



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

LAS IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA REDUCCIÓN EN LA  
CAPACIDAD DE CONSUMO DE GLUCOSA EN *ESCHERICHIA COLI* Y SU  
APLICACIÓN COMO ESTRATEGIA PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN  
DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JUAN CARLOS FRAGOSO JIMENEZ

Dr. GUILLERMO GOSSET LAGARDA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. ROSA MARIA GUTIERREZ RIOS  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS  
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Dr. LUIS CASPETA GUADARRAMA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Abril., 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM –Dirección General de Bibliotecas  
Tesis Digitales  
Restricciones de uso

**DERECHOS RESERVADOS ©PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Integrantes del comité tutor**

**Dr. Guillermo Gosset Lagarda. (tutor principal)**

Departamento de ingeniería celular y biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos**

Departamento de microbiología molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM

**Dr. Miguel Ángel Carlos Cevallos Gaos**

Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

**Dr. Luis Caspeta Guadarrama**

Departamento de ingeniería celular y biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.

## **Integrantes del jurado de examen de grado**

**PRESIDENTE: Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella**

Departamento de ingeniería celular y biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Vocal: Dr. Juan Carlos Sigala Alanís**

División de ciencias naturales e ingeniería, Departamento de procesos y tecnología, UAM-Cuajimalpa.

**Vocal: Dr. Dimitris Georgellis**

Instituto de Fisiología celular, UNAM.

**Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla**

Instituto de Química, UNAM.

**Secretario: Dra. Cinthia Ernestina Núñez López**

Departamento de microbiología molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Instituto de Biotecnología-UNAM en Cuernavaca, Morelos, México. Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) donativo A1-S-8646 y beca 404461. El presente trabajo ha sido presentado en diferentes instancias gracias al “Programa de Apoyo a los Estudios del Postrado” (PAEP).

# Agradecimientos

Agradezco al Dr. Guillermo Gosset Lagarda y demás investigadores que pertenecen al laboratorio 4 del Consorcio Bolívar-Gosset-Martínez del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM para la realización de esta investigación.

Agradezco de forma especial a la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, Dr. Luis Caspeta Guadarrama y al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por su trabajo, apoyo y valiosa dirección a través de las diferentes etapas de este. Especialmente, por su participación en crítica y aportaciones intelectuales que permitieron la concepción, desarrollo y realización de este trabajo y de lo relacionado con mi formación profesional durante esta etapa. Agradezco particularmente al Dr. Alfredo Martínez por su participación en la revisión crítica de los artículos publicados durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología.

También agradezco al personal técnico de M. C. Georgina Teresa Hernández Chávez, M.C. Luz María Martínez Mejía, Dra. Noemí Flores Mejía por su apoyo técnico y conocimientos aportados durante la realización de este proyecto. Además, se agradece al personal de apoyo y administrativo que permitieron el desarrollo de este proyecto, Mercedes Ensaldo, Manuel, Delia Caro, Rubí Robledo y Aurelia.

Agradezco así mismo a mis compañeros de laboratorio, en especial a Juan Andrés Martínez, Dulce Catalina Díaz, Karina Vite, Andrea Sabido por su apoyo y guía a lo largo de la investigación.

Agradezco de manera especial a la Dra. Jimena Isaias Cid Uribe y familia, cuyo apoyo incondicional y compañía me han impulsado a realizar y concluir esta etapa de mi formación.

Finalmente, el presente trabajo no hubiera sido posible sin los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) donativo A1-S-8646 y beca número 404461.

# Índice general

AGRADECIMIENTOS .....	V
ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS EN ORDEN DE APARICIÓN .....	XII
RESUMEN .....	XIV
SUMMARY .....	XVII
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Introducción</i> .....	2
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> y su papel como fabrica celular bacteriana.....	2
1.1.2.    Glucosa y <i>E. coli</i> .....	2
1.1.3.    Los sistemas fosfotransferasa (PTS) para fuentes de carbono .....	2
1.1.4.    Represión catabólica por carbono (CCR).....	3
1.1.5.    Sistemas de transporte de glucosa distintos al PTS .....	4
1.1.6.    Glucosa a través del metabolismo central .....	4
1.1.7.    El acetato como un ácido, sus efectos y producción en células de <i>E. coli</i> .....	5
1.1.8.    Estrategias para eliminar o mitigar la excreción de ácido acético en procesos de producción de proteínas recombinantes.....	6
1.1.9.    Estrategias de cultivo para evitar la acumulación de acetato en el medio de cultivo.....	6
1.1.10.    Estrategias de modificación genética para evitar la acumulación de acetato en el medio de cultivo	7
1.2. <i>Antecedentes</i> .....	10
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1. <i>Justificación</i> .....	15
2.2. <i>Hipótesis</i> .....	15
2.3. <i>Objetivos</i> .....	15
2.3.1.    Objetivo general.....	15
2.3.2.    Objetivos particulares .....	15
<b>CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Cepas bacterianas y plásmido</i> .....	18
3.1.1.    Cepas bacterianas .....	18
3.2. <i>Medios y condiciones de cultivo</i> .....	20
3.2.1.    Conservación de cepas.....	20
3.2.2.    Obtención de las cepas transformantes.....	20
3.3. <i>Cinéticas de producción de GFP (Pre-inóculo)</i> .....	20
3.3.1.    Cinética de producción de GFP en matraz bafleado de 250 mL.....	20
3.3.2.    Cinéticas de producción de GFP en biorreactores de 250 mL.....	21
3.3.3.    Para la caracterización de las cepas mutantes en 20 g/L de glucosa y toma de muestras para los experimentos de RNA-seq .....	22
3.3.4.    Cultivos en reactores microfluídicos experimentos de toma de imágenes en tiempo real .....	23
3.4. <i>Métodos analíticos</i> .....	24
3.4.1.    Medición de biomasa espectrofotométricamente y correlación DO <sub>600nm</sub> peso seco de biomasa. .	24
3.4.2.    Producción y purificación de GFP-His.....	24
3.4.3.    Medición de GFP por fluoroespectrometría .....	25

3.4.4.	Análisis de sobrenadantes por HPLC.....	25
3.4.5.	Cálculo de parámetros cinéticos y de fermentación.....	25
3.5.	<i>Citometría de flujo</i> .....	26
3.5.1.	Correlación de fluorescencia y número de moléculas de GFP en citometría de flujo.....	26
3.6.	<i>Extracciones de ARN por medio del kit RNeasy (Qiagen) y método del fenol caliente.</i> .....	27
3.6.1.	Experimentos RNA-seq.....	27
3.6.2.	Construcción de biblioteca de ARNm y secuenciación.....	27
3.6.3.	Análisis de expresión diferencial por comparación por pares de las cepas.....	28
3.6.4.	Anotación de los genes diferencialmente expresados usando los COG ( <i>Clusters of Orthologous Groups</i> )	28
3.6.5.	Experimentos RT-qPCR: extracción y purificación del ARN, síntesis de ADNc.....	29
3.6.6.	RT-qPCR.....	29
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....		<b>30</b>
4.1.	<i>Caracterización fisiológica y de poblaciones de las cepas W3110/pV21, WG/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en matraces y biorreactores con diferentes concentraciones de glucosa.</i> .....	31
4.1.1.	Caracterización cinética y de producción de las cepas de <i>E. coli</i> W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en matraces de 250 mL con medio mínimo M9 con 10 g/L de glucosa.....	31
4.1.2.	Caracterización cinética y de producción de las cepas de <i>E. coli</i> W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en biorreactores de 250 mL con medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa.....	33
4.1.3.	Segregación poblacional en las cepas de <i>E. coli</i> W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 usando medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores: coexistencia de estados de alta y baja producción.....	35
4.2.	<i>Caracterización del estado de alta producción de la cepa de E. coli WG/pV21 en reactores microfluidicos usando medio M9 con 20 g/L de glucosa: La acumulación de GFP puede provocar la filamentación celular.</i> .....	39
4.2.1.	Imágenes en reactores microfluidicos.....	39
4.2.2.	Rojas, pero no muertas.....	42
4.3.	<i>Caracterización fisiológica de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores de 1 L.</i> .....	43
4.3.1.	Caracterización cinética de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores de 1 L.....	43
4.3.2.	Análisis de expresión diferencial, abundancia de lecturas y mapeo.....	46
4.3.3.	Respuesta transcriptómica global entre las cepas con capacidad reducida de consumo de glucosa.	47
4.3.4.	Descripción de los transcriptomas de las cepas mutantes.....	48
4.3.4.1.	Cepas mutantes comparadas contra la cepa W3110.....	48
4.3.5.	Comparaciones ente pares de cepas.....	53
4.3.5.1.	Comparación entre la cepa W3110 y WG:.....	54
4.3.5.2.	Comparación entre la cepa WG y WGM:.....	56
4.3.5.3.	Comparación entre la cepa WGM y WGMC:.....	59
4.3.5.4.	Comparación entre la cepa WGMC y WHIC:.....	61
4.3.6.	Validación de la expresión génica por qPCR.....	63
4.4.	<i>Correlación entre la qs y los niveles de expresión.</i> .....	65
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y PRODUCTOS</b> .....		<b>69</b>
5.1.	<i>Conclusiones</i> .....	70
5.2.	<i>Perspectivas</i> .....	71
5.3.	<i>Productos</i> .....	72
<b>ANEXO I. REFERENCIAS</b> .....		<b>XVII</b>
<b>ANEXO II. PUBLICACIONES.</b> .....		<b>XXVI</b>



# Índice de figuras

Figura 1. Transporte y metabolismo de glucosa en <i>E. coli</i> . Esquema de los sistemas de transporte de glucosa principales de <i>E. coli</i> de tipo PTS y no PTS; así como las vías glucolítica, TCA y de producción de ácido acético.....	3
Figura 2. $\mu$ como función de la $q_s$ de la colección de cepas generadas de Fuentes LG. Tomado de (Fuentes et al. 2013).....	11
Figura 3. $Y_{p/X}$ como función de la $q_s$ para varias cepas de <i>E. coli</i> . Tomado de (Fuentes et al. 2013). .....	11
Figura 4. Esquema del plásmido pV21. El plásmido pV21 contiene un sitio de replicación tipo EcolE1, gen de resistencia a espectinomicina y el gen <i>gfp</i> bajo el control del promotor <i>plac</i> . ...	18
Figura 5. Correlación de fluorescencia y número de moléculas de GFP en citometría de flujo. Diagrama de dispersión de las microesferas de validación (izquierda). Pueden observarse 6 poblaciones de microesferas que tienen diferentes cantidades específicas de moléculas de fluoresceína. Regresión matemática que relaciona la intensidad de la fluorescencia FL-1 con una cantidad de moléculas de GFP (Derecha). ....	27
Figura 6. Correlación entre $\mu$ y la $q_s$ . $\mu$ como función de $q_s$ para las cepas pV21 cultivadas en matraz (Círculos negros) y biorreactor (Cuadros rojos) en medio M9 con 10 y 20 g/L de glucosa, respectivamente. Líneas punteadas corresponden a la tendencia de los puntos en matraz (línea negra) y biorreactor (línea roja). ....	32
Figura 7. Disminuir la $q_s$ disminuye la $\mu$ y $q_{ac}$ pero incrementa el título de GFP. A. Gráficos de las cinéticas de producción de biomasa, consumo de glucosa, producción de acetato y GFP de las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz B. Gráficos de las cinéticas de producción de biomasa, consumo de glucosa, producción de acetato y GFP de las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en biorreactor. ....	32
Figura 8. La producción máxima de GFP se da alrededor del 50% de la $q_s$ máxima. $Y_{GFP/X}$ como función de la $q_s$ (izquierda), $q_{GFP}$ en función de $q_s$ (derecha) para las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz (círculos negros) y biorreactor (cuadros rojos) en medio M9 con 10 y 20 g/L de glucosa. Líneas punteadas representan tendencia de los puntos de los experimentos realizados en matras (línea negra) y biorreactor (línea roja). ....	35
Figura 9. Determinación de los parámetros basales de tamaño y fluorescencia de <i>E. coli</i> W3110 en citómetro de flujo. Gráfico de dispersión de la cepa W3110 sin plásmido pV21, eje Y “fisiológico” (número de moléculas de GFP por célula; FL1) contra eje X “tamaño/filamentación” (FSC; Fordward scatter channel). Línea en negro valor de la media del tamaño/filamentación; línea en rojo +1 desviación estándar; línea en verde valor considerado como autofluorescencia. ....	36
Figura 10. Coexistencia de fenotipos de alta y baja producción de GFP en cultivos de <i>E. coli</i> WG. Ejemplo de segregación poblacional ocurrida durante el cultivo de la cepa WG en biorreactor. Muestra tomada después de 6 horas del inicio del cultivo. En el panel lateral se indican las poblaciones presentes denominadas de baja o nula producción (células que no producen GFP), en estado de transición (células diferenciándose hacia el estado de producción) y de alta producción (células altamente fluorescentes).....	37

