1999). Cho y colaboradores (2005) modificaron la región del promotor del gen *mcl* para aumentar su expresión y observaron una disminución del 50% en la producción de acetato, así como un incremento importante en los rendimientos de proteína en cultivos en matraz agitado utilizando medio complejo.

Chou y colaboradores (1994) demostraron que una cepa mutante de *E. coli* con el complejo PTS de glucosa (*ptsG*) inactivo es capaz de crecer en glucosa con una tasa correspondiente al 80% de lo observado en una cepa silvestre. Esta estrategia permitió disminuir el flujo glicolítico, lo que llevó a una menor acumulación de acetyl-CoA. Por otro lado, Han y colaboradores (2004) encontraron un incremento en la producción de biomasa y de proteína recombinante como resultado de la eliminación de *ptsG*, ya que al reducir el flujo glicolítico se redujo la acumulación de acetato, evitando el desperdicio de carbono.

Se ha observado que en cepas de *E. coli* con el sistema PTS inactivo, proteínas relacionadas con el transporte de galactosa son inducidas y son capaces de importar glucosa (Flores et al., 2005). Esto también se ha observado en cultivos de *E. coli* en condiciones de limitación de glucosa (Death y Ferenci, 1994). Uno de estos genes inducidos es *galP*, el cual codifica para el cotransporte paralelo GalP (McDonald, et al., 1997). Los genes *mglABC* codifican para una proteína de unión al ATP, una proteína de unión al periplasma de galactosa/glucosa y una proteína intramembranal de transporte respectivamente. Estas proteínas, las cuales también se inducen bajo limitación de glucosa, son parte del sistema Mgl de alta afinidad de transporte ABC (Death y Ferenci 1994).

SgrS es un ARN pequeño de *E. coli* que regula la expresión del transportador de glucosa IICB^{Glc}, por lo que también regula el consumo de glucosa. Negrete y colaboradores (2010) estudiaron el efecto de altas concentraciones de glucosa (40 g L⁻¹) en los niveles de transcripción del SgrS y del ARN mensajero *ptsG* en las cepas de *E. coli* MG1655, JM109 y BL21. En este estudio encontraron que la transcripción de *sgrS* se regula diferente en BL21 que en las cepas derivadas de K-12 (MG1655 y JM109). En las cepas derivadas de K-12, la transcripción de *sgrS* fue más baja, lo cual contribuye a una mayor concentración del transportador y a un mayor consumo de sustrato; mientras que en BL21 ocurrió lo contrario.

Una posible explicación al incremento en la transcripción de *sgrS* es la acumulación de intermediarios de la vía glicolítica, lo que podría indicar un sobreflujo de glucosa. Estos resultados sugieren que BL21 tolera altas concentraciones de glucosa no solo por su metabolismo eficiente, si no por su capacidad de controlar el transporte de glucosa regulada por SgrS. A partir de estos resultados, se sobreexpresó SgrS en las cepas MG1655 y JM109, lo cual resultó en una reducción en la velocidad de consumo de glucosa y por consecuencia, una disminución en la producción de acetato (Negrete et al., 2013).

En *E. coli*, la presencia de glucosa evita la expresión de sistemas catabólicos capaces de utilizar una fuente de carbono diferente a esta. Este fenómeno se conoce como represión catabólica, el cual es el resultado de la inhibición de la capacidad de transporte de sustrato, actividades enzimáticas y expresión genética por la presencia de una fuente de carbono fácil de metabolizar y que permita la tasa de crecimiento más alta (Saier et al., 1996). La enzima IIA^{Glc} se encuentra no fosforilada cuando hay glucosa presente en el medio; en este estado, la enzima se une a varias permeasas no-PTS, inhibiendo el importe de carbohidratos no pertenecientes al PTS, además de unirse a la enzima glicerol cinasa, inhibiendo su actividad (Novotny et al., 1985). La enzima IIB^{Glc} en un estado no fosforilado, se une a la proteína represora Mlc, evitando así la represión de los genes *ptsHI*, *ptsG*, *mlc*, *manXYZ* y *malT* (Plumbridge, 2002).

Por otro lado, si no hay glucosa presente, IIA^{Glc}-P se une a la enzima adenilato ciclasa, activando su capacidad de síntesis por lo que aumenta la concentración de AMPc. El

AMPc se une a la proteína receptora de AMPc (CRP), provocando la inducción de genes reprimidos por catabolitos (Korner et al., 2003). En su estado fosforilado, $IIB^{Glc}\sim P$ no es capaz de unirse a la proteína represora Mlc, por lo que se reprimen los genes involucrados en el consumo de glucosa (Plumbridge, 2002). Al igual que IIB^{Glc} , los componentes EI y Hpr tienen funciones reguladoras. Hpr activa el enzima glucógeno fosforilasa (Seok et al., 2001), mientras que en su estado fosforilado ($Hpr\sim P$) tiene un efecto similar sobre BglG, el cual activa el operón *bgl* que codifica proteínas involucradas en el consumo de carbohidratos β -glucosídicos (Görke & Rak, 1999). Finalmente, la enzima EI en su estado no fosforilado se une a la proteína de quimiotaxis CheA, inhibiendo su autofosforilación (Lux et al., 1995) (figura 4). Debido al papel regulatorio de estos componentes el PTS, es de esperarse que su modificación tenga efectos importantes en la fisiología celular (Gosset, 2005).

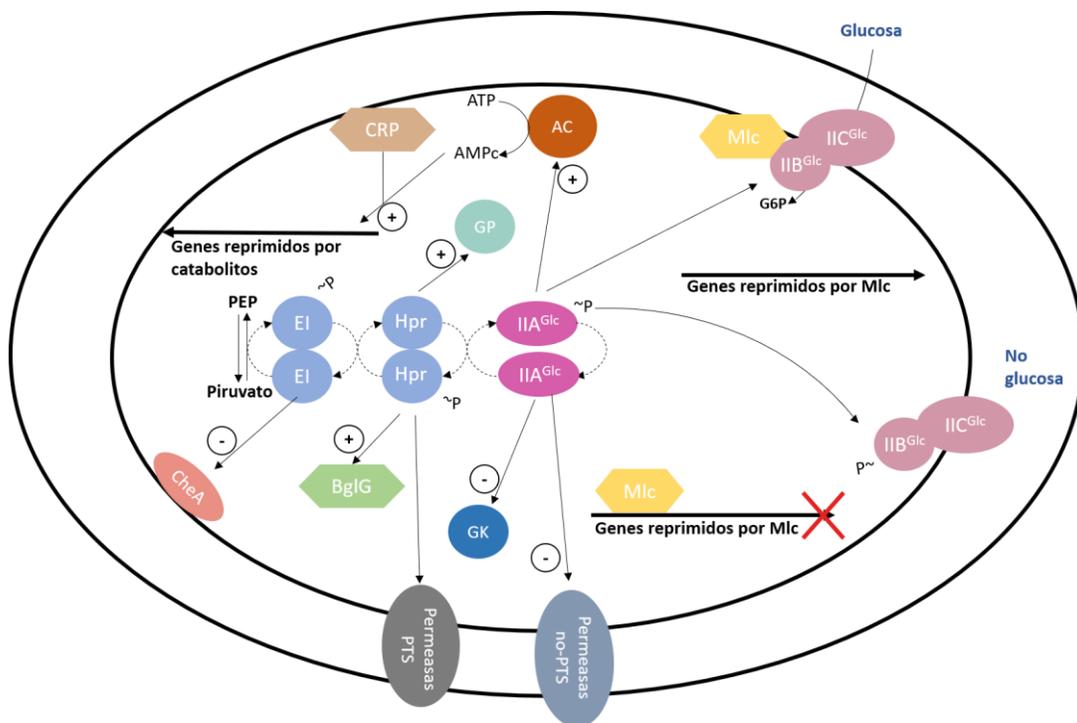


Figura 4. Mecanismos de represión catabólica en *E. coli*. EI, enzima I; Hpr, proteína acarreadora de fosfohistidina; Mlc, proteína represora; CRP, proteína receptora de AMPc; BglG, proteína reguladora del operón *bgl*; AC, adenilato ciclasa; GP, glucógeno fosforilasa; GK, glicerol cinasa; CheA, proteína de quimiotaxis; adaptado de Gosset, 2005.

2.5 Cultivos por lote empleando cepas modificadas para alcanzar altas densidades celulares

La inactivación del sistema PTS, mediante la delección del operón *ptsHI-crr* (el cual contiene los genes que codifican para las proteínas EI, HPr y IIA^{Glu}), aunado a la sobreexpresión cromosomal del gen *galP* bajo el control del promotor *trc*, dio como resultado la cepa VH32GalP⁺. Esta cepa modificada presenta una menor tasa de producción de acetato comparada con la cepa nativa W3110, así como una producción de GFP cuatro veces mayor que la obtenida con W3110 (De Anda et al., 2006). De igual forma, Lara y colaboradores (2008) evaluaron la producción de GFP cepa VH32GalP⁺ en lote y la compararon con la producción en la cepa W3110 en lote alimentado. En este estudio demostraron que tanto la alta densidad celular, como altas concentraciones de proteína recombinante, se pueden obtener en cultivos por lote simple al lograr evitar la producción de acetato.

La cepa VH33 (VH32GalP⁺ sin el *cassette* de resistencia a kanamicina) fue evaluada por Knabben y colaboradores (2010) en un cultivo por lote en un reactor presurizado, en donde a lo largo del cultivo, la presión fue incrementando de tal forma que se mantuviera la tensión de oxígeno disuelto por arriba del 30% de la saturación del aire, alcanzando la tasa de transferencia de oxígeno más alta obtenida en cultivos por lote (451 mmol L⁻¹ h⁻¹) hasta esa fecha con este tipo de reactores. A pesar de que la concentración de glucosa inicial fue de 130 g L⁻¹, la concentración de acetato fue de 0.35 g L⁻¹ y obtuvieron una concentración de biomasa de 48 g L⁻¹, así como una productividad promedio de 2.10 g L⁻¹ h⁻¹.

La cepa VH33 también fue evaluada por Soto y colaboradores (2011) para la producción de ADN plasmídico (ADNp), empleando el plásmido pHN, el cual es una vacuna experimental contra las paperas, en cultivos por lote con 100 g L⁻¹ de glucosa. La cepa nativa W3110 produjo 17 mg L⁻¹ de plásmido y 5.3 g L⁻¹ de acetato, mientras que VH33 produjo 40 mg L⁻¹ de pHN y únicamente 2 g L⁻¹ de acetato. Borja y colaboradores (2012) compararon la producción de ADNp en la cepa productora DH5 α con VH33 y derivadas de esta con los genes *endA*, *recA*, *deoR* y *nupG* inactivados de manera independiente y en combinación. En altas concentraciones de glucosa (100 g L⁻¹), la triple mutante VH33

Δ *recA deoR nupG* produjo 186 mg L⁻¹ de ADNp, 40 g L⁻¹ de biomasa y 2.2 g L⁻¹ de acetato, mientras que la cepa DH5 α produjo únicamente 70 mg L⁻¹ de ADNp y acumuló 9.5 g L⁻¹ de acetato.

Bäcklund y colaboradores (2007) generaron tres cepas con mutaciones en los genes *ptsG*, *manX* y ambas. Al evaluar la producción de proteína recombinante en estas mutantes en cultivos modo lote y compararla con la producción en modo lote alimentado de la cepa parental AF1000, observaron que tanto la producción de proteína recombinante y de acetato, como el consumo de oxígeno era similar para las mutantes y la cepa silvestre. Sin embargo, la cantidad de células que se pudo producir en cultivos modo lote sin producción perjudicial de acetato fue 10 veces mayor al utilizar las mutantes.

La cepa GJT001 con el operón *ptsHI* eliminado fue evaluada por Wong y colaboradores (2007) en cultivos con medio mineral y en medio rico (caldo lisogénico 2X adicionado con glucosa). La eliminación del operón resultó en una disminución importante en la tasa de crecimiento, así como en la tasa de consumo de glucosa, aunado a la eliminación de producción de acetato en los cultivos en medio mineral. Por otro lado, los cultivos en medio complejo presentaron un crecimiento rápido y disminución del 90 % de acumulación de acetato comparada con la cepa parental. La producción de proteína recombinante (GFP) fue evaluada en la cepa mutante en un reactor instrumentado, en este se obtuvo que la cepa modificada presentó una productividad volumétrica 25 veces mayor a la cepa silvestre.

Licon-Cassani y colaboradores (2014) evaluaron la producción de dos compuestos de valor industrial: ácido 3-dehidroshikímico y ácido shikímico, en cepas de *B. subtilis* PTS⁻ y con la enzima piruvato cinasa inactiva (PYKA⁻). Comparada con la cepa nativa, los rendimientos de ácido shikímico ($Y_{SHIK/S}$) y de ácido 3-dehidroshikímico ($Y_{DHS/S}$) en glucosa con la cepa PTS⁻ fueron 1.9 y 4.6 veces mayores, respectivamente. Mientras que en la cepa PYKA⁻ los rendimientos $Y_{SHIK/S}$ y $Y_{DHS/S}$ fueron 2 y 4.2 veces mayores que en la nativa, respectivamente.

Por otro lado, las cepas W3110 *vgb*⁺ y MG1655 *vgb*⁺, las cuales expresan VHb, se evaluaron en cultivos aerobios y se compararon con las cepas nativas W3110 y MG1655

(*vgb*⁻). La producción de acetato se redujo un 50% en MG1655 *vgb*⁺ y más del 90% en W3110 *vgb*⁺. Los valores de μ , $Y_{x/s}$ y q_s se mantuvieron similares en las cepas *vgb*⁺ y *vgb*⁻. En contraste, la presencia de esta hemoglobina incrementó al doble el rendimiento de ADNp ($Y_{p/x}$) en la cepa W3110 *vgb*⁺ en comparación con la nativa. La cepa MG1655 no presentó cambios en $Y_{p/x}$ con la presencia de VHb. En este mismo estudio se evaluaron las cepas modificadas W3110 *arcA*⁻ y MG1655 *sdh*⁺. La eliminación de *arcA* dio como resultado una disminución en la producción de acetato y de $Y_{x/s}$, mientras que la expresión de hemoglobina en las mutantes resultó en un incremento en la tasa de crecimiento y en q_s , llegando a valores similares a los de las cepas silvestres. A pesar de esto el rendimiento acetato-biomasa no se vio afectado, por lo que se puede concluir que la expresión de la hemoglobina resulta en un metabolismo de carbono más eficiente aún en las cepas mutantes. Estos resultados mostraron que mejorar la eficiencia del metabolismo aerobio es un enfoque interesante para evitar el sobreflujo metabólico en cultivos de alta densidad celular por lote (Pablos et al., 2014).

2.6 Potencial biotecnológico de cepas con diferentes capacidades de transporte de glucosa

Fuentes y colaboradores (2013) generaron una colección de *E. coli* W3110 con mutaciones en las proteínas relacionadas con el transporte de glucosa (tabla 2). Incluyendo a la cepa progenitora, los valores de μ , q_s y q_{acet} abarcan de 0.18 a 0.65 h⁻¹; de 0.33 a 1.33 g g⁻¹ h⁻¹ y de 0 a 0.19 g g⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Este amplio espectro de tasas específicas permite generar un panorama completo de cultivos en lote que asemejen la operación por lote alimentado.

La producción de GFP inducida por IPTG fue evaluada por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019) en medio mineral en las cepas WHI, WHIC, WG, WGX y WGM, siendo el mayor rendimiento de GFP ($Y_{GFP/x}$) de 91.3 mg/g en WGM, mientras que para la nativa fue de 10.5 mg/g. Existen evidencias que sugieren que las modificaciones en el sistema de transporte de glucosa afectaron también el transporte de IPTG, lo que puede sesgar los resultados observados. Por otro lado, la inducción con IPTG genera estados bi-estables, que pueden dificultar la interpretación fisiológica. Debido a esto, la

acumulación de proteína recombinante está acompañada de una fuerte diversificación fenotípica de la población microbiana. Las cepas que presentaron los mayores rendimientos de proteína también presentaron la mayor heterogeneidad con respecto a la morfología y acumulación de GFP. Una de las principales consecuencias de la acumulación masiva de GFP observadas en este estudio es la elongación celular, aunado a un incremento en la permeabilidad de la membrana.

Tabla 2. Colección de cepas mutantes de *E. coli* generadas por Fuentes, *et al.*, 2013.