Figura 11. Esquema de la red de regulación transcripcional involucrada en la inducción del operón <i>lac</i> en <i>E. coli</i> . .....	38
Figura 12. La filamentación celular puede estar relacionada con el fenotipo de alta producción de GFP. Cultivo de la cepa WG de <i>E. coli</i> . Imágenes tomadas al inicio ( $t_0=0$ minutos), 70 minutos después ( $t_{70}=70$ minutos) y tiempo final ( $t_{120}=120$ minutos). En el $t=120$ min, se muestra a la izquierda una colonia de células heterogénea (Colonia 1) con células de diferente tamaño, algunas células se observan claramente verdes, es decir produciendo GFP. A la derecha se muestra una colonia más homogénea (Colonia 2) con células de tamaño similar y sin fluorescencia. ....	40
Figura 13. El incremento en la producción de GFP corresponde al incremento de GFP producido por célula. Correlación entre la producción de GFP a nivel de célula única y la producción global de GFP. El área sombreada corresponde a la abundancia de proteínas típica en <i>E. coli</i> . ....	41
Figura 14. La filamentación celular podría estar relacionada con el incremento de la permeabilidad de la membrana celular. (a) Gráfico de dispersión de una muestra de la cepa WG/pV21 de <i>E. coli</i> después de 12 horas de cultivo en biorreactor. Distribución de la población celular: eje X tamaño celular (FSC), eje Y contenido intracelular de GFP (FL-1 moléculas de GFP por célula). Recuadro color rojo se demarcaron la población de células con el mayor nivel de GFP por célula y mayor tamaño, cuadrante superior derecho del gráfico de dispersión. (b) microscopía de fluorescencia, célula filamentosa que exhibe alta afinidad por PI. ....	42
Figura 15. Correlación entre la $q_s$ y $\mu$ . $\mu$ como función de la $q_s$ de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC. ....	44
Figura 16. Caracterización de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato de las cepas W3110 y mutantes WG, WGM, WGMC y WHIC. ....	44
Figura 17. La disminución de $q_s$ genera patrones específicos de expresión de genes, mayoritariamente aquellos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos y de generación de energía (COGs C, E y G). Distribución de los genes expresados diferencialmente entre las cepas mutantes en COGs al comparar los transcriptomas de W3110 con las cepas mutantes WG, WGM, WGMC y WHIC. El valor de $q_s$ para cada cepa se muestra entre paréntesis y se presenta como (g/g h). Los valores para el $Y_{GFP/X}$ se expresan como mg GFP/g DCW y son presentados en la tabla 5. Los nombres de los COGs están presentes en la tabla 10. ....	48
Figura 18. Distribución de los genes expresados diferencialmente entre pares de cepas clasificados por clase de COGs. Se indica el número de genes regulados al alza (valor positivo) o a la baja (valor negativo) de cada COG. Comparaciones del transcriptoma: WG-W3110 (amarillo), WGM-WG (azul), WGMC-WGM (naranja) y WHIC-WGMC (rojo). ....	52
Figura 19. Genes diferencialmente expresados en la cepa WG con respecto a la cepa W3110 relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes esta presentado en color verde (sobrexpresados) y rojo (subexpresados) .....	55
Figura 20. Genes diferencialmente expresados en la cepa WGM con respecto a la cepa WG relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes esta presentado en color verde (sobrexpresados) y rojo (subexpresados). Además, en rectángulos de color azul se muestran dos genes que fueron diferencialmente expresados en la cepa WGMC con respecto a la cepa WGM. ....	58

Figura 21. Genes diferencialmente expresados en la cepa WGMC con respecto a la cepa WHIC relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes esta presentado en color verde (sobreexpresados) y rojo (subexpresados)

..... 62

Figura 22. Perfiles de expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de carbohidratos (COG G). Comparación de los niveles de expresión como función de la *qs* de los experimentos de qPCR y *RNA-seq* de genes relacionados al transporte de carbohidratos, TCA y producción/consumo de acetato..... 65

# Índice de tablas

Tabla 1. Tabla de genotipos de las cepas y plásmidos usadas en este estudio.....	19
Tabla 2. Tiempo de cultivo en la etapa de adaptación al medio mínimo M9 de las cepas transformadas con el plásmido pV21. ....	21
Tabla 3. Tiempo de cultivo en la etapa de adaptación al medio mínimo M9 de las cepas sin plásmido pV21. ....	22
Tabla 4. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz. ....	33
Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en biorreactor. ....	34
Tabla 6. Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de <i>E. coli</i> y cepas mutantes derivadas en biorreactores de 1 L. ....	43
Tabla 7. Comparación de parámetros cinéticos y de fermentación de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en dos sistemas de cultivo: matraz con 2.5 g/L de glucosa y biorreactor con 20 g/L de glucosa en medio M9. ....	46
Tabla 8. Estadísticos de las librerías y mapeos de las bibliotecas del RNA-seq.....	47
Tabla 9. Número de genes diferencialmente expresados entre pares de cepas. ....	50
Tabla 10. Número de genes diferencialmente expresados clasificados por COGs* ....	51
Tabla 11. Comparación de resultados de los experimentos de qPCR y <i>RNA-seq</i> de genes relacionados al transporte de carbohidratos, TCA y producción/consumo de acetato.....	64

# Lista de abreviaturas en orden de aparición

## Abreviatura Significado

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
$\mu\text{M}$	micromolar
PTS	sistema fosfotransferasa
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
PEP	fosfoenol piruvato
EMP	vía glucolítica Embden-Meyerhof Parnas
CCR	Represión catabólica por Carbono
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
TF	Factor de transcripción
CRP	Proteína receptora de cAMP
ATP	Adenosín trifosfato
G6P	Glucosa 6-fosfato
PPP	Vía de las pentosas fosfato
AcCoA	Acetil coenzima A
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos/Ciclo de Krebs
ADP	Adenosín difosfato
FAD <sup>+</sup> /FADH <sub>2</sub>	Dinucleótido de flavina-adenina oxidado/Dinucleótido de flavina-adenina reducido
NAD <sup>+</sup> /NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido/Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
<i>q<sub>s</sub></i>	Tasa específica de consumo de glucosa
<i>q<sub>O<sub>2</sub></sub></i>	tasa específica de consumo de oxígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
YP/X	rendimiento del producto a partir de la biomasa
<i>q<sub>p</sub></i>	velocidad específica de producción
LB	medio Luria-Bertani
°C	grados Celsius
rpm	revoluciones por minuto
ADN	ácido desoxirribonucleico
h	horas
$\mu\text{g}$	microgramos
mL	mililitros
L	Litro
g	gramos
mM	milimolar
IPTG	isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
DO <sub>600nm</sub>	Densidad óptica a 600 nanómetros
GFP	Proteína Verde Fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
NH <sub>4</sub> OH	hidróxido de amonio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ácido fosfórico
N	Normalidad/normal
vvm	volumen de aire por volumen de medio por minuto/aireación

<b>DCW</b>	peso seco celular ( <i>Dry cell weight</i> )
<b>PBS</b>	Solución salina con tampón de fosfatos ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>NaCl</b>	cloruro de sodio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	ácido sulfúrico
<b><i>q<sub>ac</sub></i></b>	velocidad específica de producción de acetato
<b><i>q<sub>GFP</sub></i></b>	velocidad específica de producción de GFP
<b><i>Y<sub>X/S</sub></i></b>	rendimiento biomasa por sustrato
<b><i>Y<sub>GFP/X</sub></i></b>	rendimiento de GFP por biomasa
<b>PI</b>	yoduro de propidio
<b>FL-1</b>	canal de fluorescencia para detectar GFP
<b>FL-3</b>	canal de fluorescencia para detectar PI
<b>SSC</b>	canal de dispersión lateral ( <i>Side scatter channel</i> )
<b>FSC</b>	canal de dispersión frontal ( <i>Forward scatter channel</i> )
<b>BH</b>	Benjamini-Hochberg
<b>FDR</b>	tasa de descubrimiento de falsos ( <i>False discovery rate</i> )
<b>FC/logFC</b>	factor de cambio/logaritmo de factor de cambio
<b>COG</b>	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

# Resumen

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa que prefiere la glucosa como fuente de carbono y energía. *E. coli* transporta esta fuente de carbono mediante el sistema de fosfotransferasa (PTS) específico de glucosa (PtsG) y con este puede alcanzar altas tasas de consumo y crecimiento. Sin embargo, una alta tasa de crecimiento trae consigo un desbalance entre la velocidad de producción de AcCoA y su consumo por el TCA, incluso en condiciones donde el oxígeno no es limitante para la respiración celular, fenómeno denominado sobre flujo de carbono o metabólico. El sobre flujo metabólico trae como resultado la producción y excreción de ácido acético al medio de cultivo. El ácido acético, además de significar una pérdida de carbono como AcCoA, también es deletéreo para las células. Se han probado 2 grupos de estrategias para eliminar o mitigar el sobre flujo de carbono en *E. coli*: las estrategias de cultivo y las de modificación genética. Del segundo grupo se tienen 2 enfoques diferentes: la eliminación de las vías de síntesis de ácido acético o la eliminación de proteínas relacionadas al transporte de glucosa; esta última con la finalidad de controlar la velocidad de entrada de carbono a la célula. Sin embargo, la limitación de la entrada de glucosa a la célula trae consigo dos posibles estados fisiológicos a la limitación de carbono. El primero de ellos es un estado denominado “*hunger response*” el cual se caracteriza por la reducción de la  $\mu$  a un valor por debajo del máximo observado cuando la glucosa no es limitante en el medio. El estado “*hunger response*” está caracterizada por la expresión de genes relacionados al uso de fuentes alternativas de carbono. El segundo estado, llamado “*starvation state*” está definido como el cese del crecimiento por el agotamiento de la glucosa o la entrada a la fase estacionaria.

Siguiendo esta línea de pensamiento, Fuentes LG y colaboradores en 2013 generaron una colección de cepas mutantes de *E. coli*, con mutaciones sencillas y combinatorias de genes relacionados con sistemas de transporte de tipo PTS (*ptsG*, *manX*, *malX*, *bglF*, *nagE*, *ptsH*, *ptsI* y *crr*) y no PTS (*mglABC* y *galP*). PtsG es el transportador PTS para glucosa, y sabiendo que ManX puede transportar glucosa en una cepa carente de PtsG. Decidieron realizar la inactivación arbitraria y combinatoria de genes pertenecientes a estas dos familias de proteínas. Con esto consiguieron un conjunto de 15 cepas, más la parental W3110, con  $q_s$  en el rango de 1.33 a 0.32 g/g h y  $\mu$  de 0.65 a 0.18 h<sup>-1</sup>. Seis de estas cepas fueron probadas para la producción de un plásmido experimental terapéutico contra el virus de paperas (pHN). Los resultados obtenidos fueron un comportamiento de tipo campana, cuando se graficó el  $Y_{P/X}$  como función de la  $q_s$ . Observaron que la disminución de la  $q_s$  con una concomitante reducción de la  $q_{ac}$  dio como resultado un incremento del rendimiento del plásmido a partir de biomasa. Sin embargo, un decremento excesivo de la velocidad de consumo de glucosa resultó subóptimo, esta vez no por la producción de acetato sino más bien por la posible limitación en carbono y energía necesarios para la producción del plásmido. Finalmente se obtuvo un máximo de producción a una  $q_s$  del

58% de la cepa W3110. Este enfoque, de limitar la velocidad de consumo de glucosa a diferentes tasas de consumo, también ha sido probada, como resume Peebo K en 2018, para la producción de proteínas recombinantes en cultivos continuos. En muchos casos, se ha observado el mismo comportamiento tipo campana donde los máximos u óptimos de producción rondan el 50% de la  $q_s$  máxima en *E. coli*.

Tomando como base lo anterior, se llevó a cabo un estudio en el cual se caracterizaron 6 cepas mutantes carentes de distinto sistema de transporte de distintas fuentes de carbono y que tienen una menor capacidad de consumo de glucosa. Estas cepas fueron WG (W3110  $\Delta ptsG$ ), WGM (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta manX$ ), WGMC (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta manX$ ,  $\Delta mglABC$ ), WGX (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta malX$ ), WHI (W3110  $\Delta ptsHIcrr$ ) y WHIC (W3110  $\Delta ptsHIcrr$ ,  $\Delta mglABC$ ). Las 6 cepas mutantes y la cepa parental W3110 fueron transformadas con el plásmido pV21, el cual contiene el gen *gfp* que codifica para una GFP cuya expresión esta dictada por el promotor nativo del operón *lac*. Se probaron 2 sistemas de cultivo diferentes con distintas concentraciones de glucosa: matraces con 10 g/L de glucosa y biorreactores con 20 g/L de glucosa en medio mínimo M9. En los cultivos en matraz las cepas desplegaron  $q_s$  que fueron de 1.75 a 0.45 g /g h con una correspondiente  $\mu$  de 0.54 a 0.16 h<sup>-1</sup>. Por su parte, en los cultivos en biorreactor la  $q_s$  y la  $\mu$  fueron de 1.65 a 0.45 g/g h y de 0.52 a 0.15 h<sup>-1</sup>, respectivamente. En ambos casos, al graficar el  $Y_{GFP/X}$  como función de  $q_s$ , se observó un comportamiento de tipo campana, con una  $q_s$  óptima para la producción de la GFP entre los 0.8 y 0.9 g/g h, que representaron 50% de la  $q_s$  máxima para cada sistema de cultivo. Estas  $q_s$  correspondieron a la cepa WG/pV21 y WGM/pV21 con títulos de producción de GFP de 305.4 y 438.5 mg/L, respectivamente. Mediante citometría de flujo y cultivos microfluídicos, se pudo evidenciar que la alta producción de GFP desencadena el proceso de filamentación celular, así como una segregación entre poblaciones de alta y baja producción como resultado de la naturaleza biestable del promotor *lac*.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de RNA-seq de un subconjunto de las cepas mutantes, cultivadas en biorreactor con 20 g/L de glucosa. La secuenciación fue pareada, con lecturas de 75 pb y una profundidad de 40 mil lecturas. Posteriormente, el análisis de expresión diferencial se realizó con EdgeR basado en R y los genes diferencialmente expresados fueron anotados usando las bases de datos de EggNOG y Uniprot. En estas condiciones de cultivo las cepas desplegaron  $q_s$  de 1.52 a 0.35 g/g h y  $\mu$  de 0.67 a 0.27, estos dos parámetros tuvieron un coeficiente de correlación cuadrado de 0.995. El número de genes diferencialmente expresados fue de 201 a 779, presentado una correlación parcial, al menos entre las cepas WG, WGM y WGMC. Por otra parte, los COGs más representados fueron S, C, E, G y K. Sin embargo, los del COG S no fueron considerados en el análisis por ser los de función desconocida, aunque no se descarta su posible implicación en el fenotipo de las cepas. Por su parte, los COGs C, E, G y K contenían genes relacionados a una respuesta transcripcional de limitación de carbono, involucrando funciones como la de transporte y metabolismo de fuentes alternativas de



carbono, así como el decremento en funciones como las de glicolisis, cadena respiratoria y síntesis de aminoácidos e incrementado otros como el metabolismo gluconeogénico. Finalmente, se encontró que un total de 107 y 185 genes desplegaron correlaciones de Pearson positivas y negativas, respectivamente, al usar el factor de cambio de la expresión génica como función de la  $q_s$ . De ellas, la obtención de energía, transporte de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos tuvieron correlación positiva, es decir, que los genes decrementaban su expresión en concordancia con la reducción de la  $q_s$ .

Los cambios en la expresión génica de las cepas de *E. coli* con menor capacidad de importación de glucosa pudieron correlacionarse con los valores de  $q_s$  y esto permitió inferir el estado fisiológico de cada mutante. En las cepas con valores de  $q_s$  más bajos, el patrón de expresión génica es coherente con la limitación energética y la entrada en la fase estacionaria. Este estado fisiológico podría explicar por qué estas cepas muestran una menor capacidad de producción de proteínas recombinantes, incluso cuando muestran tasas muy bajas de producción de acetato. Además, desde la perspectiva de la heterogeneidad fenotípica, se observó que los sistemas heterogéneos son también los que conducen a un mayor rendimiento. Esta observación sugiere reconsiderar la proposición generalmente aceptada de que la heterogeneidad fenotípica es indeseable en las aplicaciones de bioprocesos.

## Summary

*Escherichia coli* is a Gram-negative bacterium that prefers glucose as a carbon and energy source. *E. coli* transports this carbon source via the glucose-specific phosphotransferase (PTS) system (PtsG) and with it can achieve high consumption and growth rates. However, a high growth rate brings with it an imbalance between the rate of AcCoA production and its consumption by the TCA, even under conditions where oxygen is not limiting for cellular respiration, a phenomenon referred to as carbon or metabolic overflow. Metabolic overflow results in the production and excretion of acetic acid into the culture medium. Acetic acid, besides meaning a loss of carbon as AcCoA, is also deleterious to cells. Two groups of strategies have been tested to eliminate or mitigate carbon overflow in *E. coli*: culture strategies and genetic modification strategies. From the second group we have 2 different approaches: elimination of acetic acid synthesis pathways and elimination of proteins related to glucose transport; the latter with the aim of controlling carbon entry into the cell. However, the limitation of glucose entry into the cell brings with it two possible physiological states to carbon limitation. The first of these is the hunger response which is characterized by the reduction of  $\mu$  to a value below the maximum observed when glucose is limiting in the medium. The hunger response is characterized by the expression of genes related to the use of alternative carbon sources. The second is the Starvation state is defined as the cessation of growth due to glucose depletion or stationary phase.

Following this line of thinking, Fuentes LG et al. in 2013 generated a collection of *E. coli* mutant strains with single and combinatorial mutations of genes related to PTS transport systems (*ptsG*, *manX*, *malX*, *bglF*, *nagE*, *ptsH*, *ptsI*, and *crr*) and non-PTS (*mgIABC* and *galP*) transport systems. PtsG is the PTS transporter for glucose, and knowing that ManX can transport glucose in a strain lacking PtsG. They decided to perform arbitrary and combinatorial inactivation of genes belonging to these two protein families. With this they obtained a set of 15 strains, plus the parental W3110, with  $q_s$  in the range of 1.33 to 0.32 g/g h and  $\mu$  from 0.65 to 0.18 h<sup>-1</sup>. Six of these strains were tested to produce an experimental therapeutic plasmid against mumps virus (pHN). The results obtained were bell-shaped behavior, when  $Y_{p/X}$  was plotted as a function of  $q_s$ . They observed that a decrease in  $q_s$  with a concomitant decrease in  $q_{ac}$  resulted in an increase in plasmid yield from biomass. However, an excessive decrease in the rate of glucose consumption proved suboptimal, this time not because of acetate production but rather because of possible limitation in carbon and energy needed for plasmid production. Finally, maximum production at a  $q_s$  of 58% was obtained from strain W3110. This approach, of limiting the rate of glucose consumption at different consumption rates, has also been tested, as summarized by Peebo K in 2018, to produce recombinant proteins in continuous cultures. In many cases, the same bell-like behavior has been observed where production maxima or optima hover around 50% of the maximum  $q_s$  in *E. coli*.

Based on this, we performed a study in which 6 mutant strains lacking a different transport system for different carbon sources and having a lower glucose consumption capacity were tested. These strains were WG (W3110  $\Delta ptsG$ ), WGM (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta manX$ ), WGMC (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta manX$ ,  $\Delta mgIABC$ ), WGX (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta malX$ ), WHI (W3110  $\Delta ptsHcrr$ ) y WHIC (W3110  $\Delta ptsHcrr$ ,  $\Delta mgIABC$ ). These 6 strains, and their parental strain W3110 were transformed with the plasmid pV21, which encodes for a GFP that is under the control of the native promoter of the *lac* operon. Two different

culture systems were tested with different glucose concentrations: flasks with 10 g/L glucose and bioreactors with 20 g/L glucose in M9 minimal medium. In the flask cultures, the strains displayed  $q_s$  ranging from 1.75 to 0.45 g/g h with a corresponding  $\mu$  from 0.54 to 0.16 h<sup>-1</sup>. In bioreactor cultures,  $q_s$  and  $\mu$  were 1.65 to 0.45 g/g/g h and 0.52 to 0.15 h<sup>-1</sup>, respectively. In both cases, when plotting  $Y_{GFP/X}$  as a function of  $q_s$ , a bell-shaped behavior was observed, with optimal  $q_s$  for GFP production between 0.8 and 0.9 g/g h, which represented around 50% of the maximum  $q_s$  for each culture system. These  $q_s$  corresponded to strain WG and WGM with GFP production titers of 305.4 and 438.5 mg/L, respectively. By means of flow cytometry and microfluidic cultures, it could be evidenced that high GFP production triggers the cell filamentation process, as well as a segregation between high and low production populations because of the bistable nature of the *lac* promoter.

Moreover, RNA-seq experiments were performed on a subset of the mutant strains, grown in bioreactor with 20 g/L glucose. Sequencing was paired sequencing, with 75 bp length reads and a depth of 40 thousand reads. Subsequently, differential expression analysis was performed with EdgeR R-based and differentially expressed genes were annotated using the EggNOG and Uniprot databases. Under these culture conditions the strains displayed  $q_s$  from 1.52 to 0.35 g/g h and  $\mu$  from 0.67 to 0.27, these two parameters had a squared correlation coefficient of 0.995. The number of differentially expressed genes ranged from 201 to 779, showing a partial correlation, at least between WG, WGM and WGMc strains. On the other hand, the most represented COGs were S, C, E, G and K. However, those genes which belong to COG S were not considered in the analysis because of their unknown function, although their possible implication in the phenotype of the strains was not ruled out. COGs C, E, G and K contained genes related to a transcriptional response to carbon limitation, involving functions such as transport and metabolism of alternative carbon sources, as well as decreasing functions such as glycolysis, respiratory chain and amino acid synthesis and increasing others such as gluconeogenic metabolism. Finally, a total of 107 and 185 genes were found to display positive and negative Pearson correlations, respectively, when using the gene expression change factor as a function of  $q_s$ . Of these, energy production, carbohydrate transport and amino acid synthesis were positively correlated, i.e., the genes decreased their expression in accordance with the reduction of  $q_s$ .

Changes in gene expression in *E. coli* strains with lower glucose import capacity could be correlated with  $q_s$  values and this allowed inferring the physiological state of each mutant. In strains with lower  $q_s$  values, the gene expression pattern is consistent with energy limitation and entry into stationary phase. This physiological state could explain why these strains show a lower capacity for recombinant protein production, even when they show very low rates of acetate production. Moreover, from the perspective of phenotypic heterogeneity, it was observed that heterogeneous systems are also those that lead to higher yields. This observation suggests reconsidering the generally accepted proposition that phenotypic heterogeneity is undesirable in bioprocess applications.

# Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

### **1.1. Introducción**

#### **1.1.1. *Escherichia coli* y su papel como fabrica celular bacteriana**

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, de fácil cultivo, cuyos requerimientos nutricionales pueden ser fácilmente suplementados incluso en medios mínimos minerales. Esta bacteria ha sido utilizada las ultimas 3 décadas, tanto en la academia como en la industria, para la producción de un gran número de productos biotecnológicos como plásmidos, proteínas y químicos. Todo esto debido a que *E. coli* es un organismo modelo del cual se tiene un amplio conocimiento de su fisiología y genética, por lo cual se cuentan con una amplia variedad de herramientas moleculares (Görke and Stülke 2008; Fuentes et al. 2013).

#### **1.1.2. Glucosa y *E. coli***

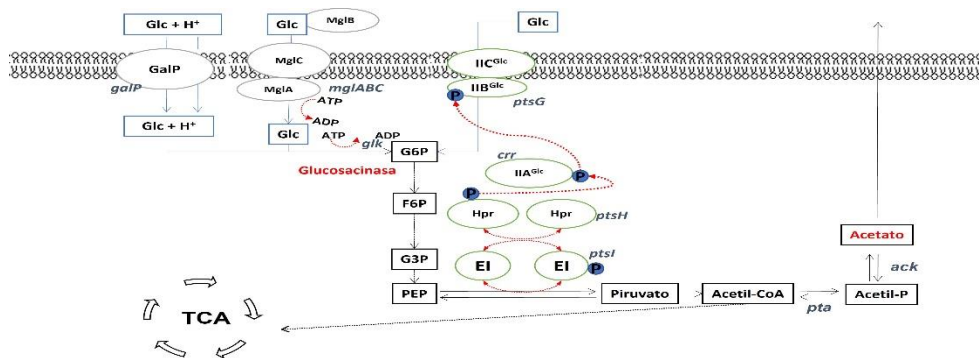
La glucosa es el carbohidrato más abundante en la naturaleza (Sreeranjit and Lal 2003). *E. coli* puede utilizar la glucosa como fuente de carbono y energía, y de hecho la prefiere frente a otras fuentes de carbono. Para que *E. coli* pueda metabolizar la glucosa presente en los medios de cultivo, esta primero tiene que atravesar la membrana externa de *E. coli* a través de las porinas LamB u OmpC. Una vez que la glucosa se encuentra en el espacio periplásmico, *E. coli* tiene dos mecanismos principales para su transporte activo, dependientes de la concentración extracelular. Si la concentración de glucosa en el medio es mayor que 3-10  $\mu\text{M}$ , la glucosa es transportada mediante el sistema de fosfotransferasa (PTS) específico de glucosa PtsG. Por el contrario, si la concentración de glucosa es menor a la antes mencionada, es decir que se encuentra en condiciones limitantes, la glucosa es transportada por transportadores de alta afinidad como MglABC ( $K_m$  0.2  $\mu\text{M}$ ) o bien por el simportador de galactosa:protón (galactosa:H<sup>+</sup>;  $K_m$  10  $\mu\text{M}$ ) GalP (Steinsiek and Bettenbrock 2012).

#### **1.1.3. Los sistemas fosfotransferasa (PTS) para fuentes de carbono**

Los sistemas de transporte de tipo PTS están ampliamente distribuidos en las bacterias, pero ausentes en arqueas y eucariontes. En *E. coli* se han descrito 21 complejos PTS para el transporte de carbohidratos. Estos sistemas de transporte de fuentes de carbono están constituidos por 2 proteínas generales solubles (EI y HPr) y las que son

## Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

específicas de cada fuente de carbono EIIA, IIB, IIC. Las proteínas EIIC y a veces IID constituyen las permeasas encargadas del transporte de las fuentes de carbono (Tchieu et al. 2001). El mecanismo de transporte en los sistemas PTS está bien descrito. Para el caso del transporte de glucosa, el proceso inicia con la fosforilación de la proteína EI por la transferencia del grupo fosforilo del fosfoenol piruvato (PEP) proveniente de la vía glucolítica Embden-Meyerhof Parnas (EMP). Posteriormente, la EI transfiere el grupo fosforilo a la proteína HPr y esta a su vez a la EIIA. La proteína EIIA transfiere el grupo fosforilo a la EIIB que está unida a la permeasa EIIC. Este mecanismo de transporte asegura además del paso de la glucosa a través de la membrana citoplásmica, su fosforilación de manera simultánea mediada por IIB (Görke and Stülke 2008; Tchieu et al. 2001). En la figura 1 se muestra un esquema de los sistemas de transporte de glucosa principales de *E. coli* de tipo PTS y no PTS; así como las vías del metabolismo central y producción de acetato.