Cepa	Genes eliminados	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_{ac} (g g ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{x/s}$
W3110	-	0.65 ± 0.02	1.33 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.49 ± 0.00
WG	<i>PtsG</i>	0.51 ± 0.01	1.05 ± 0.12	0.07 ± 0.05	0.53 ± 0.12
WGX	<i>ptsG, malX</i>	0.23 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0	0.41 ± 0.01
WGB	<i>ptsG, bglF</i>	0.43 ± 0.04	1.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.42 ± 0.03
WGE	<i>ptsG, nagE</i>	0.41 ± 0.02	0.69 ± 0.06	0	0.60 ± 0.08
WGM	<i>ptsG, manX</i>	0.36 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0	0.56 ± 0.08
WGMX	<i>ptsG, manX, malX</i>	0.32 ± 0.01	0.58 ± 0.06	0	0.55 ± 0.06
WGMB	<i>ptsG, manX, bglF</i>	0.29 ± 0.00	0.66 ± 0.07	0	0.40 ± 0.02
WGME	<i>ptsG, manX, nagE</i>	0.28 ± 0.02	0.56 ± 0.00	0	0.48 ± 0.03
WGP	<i>ptsG, galP</i>	0.49 ± 0.08	1.19 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.44 ± 0.01
WGC	<i>ptsG, mglABC</i>	0.49 ± 0.01	1.02 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.47 ± 0.05
WGMP	<i>ptsG, manX, galP</i>	0.29 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0	0.52 ± 0.02
WGMC	<i>ptsG, manX, mglABC</i>	0.31 ± 0.01	0.68 ± 0.00	0	0.47 ± 0.01
WHI	<i>ptsHIcrr</i>	0.25 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0	0.51 ± 0.02
WHIP	<i>ptsHIcrr, galP</i>	0.18 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0	0.55 ± 0.03
WHIC	<i>ptsHIcrr, mglABC</i>	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0	0.38 ± 0.02

μ : Tasa específica de crecimiento

q_s : Tasa específica de consumo de sustrato

q_{ac} : Tasa específica de producción de acetato

$Y_{x/s}$: Rendimiento biomasa-sustrato

El resto de la colección no ha sido evaluada para la producción de proteína recombinante. Sin embargo, Fuentes y colaboradores (2013) evaluaron la producción del plásmido pHN en las mutantes WG, WGMC, WGM, WGME WHIC, y la cepa nativa W3110 utilizando un medio mineral. En este estudio encontraron que todas las cepas mutantes evaluadas presentaron mayores rendimientos producto-biomasa ($Y_{p/x}$) que la cepa nativa, estos incrementos pueden deberse a la escasa o nula producción de acetato. La cepa que presentó los mejores resultados fue WGMC, la cual obtuvo un rendimiento de ADNp 3.2 veces mayor al de la cepa nativa con el plásmido pHN, esto puede deberse a que la distribución de los flujos metabólicos asociados a la generación de biomasa y ácidos nucleicos en esta cepa favorece la síntesis de precursores de ADN, generando una mayor producción de plásmido. De acuerdo con lo obtenido por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019), se espera que la cepa WHIC portando el plásmido con expresión constitutiva de GFP presente heterogeneidades en su morfología, provocando una posible elongación celular. De igual forma, se espera encontrar heterogeneidad poblacional respecto a la acumulación de GFP, obteniendo poblaciones en un estado alto y en un estado bajo de producción.

A pesar de los posibles efectos negativos de la acumulación masiva de GFP, la cepa mutante WHIC podría resultar en una fábrica celular capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa, sin producir acetato y obteniendo altos rendimientos producto-biomasa.

2.7 GFP como proteína modelo de producción

La GFP de la medusa *Aequorea victoria* es una proteína que emite fluorescencia verde y es ampliamente utilizada en estudios moleculares y celulares. Esta proteína fluorescente es estable, no requiere la adición de ninguna sustancia o cofactor (Zimmer, 2002) y su uso elimina la necesidad de la permeabilización celular. Otra de las ventajas que presenta esta molécula es su fácil detección en células vivas, además de permitir un análisis en tiempo real de eventos moleculares (Kumar & Pal, 2016).

La GFP es una proteína monomérica y posee una masa molecular de 27 KDa. La estructura terciaria de esta proteína consiste en un barril beta formado por 11 cadenas y una hélice alfa central, en la cual se encuentra el cromóforo (figura 5). La GFP silvestre presenta un pico de absorción a 395 nm y otro menor a 475 nm. Su pico de emisión está a 509 nm (Deo & Daunert, 2001). El cromóforo de esta proteína es una p-hidroxibencilidenimidazolinona formada a partir de los residuos 65-67 (Ser-Tyr-Gly) en la proteína nativa. La formación del cromóforo se da de la siguiente manera. En primer lugar, la proteína se pliega en conformación casi nativa ($t_{1/2}$ ~10 min), posteriormente la molécula pasa por una ciclación y una deshidratación ($t_{1/2}$ ~3 min) y se forma la imidazolinona. Finalmente, el oxígeno molecular deshidrogena el enlace α - β del residuo 66 para conjugar su grupo aromático con la imidazolinona ($t_{1/2}$ ~19-83 min). Únicamente en esta última etapa el cromóforo adquiere fluorescencia visible (Tsien, 1998). El nivel de expresión y la detectabilidad de GFP dependen de varios factores: solubilidad, formación de cuerpos de inclusión, disponibilidad de oxígeno, dimerización, etc.

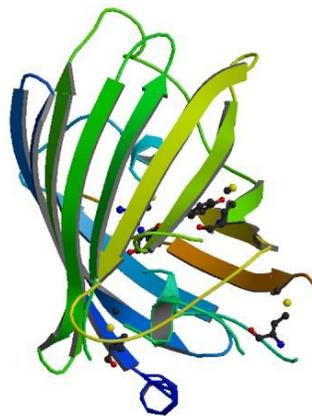


Figura 5. Representación de la estructura terciaria de la proteína verde fluorescente de *A. victoria*.

Además de la GFP, existen variantes y homólogas de esta proteína de diferentes colores, lo cual permite tener una fuente herramientas moleculares para una gran variedad de aplicaciones en el estudio de sistemas biológicos. Dentro de las principales aplicaciones de las proteínas fluorescentes se encuentran el marcaje de proteínas, células, organelos

y organismos, detección de drogas, evaluación de promotores, uso como biosensores, entre otras (Kumar & Pal, 2016).

Debido a sus características, la GFP resulta una gran herramienta al ser una proteína modelo de fácil detección para los procesos biotecnológicos. En el presente trabajo se utilizó esta proteína para representar un esquema típico de producción de proteínas recombinantes.

3. HIPÓTESIS

La disminución en la tasa de consumo de glucosa, provocada por las deleciones de genes relacionados con el importe de glucosa, en la colección de cepas mutantes generada por Fuentes y colaboradores (2013) permitirá desarrollar cultivos de alta densidad celular en modo lote con productividades de proteína verde fluorescente comparables a las obtenibles en cultivos por lote alimentado empleando la cepa silvestre.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Proponer una alternativa tecnológica a los cultivos modo lote alimentado para la producción de proteína recombinante utilizando GFP como proteína modelo en cepas de *E. coli*.

4.2 Objetivos específicos

1. Realizar cultivos de *E. coli* W3110 y la colección de cepas mutantes que expresen GFP de manera constitutiva en microbiorreactores empleando medio mineral enriquecido con extracto de levadura y con 1, 10 y 20 g/L de glucosa.

2. Seleccionar las cepas mutantes que presenten la mayor producción de GFP y evaluar su crecimiento en extracto de levadura y glucosa.
3. Caracterizar la productividad, rendimientos de GFP, producción de acetato y heterogeneidad poblacional en cultivos en modo lote con 100 y 120 g/L de glucosa inicial de la cepa W3110 y mutantes seleccionadas.
4. Caracterizar la productividad, rendimientos de GFP, producción de acetato y heterogeneidad poblacional en cultivos por lote alimentado de la cepa W3110.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos y plásmido utilizados

Se evaluó la producción de proteína recombinante en la colección de cepas mutantes de *E. coli* generadas por Fuentes y colaboradores, así como en la cepa nativa W3110 (*F* λ *rph-1 INV(rrnD, rrnE)*) proveniente de *E. coli* K-12. Como proteína modelo se eligió la GFP, por lo que las cepas se transformaron con el plásmido pWF14 (3682 pb) el cual tiene resistencia a kanamicina y cloranfenicol, y expresa de manera constitutiva la GFP bajo el control de un promotor sintético generado por Martínez y colaboradores (2020) (datos sin publicar), basado en una librería de secuencias reguladoras por Rossi y colaboradores (1983) (figura 6). El plásmido ha sido introducido en la colección por electrotransformación y se han preparado bancos celulares conservados a -70 °C en glicerol al 40 % usando el antibiótico apropiado.

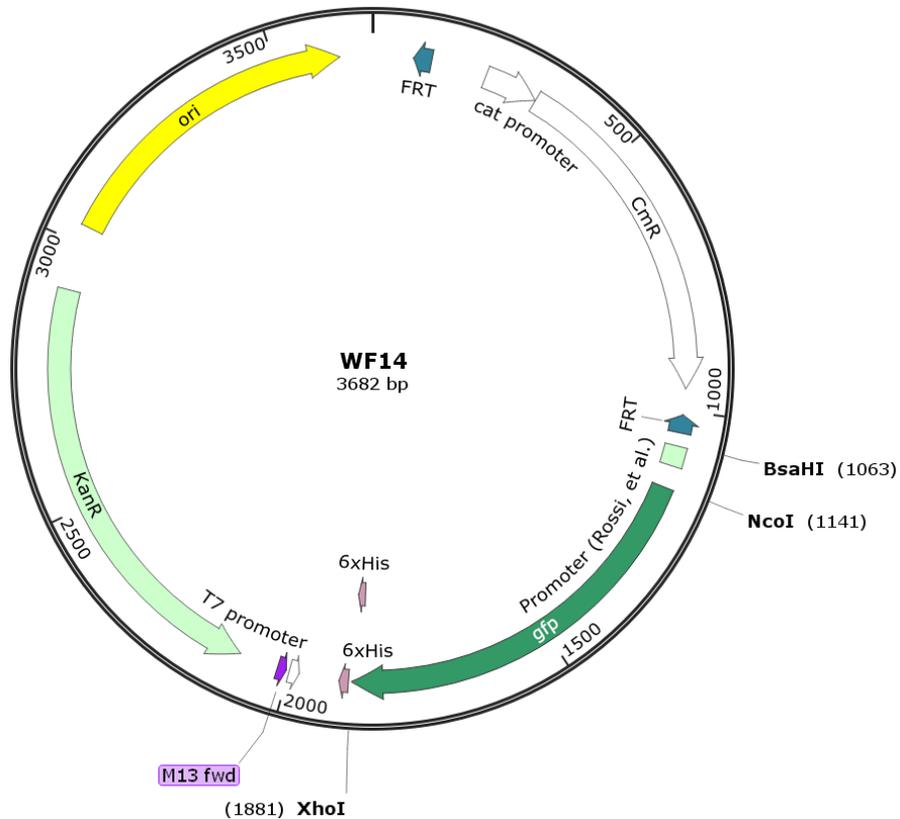


Figura 6. Diagrama de pWF14. Este plásmido cuenta con un origen de replicación (ori) pUC, un gen de resistencia a kanamicina (KanR), un gen de resistencia a cloranfenicol (CmR) y el gen de GFP bajo el control de un promotor constitutivo flanqueado por los sitios de restricción BsaHI-NcoI.

5.2 Preparación de células electrocompetentes

Para preparar las células electrocompetentes se partió de un precultivo de 5 mL de medio YENB (0.75% extracto de levadura y 0.80% de caldo nutritivo) de una colonia en placa de cada cepa. Los cultivos se iniciaron con 0.1 DO_{600nm} en 50 mL de medio YENB en un matraz de 500 mL con deflectores, cerrados con tapones de esponja. Se incubaron a 37 °C y se mantuvo una agitación orbital a 250 rpm. Una vez que los cultivos alcanzaron 0.5-1 DO_{600nm}, se transfirió el contenido a tubos cónicos de 50 mL y se mantuvieron en hielo por 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados de la pastilla celular con 5 mL de agua Milli-Q estéril fría y se distribuyó en tubos de 1.5 mL estériles. Éstos se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 min y se les retiró el sobrenadante. Se lavó la pastilla celular de cada

tubo con 500 μ L de glicerol 10% frío, se resuspendió suavemente y se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 1 min descartando el sobrenadante. Se recuperó la pastilla celular de todos los tubos con 500 μ L de glicerol 10% frío en un solo tubo. Finalmente, se alicuotaron 50 μ L de la suspensión en microtubos de 1.5 mL estériles y se almacenaron a -80 °C.

5.3 Transformación

Para transformar las células electrocompetentes se añadieron 50 ng de ADNp en un volumen de 1-4 μ L y se mezcló suavemente. La suspensión se transfirió a una celda de electroporación de 1 mm de separación, evitando la formación de burbujas y se dejó en reposo por 1 min en hielo. Posteriormente se electroporó a 1,800 V con una constante de 5 mS en un electroporador Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Inmediatamente se retiró la celda y se adicionaron 950 μ L de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2.0% triptona, 20 mM glucosa, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM KCl). Se transfirió el contenido de la celda a un tubo de 1.5 mL estéril y se incubó a 250 rpm por 1 h a 37 °C. Una vez transcurrida la etapa de recuperación, se centrifugó el tubo a 8,000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular en el líquido remanente y se transfirió a una placa de LB-agar con el antibiótico de selección. Para su dispersión se emplearon perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron a 37 °C por al menos 12 h.

5.4 Condiciones de cultivo

5.4.1 Cultivos en placas multipozos

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un medio mineral base (17 g/L K_2HPO_4 , 5.3 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 2.5 g/L $NH_4(SO_4)_2$, 2 g/L $Na_3(Cit)\cdot 2H_2O$) adicionado con 1, 10 y 20 g/L de glucosa y 0.4 gramos de extracto de levadura por gramo de glucosa. En todos los experimentos se utilizó el mismo lote de extracto de levadura (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA). Una vez esterilizado el medio mineral, se le añadieron 2 mL/L de elementos

traza (39.9 g/L $C_6H_8O_7$, 51.4 g/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 5.5 g/L $C_{10}H_{16}N_2O_8$, 10.5 g/L $ZnCl_2$), 1 g/L de sulfato de magnesio, 0.01 g/L de tiamina y el antibiótico de selección que en este caso fue kanamicina (0.05 g/L) o cloranfenicol (0.03 g/L) dependiendo de la cepa. Los precultivos se realizaron con el medio mineral ya descrito en matraces agitados de 250 mL con cuatro placas deflectoras y un volumen de llenado de 30 mL. Se incubaron a 37 °C con una agitación orbital constante de 250 rpm durante 22 h aproximadamente.

Los cultivos se llevaron a cabo con el equipo BioLector (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Alemania) en placas de 48 pozos con sensores de oxígeno disuelto, pH, biomasa y fluorescencia “Multiparameter FlowerPlate” (m2p-labs GmbH, Baesweiler, Alemania). La fluorescencia de biomasa se midió mediante luz dispersa a 620 nm. La fluorescencia de NADH se monitoreó con las longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 450 nm, respectivamente. La producción de GFP se siguió mediante un filtro a 488 nm para la excitación y 520 nm para la emisión. El volumen de llenado fue de 800 μ L y se mantuvo una agitación orbital constante de 1500 rpm, bajo estas condiciones el valor de OTR_{max} esperado es de 110 $mmol L^{-1} h^{-1}$. La duración de los cultivos varió dependiendo de la cepa. Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Se tomó todo el volumen de cada pozo al final de los cultivos y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

5.4.2 Cultivos modo lote alimentado

Los cultivos alimentados se realizaron en un biorreactor instrumentado de tanque agitado de 1 L Biostat B Plus (Sartorius, Goettingen, Alemania) utilizando un medio mineral base adicionado con extracto de levadura 50 $g L^{-1}$ y glucosa 15 $g L^{-1}$. Una vez esterilizado el biorreactor junto con el medio mineral, se añadieron 2 $mL L^{-1}$ de elementos traza, 1 $g L^{-1}$ de sulfato de magnesio, 0.01 $g L^{-1}$ de tiamina y 0.05 $g L^{-1}$ de kanamicina. La temperatura y el pH de los cultivos se controlaron a 37 °C y 7, respectivamente. El pH se controló mediante la adición de NH_4OH al 15% y HCl al 10%. A lo largo La TOD fue medida mediante un sensor óptico Visiferm 120 (Hamilton, Nevada, EUA) y se mantuvo a un valor de 30% con respecto a la saturación con aire.