**Figura 1.** Transporte y metabolismo de glucosa en *E. coli*. Esquema de los sistemas de transporte de glucosa principales de *E. coli* de tipo PTS y no PTS; así como las vías glucolítica, TCA y de producción de ácido acético.

### 1.1.4. Represión catabólica por carbono (CCR)

Muchas bacterias, incluidas *E. coli*, pueden usar varios compuestos como fuente de carbono. Estas fuentes pueden: metabolizarse simultáneamente, o bien, seguir un orden de consumo preferencial que le permita al organismo crecer más rápidamente. Este efecto fue descrito por Jaques Monod en 1942, al describir el crecimiento diáuxico en cultivos de *E. coli* que contenían glucosa y lactosa. Entonces se puede definir la CCR como el efecto regulatorio ejercido por una fuente de carbono, que previene la expresión de genes relacionados con la utilización de fuentes alternativas de carbono. El mecanismo

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

de CCR en *E. coli* está controlado principalmente por el factor de transcripción (TF) llamado proteína receptora de adenosín monofosfato cíclico (AMPc, CRP por sus siglas en inglés), el AMPc, la enzima adenilato ciclasa (CyaA), la EIIA y también la proteína HPr. Como se mencionó en el apartado 1.1.3. el transporte de glucosa mediado por el sistema específico para glucosa PtsG es dependiente de una serie de fosforilaciones secuenciales de los distintos componentes de PTS. Entonces el CCR está mediado por el estado de fosforilación de la EIIA. Brevemente, cuando se transporta glucosa u otro carbohidrato PTS, la EIIA se encuentra mayormente desfosforilada, esto debido a que la proporción de PEP/Piruvato es alta. Mientras que cuando la glucosa empieza a ser limitante o está ausente la relación PEP/Piruvato es baja y la EIIA se encuentra predominantemente en su estado fosforilado. En este último escenario la EIIA fosforilada activa a la enzima CyaA promoviendo la generación del cAMP. El cAMP producido entonces se une a la proteína receptora CRP y el complejo cAMP-CRP puede promover la expresión de genes y operones catabólicamente reprimidos (Görke and Stülke 2008; Steinsiek and Bettenbrock 2012; Kremling, Bettenbrock, and Gilles 2007), entre ellos algunos genes como los transportadores de galactosa/glucosa de más alta afinidad *mgIABC* y *galP* (Ferenci 2006).

### **1.1.5. Sistemas de transporte de glucosa distintos al PTS**

En condiciones donde la concentración de glucosa en el medio de cultivo es limitante o bien cuando se eliminan los genes que codifican para las proteínas del sistema PTS, normalmente genes involucrados en el transporte de galactosa son inducidos y pueden transportar glucosa (Death and Ferenci 1994; Flores et al. 2005). Los genes que son inducidos son *galP* que codifica para el simportador GalP y los genes *mgIABC* que codifican para un sistema de alta afinidad de transporte de galactosa/glucosa MglABC (Death and Ferenci 1994; McDonald, Walmsley, and Henderson 1997; Fuentes et al. 2013; A. R. Lara et al. 2006). La glucosa transportada por estos sistemas es fosforilada por medio de la enzima glucosa cinasa, codificada por el gen *glk*, de manera dependiente a ATP (adenosin trifosfato) (Lunin et al. 2004).

### **1.1.6. Glucosa a través del metabolismo central**

Una vez que la glucosa es internalizada y fosforilada, ya sea por el sistema PTS o por sistemas no PTS y la glucosa cinasa, la glucosa-6-fosfato (G6P) generada, es dirigida a

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

través de la vía glucolítica EMP y la vía de las pentosas fosfato (PPP). La vía EMP termina con la producción de piruvato, este último es posteriormente descarboxilado, generando acetil-Coenzima A (AcCoA) la cual es dirigida hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y el ciclo del glioxilato (Fuentes et al. 2013; Taymaz-Nikerel and Lara 2021).

### **1.1.7. El acetato como un ácido, sus efectos y producción en células de *E. coli***

El ácido acético es un ácido orgánico monoprótico de cadena corta de 2 átomos de carbono, que a concentraciones mayores a 1 g/L es tóxico para *E. coli*. El ácido acético que es su forma no disociada puede atravesar las membranas celulares y puede acidificar el citoplasma o el medio de cultivo con lo cual pueden alterarse las proteínas celulares y alterar el gradiente de pH transmembranal. En su forma disociada el acetato incrementa la presión osmótica interna (Wolfe 2005).

Es importante mencionar que *E. coli* puede generar ácido acético en condiciones aeróbicas a través de 2 vías y esto puede representar una pérdida de carbono como AcCoA disminuyendo su productividad. Primero, la vía del acetato cinasa-fosfotransacetilasa (Ack-Pta) y la vía de la piruvato oxidasa (PoxB). La primera genera acetato mediante la conversión del AcCoA hacia acetil-fosfato con fosfato inorgánico y posteriormente genera ATP a partir del acetil-fosfato y adenosín difosfato (ADP). La vía de la piruvato oxidasa genera acetato a partir de la descarboxilación del piruvato mediante la reducción de una molécula de FAD<sup>+</sup>. Sin embargo, el ácido acético puede ser generado en condiciones aeróbicas cuando se genera un desbalance entre la velocidad de consumo y producción de la AcCoA por parte del TCA y es redirigido hacia acetato principalmente por la vía de Ack-Pta, a este fenómeno se le llama sobre flujo metabólico. Esto es que a bajas tasas específicas de consumo de glucosa ( $q_s$ ), la glucosa puede ser oxidada en su totalidad por el TCA y el NADH por la cadena de electrones. Al incrementarse la  $q_s$  también se da el incremento de la tasa de consumo de oxígeno hasta cierto umbral de  $q_s$  donde el acetato empieza a acumularse. Este fenómeno coincide con la velocidad máxima de consumo de oxígeno (Wolfe 2005; Taymaz-Nikerel and Lara 2021; Eiteman and Altman 2006; De Mey et al. 2007). Sin embargo, este proceso tiene un límite en el cual el piruvato y la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> se incrementan hasta que se alcanza la máxima tasa específica de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) y después se empieza a acumular



## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

acetato (Vemuri et al. 2006). La acumulación de NADH tiene varias consecuencias. Primero el NADH es un inhibidor alostérico fuerte y específico de la citrato sintasa (*gltA*) la cual dicta el paso de la AcCoA hacia el TCA por la condensación con el oxaloacetato hacia citrato. En otras palabras, limita la entrada de carbono al TCA (Molgat, Donald, and Duckworth 1992). Segundo, el estado redox de la célula es una señal para que se active el regulador ArcA en *E. coli* el cual reprime genes del TCA (Iuchi and Lin 1988; Georgellis, Kwon, and Lin 2001). Entonces, *E. coli* a altas tasas de consumo de glucosa dirige carbono hacia la vía de síntesis de acetato ya que esta no genera NADH lo cual disminuye la producción de ATP por la fosforilación oxidativa (Vemuri et al. 20).

Cabe destacar que la vía de AckA-Pta es una vía reversible y funciona también como vía de asimilación de acetato, pero solo a altas concentraciones (Wolfe 2005). Por otra parte, la vía de la AcCoA sintetasa (Acs), es una vía de asimilación pero que es funcional a bajas concentraciones de acetato. La Acs tiene una Km de 200  $\mu$ M (Kumari et al. 1995).

### **1.1.8. Estrategias para eliminar o mitigar la excreción de ácido acético en procesos de producción de proteínas recombinantes.**

Como se trató en el apartado 1.1.7. el ácido acético es tóxico para *E. coli*, además que representa una pérdida de carbono y disminuye la productividad tanto de la biomasa como de productos como proteínas recombinantes, plásmidos y otros químicos. En general, se pueden dividir en dos grupos las estrategias empleadas en procesos biotecnológicos para la disminución de la excreción de acetato al medio: estrategias de cultivo y las de modificación genética de cepas.

### **1.1.9. Estrategias de cultivo para evitar la acumulación de acetato en el medio de cultivo.**

La excreción de acetato en cultivos de *E. coli* se debe a un desbalance entre el consumo de una fuente de carbono, como glucosa, y el consumo de AcCoA por TCA. Para evitar el sobre flujo metabólico en cultivos de *E. coli* se pueden emplear diferentes estrategias: limitar la velocidad de consumo de glucosa, o bien eliminar el acetato del medio. Se tienen por ejemplo:

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

- a. **Esquemas de alimentación:** se basa en la adición controlada de soluciones de glucosa al medio de cultivo, mediante el empleo de algoritmos de alimentación. Esto con el fin de limitar o mantener en cero o cercano a este valor la concentración de glucosa del medio de cultivo y así evitar la producción de acetato. Dentro de esta estrategia se encuentran trabajos realizados en cultivos de lote alimentados (Jensen and Carlen 1990; Bäcklund et al. 2008; W., Cord-Ruwisch, and M. 2002; Shen et al. 2004; Lecina et al. 2013).
- b. **Cambio de la fuente de carbono y cambio de la formulación del medio de cultivo:** del mismo modo que en el caso de los cultivos alimentados, el cambio de glucosa por alguna fuente de carbono que permita la reducción de la velocidad de crecimiento es un buen candidato para evitar la producción de acetato. Existen distintos enfoques que han empleado como el glicerol (Lee et al. 1999; Hahm, Pan, and Rhee 1994; Luo Ya-Ling Shen Dong-Zhi Wei Wei Cao 2006), manosa (Andersen and Von Meyenburg 1980) o fructosa (Aristidou, San, and Bennett 1999). También se ha intentado suplementar los medios de cultivo con extracto de levadura, glicina o metionina (K. Han et al. 1992; K. Han, Hong, and Lim 1993) o bien agregando pulsos de glucosa en solución con aminoácidos periódicamente (Zawada and Swartz 2005).
- c. **Eliminación del acetato del medio de cultivo:** en vez de reducir la velocidad de crecimiento, en este caso se remueve el acetato producido del medio de cultivo. Se han probado 2 esquemas diferentes, los reactores dializados (Nakano et al. 1997; Fuchs et al. 2002) o bien el uso de resinas de intercambio iónico (Chen, Cen, and Chen 2005).

### **1.1.10. Estrategias de modificación genética para evitar la acumulación de acetato en el medio de cultivo**

Diferentes estrategias genéticas para la disminución o abolición de la excreción del acetato son descritas en la siguiente sección:

#### **a. Vías de síntesis y consumo de acetato**

Una primera aproximación es la eliminación de la acetato cinasa (*ackA*) (Bauer et al. 1990) junto o por separado de la fosfotransacetilasa (*pta*) (Hahm, Pan, and Rhee 1994),

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

otra puede ser el uso de ARNs antisentido para modular la expresión de estos genes (J. Y. H. Kim and Cha 2003). Sin embargo, se ha visto que la delección del gene *pta* puede conducir a la acumulación de lactato o piruvato (Chang et al. 1999). Por otra parte, también se ha demostrado que la eliminación de *poxB* mostraron una reducción significativa de formación de acetato, pero en condiciones de oscilación de la concentración de oxígeno (A. Lara et al. 2006).

Por otra parte, se sabe que la sobreexpresión del gen *acs* que codifica para la acetato cinasa puede reducir la excreción de acetato en cultivos con glucosa o con acetato como fuente de carbono (Lin, Bennett, and San 2005).

Otra manera de evitar la producción de acetato es la delección de genes que regulen negativamente a los genes de TCA, como el regulador *fadR* o *arcA*. Con el primero se favorece la expresión de genes del shunt del glioxilato (Farmer and Liao 1997), con el segundo se evita que sean reprimidos los genes del TCA por acumulación de NADH.

### **b. El nodo del piruvato**

Reducir el carbono destinado a la formación de acetato o sus precursores, directamente hacia el TCA puede ser alcanzado mediante la sobre expresión de la PEP-carboxilasa (*ppc*). La sobre expresión de *ppc*, en efecto, reduce la producción de acetato al consumir PEP; sin embargo, disminuye la velocidad de crecimiento debido a que hay menor disponibilidad de PEP para el sistema PTS de glucosa y favorece la producción de proteína recombinante (March, Eiteman, and Altman 2002; Gokarn et al. 2001). También se ha intentado la inactivación de las isoenzimas piruvato cinasa-I y II (codificadas en los genes *pykA* y *pykF*). Se sabe que la inactivación de una u otra trae consigo la disminución en la excreción de acetato al medio con la reducción de la velocidad de crecimiento. La inactivación de ambas enzimas trae consigo una mayor reducción tanto en la velocidad de crecimiento como en la cantidad de acetato producido; sin embargo, otros subproductos son generados como malato y oxaloacetato (Enriqueta Muñoz and Ponce 2003; Emmerling et al. 2002).