Los cultivos se iniciaron con 15 $g L^{-1}$ de glucosa y 50 $g L^{-1}$ de extracto de levadura, con un volumen inicial de 0.5 L. Una vez transcurridas 9 h se inició con la etapa de alimentación, para la cual se utilizó una solución de glucosa 500 $g L^{-1}$ suplementada con

0.05 g L⁻¹ de kanamicina. El suministro de esta solución de alimentación se realizó con una bomba peristáltica Watson Marlow 101U/R. La tasa de alimentación se determinó mediante una ecuación que permite el crecimiento exponencial del cultivo a una μ de 0.05 h⁻¹ sin que exista acumulación de glucosa o acetato (Jaén et al., 2013). El cambio en la tasa de alimentación se realizó mediante el cambio automático del punto de ajuste utilizando una macro (VBA, Microsoft) programada en nuestro grupo de trabajo, a través de un enlace con el sistema de control del biorreactor Biostat B plus y la bomba externa.

Los precultivos se realizaron en matraces agitados de 500 mL con placas deflectoras y un volumen de llenado de 100 mL. Se utilizó medio mineral adicionado con 5 g L⁻¹ de glucosa y 2 g L⁻¹ de extracto de levadura, 2 mL L⁻¹ de elementos traza, 1 g L⁻¹ de sulfato de magnesio, 0.01 g L⁻¹ de tiamina y 0.05 g L⁻¹ de kanamicina. Se mantuvo una agitación orbital constante de 250 rpm y una temperatura de 37 °C. El contenido de los matraces se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min y se resuspendió la pastilla celular en un volumen de 20 mL, con lo cual se inoculó el biorreactor.

5.4.3 Cultivos modo lote con altas concentraciones iniciales de glucosa

Los cultivos con alta concentración de glucosa inicial se llevaron a cabo utilizando el sistema descrito en la sección anterior (5.4.2). El volumen de operación fue de 0.6 L y las concentraciones iniciales de glucosa y de extracto de levadura fueron de 100 y 50 g L⁻¹, respectivamente. Los precultivos se realizaron de la forma descrita en 5.4.2.

5.5 Herramientas analíticas

5.5.1 Determinación de la concentración celular

DO_{600nm}

La concentración celular se siguió a través de la medición de densidad óptica a 600 nm utilizando el espectrofotómetro BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La medición se realizó en celdas semi-micro de policarbonato con un paso de luz de 10 mm. Se realizaron diluciones de las muestras para obtener una lectura por debajo de 0.4 unidades.

Peso seco

Para obtener la concentración celular en peso seco se utilizaron microtubos de 1.5 o 2 mL previamente secados en un horno eléctrico Precision (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) y pesados. Se colectó la biomasa a lo largo del cultivo en un volumen entre 1.5 y 6 mL de caldo de cultivo en ciclos de centrifugado a 13,000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. Posteriormente se llevaron los tubos con biomasa, sin medio remanente y abiertos, al horno eléctrico y se mantuvieron al menos 18 h secándose a 80 °C. Una vez transcurrido el tiempo de secado, los tubos se trasladaron a un desecador de polipropileno para su enfriamiento. Finalmente, los tubos se pesaron en una balanza analítica.

5.5.2 Cuantificación de proteína

Para la lisis celular se tomaron 360 µL de muestra y se le añadieron 40 µL de una solución de lisozima 10 mg mL⁻¹. Se incubaron a 37 °C durante 15 min, posteriormente se congelaron a -70 °C durante 30 min y se descongelaron a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugaron a 13000 rpm por 2 min y se recuperó el sobrenadante.

La cuantificación de GFP se realizó utilizando el paquete comercial Agilent Protein 80 Kit (Agilent Technologies, California, EUA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 4 µL de muestra y se le añadieron 2 µL de solución desnaturizante. Posteriormente se colocaron las muestras y el marcador de peso molecular a 95 °C durante 5 min y se añadieron 85 µL de agua desionizada. Se cargaron 12 µL de la mezcla gel-colorante en el chip y se presurizó con ayuda de una jeringa. Se cargaron los pozos restantes correspondientes a la mezcla gel-colorante, a la solución desteñidora y al marcador de peso molecular. Se cargaron por duplicado 6 µL de cada una de las muestras y de un estándar de GFP_r (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza). Finalmente, se colocó el chip en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, EUA).

La cuantificación se realizó creando una curva estándar de concentración de GFP contra el área bajo la curva proporcionada por el software Agilent Expert (Agilent Technologies,

California, EUA). Una vez obtenida la curva se interpolaron las áreas obtenidas de cada muestra y se obtuvo su concentración.

5.5.3 Medición de fluorescencia de GFP fuera de línea

Se siguió la fluorescencia de GFP a lo largo de los cultivos en biorreactor instrumentado utilizando el fluorómetro ChronosBH (ISS Inc., Champaign, EUA) y el software Vinci (ISS Inc., Champaign, EUA). Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 395 y 509 nm, respectivamente y se utilizó un paso de luz de 2 mm tanto para la emisión como para la excitación. Se midió la fluorescencia de GFP intracelular en células completas diluyendo las muestras en agua de tal forma que se tuviera una DO_{600nm} de 0.4.

La cuantificación se realizó mediante una curva estándar de concentración de GFP_r (rGFP, Sigma-Aldrich, Misuri, EUA) contra las unidades de fluorescencia emitidas. Una vez obtenida la curva se interpolaron las unidades de fluorescencia obtenidas de cada muestra y se obtuvo su concentración.

5.5.4 Análisis de metabolitos extracelulares

Para determinar la concentración de glucosa y acetato, las muestras de los cultivos en reactor instrumentado se centrifugaron durante 5 min a 13,000 rpm en una microcentrífuga. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm y posteriormente almacenado a -20 °C hasta su análisis.

La glucosa se cuantificó utilizando el analizador bioquímico YSI-2900 (YSI Inc., Ohio, EUA) y el acetato se cuantificó mediante HPLC Varian ProStar 210 (Varian Inc., California, EUA). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, California, EUA) a 60 °C y 0.6 mL min^{-1} de H_2SO_4 5 mM como fase móvil. La detección se realizó a 210 nm en un detector espectrofotométrico UV-Vis Varian PS-235 (Varian Inc., California, EUA).

5.6 Cálculos cinéticos y estequiométricos

Las velocidades específicas de crecimiento, producción de GFP y acetato, así como los rendimientos fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\mu = (dX/dt)/X \quad (Ec. 2)$$

$$Y_{X/S} = -(dX/dS) \quad (Ec. 3)$$

$$Y_{GFP/X} = (dGFP/dX) \quad (Ec. 4)$$

$$Y_{Ace/X} = (dAce/dX) \quad (Ec. 5)$$

$$q_S = \mu/Y_{X/S} \quad (Ec. 6)$$

$$q_{GFP} = Y_{GFP/X} \cdot \mu \quad (Ec. 7)$$

$$q_{Ace} = Y_{Ace/X} \cdot \mu \quad (Ec. 8)$$

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

$Y_{X/S}$: rendimiento biomasa-sustrato ($g\ g^{-1}$)

$Y_{GFP/X}$: rendimiento GFP-biomasa ($g\ g^{-1}$)

$Y_{Ace/S}$: rendimiento acetato-biomasa ($g\ g^{-1}$)

q_S : velocidad específica de consumo de sustrato ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)

q_{GFP} : velocidad específica de producción de GFP ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)

q_{Ace} : velocidad específica de producción de acetato ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)

X: concentración de biomasa ($g\ L^{-1}$)

S: concentración de sustrato ($g\ L^{-1}$)

GFP: concentración de GFP ($g\ L^{-1}$)

Ace: concentración de acetato (g L^{-1})

t : tiempo (h)

5.7 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si los resultados fueron estadísticamente diferentes. Las pruebas se hicieron con una significancia de 0.05 utilizando el paquete de análisis de datos de Excel.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se divide en dos secciones. La primera sección muestra el cribado de la colección de cepas mutantes junto con la cepa silvestre evaluando la producción de GFP en cultivos con diferentes concentraciones de glucosa y extracto de levadura. En la segunda sección se presenta la cepa que tuvo mejor desempeño y se compara la producción de GFP en cultivos de alta densidad celular con la cepa silvestre.

6.1 Cribado de la colección de cepas mutantes en diferentes concentraciones de glucosa

Se evaluó la producción de proteína recombinante en la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre transformadas con el plásmido pWF14. Los cultivos se realizaron bajo condiciones aerobias, en medio mineral enriquecido con extracto de levadura. Se evaluaron tres concentraciones de sustratos diferentes: 1, 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa adicionado con 0.4, 4 y 8 g L⁻¹ de extracto de levadura, respectivamente. Dado que los cultivos presentaron diferencias importantes tanto en la biomasa y fluorescencia alcanzadas, como en la duración del cultivo, los resultados se muestran en cuatro grupos: WG, WGE, WGP y WHI (1); WGB, WGME, WGMX y WGMP (2); W3110, WGM, WGX y WGMB (3) y WHIC (4).

En la figura 7 se muestra el seguimiento de la concentración de biomasa mediante intensidad de luz dispersa, así como la fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y de la cepa nativa W3110 en los cultivos con 1 g L⁻¹ de glucosa. En la tabla 3 se muestran las tasas de crecimiento específico globales de la colección de cepas, así como la duración de cada cultivo. Como se puede observar, la colección de cepas mutantes presenta un amplio intervalo de tasas de crecimiento específico globales (0.01-0.51 h⁻¹), lo cual lleva a diferencias en la duración del cultivo (8-50 h). Las cepas WGMX, WGME, WGMB, WGM portando el plásmido pWF14 presentaron un crecimiento fluctuante y no exponencial, mientras que las cepas WGX pWF14 y WHIC pWF14 presentaron dos fases de crecimiento exponencial. El comportamiento de estas últimas cepas puede deberse a un crecimiento diaúxico debido a la adición de glucosa y extracto

de levadura, sin embargo, este comportamiento no se observa en el resto de la colección.

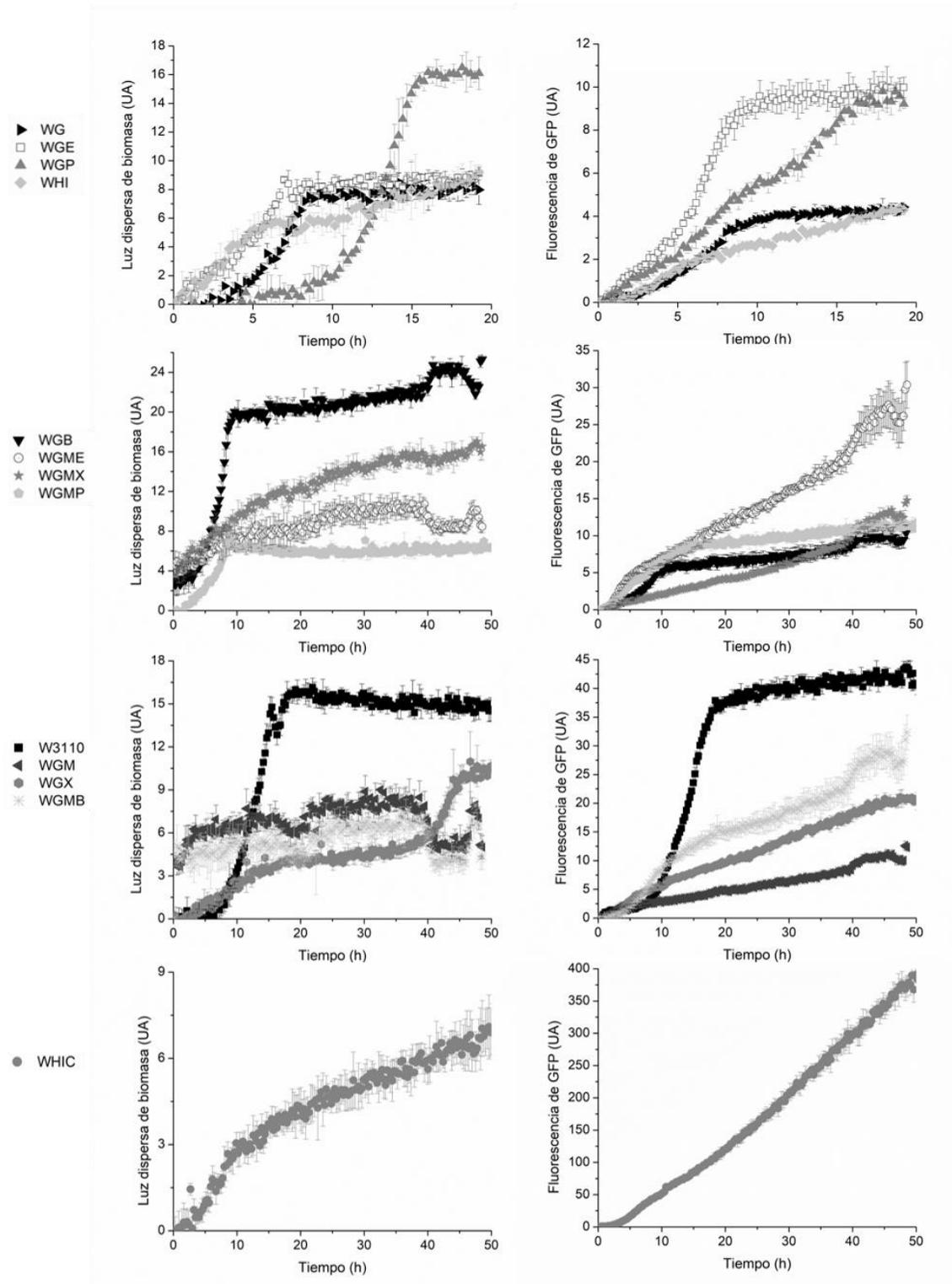


Figura 7. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 1 g L⁻¹ de glucosa y 0.4 g L⁻¹ de extracto de levadura. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Tabla 3. Tasas específicas de crecimiento global (μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 1 g L⁻¹ de glucosa y 0.4 g L⁻¹ de extracto de levadura.

Cepa	μ_{global} (h ⁻¹)	$t_{cultivo}$ (h)
W3110 pWF14	0.40 ± 0.08	15
WG pWF14	0.51 ± 0.03	8
WGB pWF14	0.28 ± 0.03	8
WGE pWF14	0.36 ± 0.03	7
WGM pWF14	0.01 ± 0.00	39
WGMB pWF14	0.01 ± 0.01	39
WGME pWF14	0.02 ± 0.00	38
WGMP pWF14	0.38 ± 0.02	8
WGMX pWF14	0.02 ± 0.00	48
WGP pWF14	0.49 ± 0.15	15
WGX pWF14	0.04 ± 0.01	45
WHI pWF14	0.07 ± 0.01	19
WHIC pWF14	0.04 ± 0.01	50

La cepa silvestre W3110 pWF14 presentó 15 UA de luz dispersa de biomasa y 27 UA de fluorescencia de GFP al entrar a la fase estacionaria. WGB pWF14 alcanzó el valor más alto de luz dispersa de biomasa y en el menor tiempo. La mutante WHIC pWF14 presentó la mayor fluorescencia de GFP bajo estas condiciones alcanzando cerca de 400 UA de fluorescencia en 50 horas. A pesar de obtener 10 veces más UA de fluorescencia de GFP que la cepa silvestre W3110 portando el plásmido, esta cepa también se caracterizó por una baja producción de biomasa obteniendo la mitad de la biomasa producida por W3110 pWF14. El resto de las cepas mutantes presentaron una fluorescencia de GFP menor a la obtenida con W3110 pWF14.

Al evaluar la colección de cepas con una concentración más alta de glucosa se obtuvieron curvas de crecimiento más definidas y se pudo observar que todas las cepas presentan un crecimiento diaúxico. En la figura 8 se muestran las cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de los cultivos realizados con 10 g L⁻¹ de glucosa y en la tabla 4 se muestran las tasas de crecimiento específico de cada fase, así como la global y la duración del cultivo.