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

### **c. Modificación de las reservas de la coenzima, NADH**

Como se mencionó en el apartado 1.1.7. La  $q_s$  tiene un límite en el cual el piruvato y la relación de NADH/NAD<sup>+</sup> se incrementan y después se empieza a acumular acetato. Este punto se alcanza al sobrepasar la máxima  $q_{O_2}$ . Con lo que se deduce que el NADH no puede ser completamente oxidado por la cadena respiratoria.

Un enfoque probado es reducir la cantidad de NADH; por ejemplo, expresando una NADH oxidasa formadora de agua de *Streptococcus pneumoniae*, la cual reduce la excreción de acetato a costa del rendimiento de biomasa debido a que es un proceso energéticamente desfavorable (Vemuri et al. 2006).

Otra forma para reoxidar el NADH en *E. coli* es el uso de la hemoglobina de la bacteria *Vitreoscilla stercoraria* (VHb). La VHb tiene una alta capacidad para llevar oxígeno a las proteínas de la cadena respiratoria, tiene una  $K_{off}$  por el O<sub>2</sub> de 78 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Al expresar la VHb en la cepa *E. coli* W3110 prácticamente se abate la producción de acetato sin sacrificar la velocidad de crecimiento, pero disminuyendo levemente el rendimiento de la biomasa a partir de glucosa  $Y_{X/S}$  (Pablos et al. 2014; A. R. Lara et al. 2020).

### **d. Estrategias que directamente reducen la capacidad de consumo de glucosa.**

Otra estrategia considera modificar la regulación del gene *ptsG* para limitar la entrada de glucosa a la célula. Esto mediante la delección de genes codificantes para reguladores transcripcionales como el gene *arcA* y *mlc*. Se sabe que la delección del regulador ArcA promueve la sobreexpresión del gen *ptsG*. Por el contrario, la sobreexpresión de este regulador reprime la expresión de *ptsG* (J.-Y. Jeong et al. 2004). Otra manera es la de sobreexpresar el gen *mlc* que codifica para el regulador Mlc el cual reprime la expresión de *ptsG* (S. Y. Kim et al. 1999; Kimata et al. 1998; Cho et al. 2005). Adicionalmente se ha recurrido a la eliminación directa de los genes que codifican proteínas relacionadas al transporte de glucosa como del sistemas PTS de glucosa *ptsG* (Chou, Bennett, and Sari 1994; C. Han et al. 2004; Sigüenza et al. 1999), *manX* adicionalmente a *ptsG*, es decir una doble eliminación (Picon, Teixeira de Mattos, and Postma 2005). O bien, abolir el transporte de carbohidratos mediante la eliminación del operón *ptsHlcr* (Aguilar et al. 2012). Sin embargo; este último caso trae consigo una gran

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

disminución de la velocidad de consumo y crecimiento. Para solventar este efecto indeseable se han sobre expresados genes de proteínas no-PTS capaces de transportar glucosa como *galP* (De Anda et al. 2006).

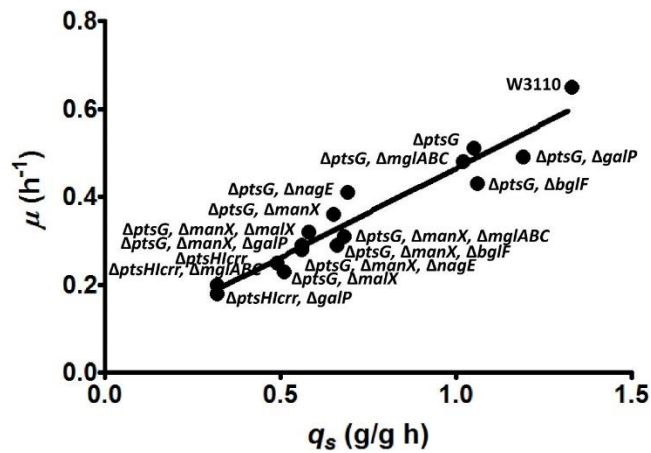
### **1.2. Antecedentes**

La respuesta fisiológica causada por la limitación de nutrientes ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*. Primero hay que establecer dos condiciones o estados fisiológicos diferentes causados por la limitación o ausencia de carbono o específicamente glucosa en el medio. Para no errar en el uso del lenguaje, estos estados están definidos en el idioma inglés como “*hunger response*” y “*starvation state*”. Entonces, en *E. coli* se puede describir que la “*hunger response*” se presenta cuando la glucosa es limitante en el medio de cultivo, y esta respuesta se manifiesta con la reducción de la velocidad de crecimiento a un valor por debajo de la máxima tasa observada cuando la glucosa no es limitante. En contraste, el “*starvation state*” es definido por el cese del crecimiento por el agotamiento de la glucosa. La “*hunger response*” es caracterizada por la expresión de genes relacionados con el consumo de fuentes alternativas de carbono, como los mencionados en la sección 1.1.5. además de LamB en remplazo de OmpC (Ferenci 2006).

También se ha mencionado en los apartados 1.1.9.a, b. y 1.1.10.d. que la disminución en la velocidad de consumo de glucosa; además de traer como consecuencia la mitigación o abolición de la excreción de acetato al medio, favorece la producción de proteínas recombinantes. Si bien los trabajos antes mencionados en el apartado 1.1.10.d. consiguen disminuir la velocidad de consumo de glucosa, tienen como limitante, que solo tienen 1 o 2 cepas mutantes con menores velocidades de consumo de glucosa. Por tal motivo, Fuentes LG (Fuentes et al. 2013) generaron una colección de 15 cepas mutantes derivadas de *E. coli* K-12 W3110 con mutaciones sencillas y combinatorias de genes relacionados con sistemas de transporte de tipo PTS (*ptsG*, *manX*, *malX*, *bglF*, *nagE*, *ptsH*, *ptsI* y *crr*) y no PTS (*mgIABC* y *galP*). PtsG es el transportador PTS para glucosa, y sabiendo que ManX puede transportar glucosa en una cepa carente de PtsG. Decidieron realizar la inactivación arbitraria y combinatoria de genes pertenecientes a estas dos familias de proteínas. Con ello consiguieron una amplia variedad de fenotipos preestablecidos de *qs*

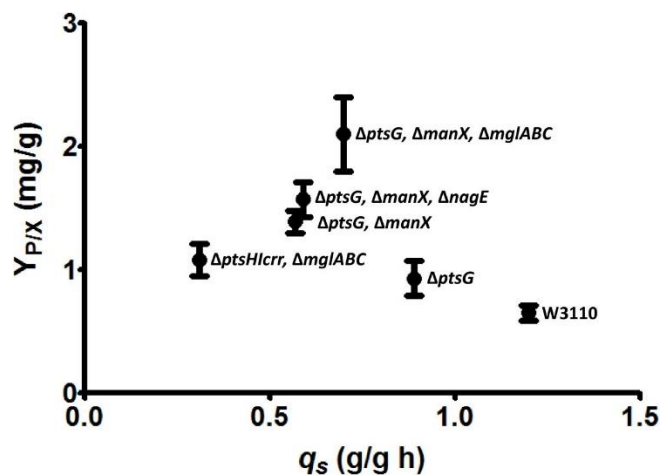
## Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

y  $\mu$  al ser cultivadas en medio M9 con 2.5 g/L de glucosa. Las  $q_s$  y  $\mu$  desplegadas fueron de 1.33 a 0.32 g/g h y 0.65 a 0.18 h<sup>-1</sup>, respectivamente (figura 2 y tabla 5).



**Figura 2.**  $\mu$  como función de la  $q_s$  de la colección de cepas generadas de Fuentes LG. Tomado de (Fuentes et al. 2013).

Posteriormente, probaron un subconjunto de 6 cepas cultivadas en medio PD para la producción de un plásmido terapéutico (pHN) el cual contiene un gen de una hemaglutinina-neuraminidasa del virus de las paperas. El medio contiene 2.5 g/L de glucosa, 17 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.3 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L de (NH<sub>4</sub>)Cl, 1 g/L de citrato de sodio, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L de clorhidrato de tiamina y 2 mL de una solución madre de oligoelementos (Pablos et al. 2012). Se encontró que el rendimiento del plásmido a partir de la biomasa ( $Y_{p/x}$ ) cuando es usado como función de la  $\mu$  tiene un comportamiento de tipo campana (Figura 3).



**Figura 3.**  $Y_{p/x}$  como función de la  $q_s$  para varias cepas de *E. coli*. Tomado de (Fuentes et al. 2013).

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

De la figura 3 los autores discuten que se encuentran al menos 3 comportamientos a destacar. Primero, la cepa W3110, que se encuentra a la derecha de la campana, tuvo la mayor  $q_s$  y  $\mu$  (1.2 g/g h y 0.63 h<sup>-1</sup>, respectivamente) y fue la única que produce acetato hasta una concentración de 0.4 g/L y tuvo el menor título de plásmido (0.83 mg/L). Por otra parte, ninguna de las 5 cepas mutantes usadas ninguna produjo acetato. Como se puede ver en la figura 3 la cepa WG (W3110  $\Delta ptsG$ ) tiene un leve incremento de plásmido producido, esto probablemente se debe a que esta cepa no produce acetato con respecto a la cepa W3110. Debido a que ninguna cepa mutante produce acetato, las diferencias entre la producción de plásmido en el medio no pueden atribuirse a algún efecto de toxicidad o de pérdida de carbono. Sin embargo, la producción de plásmido de la cepa WG es menor que en la cepa WGMC (W3110  $\Delta ptsG$ ,  $\Delta manX$ ,  $\Delta mglABC$ ). Esta última, es el segundo punto por destacar. La cepa WGMC tuvo título más alto de plásmido producido (1.63 mg/L). Lo que fue propuesto por los autores es que las diferencias entre las  $q_s$  pueden alterar los patrones de distribución de flujo de carbono en la cepa WGMC la cual favorecen la generación de los precursores necesarios para la síntesis de pHN. El tercer punto es que las cepas que se encuentran a la izquierda de la WGMC (WGM, WGME y WHIC), las cuales tienen menor  $q_s$ . En estas cepas se hipotetiza que tienen una limitación en los intermediarios del metabolismo central de carbono y energía, lo cual provoca que la producción de pHN no se vea favorecida. Finalmente, los autores destacan la ventaja de contar con una colección de cepas que cubren un amplio rango de  $q_s$  y  $\mu$ , con lo cual pudieron determinar un fenotipo óptimo o cercano a este (cepa WGMC) para la producción de un producto en particular. Cabe mencionar que la colección de cepas mutantes representan un conjunto de fenotipos preestablecidos que pueden emular a los procesos como cultivos continuos sin la necesidad de un control externo en las fermentaciones.

La reducción de la velocidad de consumo por la inactivación de genes codificantes para transportadores de glucosa en *E. coli*, ha sido probado como estrategia para el mejoramiento de cepas y producción de algunos químicos, proteína recombinante y por supuesto pDNA (Fuentes et al. 2013; De Anda et al. 2006; Picon, Teixeira de Mattos, and Postma 2005; Lin, Bennett, and San 2005). Estos y otros ejemplos más muestran como la reducción del transporte de glucosa es una estrategia efectiva para mejorar a las cepas

## **Capítulo 1. Introducción y Antecedentes**

de producción. Sin embargo, aún no están completamente claras las consecuencias de tales modificaciones sobre varios aspectos de la fisiología celular y como estas respuestas se traducen en una mejora de las características de producción. De manera similar se han llevado a cabo estudios en cultivo continuo a diferentes tasas de consumo de cepas de *E. coli* en condiciones de producción de proteína recombinante. En estos trabajos, donde se produjeron proteínas como  $\beta$ -lactamasa (Seo and Bailey 1986; K. Han, Hong, and Lim 1993), cianasa (Flickinger and Rouse 1993), linfocinasa (Curless et al. 1989), han demostrado que existe una cinética de producción de proteína recombinante dependiente del crecimiento. Además, se ha observado que esta relación  $qs/qp$  usualmente sigue el comportamiento de tipo campana. Cabe destacar que en las cinéticas que se comportan con forma de campana con un máximo de  $qp$  es frecuente que éste máximo sea alcanzado en el rango medio de  $\mu$ . En *E. coli* el decremento de la  $qp$  sobre cierto umbral de  $\mu$  a menudo ocurre cuando se alcanza la  $qs$  umbral que dispara el fenómeno de sobre flujo metabólico (Peebo and Neubauer 2018).



*Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos*

# Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos

## **Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos**

### **2.1. Justificación**

La reducción de la capacidad de consumo de glucosa en cepas de *E. coli* ha sido empleada como estrategia para disminuir o eliminar la producción de ácido acético, evitando así la pérdida de carbono y su toxicidad. El evitar la acumulación de ácido acético en procesos de producción ha dado como resultado el incremento en la síntesis de distintos productos, incluidas las proteínas recombinantes. Sin embargo, en muchos de esos casos se han probado un número limitado de cepas mutantes. El contar con una colección de cepas mutantes de *E. coli*, carentes de uno o varios sistemas de transporte de fuentes de carbono con diferentes capacidades de consumo de glucosa, puede permitir realizar estudios comparativos de las consecuencias de alterar, con valores predeterminados, la capacidad de transporte de glucosa sobre parámetros fisiológicos y la capacidad de producción de proteína recombinante en procesos de producción a nivel de población y célula única.