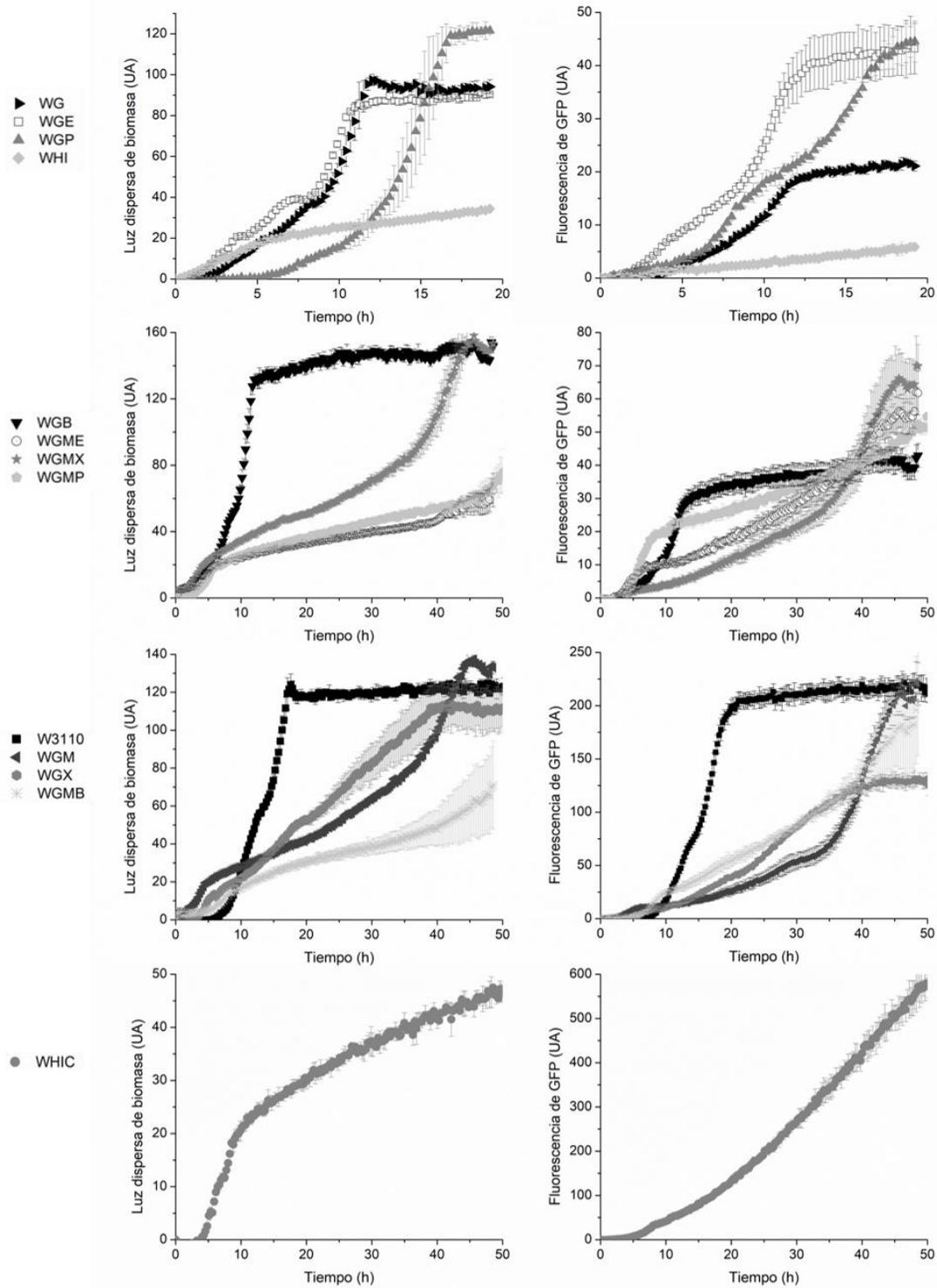


Figura 8. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 10 g L^{-1} de glucosa y 4 g L^{-1} de extracto de levadura. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Tabla 4. Tasas de crecimiento específico de cada fase y global (μ_1 , μ_2 , μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 10 g L⁻¹ de glucosa y 4 g L⁻¹ de extracto de levadura.

Cepa	μ_1 (h ⁻¹)	μ_2 (h ⁻¹)	μ_{global} (h ⁻¹)	$t_{cultivo}$ (h)
W3110 pWF14	0.67 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.32 ± 0.01	17
WG pWF14	0.94 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.4 ± 0.01	12
WGB pWF14	0.42 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.00	12
WGE pWF14	0.92 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.30 ± 0.01	10
WGM pWF14	0.48 ± 0.05	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	45
WGMB pWF14	0.23 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	48
WGME pWF14	0.38 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00	48
WGMP pWF14	0.62 ± 0.10	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	50
WGMX pWF14	0.47 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	45
WGP pWF14	0.81 ± 0.13	0.32 ± 0.02	0.41 ± 0.05	15
WGX pWF14	0.64 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	40
WHI pWF14	0.53 ± 0.04	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.01	19
WHIC pWF14	0.46 ± 0.04	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	50

La cepa W3110 pWF14 obtuvo 121 UA de luz dispersa de biomasa y 147 UA de fluorescencia de GFP. WGMX, WGM y WGB portando pWF14 presentaron valores de luz dispersa de biomasa 26.2, 11.4 y 7.9 % mayores a los obtenidos con W3110 pWF14, respectivamente. Por otro lado, WHIC pWF14, WGMB pWF14 y WGM pWF14 alcanzaron una fluorescencia de GFP 304.2, 58.2 y 39.1 % mayor a la silvestre.

Las cepas evaluadas presentaron diferencias en las tasas de crecimiento específico tanto globales como de cada fase. Durante la primera fase de crecimiento se presentaron valores de μ desde 0.23 hasta 0.94 h⁻¹, mientras que la segunda fase se caracterizó por una disminución en μ , obteniendo valores desde 0.02 hasta 0.32 h⁻¹. Como se puede apreciar en la figura 8, algunas de las mutantes presentaron una fase *lag* más prolongada comparada con la cepa silvestre. Las diferencias en la duración de la fase *lag*, así como en las tasas de crecimiento específico, llevaron a que la colección de mutantes presentara diferencias en la μ_{global} (0.03-0.41 h⁻¹) y en la duración del cultivo (10-50 h).

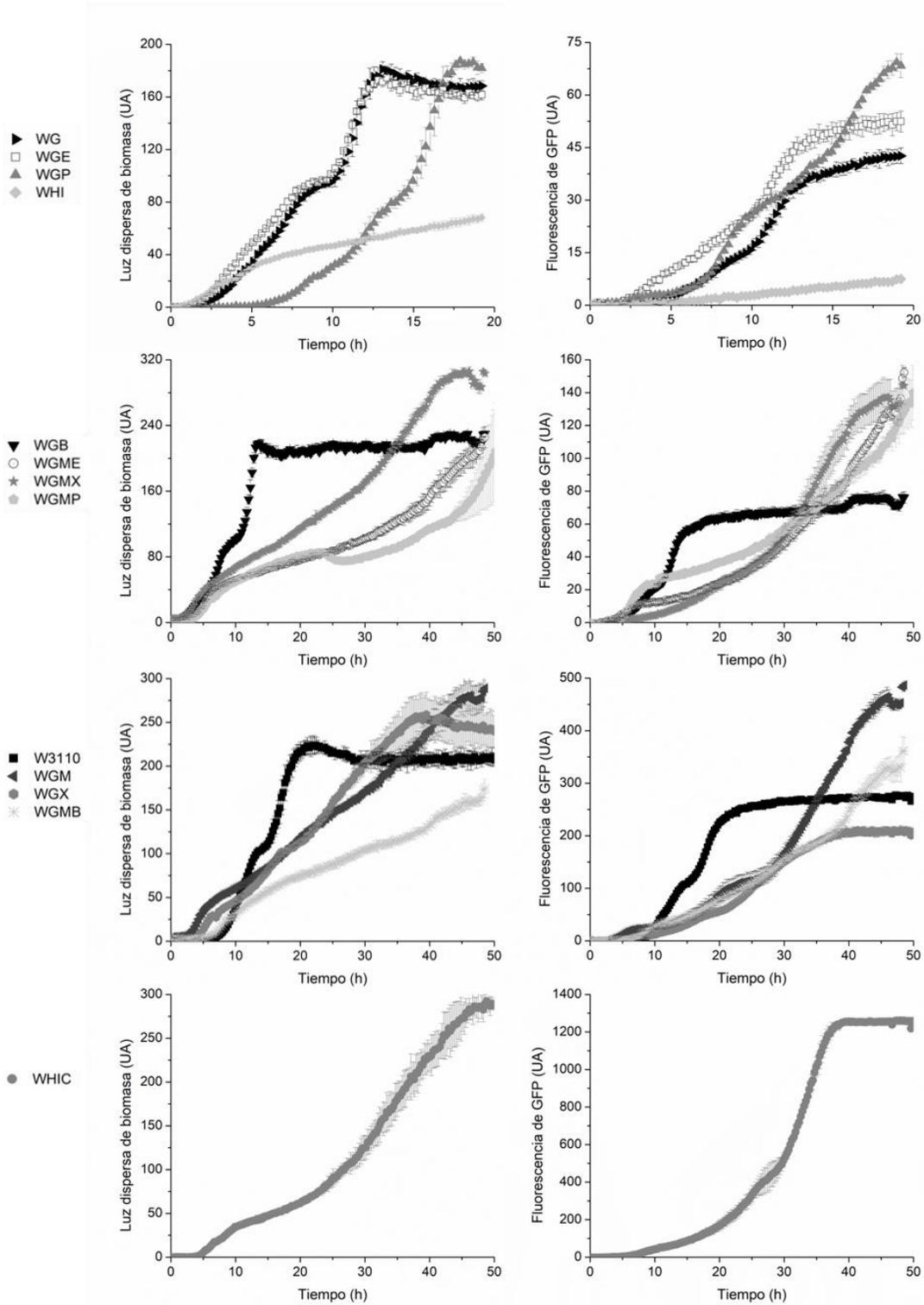


Figura 9. Cinéticas de crecimiento y de fluorescencia de GFP de la colección de cepas mutantes y la cepa silvestre con 20 g L^{-1} de glucosa y 8 g L^{-1} de extracto de levadura. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

Tabla 5. Tasas de crecimiento específico de cada fase y global (μ_1 , μ_2 , μ_{global}) y duración de los cultivos ($t_{cultivo}$) de la colección de cepas con 20 g L⁻¹ de glucosa y 8 g L⁻¹ de extracto de levadura.

Cepa	μ_1 (h ⁻¹)	μ_2 (h ⁻¹)	μ_{global} (h ⁻¹)	$t_{cultivo}$ (h)
W3110 pWF14	0.70 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.28 ± 0.01	21
WG pWF14	0.52 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.31 ± 0.01	13
WGB pWF14	0.43 ± 0.03	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.02	13
WGE pWF14	0.42 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	12
WGM pWF14	0.66 ± 0.04	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	43
WGMB pWF14	0.61 ± 0.27	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	48
WGME pWF14	0.59 ± 0.06	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	48
WGMP pWF14	0.46 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00	50
WGMX pWF14	0.66 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	42
WGP pWF14	0.43 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.02	16
WGX pWF14	0.94 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.01	37
WHI pWF14	0.51 ± 0.07	0.04 ± 0.00	0.10 ± 0.01	19
WHIC pWF14	0.46 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.08 ± 0.01	47

En los cultivos con 20 g L⁻¹ de glucosa (figura 9), WGMX pWF14 presentó el valor más alto de luz dispersa de biomasa, seguida de WHIC, WGM y WGX con el plásmido pWF14. Una vez más, la mutante WHIC pWF14 mostró a mayor fluorescencia de GFP, siendo esta 5.4 veces mayor que la obtenida con W3110 pWF14 bajo estas condiciones. WGM pWF14 y WGMB pWF14 también presentaron valores de fluorescencia de GFP 88.2 y 54.5 % mayores a los obtenidos con la cepa silvestre, respectivamente.

En la tabla 5 se muestran las tasas de crecimiento específico de cada fase, así como la global y la duración de los cultivos con 20 g L⁻¹ de glucosa. En la primera fase de crecimiento se obtuvieron valores de μ desde 0.43 hasta 0.94 h⁻¹ y en la segunda desde

0.03 hasta 0.31 h⁻¹. Los cultivos tuvieron una duración de 12 a 50 h dependiendo de la cepa.

Tanto en los cultivos con 10 g L⁻¹ de glucosa, como en los de 20 g L⁻¹, la colección de mutantes y la cepa nativa presentaron un crecimiento diaúxico debido a la presencia de glucosa y otros componentes del extracto de levadura. La segunda fase de crecimiento se caracterizó por una mayor duración y menores tasas de crecimiento específico comparadas con la primera fase. La diauxia se presenta en el momento que comienza la expresión de los genes necesarios para el consumo de los otros sustratos presentes en el medio. Este comportamiento diaúxico generalmente implica el consumo de la fuente de carbono más accesible y permite un crecimiento rápido.

Kumar y colaboradores (2020) determinaron que los aminoácidos serina, ácido aspártico y ácido glutámico se encuentran estrechamente relacionados con el crecimiento celular en *E. coli*, por lo que estos son los primeros en consumirse en un medio definido suplementado con los 20 aminoácidos. Se especula que durante la primera fase de crecimiento se consumieron principalmente los aminoácidos mencionados (entre otros componentes del extracto de levadura) junto con glucosa. Una vez limitada la presencia de uno o varios de estos aminoácidos, comenzó la segunda fase crecimiento en la que, de acuerdo con las figuras 7, 8 y 9, la producción de GFP se ve favorecida. Dentro de los aminoácidos más abundantes en la GFP se encuentran glicina (8.8 %), lisina (8 %) y treonina (7.6 %), por lo que es probable que durante la segunda fase crecimiento ocurra un consumo principalmente de estos aminoácidos junto con glucosa.

La tasa de crecimiento específico de la segunda fase se redujo alrededor de un 90 % en las cepas WGM, WGMB, WGME, WGMX, WGMP, WGX, WHI y WHIC portando el plásmido pWF14 en comparación a la μ de la primera fase en los cultivos con 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa. Las cepas WGM, WGMB, WGME, WGMX y WGMP tienen eliminado el gen *manX*, el cual codifica para el transportador de manosa. Como ya se mencionó, este transportador es capaz de importar la glucosa, por lo que la reducción en la μ_2 podría deberse a esta delección ya que en las cepas con mutaciones en los genes *bglIF* y *nagE* con *manX* activo (WGB y WGE, respectivamente) no se presentó una reducción en μ_2 tan alta (40 %). WGX, al igual que WGMX, tiene eliminado el gen *malX*, codificante para

el transportador de maltosa. Fuentes y colaboradores (2013) sugirieron que *malX*, después de *ptsG*, es el gen con mayor impacto sobre el consumo de glucosa y tasa de crecimiento, lo cual coincide con los resultados obtenidos. De acuerdo con lo observado, la delección del gen *malX* confiere una mayor producción de biomasa y de GFP comparada con la delección de los genes *bglF* y *nagE*.

Las cepas WHI y WHIC tienen interrumpido el operón *ptsHI-crr*, en el cual se encuentran los genes codificantes para EI y HPr por lo que se interrumpe la cadena de fosfotransferencia, dejando todos los complejos PTS inactivos. A pesar de que ambas cepas cuentan con esta mutación, WHI pWF14 presentó una baja producción tanto de biomasa como de GFP, por lo que el incremento en la producción de GFP de la cepa WHIC puede atribuirse a la combinación de la inactivación del operón *ptsHI-crr* con la interrupción de los genes no-PTS *mglABC*. Estos últimos codifican para una proteína de unión a ATP, una proteína de unión al periplasma de galactosa/glucosa y una proteína transmembranal de transporte. Cabe mencionar que, dentro de las cepas evaluadas, WHIC es la única que cuenta con esta delección de *mglABC*, además de presentar la q_s más baja de la colección de cepas con un valor de $0.32 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en medio mineral (Fuentes, et al., 2013).

Como se puede observar en las tablas 3, 4 y 5, las velocidades de crecimiento cambian de acuerdo con la concentración de sustrato empleada en la mayoría de las cepas evaluadas. Esto sugiere que las tasas de crecimiento no dependen únicamente del fondo genético, sino que también toma un papel importante la disponibilidad de la fuente de carbono al estar estrechamente relacionado con el estado energético de la célula (Jensen & Michelsen, 1992).