### **2.2. Hipótesis**

La reducción de la velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_s$ ), dictada por la deleción de genes codificantes para transportadores de fuentes de carbono de tipo PTS y no PTS, modifica la fisiología celular, no solo disminuyendo el sobre flujo de carbono y la velocidad de crecimiento. También mejorará la producción de proteína recombinante (GFP) y los perfiles transcripcionales corresponderán con un estado de limitación de carbono.

### **2.3. Objetivos**

#### **2.3.1. Objetivo general**

Entender los efectos fisiológicos causados por la disminución en la capacidad de consumo de glucosa en cepas mutantes de *E. coli* carentes de uno o varios genes relacionados con el transporte de este carbohidrato, y cómo esto impacta la producción de proteína recombinante.

#### **2.3.2. Objetivos particulares**

## **Capítulo 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos**

- Medir la capacidad de consumo de glucosa y de producción de acetato y proteína recombinante GFP en cepas de *E. coli* con capacidad reducida de consumo de glucosa, realizando cultivos en matraz con medio mínimo M9 con 10g/L glucosa como única fuente de carbono.
- Medir la capacidad de consumo de glucosa y de producción de acetato y proteína recombinante GFP en cepas de *E. coli* con capacidad reducida de consumo de glucosa, en biorreactores controlando la aireación y control de pH en medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa como única fuente de carbono.
- Medir heterogeneidad poblacional de cultivos de mutantes de *E. coli* con capacidad reducida de consumo de glucosa productoras de GFP mediante citometría de flujo.
- Observar la filamentación celular, así como la heterogeneidad poblacional en cultivos de la cepa WG/pV21 mediante el cultivo en reactores microfluídicos y la captura de imágenes en lapsos de tiempo.
- Medir la respuesta transcripcional causada por la reducción de consumo de glucosa en cepas mutantes de *E. coli* con capacidad reducida de consumo de glucosa, mediante un análisis de expresión diferencial.

*Capítulo 3. Material y Métodos*

# Capítulo 3. Material y Métodos

## Capítulo 3. Material y Métodos

### 3.1. Cepas bacterianas y plásmido

#### 3.1.1. Cepas bacterianas

En la tabla 1 se muestran los genotipos de las cepas usadas en este estudio. Brevemente la cepa silvestre de *E. coli* K-12 W3110 es de la cual derivan las cepas mutantes (Bachmann 1972). Las cepas WG, WGX, WGM, WGMC, WHI y WHIC provienen del trabajo de Fuentes LG (Fuentes et al. 2013). Las cepas antes mencionadas fueron transformadas con el plásmido pV21 (De Anda et al. 2006) y se obtuvieron las cepas WG/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21.

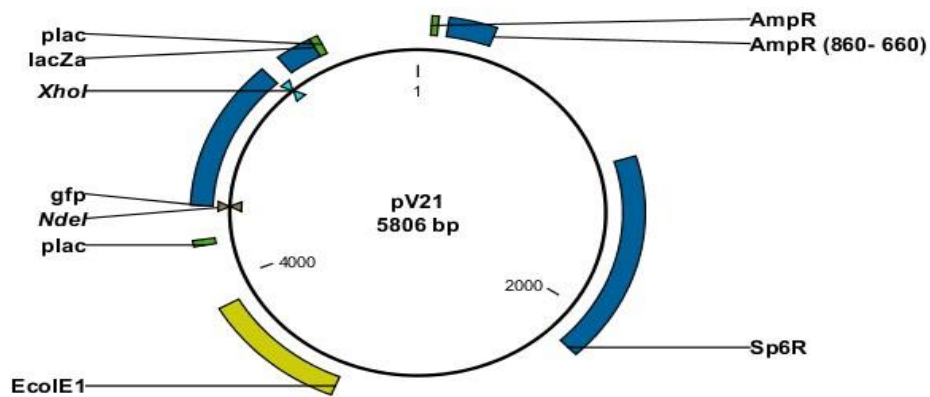


Figura 4. Esquema del plásmido pV21. El plásmido pV21 contiene un sitio de replicación tipo EcoIE1, gen de resistencia a espectinomicina y el gen *gfp* bajo el control del promotor *plac*.

### Capítulo 3. Material y Métodos

Tabla 1. Tabla de genotipos de las cepas y plásmidos usadas en este estudio

Cepas		
Nombre	Descripción	Fuente
W3110	<i>E. coli</i> F- $\lambda$ -rph-1 IN( <i>rrnD-rrnE</i> )1	(Bachmann 1972)
WG	W3110 $\Delta$ <i>ptsG</i> ::FRT	(Fuentes et al. 2013)
WGX	WG $\Delta$ <i>malX</i> ::FRT	
WGM	WG $\Delta$ <i>manX</i> ::FRT	
WGMC	WGM, $\Delta$ <i>mglABC</i> ::FRT-Cm-FRT	
WHI	W3110 $\Delta$ <i>ptsHlcr</i> ::FRT	
WHIC	W3110 $\Delta$ <i>ptsHlcr</i> ::FRT-Cm-FRT $\Delta$ <i>mglABC</i> ::FRT-Cm-FRT	
W3110/pV21	W3110/pV21	(Fragoso-Jiménez et al. 2019)
WG/pV21	WG/pV21	
WGX/pV21	WGX/pV21	
WGM/pV21	WGM/pV21	
WGMC/pV21	WGMC/pV21	
WHI/pV21	WHI/pV21	
WHIC/pV21	WHIC/pV21	
Plásmidos		
pV21	Basado en el plásmido pBCSK+ pLac/ <i>gfp</i> , <i>Sp<sup>r</sup></i>	(De Anda et al. 2006)
pJOQ	Plásmido multicopia 2001-pb, origen de replicación de pBR322, pTrc/ <i>gfp-His tag</i> , <i>Km<sup>r</sup></i>	(Roldan-Salgado, Sanchez-Barreto, and Gaytan 2016)

## **Capítulo 3. Material y Métodos**

### **3.2. Medios y condiciones de cultivo**

#### **3.2.1. Conservación de cepas**

Las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB), con espectinomicina a 30 µg/mL para las cepas pV21. Y después de un cultivo de 12 horas a 37 °C a 300 rpm se tomó 400 µL del medio y se les adicionó un volumen igual de glicerol al 80%. Se mantienen a -70 °C.

#### **3.2.2. Obtención de las cepas transformantes**

Las cepas W3110, WG, WGX, WGM, WGMC, WHI Y WHIC fueron cultivadas en medio YENB, se cosecha la biomasa por centrifugación a 8 000 rpm a 4 °C y se lavan varias veces con agua destilada, para finalmente ser resuspendidas en glicerol al 10%.

Estas células se electroporaron con 1 µg de ADN plasmídico y se aislaron en medio solido LB con 30 µg/mL de espectinomicina, para la obtención de las cepas pV21.

### **3.3. Cinéticas de producción de GFP (Pre-inóculo).**

A partir de las cepas transformadas con el plásmido pV21 y criopreservadas a -70 °C, inocular 4 mL de medio LB con 30 µg/mL de espectinomicina. Incubar a 37 °C en agitación a 300 rpm por 12 h. Posteriormente, inocular 50 mL de medio M9 con con 30 µg/mL de espectinomicina y glucosa con 10 o 20 g/L de glucosa dependiendo si se realizará:

#### **3.3.1. Cinética de producción de GFP en matraz bafleado de 250 mL.**

Para el inóculo de estas cinéticas se utilizó medio M9 con 10 g/L de glucosa y 30 µg/mL de espectinomicina, se incuban a 37 °C a 300 rpm. El tiempo de incubación varía dependiendo de la cepa, en la tabla 2 se muestra el tiempo que tardan las cepas en adaptarse al medio M9.

### Capítulo 3. Material y Métodos

Tabla 2. Tiempo de cultivo en la etapa de adaptación al medio mínimo M9 de las cepas transformadas con el plásmido pV21.

Cepa	Tiempo de cultivo en adaptación
W3110/pV21	10
WG/pV21	20-24
WGX/pV21	42-48
WGM/pV21	42-48
WGMC/pV21	48-54
WHI/pV21	60-72
WHICH/pV21	60-72

Después de que se cumple el tiempo en la fase de la adaptación, se procede a inocular (cinética de producción) 50 mL de medio M9 con 10 g/L de glucosa, 30 µg/mL de espectinomicina y 0.1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG Sin embargo, para inocular se tomó la cantidad necesaria del medio de adaptación para iniciar a una  $DO_{600nm}$  de 0.1, se centrifuga a temperatura ambiente por 5 minutos a 5 000 rpm, se retira el medio de cultivo y se agrega 1 mL de medio fresco con el cual se inocula el matraz. En cada punto muestral se tomó 1 mL de cultivo para medir densidad óptica, GFP por fluoroespectrometría y el sobrenadante se analizó por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), estos métodos se detallan en la sección 3.4.4.

#### 3.3.2. Cinéticas de producción de GFP en biorreactores de 250 mL.

Para el caso de las cinéticas de producción en biorreactores de 250 mL, se procede de igual manera, preinóculo, adaptación (ver apartado 3.3.1.). Se utilizó el mismo medio de cultivo M9 pero con 20 g/L de glucosa, 0.15 mL/L de solución de elementos traza, con 30 µg/mL de espectinomicina y 0.1 mM IPTG. Sin embargo, para inocular se tomó la cantidad necesaria del medio de adaptación para iniciar a una  $DO_{600nm}$  de 0.1, centrifugando a temperatura ambiente por 5 minutos a 5 000 rpm, se retira el medio de cultivo y se agrega 1 mL de medio fresco con el cual se inocula el reactor. Las condiciones de incubación fueron 37 °C, pH 7 controlado por la adición de  $NH_4OH$  o  $H_3PO_4$  0.1N, el oxígeno disuelto se mantuvo superior al 20% variando la velocidad de agitación en un rango de 300 a 1 800 rpm, la aireación se mantuvo constante a 100 mL/min. El volumen de trabajo fue de 150 mL. Los tiempos de cultivo y los tiempos de toma de muestra varían



### **Capítulo 3. Material y Métodos**

según la cepa y esto será detallado en la sección de resultados y discusión. En cada punto muestral se tomó 1 mL de cultivo para medir densidad óptica y el sobrenadante se analizó por medio de HPLC. Sin embargo, para el caso de estas cinéticas de producción, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo. Estos métodos se detallan en la sección 3.5.

#### **3.3.3. Para la caracterización de las cepas mutantes en 20 g/L de glucosa y toma de muestras para los experimentos de RNA-seq**

Para el inóculo de estas cinéticas se utilizó medio M9 con 10 g/L de glucosa, se incuban a 37 °C a 300 rpm. El tiempo de incubación varía dependiendo de la cepa, en la tabla 3 se muestra el tiempo que tardan las cepas en adaptarse al medio M9.

**Tabla 3.** Tiempo de cultivo en la etapa de adaptación al medio mínimo M9 de las cepas sin plásmido pV21.

Cepa	Tiempo de cultivo en adaptación
W3110	8
WG	12-16
WGX	24-30
WGM	28-32
WGMC	28-32
WHI	40-48
WHICH	48-60

Para el caso de las cinéticas para el RNA-seq, se realizaron en reactores de 1 L, se procede de igual manera, preinóculo y adaptación. Se utilizó el mismo medio de cultivo M9 pero con 20 g/L de glucosa y 0.15 mL/L de solución de elementos traza. Para la cinética se procedió de igual manera que en los reactores de 250 mL. Se inicia a una  $DO_{600nm}$  de 0.1. El volumen de trabajo fue de 750 mL. En cada punto muestral se tomó 1 mL de cultivo para medir densidad óptica y sobrenadante por HPLC. Estos métodos se detallan en la sección 3.4.4. Además, cuando los cultivos alcanzaron 1  $DO_{600nm}$  fueron tomadas 2 muestras de 50 mL cada una y colocadas en un tubo cónico de 50 mL en baño de hielo. Inmediatamente se adicionó 1 mL del tampón *RNA later* (Ambion Inc, USA), se mezcló y centrifugó a 4 °C y 5 000 rpm. Se removió el sobrenadante y el botón de células fue mantenido a -70 °C.

### **Capítulo 3. Material y Métodos**

#### **3.3.4. Cultivos en reactores microfluídicos experimentos de toma de imágenes en tiempo real.**

Se realizaron experimentos de toma de imágenes en tiempo real de la cepa WG en reactores microfluídicos en medio M9. Brevemente, el dispositivo para los cultivos microfluídicos fue una celda CellASIC® ONIX B04A-03 (Millipore, USA), diseñada para el dispositivo homónimo CellASIC® ONIX. Para cada experimento de cultivos e imágenes microfluídicos, fue necesario realizar un paso de preinoculo en 100 mL de medio M9 con 10 g/L de glucosa en matraces bafleados, incubandolos a 37 °C y 160 rpm. Estos matraces fueron inoculados usando una colonia proveniente de una caja de Petri. Una vez alcanzada la mitad de la fase exponencial del crecimiento, el cultivo fue centrifugado y la biomasa lavada dos veces con PBS y al final resuspendida en medio de cultivo M9 fresco. Se realizaron diluciones para obtener una OD final de 0.03. De esa suspensión se tomaron 50 µL para ser inoculados a la celda de cultivo. Dentro de la celda, las células bacterianas son perfundidas con medio fresco y la temperatura de incubación fue de 37 °C. La adquisición de imágenes se realizó en intervalos de 30 minutos. Dicho esto, la placa es puesta en un microscopio invertido, usando un objetivo inmersión de 100X. La iluminación fue provista por una lampara HXP de (120 V). Para la medición de la fluorescencia se utilizó un filtro 38 HE y los experimentos fueron grabados usando una cámara digital Hamamatsu ORCA-flash 4.0. El análisis de imágenes fue realizado con los programas Fiji<sup>53</sup>, usando el MicrobeJ plugin<sup>54</sup> y con MicrobeTracker<sup>55</sup> en MATLAB (R2013a, Mathworks) (Fragoso-Jiménez et al. 2019).