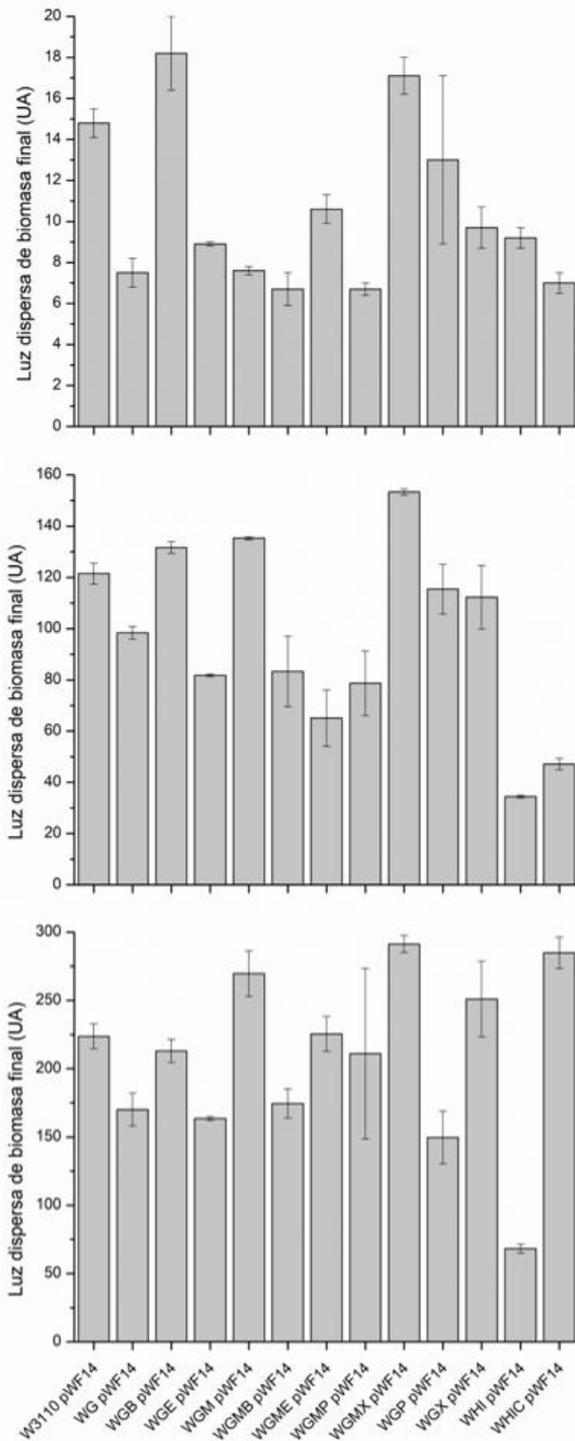


Figura 10. Luz dispersa de biomasa al final de los cultivos con 1 (A), 10 (B) y 20 (C) g L⁻¹ de glucosa. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

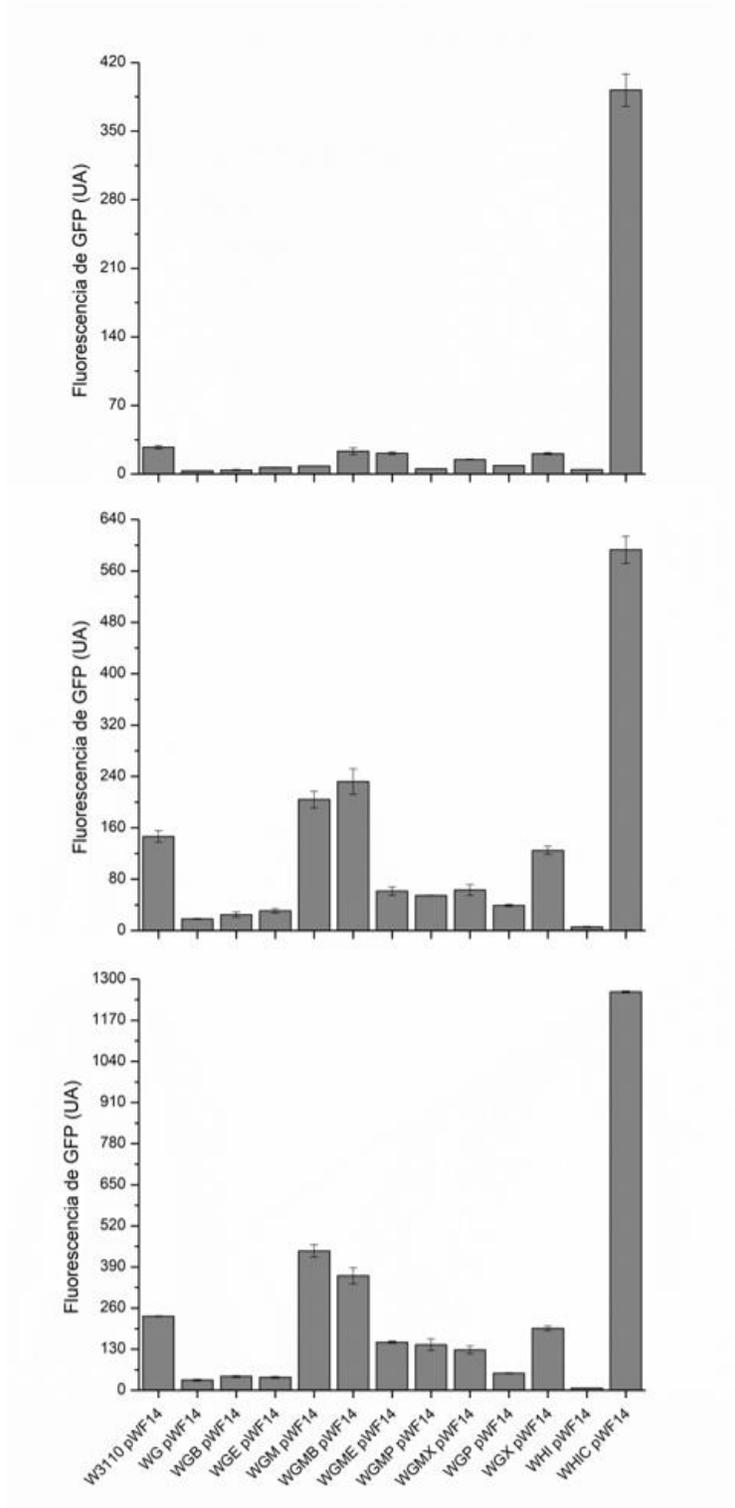


Figura 11. Fluorescencia de GFP al final de los cultivos con 1 (A), 10 (B) y 20 (C) g L⁻¹ de glucosa. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

En las figuras 10 y 11 se presenta la luz dispersa de biomasa y la fluorescencia de GFP al final de los cultivos. Como se puede observar, las cepas alcanzaron diferentes concentraciones de biomasa final, lo cual indica diferencias en los rendimientos biomasa-sustrato (datos no mostrados). Estas diferencias pueden deberse al estado de estrés de cada cepa debido a su fondo genético, pues podrían inducirse diferentes proteínas, lo cual lleva a una distribución diferente de recursos. Bäcklund y colaboradores (2008) sugieren que es posible que se requiera una mayor energía de mantenimiento si la célula experimenta un conflicto al estar en altas concentraciones de glucosa, pero carece de un sistema PTS completamente funcional. Otro aspecto a tomar en cuenta es el papel regulatorio de los componentes del PTS eliminados. EIIBC^{Glc} se encuentra relacionado con la regulación de la transcripción de los genes *ptsH-ptsI* (Notley-McRobb & Ferenci, 2000), además de su efecto en la regulación de la entrada de carbono, pues su inactivación provoca la activación indirecta de otras proteínas afines a la glucosa (Yao et al., 2011).

La cepa WHIC pWF14 obtuvo valores de fluorescencia de GFP 14.4, 4 y 5.4 veces lo obtenido con la cepa silvestre W3110 pWF14 en los cultivos con 1, 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa, respectivamente. Las cepas WGM pWF14 y WGMB pWF14 presentaron una fluorescencia de GFP 39 y 58 %, respectivamente, mayor a la obtenida con la cepa silvestre en los cultivos con 10 g L⁻¹ de glucosa. En los cultivos con 20 g L⁻¹ de glucosa la fluorescencia de GFP alcanzada con las cepas WGM pWF14 y WGMB pWF14 fue un 88 y 55 %, respectivamente, mayor a lo obtenido con W3110 pWF14.

En la figura 12 se muestran los valores de fluorescencia específica de la colección de cepas. En los cultivos con 1 g L⁻¹ de glucosa, las cepas WGMB pWF14 y WHIC pWF14 alcanzaron una fluorescencia específica 1.9 y 30 veces mayor a la alcanzada con W3110 pWF14. Con 10 g L⁻¹ de glucosa las cepas WGM, WGMB y WHIC portando el plásmido pWF14 presentaron una fluorescencia específica 1.3, 2.3 y 10.3 veces mayor a la cepa silvestre. Estas mismas cepas presentaron una fluorescencia específica 1.6, 2 y 4.2 veces mayor a W3110 pWF14 en los cultivos con 20 g L⁻¹ de glucosa. El resto de la colección de mutantes presentó una baja fluorescencia específica comparada con la cepa silvestre. Cabe mencionar que los rendimientos obtenidos con la mayoría de las

cepas presentan una disminución a medida que la concentración de glucosa y extracto de levadura.

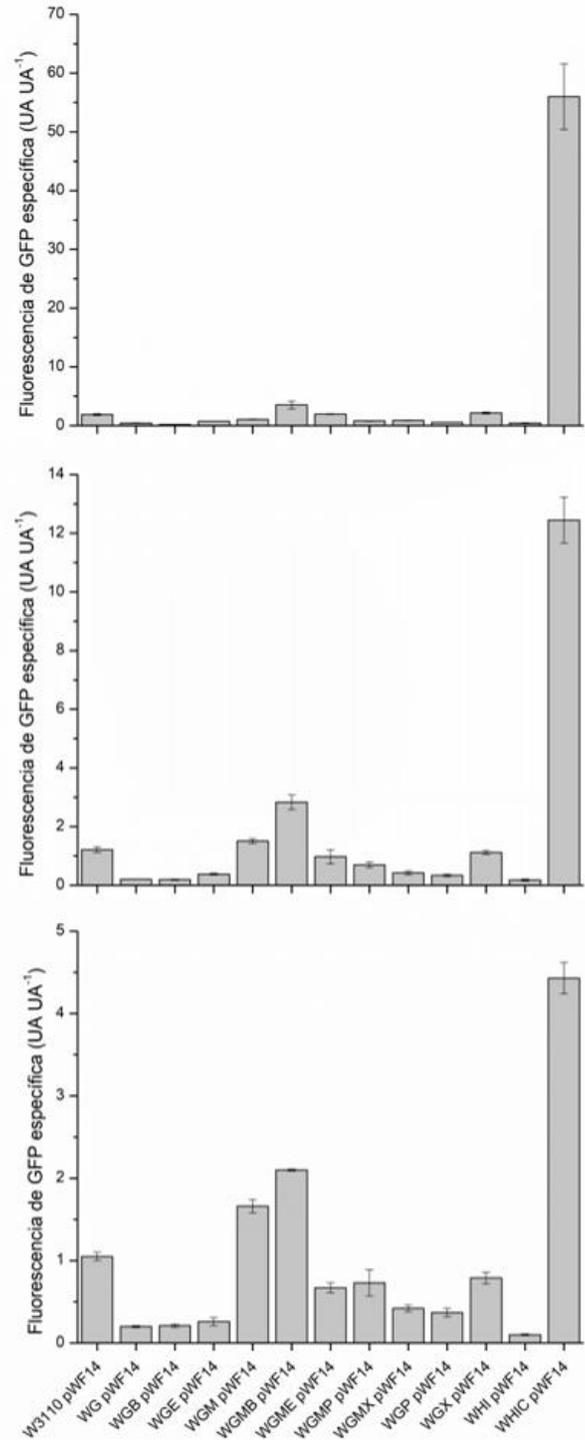


Figura 12. Fluorescencia de GFP específica de los cultivos con 1 (A), 10 (B) y 20 (C) g L⁻¹ de glucosa. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

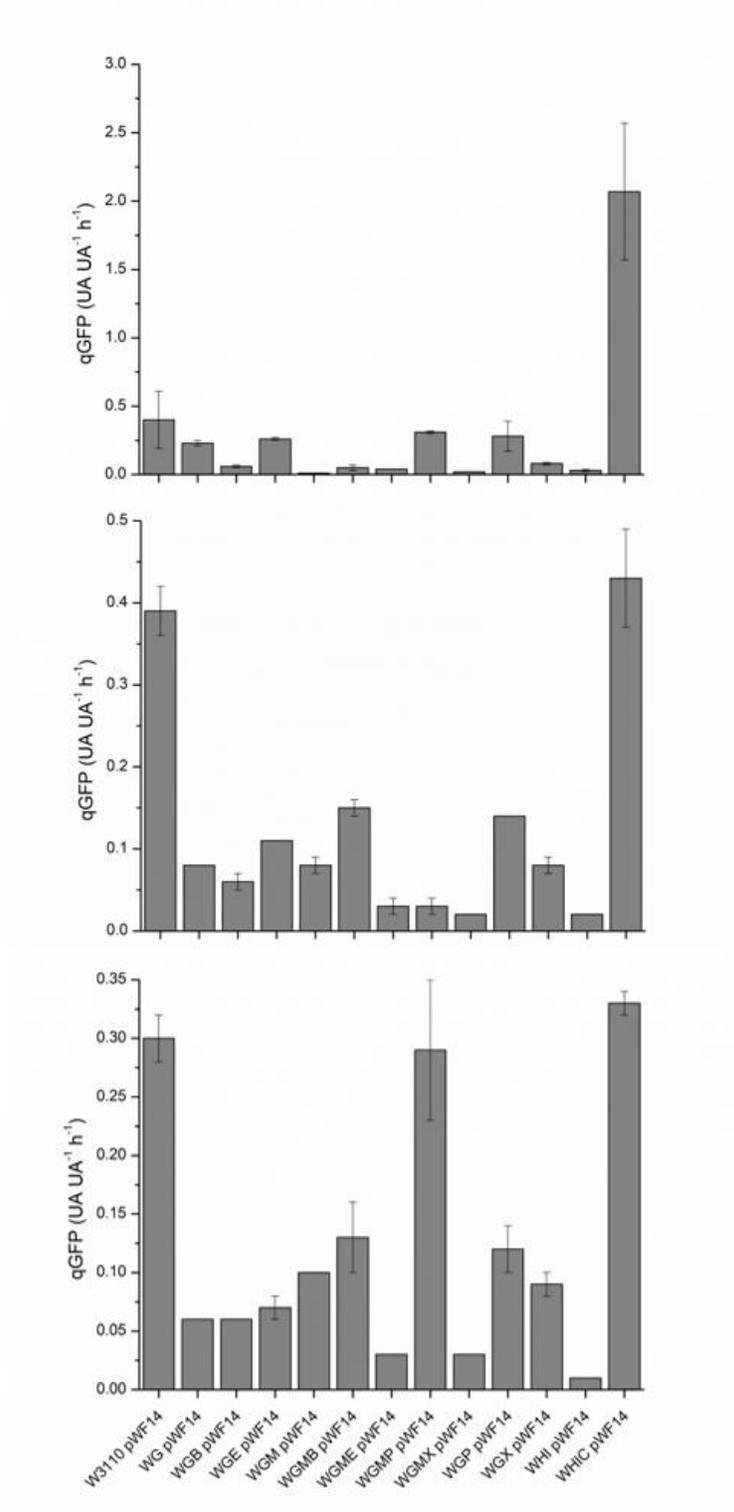


Figura 13. Tasa de fluorescencia específica de GFP de los cultivos con 1 (A), 10 (B) y 20 (C) g L⁻¹ de glucosa. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

En la figura 13 se muestran las tasas de fluorescencia específica de GFP (q_{GFP}) de los cultivos con 1, 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa. En esta se puede observar que la mutante WHIC pWF14 es la única que presenta una tasa de fluorescencia específica mayor o similar a la de W3110 pWF14 bajo las tres condiciones. En los cultivos con 1 g L⁻¹ de glucosa, WHIC pWF14 presentó una q_{GFP} 5.2 veces mayor a W3110 pWF14, sin embargo, en los cultivos con 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa los valores de q_{GFP} de ambas cepas fueron similares. Por otro lado, la cepa WGMP pWF14 también presentó una q_{GFP} similar a WHIC pWF14 y la cepa silvestre al cultivarse con 20 g L⁻¹ de glucosa.

Aunado a la medición de fluorescencia, se realizó la cuantificación de GFP en los cultivos de 20 g L⁻¹ de glucosa. Las concentraciones obtenidas se presentan en la tabla 6 y en la figura 14 se muestra la correlación entre las unidades de fluorescencia y la concentración de GFP. Únicamente la cepa WHIC presentó una concentración mayor de GFP que la nativa (238.8 % mayor), sin embargo, las cepas WGM y WGMB presentaron valores cercanos a W3110. Los valores de la concentración de GFP en las cepas WG, WHI, WGE, WGP y WGB no se presentan en la tabla debido a que estas presentan la fluorescencia de GFP más baja y por el método utilizado la concentración resulta indetectable.