## **Capítulo 3. Material y Métodos**

### **3.4. Métodos analíticos**

#### **3.4.1. Medición de biomasa espectrofotométricamente y correlación $OD_{600nm}$ peso seco de biomasa.**

La concentración celular se determinó por espectrofotometría a 600 nm. La correlación empleada entre  $OD_{600nm}$  y el peso seco celular (DCW) (g/L) fue  $DCW = 0.37 \times OD_{600nm}$  (Hernández-Montalvo et al. 2003). Las muestras se diluyeron con agua destilada para alcanzar una absorbancia que oscilara entre 0.1 y 0.8.

#### **3.4.2. Producción y purificación de GFP-His**

La proteína Superglo GFP fue expresada en la cepa *E. coli* MC1061 transformada con el plásmido constitutivo no comercial pJOQ (Tabla 1) se produjo en 200 mL de LB suplementado con kanamicina a 25  $\mu$ g/mL, creciendo el cultivo a 37 °C durante 20 h, bajo agitación a 200 rpm. Tras este proceso, las células fueron recuperadas por centrifugación, resuspendidas en 20 mL de PBS y lisadas por sonicación en tres pulsos de 2 min, con enfriamiento intermedio en una mezcla de hielo y agua durante 10 min. Después de la centrifugación a 13 000 rpm, el sobrenadante claro se cargó en una columna HisTrap HP/1 mL (GE Healthcare), y la proteína se purificó utilizando un gradiente de imidazol de 30 mM a 300 mM en 30 min, a un flujo de 0.75 mL/min, con detección a 280 nm. Las soluciones de imidazol se prepararon en tampón fosfato 100 mM (pH 7,2) con 0.5 M de NaCl. Las fracciones que contenían la proteína pura se combinaron, se concentraron en dispositivos de filtración centrífuga (Amicon Ultra-4 10k, Millipore) y se lavaron con PBS (2  $\times$  4 mL) para eliminar el imidazol residual. La proteína pura se redisolvió en 1.5 mL de PBS. Para cuantificar la proteína se realizó una curva estándar de 5 puntos por triplicado con albumina sérica bovina y la concentración de proteína fue medida con el kit Quick Start™ Bradford protein assay siguiendo las indicaciones del fabricante. Después se realizaron diluciones de la GFP-His con PBS 1X pH 7.2 para que la determinación de la concentración de la proteína quedara dentro de los valores de absorbancia de la curva estándar, esta determinación se realizó por triplicado también. Una vez determinada la concentración de la GFP-His se realizó una curva de fluorescencia de la GFP-His para ello, para ello se realizaron diluciones con PBS 1X pH 7.2 y fueron leídas en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55, en un rango de 0 a 40 unidades de fluorescencia.

### **Capítulo 3. Material y Métodos**

La pureza de la proteína analizada mediante SDS-PAGE desnaturizante y tinción de Coomassie resultó ser superior al 95%.

#### **3.4.3. Medición de GFP por fluoroespectrometría**

La producción de GFP se detectó mediante lecturas de fluorescencia en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS55. Se utilizaron longitudes de onda de 480 nm para la excitación y de 507 nm para la emisión, ya que se comprobó que producían la máxima fluorescencia en muestras de fluorescencia máxima en muestras de caldo de cultivo que contienen células completas. Las muestras se diluyeron con PBS cuando fue necesario para obtener lecturas dentro del rango lineal (De Anda et al. 2006).

#### **3.4.4. Análisis de sobrenadantes por HPLC**

Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron para determinar las concentraciones de glucosa y acetato empleando una columna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm; 9 Am Bio-Rad, Hercules, CA). La separación se realizó de forma isocrática con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 0.5 mL/min y a una temperatura de 50 °C. La glucosa y acetato se detectaron por índice de refracción. Para estas mediciones se utilizó un sistema HPLC de Waters: Bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410.

#### **3.4.5. Cálculo de parámetros cinéticos y de fermentación**

De los datos obtenidos a partir de las cinéticas de crecimiento y producción de GFP se calculó la  $\mu$ ,  $q_S$ ,  $q_{ac}$ ,  $q_{GFP}$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{GFP/X}$  usando las ecuaciones siguientes:

$$I. \quad \mu = \frac{\Delta \ln X}{\Delta t}$$

$$II. \quad q_S = \frac{m\mu}{Y_{X/S}}$$

$$III. \quad q_{ac} = Y_{ac/X} \cdot \mu$$

$$IV. \quad q_{GFP} = Y_{GFP/X} \cdot \mu$$

$$V. \quad Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$VI. \quad Y_{GFP/S} = \frac{\Delta GFP}{\Delta S}$$

## **Capítulo 3. Material y Métodos**

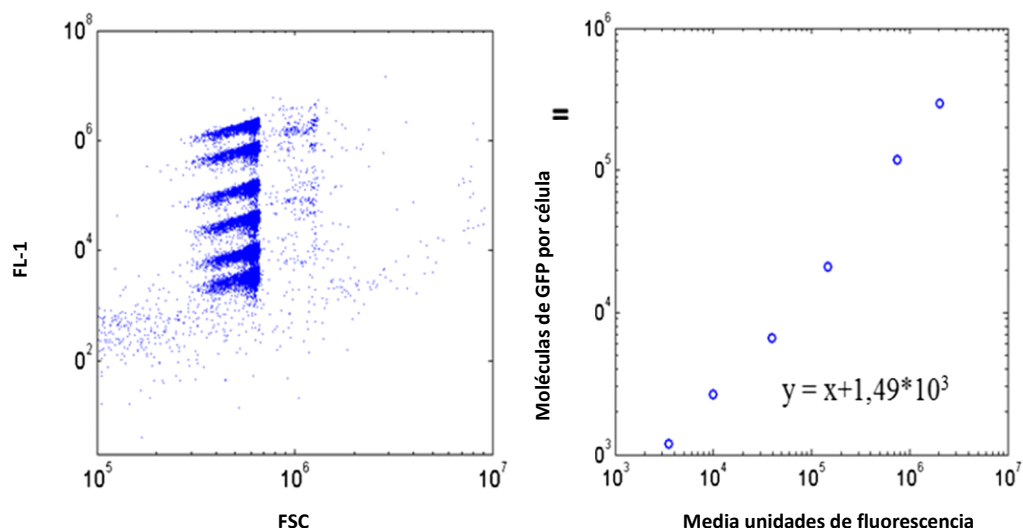
### **3.5. Citometría de flujo**

Las muestras de cultivo de biomasa del minibiorreactor DASGIP se diluyeron en PBS para ajustarse al rango deseado de 500-2500 eventos/ $\mu\text{L}$  para el análisis de citometría. Se añadió yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich Fluka, Saint-Louis Missouri USA) a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La citometría de flujo se realizó analizando 40.000 eventos (umbral de dispersión hacia delante  $> 80.000$ ; velocidad de flujo del fluido de la vaina ajustada al medio) utilizando un citómetro de flujo C6 Accury (BD Biosciences, NJ, USA). La producción de GFP se midió en el canal FL1 y la tinción PI en el canal FL3. Los datos sin procesar se extrajeron como archivos fcs y se cargaron en MATLAB utilizando la función readfsc (por L. Balkay, Universidad de Debrecen, Hungría, disponible en la central de intercambio de archivos de MATLAB). Las células fueron excitadas a 488 nm. Los canales FL1 y FL3 se procesaron para calcular la media y la desviación estándar de la intensidad de la tinción de GFP y PI a nivel de la población bacteriana.

#### **3.5.1. Correlación de fluorescencia y número de moléculas de GFP en citometría de flujo**

La intensidad de la señal FL-1 se convirtió en concentración intracelular de GFP. Para ello, se analizaron por citometría de flujo perlas de poliestireno recubiertas con un número determinado de moléculas de GFP (Clontech, EE.UU.). Se observaron seis poblaciones distintas de perlas que mostraban intensidades de fluorescencia específicas. Los datos de fluorescencia se extrajeron en MATLAB para calcular la correlación entre la señal FL-1 y la cantidad correspondiente de moléculas de GFP (figura 5).

## Capítulo 3. Material y Métodos



**Figura 5. Correlación de fluorescencia y número de moléculas de GFP en citometría de flujo.** Diagrama de dispersión de las microesferas de validación (izquierda). Pueden observarse 6 poblaciones de microesferas que tienen diferentes cantidades específicas de moléculas de fluoresceína. Regresión matemática que relaciona la intensidad de la fluorescencia FL-1 con una cantidad de moléculas de GFP (Derecha).

### 3.6. Extracciones de ARN por medio del kit RNeasy (Qiagen) y método del fenol caliente.

#### 3.6.1. Experimentos RNA-seq

La extracción de RNA total se realizó usando el kit RNeasy Mini de Qiagen, posteriormente se trataron las muestras con MICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit de Ambion para eliminar la mayor cantidad de ARNr, finalmente el ARN fue purificado y concentrado usando ADN Clean & Concentrator™-25 de Zymo Research, todos los procedimientos se realizaron siguiendo las indicaciones de los fabricantes, para finalizar se analizó la integridad del ARN con un Chip Agilent RNA 2100 Bioanalyzer, solo se consideraron aquellas con un RIN > 8 (*Ribosome Integrity Number*). Las muestras de ARN purificadas fueron enviadas para el proceso de secuenciación a la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del INMEGEN.

#### 3.6.2. Construcción de biblioteca de ARNm y secuenciación.

Se llevó a cabo la secuenciación de los ARN de las muestras descritas en el apartado anterior (3.6.1.) en la plataforma NextSeq 500/550 High Output v2 durante

### **Capítulo 3. Material y Métodos**

150 ciclos. La configuración de la secuenciación fue indexada Paired-End 2x76, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para mayor detalle revisar material y métodos de (Fragoso-Jiménez et al. 2022).

#### **3.6.3. Análisis de expresión diferencial por comparación por pares de las cepas.**

Las lecturas de RNA-seq fueron cuantificadas por Salmon utilizando los parámetros por defecto (Patro, Duggal, and Kingsford 2015), con el archivo de los cds de *E. coli* K-12 substr. W3110 como referencia ([ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/010/245/GCF\\_000010245.2\\_ASM1024v1/GCF\\_000010245.2\\_ASM1024v1\\_cds\\_from\\_genomic.fna.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/010/245/GCF_000010245.2_ASM1024v1/GCF_000010245.2_ASM1024v1_cds_from_genomic.fna.gz)).

El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo empleando EdgeR v 3.26.8 (Robinson, McCarthy, and Smyth 2010). Se utilizaron los niveles de transcripción de la cepa con el valor  $q_s$  más alto como referencia entre pares. Así, se llevaron a cabo las siguientes comparaciones WG-W3110, WGM-WG, WGMC-WGM, WHIC-WGMC. Además, se realizaron las comparaciones de las cepas mutantes contra la W3110. El método de Benjamini-Hochberg (BH) fue utilizado como ajuste del valor p (Benjamini and Hochberg 1995). Los genes expresados diferencialmente fueron aquellos con un valor  $p < 0.01$  y una tasa de falsos descubrimientos (FDR)  $< 0.01$  y un factor de cambio  $\geq 2$  como límite. Después, se complementó la información buscando los identificadores RefSeq en la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>) utilizando la herramienta de mapeo Retrieve/ID para obtener los nombres de los genes, las descripciones y los números de acceso de los números b (*bnumbers*) y la información adicional sobre las proteínas. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson de los genes expresados diferencialmente utilizando el logaritmo del factor de cambio (logFC) y sus valores de  $q_s$ . Además, se calculó la pendiente con el cociente logFC/ $q_s$ , de forma similar al método reportado por (Veit, Polen, and Wendisch 2007).

#### **3.6.4. Anotación de los genes diferencialmente expresados usando los COG (*Clusters of Orthologous Groups*)**

### **Capítulo 3. Material y Métodos**

Se utilizó la herramienta en línea eggNOG-mapper (<http://eggnogdb.embl.de/>) con el modo de mapeo DIAMOND, usando el ámbito taxonómico de las Gamma-proteobacterias, priorizando la precisión en los ortólogos y priorizando la calidad en la evidencia de la ontología genética.

#### **3.6.5. Experimentos RT-qPCR: extracción y purificación del ARN, síntesis de ADNc**

El ARN para los experimentos de RT-qPCR fue obtenido mediante el método del fenol caliente y la síntesis de ADNc se llevó a cabo siguiendo el protocolo publicado por (Aguilar et al. 2012).