Tabla 6. Cuantificación de GFP en los cultivos con 20 g L⁻¹ de glucosa y 8 g L⁻¹ de extracto de levadura.

Cepa	GFP (mg L⁻¹)
W3110 pWF14	1.52 ± 0.00
WG pWF14	n/d
WGB pWF14	n/d
WGE pWF14	n/d
WGM pWF14	1.91 ± 0.40
WGMB pWF14	1.35 ± 0.88
WGME pWF14	0.82 ± 0.28

WGMP pWF14	0.53 ± 0.04
WGMX pWF14	0.48 ± 0.04
WGP pWF14	n/d
WX pWF14	0.82 ± 0.04
WHI pWF14	n/d
WHIC pWF14	5.15 ± 0.76

n/d: no detectado por el método utilizado

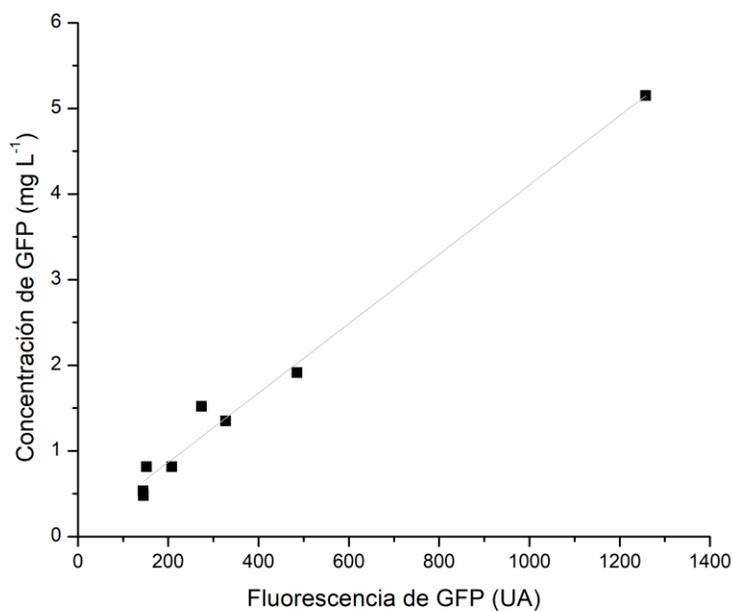


Figura 14. Correlación entre la fluorescencia y la concentración de GFP obtenida con $R=0.99375$.

Adicionalmente, se monitoreó la fluorescencia de NADH a lo largo de los cultivos. A continuación, se presentan las gráficas de fluorescencia de NADH en los cultivos con 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa de las cepas mutantes que presentaron mayores rendimientos y/o

producción de GFP, así como de la cepa nativa (figura 15). Se puede observar que las cepas WGMB pWF14 y WGM pWF14 presentan tendencias similares en ambas concentraciones de glucosa. Debido a que el uso de diferentes fuentes de carbono afecta la concentración intracelular de NADH (San, et al., 2002), se esperaba que los cambios en la fluorescencia de NADH se pudieran relacionar con las diferentes fases de crecimiento obtenidas debido a un crecimiento diaúxico. Sin embargo, las cepas WGMB pWF14 y WGM pWF14 presentan cambios en la fluorescencia de NADH alrededor de la hora 5, 20 y 40 del cultivo, contrario a lo especulado, estos cambios no coinciden con las diferentes fases de crecimiento observadas en los cultivos con 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa.

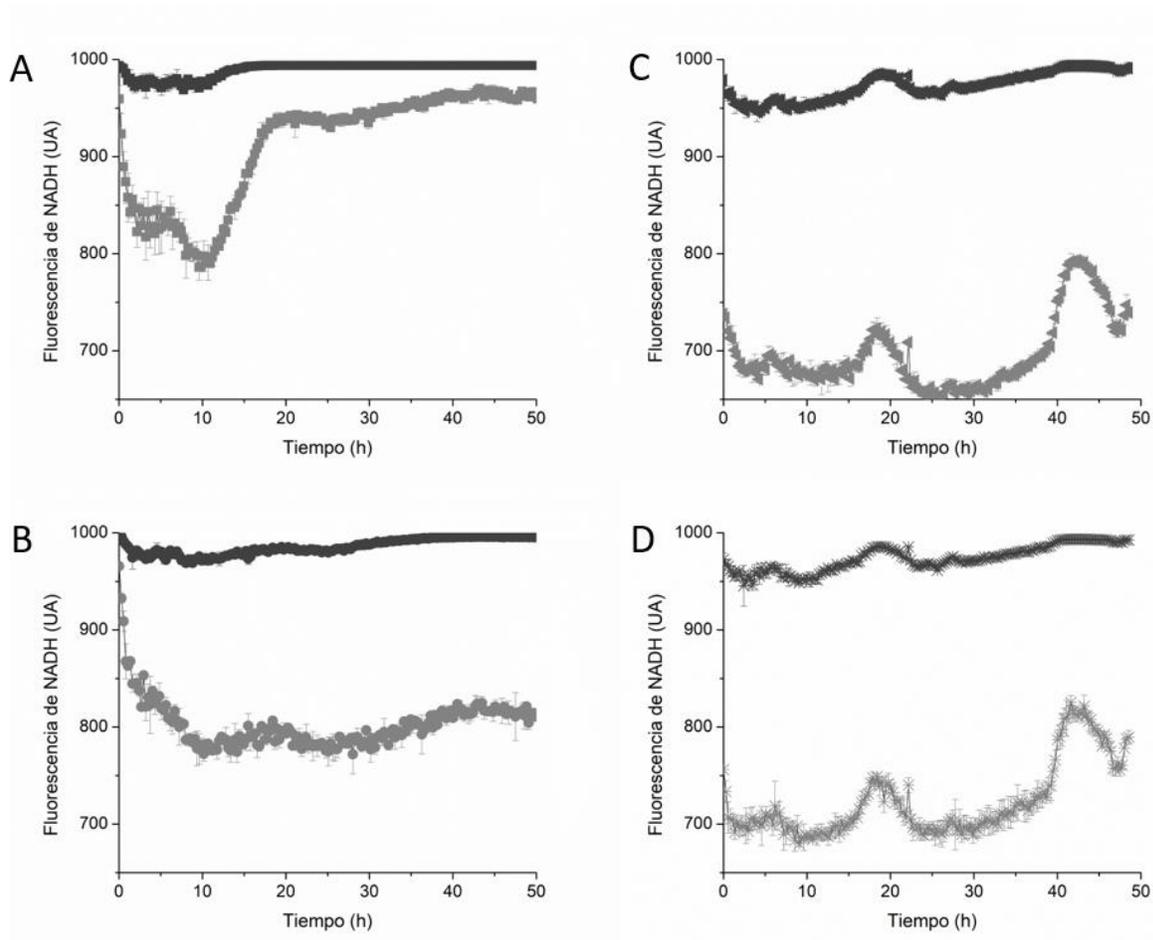


Figura 15. Fluorescencia de NADH a lo largo de los cultivos con 10 (línea negra) y 20 (línea gris) g L⁻¹ de glucosa de W3110 (A), WHIC (B), WGM (C) y WGMB (D). Las barras verticales muestran la desviación estándar.

En la cepa silvestre W3110 pWF14 también se observa un cambio metabólico alrededor de las horas 5 y 10, sin embargo, en ésta sí se puede observar una relación entre la segunda fase de crecimiento y el aumento en la fluorescencia de NADH. Para el caso de la cepa mutante WHIC pWF14 se pueden observar estos cambios metabólicos, sin embargo, son menos pronunciados comparados con las otras cepas. Al igual que en W3110 pWF14, los cambios en la fluorescencia de NADH en WHIC pWF14 coinciden con el cambio de fase de crecimiento que se presentó.

Al acumularse NADH, este cofactor actúa como un inhibidor alostérico de la enzima citrato sintasa, por lo que se reduce el flujo de acetil-CoA al TCA (Vemuri, et al., 2006b; Weitzman & Danson, 1976). Como ya se mencionó, la relación NADH/NAD⁺ está relacionada con la producción de acetato por sobreflujo metabólico, por lo que la formación de acetato se puede disminuir al reducir NADH/NAD⁺.

Assawajaruwan y colaboradores (2018) estudiaron la fluorescencia de NADH en cultivos de *S. cerevisiae*. En este estudio se observó que, al comenzar una alimentación exponencial de glucosa, la intensidad de la señal de NADH aumentó de manera importante. Como se puede observar en la figura 15, durante las primeras horas de los cultivos la fluorescencia de NADH disminuye y, para el caso de la cepa silvestre, aumenta de manera importante cuando comienza la segunda fase de crecimiento hasta estabilizarse una vez finalizado el cultivo. En las mutantes WGM, WGMB y WHIC también se puede observar que la fluorescencia de NADH aumenta al comenzar la segunda fase de crecimiento, lo cual refuerza la especulación de que durante la primera fase se consumen principalmente componentes del extracto de levadura, seguido de una segunda fase con un mayor consumo de glucosa. Sin embargo, para el caso de las mutantes, la señal de fluorescencia de NADH continúa con fluctuaciones durante la segunda fase de crecimiento. Estos resultados pueden indicar que las mutantes continúan consumiendo otros compuestos del extracto de levadura de manera simultánea al consumo de glucosa.

El extracto de levadura tiene una composición compleja; contiene péptidos, aminoácidos, oligonutrientes, vitaminas y otros factores de crecimiento importantes. Dentro de las vitaminas presentes en el extracto de levadura se encuentra el ácido pantoténico, el cual

es un precursor de acetil-CoA. Al tener este precursor presente el medio es posible que aumente la actividad del TCA, provocando un aumento en la concentración de NADH. Otra vitamina presente en el extracto de levadura es el ácido nicotínico, el cual es un precursor de NAD⁺ y NADP⁺, por lo que al consumirse podría cambiar el potencial redox de la célula, llevando a un cambio en la concentración de NADH. Para determinar la influencia de cada componente del extracto de levadura en la concentración intracelular de NADH es necesario un estudio más detallado. También se debe considerar que las mutaciones presentes en cada cepa pueden alterar de forma diferencial su capacidad de consumo de algunos de los componentes del extracto de levadura, lo cual tendría un impacto sobre la concentración de NADH. Estos datos muestran como las mutaciones en cada cepa pueden alterar la concentración de un importante metabolito celular como lo es el NADH. Es de esperarse que dichas mutaciones también alteren el estado metabólico de las cepas, lo cual deberá ser estudiado mediante técnicas que permitan establecer el metaboloma y el fluxoma bajo las condiciones estudiadas.

Con base en los resultados obtenidos, la cepa WHIC resulta atractiva debido a que presenta un incremento importante en el rendimiento producto-biomasa en las tres concentraciones de glucosa evaluadas, además de presentar la mayor concentración final de GFP en los cultivos de 20 g/L de glucosa. Las cepas WGM y WGMB también resultan interesantes; sin embargo, en todos los parámetros evaluados la mutante WHIC fue la que presentó mejores resultados. Conforme a esto se decidió enfocarse en la mutante WHIC pWF14 para evaluar su desempeño en la producción de GFP en cultivos de alta densidad celular con grandes cantidades de glucosa inicial.

6.2 Evaluación de WHIC pWF14 en cultivos de alta densidad de celular

6.2.1 Caracterización del crecimiento de WHIC pWF14

Se siguió la cinética de crecimiento, así como de producción de acetato en la cepa WHIC pWF14 en un medio mineral enriquecido con 48 g L^{-1} de extracto de levadura y 120 g L^{-1} de glucosa en reactor instrumentado (figura 16). Este cultivo presentó una μ global de $0.1 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, μ_1 de $0.36 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y μ_2 de $0.05 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. No se detectó producción de acetato en los cultivos realizados, lo cual coincide con lo reportado por Fuentes y colaboradores (2013) al momento de caracterizar las cepas en medio mineral y glucosa como única fuente de carbono. El cultivo entró al estado estacionario alrededor de la hora 30 y con una concentración de biomasa de 38 g L^{-1} . Sin embargo, la glucosa no se consumió totalmente. A la hora 38 del cultivo se puede observar que restan 14 g L^{-1} de glucosa. Es posible que, debido a su fondo genético, la cepa mutante requiera del consumo de algún componente del extracto de levadura para poder sintetizar las proteínas necesarias para el consumo de glucosa, por lo que se decidió evaluar el crecimiento en una concentración menor de glucosa (100 g L^{-1}) y una concentración ligeramente mayor de extracto de levadura (50 g L^{-1}).

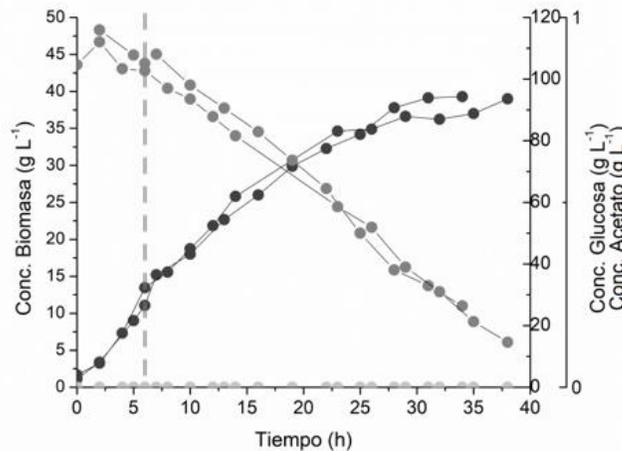


Figura 16. Crecimiento (●), consumo de glucosa (●) y producción de acetato (●) en duplicados WHIC pWF14 con 120 g L^{-1} de glucosa y 48 g L^{-1} .

En la figura 17 se muestra el crecimiento y el consumo de glucosa de WHIC pWF14 con 100 g L^{-1} de glucosa y 50 g L^{-1} de extracto de levadura. Este cultivo presentó una μ_{global} de $0.11 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$, μ_1 de $0.40 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ y μ_2 $0.05 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Al utilizar una concentración menor de glucosa se pudo observar que esta se consume totalmente alrededor de la hora 32. La concentración de biomasa máxima que alcanzaron estos cultivos fue de 45 g L^{-1} , mayor a lo obtenido con 120 g L^{-1} de glucosa y en un menor tiempo. Como ya se mencionó, es probable que WHIC requiera de uno o varios nutrientes presentes en el extracto de levadura para continuar consumiendo glucosa y generar biomasa, por lo que al aumentar la concentración de extracto de levadura y disminuir la concentración de glucosa, hubo un aprovechamiento total de esta última, alcanzando concentraciones de biomasa mayores a las obtenidas previamente.

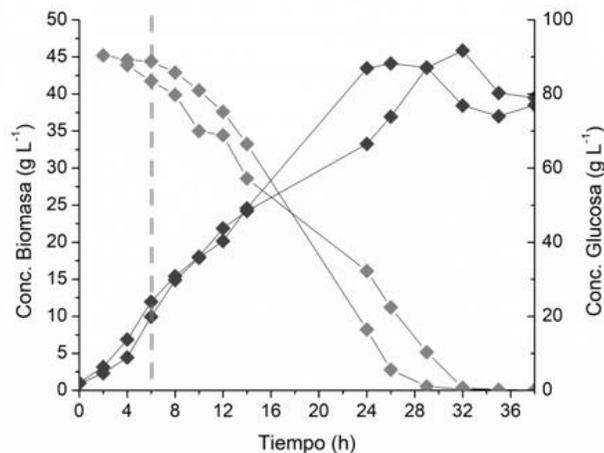


Figura 17. Crecimiento (●) y consumo de glucosa (◐) en duplicados WHIC pWF14 con 100 g L^{-1} de glucosa y 50 g L^{-1} .

En la tabla 7 se presenta la distribución de aminoácidos en la proteína presente en el extracto de levadura y en la proteína total de *E. coli*. Con estos datos se puede calcular la cantidad de aminoácidos presente en el medio de cultivo utilizando 50 g L^{-1} de extracto de levadura (considerando que el 73.8 % del extracto de levadura es proteína

(Laboratorios Britania, S/A)), así como la cantidad de biomasa de *E. coli* que se podría formar a partir de estas cantidades.

Tabla 7. Distribución de aminoácidos en la proteína total del extracto de levadura (Laboratorios Britania, S/A) y de E. coli (Beck, et al. 2020). Concentraciones de aminoácidos presentes en el medio mineral enriquecido con 50 g L⁻¹ de extracto de levadura y cantidad teórica de biomasa formada.

Aminoácido	Extracto de levadura (g por cada 100 g de proteína)	<i>E. coli</i> (g por cada 100 g de proteína)	Cantidad de aminoácido presente en el medio (g L⁻¹)	Cantidad de biomasa que se puede formar (g L⁻¹)
Alanina	8.7	7.1	3.2	45.2
Arginina	5.0	6.9	1.8	26.7
Asparagina/ aspartato	9.7	9.9	3.6	36.2
Cisteína	0.8	1.1	0.3	26.8
Glutamina/ glutamato	16.1	14.0	5.9	42.4
Glicina	4.9	6.4	1.8	28.3
Histidina	2.0	2.0	0.7	36.9
Isoleucina	5.6	4.9	2.1	42.2
Leucina	7.6	7.4	2.8	37.9
Lisina	8.0	6.7	3.0	44.1
Metionina	1.3	3.2	0.5	15.0
Fenilalanina	3.8	5.1	1.4	27.5
Prolina	4.0	3.6	1.5	41.0
Serina	4.7	4.0	1.7	43.4
Treonina	4.4	4.9	1.6	33.1
Triptófano	1.2	2.4	0.4	18.5
Tirosina	2.3	3.9	0.8	21.8
Valina	5.8	6.3	2.1	34.0

Como se puede observar, los aminoácidos limitantes bajo estas condiciones son metionina, triptófano y tirosina. En la figura 17 se encuentra señalado con una línea punteada el inicio de la segunda fase de crecimiento (debido a un crecimiento diaúxico) a la hora 6 del cultivo, en este punto la concentración de biomasa es de 14.3 g L^{-1} . Esta cantidad coincide con la cantidad teórica de biomasa que se podría formar a partir 0.5 g L^{-1} de metionina presente en el medio (lo correspondiente a 50 g L^{-1} de extracto de levadura), por lo cual es probable que este cambio en el crecimiento se deba a un agotamiento o una limitación de este aminoácido.

Similar a lo observado en este trabajo, Nacib y colaboradores (1991) reportaron que la cepa mutante *E. coli* C600 galK, ATCC 23724 (*lac*, *thr*, *leu*, *thia*), requiere de un compuesto presente en el extracto de levadura para ser capaz de consumir acetato. Sin embargo, no pudieron determinar cuál o cuáles son estos compuestos, por lo que proponen que este fenómeno puede deberse a interacciones sinérgicas, variaciones en las relaciones de las vitaminas, o bien por la presencia de otros compuestos orgánicos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los cultivos para evaluar la producción de GFP en la cepa WHIC pWF14 se realizaron con 100 g L^{-1} de glucosa y 50 g L^{-1} de extracto de levadura, ya que a estas concentraciones se obtiene un consumo total de glucosa, además de una mayor producción de biomasa.

6.2.2 Comparación de WHIC pWF14 con la cepa silvestre W3110 pWF14 en cultivos de alta densidad celular

Con la finalidad de evaluar el desempeño de la mutante WHIC en la producción de proteína recombinante en cultivos de alta densidad celular, se comparó su cultivo en modo lote con W3110 pWF14 en un cultivo modo lote alimentado. A partir de los resultados obtenidos en la sección anterior, se decidió realizar el cultivo de W3110 pWF14 con una μ_2 controlada a 0.05 h^{-1} y una concentración inicial de 15 g L^{-1} y 50 g L^{-1} de glucosa y extracto de levadura, respectivamente.

A continuación, se muestran las cinéticas de crecimiento, acumulación de acetato, producción de GFP y la concentración específica de GFP a lo largo de los cultivos de

WHIC y W3110 portando el plásmido pWF14 (figura 18). En la figura 19 se muestran las concentraciones de biomasa alcanzadas en los cultivos con ambas cepas, así como la concentración de GFP final, el rendimiento GFP-biomasa y tasa de producción específica de GFP.

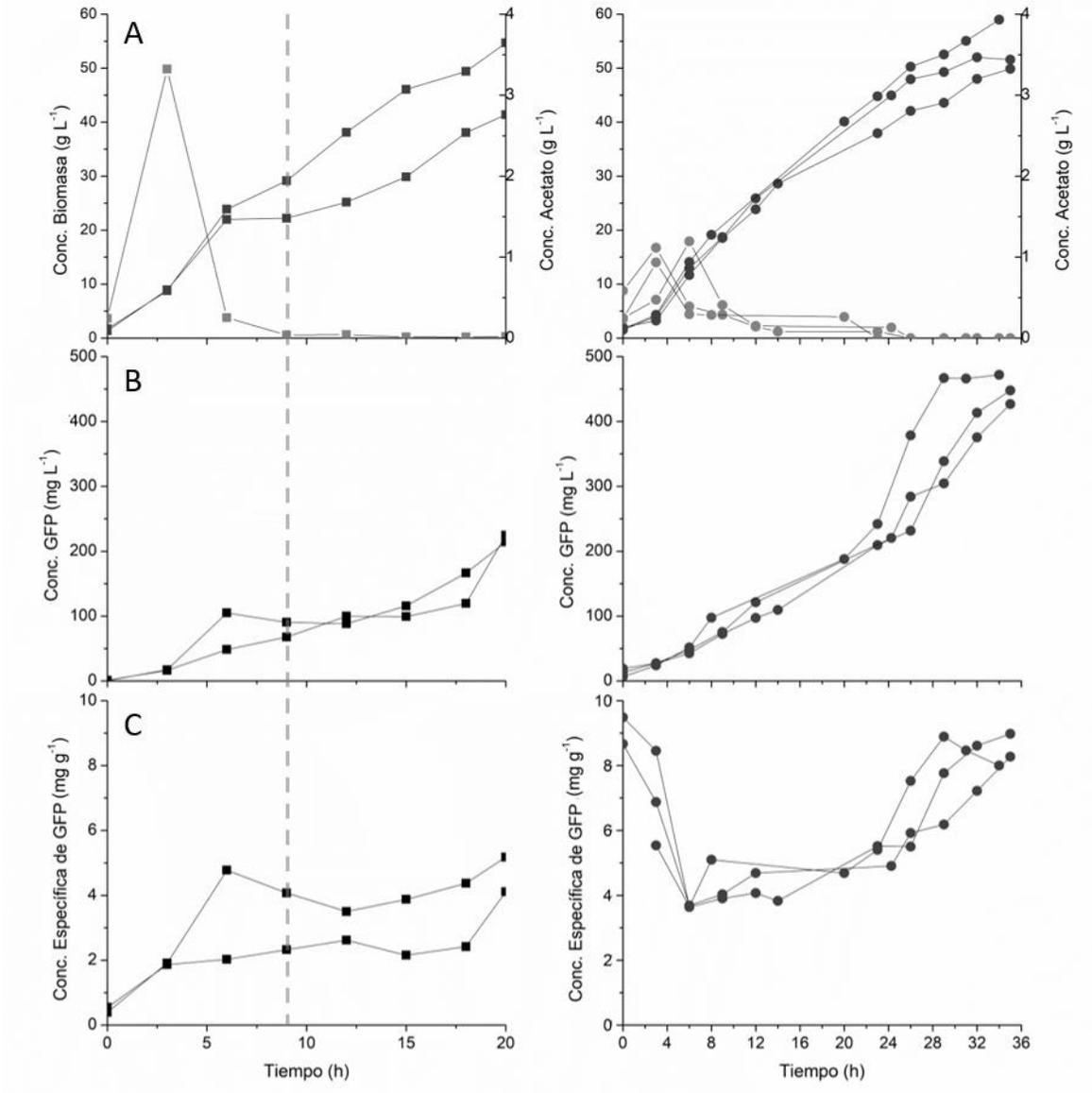


Figura 18. Crecimiento y acumulación de acetato (A), producción de GFP (B) y concentración específica de GFP (C) a lo largo de los cultivos de W3110 pWF14 en modo lote alimentado por duplicado (■) y WHIC pWF14 en modo lote por triplicado (●). El comienzo de la fase de alimentación en los cultivos modo lote alimentado se indica con una línea punteada.

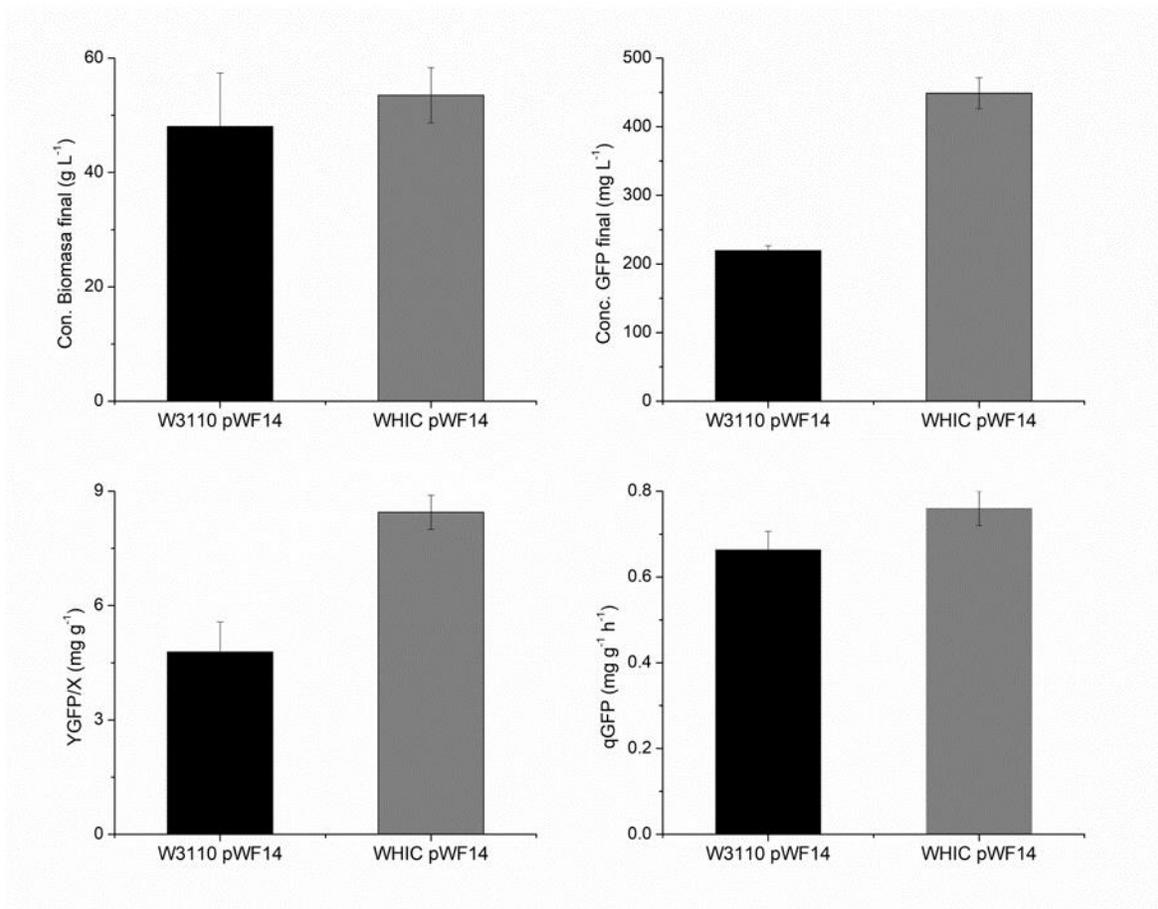


Figura 19. Concentraciones de biomasa y GFP final, rendimiento GFP-biomasa ($Y_{GFP/X}$) y tasa de producción específica de GFP (q_{GFP}) de los cultivos en modo lote alimentado de W3110 pWF14 y modo lote de WHIC pWF14. Las barras verticales muestran la desviación estándar entre los duplicados o triplicados realizados

La cepa silvestre W3110 pWF14 presentó una tasa de crecimiento específico de $0.46 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ durante la fase lote del cultivo, posterior a esto se logró controlar la μ durante la etapa de alimentación a $0.06 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. Al igual que en los cultivos con 10 y 20 g L⁻¹ de glucosa mostrados en la sección 6.1, la cepa mutante presentó dos fases de crecimiento. La primera fase tuvo una duración de 6 h con una μ_1 de $0.33 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$, mientras que la segunda fase duró 26 h a una μ_2 de $0.04 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.

Las cepas W3110 pWF14 y WHIC pWF14 no presentaron diferencias significativas en cuanto a la concentración final de biomasa, obteniendo 48 y 53.5 g L⁻¹ de biomasa, respectivamente. Sin embargo, se presentaron diferencias importantes en cuanto a la acumulación de acetato, la concentración final de GFP y el rendimiento $Y_{GFP/X}$. La mutante WHIC pWF14 presentó una concentración de acetato máxima 64 % menor a W3110 y alcanzó una concentración de GFP del doble, así un rendimiento 77% mayor a lo obtenido con su cepa parental. Respecto a la tasa de producción específica de GFP, la mutante WHIC pWF14 presentó una q_{GFP} 14.5 % mayor a la de W3110 pWF14.

Uno de los aspectos que hay que resaltar del presente trabajo es la cantidad de glucosa utilizada en los cultivos modo lote. Son pocos los trabajos en los que se han utilizado concentraciones altas de glucosa en cultivos modo lote, pues se encuentra ampliamente reportado que la glucosa a una concentración por arriba de 50 g L⁻¹ resulta inhibitoria para el crecimiento de *E. coli* (Riesenber et al., 1991). Al igual que en el presente trabajo, Lara y colaboradores (2008) utilizaron una concentración de 100 g L⁻¹ de glucosa en cultivos modo lote al evaluar la producción de proteína recombinante utilizando GFP como proteína modelo en la cepa previamente descrita VH32. En estos experimentos encontraron que, si bien la cepa modificada VH32 no incrementó la producción de GFP, sí acumuló menos acetato (15 % del valor de acumulación en W3110) aún en cantidades altas de glucosa inicial.

Wong y colaboradores (2007) eliminaron el operón *ptsHI* en la cepa silvestre GJT001 con la finalidad de reducir la acumulación de acetato. La producción de GFP se evaluó en la cepa mutante resultante (TC110) en medio LB 2X adicionado con 2 % de glucosa en cultivos modo lote y como resultado obtuvieron un incremento en la productividad volumétrica de GFP de 25 veces, comparada con la cepa parental. Los resultados obtenidos, al igual los trabajos de otros autores, indican que la modificación del sistema de transporte de glucosa resulta una estrategia atractiva no solo para reducir la producción indeseable de acetato, si no para aumentar la producción de proteína recombinante.

Como ya se mencionó, una de las limitaciones en los cultivos a gran escala son los gradientes ambientales. Estos gradientes pueden ser de algún nutriente o sustrato, o

bien, de oxígeno y suelen presentarse debido a un mezclado imperfecto (Lara et al., 2006a). La exposición de las células a estos gradientes puede llevar a serie de respuestas fisiológicas con impacto negativo, sin embargo, esto es un problema difícil de evitar. Los cultivos modo lote alimentado, los cuales son ampliamente utilizados en la industria, facilitan la formación de gradientes de sustrato al tener una alimentación externa. En este trabajo se presentó una alternativa biotecnológica a los cultivos modo lote alimentado, en el que, al tener una cepa modificada en el transporte de glucosa capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa sin acumular acetato, ya no se requiere de una alimentación externa, pues es posible añadir una alta concentración de glucosa al inicio del cultivo, evitando así la formación de gradientes. Otra de las ventajas de la presente propuesta es que al cultivarse en modo lote simple, no se requieren esquemas de control adicional, lo cual lleva a una reducción en el consumo de energía al no requerir de una bomba externa. Aunado a esto, el riesgo de contaminación se reduce, pues se cuenta con una entrada menos al sistema.

7. CONCLUSIONES

La modificación de genes relacionados con el importe de glucosa puede resultar en una disminución, o bien, en la completa eliminación de acumulación de acetato. Además, estas modificaciones pueden permitir un incremento en la producción de proteína recombinante al disminuir el desperdicio de carbono a metabolitos indeseables.

Dentro de la colección de cepas mutantes generada por Fuentes y colaboradores (2013), las cepas WGM, WGMB y WHIC portando el plásmido pWF14 presentaron rendimientos producto-biomasa 1.6, 2 y 4.2, respectivamente, mayores a lo obtenido la cepa nativa W3110 pWF14. Al evaluar la mutante WHIC pWF14 en una concentración alta de glucosa y extracto de levadura, se encontró que esta cepa no acumula acetato, además de presentar una producción de GFP 77 % mayor comparada con la cepa parental W3110 pWF14.

Tener una fábrica celular capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa sin acumular acetato y que además sea capaz de producir grandes cantidades de proteína recombinante, resulta atractivo como una alternativa a los cultivos en modo lote alimentado, pues se elimina la necesidad de esquemas de control y esfuerzos operacionales adicionales.

8. PERSPECTIVAS

La producción de proteínas recombinantes en cepas modificadas en el transporte de glucosa podría mejorarse con otras estrategias tales como la modificación del medio de cultivo o la implementación de un sistema de producción autoinducible controlado por diferentes fuentes de carbono. De acuerdo a los resultados, la mutante WHIC requiere de uno o varios componentes presentes en el extracto de levadura para continuar con el consumo de glucosa una vez que se llega a una limitación nutricional, por lo que resultaría interesante realizar los estudios necesarios para determinar cuál o cuáles son estos compuestos.

Otra perspectiva sería estudiar la heterogeneidad poblacional de la producción de GFP, pues se ha reportado que existen diferentes estados de producción dentro de una población celular (Fragoso-Jiménez et al., 2019). De igual forma, resulta interesante estudiar los efectos que tienen las deleciones en la expresión de genes relacionados con el transporte de glucosa, así como la acumulación de GFP en la fisiología celular.

Otro aspecto para tomar en cuenta es el uso de otro tipo de sustrato (*v. gr.* Lactosa, maltosa o glicerol), adicional a la glucosa, que permita tener una idea más clara del metabolismo presente en estas cepas mutantes. Debido a la diauxia observada y el análisis de aminoácidos presentes en el medio, resultaría interesante investigar la influencia de la suplementación de aminoácidos específicos (tales como metionina y triptófano) en el crecimiento celular, con lo cual se podrían modificar las diferentes fases de crecimiento observadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Atsumi S, Cann A F, Connor M R, Shen C R, Smith K M, Brynildsen M P, Chou K J, Hanai T & Liao J C (2008) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* 10:305-311.

Bäcklund, E., Markland, K., & Larsson, G. (2008). Cell engineering of *Escherichia coli* allows high cell density accumulation without fed-batch process control. *Bioprocess and Biosystems engineering*, 31(1), 11-20.

Barford J P & Hall R J (1979) An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *Microbiology*. 114:267-275.

Basan M, Hui S, Okano H, Zhang Z, Shen Y, Williamson J R & Hwa T (2015) Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature*. 528:99.

Bauer K A, Ben-Bassat A R I E, Dawson M, De La Puente V T & Neway J O (1990) Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-1 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1296-1302.

Berríos-Rivera S J, Bennett G N & San K Y (2002) Metab. Eng. of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metab. Eng.*, 4:217-229.

Blunt W, Dartailh C, Sparling R, Gapes D J, Levin D B & Cicek N (2019) Development of High Cell Density Cultivation Strategies for Improved Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Productivity Using *Pseudomonas putida* LS46. *Bioengineering*. 6:89.

Borja G M, Mora E M, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb. Cell Fact.* 11:132.

Borja G M, Ramírez O T & Lara A R (2014) Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. *BioTecnología*. 17:87-109.

Bulté, D. B., Palomares, L. A., Parra, C. G., Martínez, J. A., Contreras, M. A., Noriega, L. G., & Ramírez, O. T. (2020). Overexpression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier reduces lactate production and increases recombinant protein productivity in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*.

Castaño-Cerezo S, Bernal V, Post H, Fuhrer T, Cappadona S, Sánchez-Díaz N C, Sauer U, Heck A J, Altelaar A F & Cánovas M (2014) Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 10.

Castaño-Cerezo S, Bernal V, Röhrig T, Termeer S & Cánovas M (2015) Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N ϵ -lysine acetylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 3533-3545.

Chen P T, Chiang C J, Chen Y T, Lin H C, Liu C H, Chao Y P & Shaw J F (2012) Strategy for stable and high-level expression of recombinant trehalose synthase in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* 60: 6063-6068.

Cherrington C A, Hinton M, Pearson G R & Chopra I (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 161-165.

Childers D S, Raziunaite I, Avelar G M, Mackie J, Budge S, Stead D ... & Brown A J (2016) The rewiring of ubiquitination targets in a pathogenic yeast promotes metabolic flexibility, host colonization and virulence. *PLoS Pathog.* 12: e1005566.

Cho S, Shin D, Ji G E, Heu S & Ryu S (2005) High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 119: 197-203.

Chou C H, Bennett G N & San K Y (1994) Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 952-960.

Chrast L, Chaloupkova R & Damborsky J (2018) Gram-scale production of recombinant microbial enzymes in shake flasks. *FEMS Microbiol. Lett.* 365: fnx265.

Contiero J, Beatty C, Kumari S, DeSanti C L, Strohl W R & Wolfe A (2000) Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 421-430.

Curtis S J & Epstein W (1975) Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J. Bacteriol.* 122: 1189–1199.

De Anda R, Lara A R, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8: 281-290.

De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W & Vandamme E (2007) Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 689-700.

Death A & Ferenci T (1994) Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176: 5101-5107.

Death, A., Notley, L., & Ferenci, T. (1993). Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *Journal of bacteriology*, 175(5), 1475-1483.

Delgado J & Liao J C (1997) Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13: 361-367.

Demain A L & Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27: 297-306.

Deo S K & Daunert S (2001) Luminescent proteins from *Aequorea victoria*: applications in drug discovery and in high throughput analysis. *Fresen. J. Anal. Chem.* 369: 258-66.

Dien B S, Nichols N N & Bothast R J (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-264.

Djurdjevic I, Zelder O & Buckel W (2011) Production of glutaconic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 320-322.

Eiteman M A & Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.*, 24: 530-536.

Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M, Portais J C & Létisse F (2017) Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Sci. Rep.* 7: 42135.

Feist A M, Henry C S, Reed J L, Krummenacker M, Joyce A R, Karp P D, Broadbelt L J, Hatzimanikatis V & Palsson B Ø (2007) A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3.

Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G & Bolívar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.*, 7: 70-87.

Fragoso-Jiménez J C, Baert J, Nguyen T M, Liu W, Sassi H, Goormaghtigh F, Van Melderen, L, Gaytán P, Hernández-Chávez G, Martínez A, Delvigne F & Gosset G (2019) Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microb. Cell Fact.*, 18: 26.

Fuentes L G, Lara A R, Martínez L M, Ramírez O T, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2013) Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microb. Cell Fact.*, 12: 42.

Galindo J, Barrón B L & Lara A R (2016) Improved production of large plasmid DNA by enzyme-controlled glucose release. *Ann. Microbiol.* 66: 1337-1342.

Gokarn R, Evans J, Walker J, Martin S, Eiteman M & Altman E (2001) The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 188-195.

Görke B, Rak B (1999) Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *EMBO J.* 18:3370-3379.

Gosset G (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb. Cell Fact.* 4:14.

Habicher T, John A, Scholl N, Daub A, Klein T, Philip P & Büchs J (2019) Introducing substrate limitations to overcome catabolite repression in a protease producing *Bacillus licheniformis* strain using membrane-based fed-batch shake flasks. *Biotechnol. Bioeng.* 116: 1326-1340.

Han C, Zhang W C, You S & Huang L Y (2004) Knockout of the ptsG gene in *Escherichia coli* and cultural characterization of the mutants. *Chin. J. Biotechnol.* 20: 16-20.

Han Q & Eiteman M A (2019) Acetate formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* K-12 with an elevated NAD (H) pool. *Eng. Life Sci.*

Hu W S, Dodge T C, Frame K K & Himes V B (1987) Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Dev. Biol. Stand.* 66: 279-290.

Hwang K W, Raje M, Kim K J, Stark B C, Dikshit K L & Webster D A (2001) *Vitreoscilla* Hemoglobin intracellular localization and binding to membranes. *J. Biol. Chem.* 276: 24781-24789.

Jaén K E, Lara A R & Ramírez O T (2013) Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem. Eng.* 79: 230-238.

Jayapal K P, Wlaschin K F, Hu W & Yap M G (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 103: 40.

Jeong J Y, Kim Y J, Cho N, Shin D, Nam T W, Ryu S & Seok Y J (2004) Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 38513-38518.

Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D & Büchs J (2006) Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 433-445.

Jung Y K & Lee S Y (2011) Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 151: 94-101.

Jung Y K, Kim T Y, Park S J & Lee S Y (2010) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 161-171.

Keasling J D (2010) Manufacturing molecules through Metab. Eng. *Science*, 330: 1355-1358.

Kim J Y & Cha H J (2003) Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 841-853.

Kim S Y, Nam T W, Shin D, Koo B M, Seok Y J & Ryu S (1999) Purification of Mlc and analysis of its effects on thepts expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 25398-25402.

Kimata K, Inada T, Tagami H & Aiba H (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol.* 29: 1509-1519.

Knabben I, Regestein L, Marquering F, Steinbusch S, Lara A R & Büchs J (2010) High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150: 73-79.

Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J & Büchs J (2007) High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J. Biotechnol.* 132: 167-179.

Knoll A, Maier B, Tscherrig H & Büchs J (2005) The oxygen mass transfer, carbon dioxide inhibition, heat removal, and the energy and cost efficiencies of high pressure fermentation. *J. Technol. Transfer.* 92: 77-99.

Korner H, Sofia HJ, Zumft WG (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:559-592.

Korz D J, Rinas U, Hellmuth K, Sanders E A & Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39(1), 59-65.

Krause M, Ukkonen K, Haataja T, Ruottinen M, Glumoff T, Neubauer A, Neubauer P & Vasala A (2010) A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 11.

Kumar A & Pal D (2016) Green fluorescent protein and their applications in advance research. *Res. J. Appl. Sci. Eng. Tech.* 1: 42-46.

Kumar, J., Chauhan, A. S., Shah, R. L., Gupta, J. A., & Rathore, A. S. (2020). Amino acid supplementation for enhancing recombinant protein production in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 117:2420–2433.

La Merie Business Intelligence. (2018). Disponible en: <http://www.lamerie.com>.

Lara A R & Ramírez O T (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Recombinant gene expression*. Humana Press, Totowa, NJ.

Lara A R (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10: 209-223.

Lara A R, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2008) Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 893-901.

Lee S Y (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14: 98-105.

Liberti M V & Locasale J W (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends. Biochem. Sci.* 41: 211-218.

Licona-Cassani C, Lara A R, Cabrera-Valladares N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2014) Inactivation of pyruvate kinase or the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system increases shikimic and dehydroshikimic acid yields from glucose in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microb. Biotech.* 24: 37-45.

Lux R, Jahreis K, Bettenbrock K, Parkinson JS, Lengeler JW (1995) Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:11583-11587.

March J C, Eiteman M A & Altman E (2002) Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5620-5624.

Matsui T, Shinzato N, Yokota H, Takahashi J & Sato S (2006) High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. *Process Biochem.* 41: 920-924.

McDonald T P, Walmsley A R & Henderson P J (1997) Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* 272: 15189-15199.

Molenaar D, Van Berlo R, De Ridder D & Teusink B (2009) Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol. Syst. Biol.* 5.

Nancib, N., Branlant, C., & Boudrant, J. (1991). Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology*, 8(3), 165-169.

Negrete A, Majdalani N, Phue J N & Shiloach J (2013) Reducing acetate excretion from *E. coli* K-12 by over-expressing the small RNA SgrS. *New Biotechnol.* 30: 269-273.

Negrete A, Ng W I & Shiloach J (2010) Glucose uptake regulation in *E. coli* by the small RNA SgrS: comparative analysis of *E. coli* K-12 (JM109 and MG1655) and *E. coli* B (BL21). *Microb. Cell Fact.* 9: 75.

Nikaido, H. (1996). Outer Membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. Neidhardt, EC., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., & Umberger, E.H. (Eds.), Vol. 1, pp. 29-47. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Notley-McRobb L & Ferenci T (2000) Substrate specificity and signal transduction pathways in the glucose-specific enzyme II (EIIGlc) component of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *J. Bacteriol.*, 182: 4437-4442.

Novotny MJ, Frederickson WL, Waygood EB, Saier MH Jr (1985) Allosteric regulation of glycerol kinase by enzyme IIIglc of the phosphotransferase system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 162:810-816.

Pablos T E, Sigala J C, Le Borgne S & Lara A R (2014) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* 9: 791-799.

Paczia N, Nilgen A, Lehmann T, Gätgens J, Wiechert W & Noack S (2012). Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. *Microb. Cell Fact.* 11: 122.

Panula-Perälä J, Šiurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn M G & Neubauer P (2008) Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 7: 31.

Perrenoud A & Sauer U (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 3171-3179.

Phue J N & Shiloach J (2004) Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J. Biotechnol.* 109: 21-30.

Plumbridge J (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:187-193.

- Pörtner, R., & Märkl, H. (1998). Dialysis cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(4), 403-414.
- Ramírez E A, Velázquez D & Lara A R (2016) Enhanced plasmid DNA production by enzyme-controlled glucose release and an engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 38: 651-657.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre W A, Pohl H D, Korz D, Sanders E A, Ross A & Deckwer W D (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20: 17-27.
- Rossi, J. J., Soberon, X., Marumoto, Y., McMahon, J., & Itakura, K. (1983). Biological expression of an *Escherichia coli* consensus sequence promoter and some mutant derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(11), 3203-3207.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk O P, Orhan F, Galafassi S, Merico A, Woolfit M, Compagno, C & Piškur J (2011) Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* 2:302.
- Rue S M, Anderson P W, Gaylord M R, Miller J J, Glaser S M & Lesley, S. A. (2019) A high-throughput system for transient and stable protein production in mammalian cells. *High-Throughput Protein Production and Purification*. Humana, New York, NY.
- Saier MH, Ramseier TM, Reizer J (1996) Regulation of carbon utilization. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cell. Mol. Biol.* 1325-1343.
- Samper G P (2019) The Crabtree effect shapes *Saccharomyces cerevisiae* lag phase.
- Sánchez A M, Bennett G N & San K Y (2005) Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol. Prog.* 21: 358-365.
- Selifonova O V, Jessen H, Gort S J, Selmer T & Buckel W (2002) 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds. PCT WO 02/ 42418.
- Seok YJ, Koo BM, Sondej M, Peterkofsky A (2001) Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:385-393.

Sigüenza R, Flores N, Hernández G, Martínez A, Bolívar F & Valle F (1999) Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 587-592.

Soto R, Caspeta L, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng.* 56: 165-171.

Suthers PF & Cameron DC (2005) Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. US patent 6,852,517.

Szenk M, Dill K A & de Graff A M (2017) Why do fast-growing bacteria enter overflow metabolism? Testing the membrane real estate hypothesis. *Cell Syst.* 5: 95-104.

Tsang A W & Escalante-Semerena J C (1998) CobB, a new member of the SIR2 family of eukaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide: 5, 6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* 273: 31788-31794.

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein.

Underwood S A, Zhou S, Causey T B, Yomano L P, Shanmugam K T & Ingram L O (2002) Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6263-6272.

Valgepea K, Adamberg K, Nahku R, Lahtvee P J, Arike L & Vilu R (2010) Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Syst. Biol.* 4: 166.

Varma A & Palsson B O (1994) Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotech.* 12: 994.

Veit A, Polen T & Wendisch V F (2007) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 406-421.

Vemuri G N, Altman E, Sangurdekar D P, Khodursky A B & Eiteman M A (2006b) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3653-3661.

Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2002) Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1715-1727.

Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2006a) Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 538-542.

Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36: 1136-1145.

Wei X X & Chen G Q (2008) Applications of the VHB gene vgb for improved microbial fermentation processes. *Methods in enzymology*. Academic Press.

Withers S T, Gottlieb S S, Lieu B, Newman J D & Keasling J D (2007) Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6277-6283.

Wlaschin K F & Hu W S (2007) Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J. Biotechnol.* 131: 168-176.

Wolfe A J (2005). The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12-50.

Wong, M. S., Wu, S., Causey, T. B., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2008). Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metabolic engineering*, 10(2), 97-108.

Yang H, Liao Y, Wang B, Lin Y & Pan L (2011) Draft genome sequence of *Escherichia coli* XH001, a producer of L-threonine in industry. *J. Bacteriol.* 193.

Yao R, Hirose Y, Sarkar D, Nakahigashi K, Ye Q & Shimizu K (2011) Catabolic regulation analysis of *Escherichia coli* and its crp, mlc, mgsA, pgi and ptsG mutants. *Microb. Cell Fact.* 10: 67.

Zeng H & Yang A (2019) Modelling overflow metabolism in *E. coli* with flux balance analysis incorporating differential proteomic efficiencies of energy pathways. *BMC Syst. Biol.* 13: 3.

Zhang J, Sprung R, Pei J, Tan X, Kim S, Zhu H, ... & Zhao Y (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. & Cell. Proteomics.* 8: 215-225.

Zhuang K, Vemuri G N & Mahadevan R (2011) Economics of membrane occupancy and respiro-fermentation. *Mol. Syst. Biol.* 7.

Zimmer M (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102: 759-782.