#### **3.6.6. RT-qPCR**

La RT-qPCR se realizó con el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 y el sistema de PCR en tiempo real 7300 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA) utilizando el kit Maxima R SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas LifeSciences, USA). Placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (Applied Biosystems, USA) y las películas de sellado ultraligero Plate Max (Axygen Inc., USA) se utilizaron en estos experimentos. Las secuencias de ADN de los cebadores para las amplificaciones especificadas se diseñaron con el programa informático Primer Express (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA). El tamaño de todos los amplímeros fue de 101 pb. La concentración final del cebador fue de 0.2  $\mu$ M, en un volumen total de 12  $\mu$ l. Todos los experimentos se realizaron menos por triplicado a partir de tres fermentaciones diferentes, para cada gen de cada cepa, obteniendo valores muy similares (diferencias <0.3 SD). La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método 2 -  $\Delta\Delta C_q$  descrito por Livak y Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001). Los datos se normalizados utilizando el gen *ihfB* como control interno (gen de referencia).



*Capítulo 4. Resultados y Discusión*

# Capítulo 4. Resultados y Discusión

## **Capítulo 4. Resultados y Discusión**

### **4.1. Caracterización fisiológica y de poblaciones de las cepas W3110/pV21, WG/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en matraces y biorreactores con diferentes concentraciones de glucosa.**

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos de la caracterización de los cultivos de las cepas W3110/pV21, WG/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en matraces y biorreactores en medio mínimo M9 con 10 y 20 g/L de glucosa, respectivamente. Posteriormente, en el transcurso de esta sección se mencionará la razón por la cual se decidieron utilizar diferentes condiciones cultivo.

#### **4.1.1. Caracterización cinética y de producción de las cepas de *E. coli* W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en matraces de 250 mL con medio mínimo M9 con 10 g/L de glucosa.**

Se utilizaron las cepas W3110/pV21, WG/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21. El plásmido pV21 (figura 4) contiene el gen *gfp*, bajo el control del promotor nativo del operón de lactosa de *E. coli* y tiene como marcador de selección un gen de resistencia a espectinomicina. La GFP se utilizó como un marcador de la eficiencia de producción de proteína recombinante, debido a que es una proteína soluble y fácilmente medible mediante fluorescencia. Como un primer acercamiento, las cepas previamente mencionadas fueron cultivadas en matraz de 250 mL con 50 mL de medio M9 con 10 g/L de glucosa a 37 °C y agitación de 300 rpm. La medición de la producción de GFP se realizó directamente en las células mediante la medición de la fluorescencia como se menciona en los materiales y métodos. Hay que mencionar que midiendo la producción de GFP de esta manera solo se puede cuantificar la GFP que se encuentre plegada adecuadamente; en otras palabras, la proteína funcional. Los resultados de esta sección se encuentran depositados en la tabla 4. Los valores de  $q_s$  y  $\mu$  en estas condiciones de cultivo fueron de 1.75 a 0.45 g/g h y 0.54 a 0.16 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Se encontró una correlación lineal entre estos dos parámetros  $R^2=0.9472$  (figura 6). Los cultivos se detuvieron al entrar a la fase estacionaria del crecimiento lo cual fue de 10 a 32 h. Para todos los cultivos de estas cepas se detectó glucosa residual en el medio de cultivo al finalizar la fermentación, figura 7 panel A.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

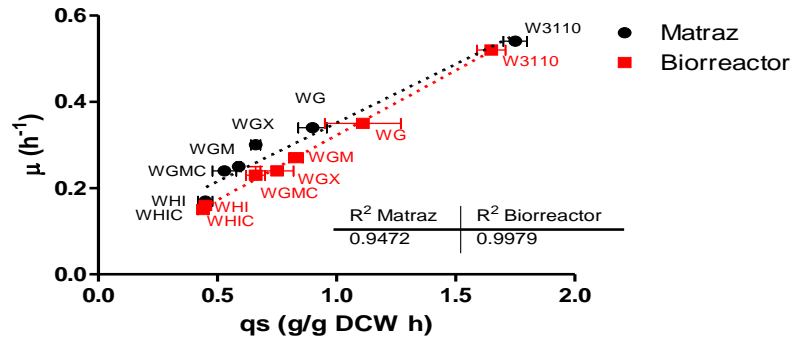
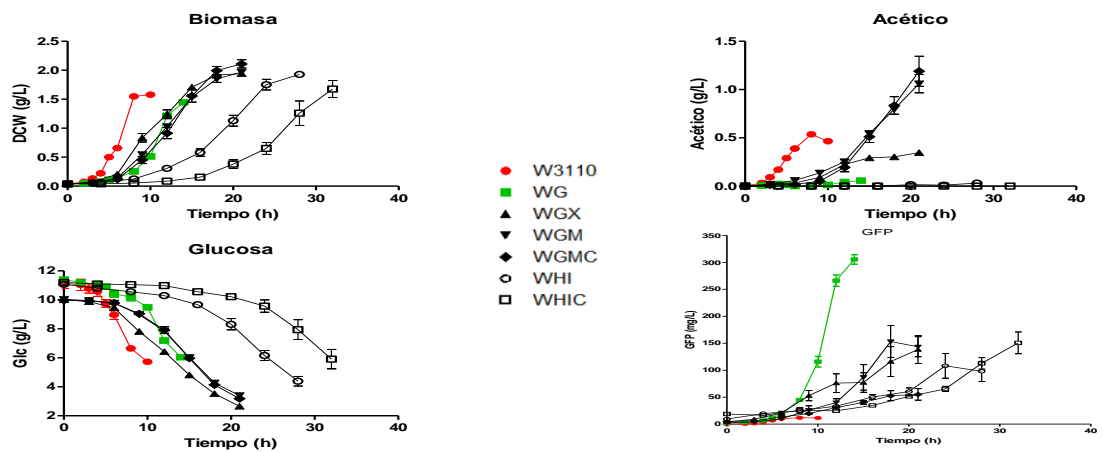


Figura 6. Correlación entre  $\mu$  y la  $q_s$ .  $\mu$  como función de  $q_s$  para las cepas pV21 cultivadas en matraz (Círculos negros) y biorreactor (Cuadros rojos) en medio M9 con 10 y 20 g/L de glucosa, respectivamente. Líneas punteadas corresponden a la tendencia de los puntos en matraz (línea negra) y biorreactor (línea roja).

**A**



**B**

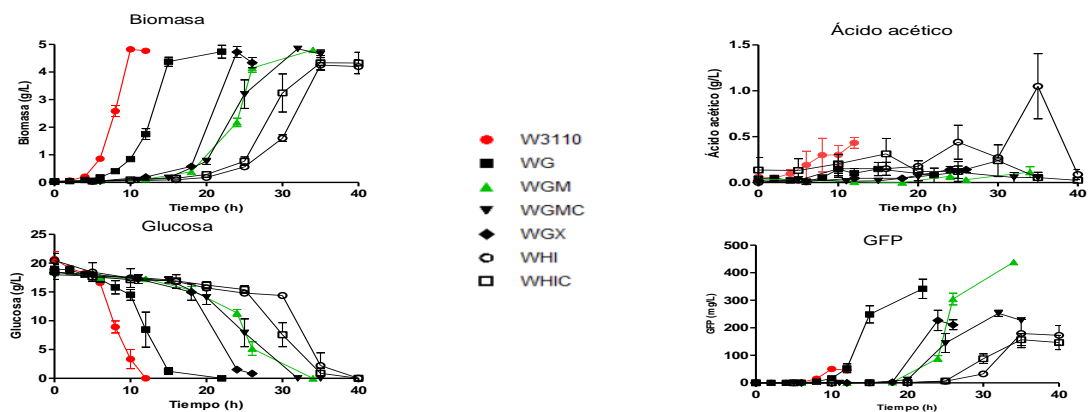


Figura 7. Disminuir la  $q_s$  disminuye la  $\mu$  y  $q_{ac}$  pero incrementa el título de GFP. **A.** Gráficos de las cinéticas de producción de biomasa, consumo de glucosa, producción de acetato y GFP de las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz **B.** Gráficos de las cinéticas de producción de biomasa, consumo de glucosa, producción de acetato y GFP de las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en biorreactor.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

Con respecto a la  $q_{ac}$ , la cepa W3110/pV21 fue la más alta con 0.47 g/g h y todas las cepas mutantes tuvieron menores  $q_{ac}$  de 0.08 a 0.004 g/g h. Las cepas WG, WGX, WHI y WHIC/pV21 tuvieron menores títulos finales de acetato de 0 a 0.35 g/L, con respecto a la cepa W3110/pV21, la cual tuvo 0.54 g/L. Este no fue el caso de las cepas WGM y WGMC/pV21 las cuales acumularon acetato hasta una concentración de 1.06 y 1.19 g/L, respectivamente. Por otra parte, la cantidad de GFP acumulada por las cepas mutantes, fue en todos los casos mayor a la presentada por la cepa silvestre (de 55.1 a 305.4 mg/L de GFP). Por su parte la cepa silvestre solo acumuló 11.94 mg/L. Cabe destacar que la cepa WG/pV21 tuvo el título de producción de GFP más alto, el cual fue de 305 mg/L.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$q_s$ (g/g h)	$q_{ac}$ (g/g h)	Max acetato (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Max GFP (mg/L)	$q_{GFP}$ (mg/g h)	$Y_{GFP/X}$ (mg/g)	Max biomasa (g/L)	Tiempo de cultivo (h)
W3110/pV21	0.54±0.01	1.75±0.05	0.47±0.03	0.54±0.00	0.30±0.02	11.9±0.4	8.0±0.5	7.7±0.2	1.58±0.04	10
WG/pV21	0.34±0.00	0.90±0.06	0.01±0.00	0.06±0.01	0.27±0.01	305.4±8.6	54.2±1.3	211.5±8.9	1.45±0.03	14
WGX/pV21	0.30±0.00	0.66±0.02	0.04±0.00	0.35±0.03	0.27±0.00	138.3±25.9	19.5±0.5	71.2±18.9	1.94±0.03	21
WGM/pV21	0.25±0.00	0.59±0.01	0.08±0.00	1.06±0.1	0.3±0.00	153.2±29.4	8.9±0.1	83±15.8	1.97±0.03	21
WGMC/pV21	0.24±0.00	0.53±0.05	0.06±0.01	1.19±0.16	0.31±0.01	55.1±10.6	8.1±0.1	27.5±7.3	2.11±0.07	21
WHI/pV21	0.17±0.01	0.45±0.03	0.004±0.001	0.03±0.01	0.29±0.02	108.3±22.9	13.6±1.4	65.4±15.8	1.93±0.04	28
WHIC/pV21	0.16±0.01	0.45±0.02	ND <sup>a</sup>	0.00±0.00	0.32±0.02	150.7±20.3	12.8±2.2	97.6±19.0	1.68±0.15	32

### 4.1.2. Caracterización cinética y de producción de las cepas de *E. coli* W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 en biorreactores de 250 mL con medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa.

Posteriormente se caracterizaron a las mismas cepas en condiciones de cultivo más controladas. Por tal motivo, las cepas W3110 y las mutantes pV21 fueron cultivadas esta vez con 20 g/L de glucosa, en biorreactores de 250 mL con 150 mL de medio M9. Se mantuvo la temperatura a 37 °C, el pH en 7 y el oxígeno disuelto > 20%. Como puede verse los valores de  $q_s$ ,  $\mu$  y  $Y_{X/S}$  fueron similares a los obtenidos en matraz (tabla 4 y 5). También se encontró una correlación lineal entre la  $q_s$  y  $\mu$  con una  $R^2= 0.9979$  (figura 6). Los rendimientos  $Y_{X/S}$  tanto en matraz como en biorreactor fueron similares, aunque ligeramente mayores en matraz.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 5. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en biorreactor.

Strain	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$q_s$ (g/g h)	$q_{ac}$ (g/g h)	Max acetato (g/L)	Y X/S (g/g)	Max GFP (mg/L)	qGFP (mg/g h)	Y GFP/X (mg/g)	Max Biomasa (g/L)	Tiempo de Cultivo (h)
W3110/pV21	0.52±0.01	1.65±0.06	0.112±0.064	0.49±0.10	0.24±0.01	50.5±4.6	2.5±0.1	10.5±0.9	5.1±0.4	12
WG/pV21	0.35±0.00	1.11±0.16	0.012±0.003	0.26±0.03	0.25±0.01	342.0±35.0	9.3±1.7	71.8±4.5	4.7±0.4	22
WGM/pV21	0.27±0.00	0.83±0.03	0.005±0.002	0.16±0.02	0.26±0.01	438.5±6.6	12.8±0.3	91.3±0.7	4.8±0.1	34
WGX/pV21	0.24±0.01	0.75±0.07	0.003±0.000	0.15±0.03	0.24±0.01	231.9±34.7	6.7±0.9	49.2±4.9	4.7±0.3	26
WGMC/pV21	0.23±0.02	0.66±0.04	0.003±0.000	0.17±0.04	0.27±0	252.8±11.0	7.1±0.8	52.2±2.1	4.8±0.1	35
WHI/pV21	0.15±0.01	0.44±0.02	0.008±0.002	1.05±0.01	0.22±0.02	187.6±44.2	3.1±0.7	42.8±9.6	4.3±0.3	40
WHIC/pV21	0.16±0.01	0.45±0.00	0.011±0.011	0.52±0.06	0.25±0.01	158.8±21.3	2.5±0.3	37.5±5.6	4.3±0.5	40

La  $q_{ac}$  para las cepas W3110/pV21, WG/pV21 y WGX/pV21 tuvieron el mismo comportamiento en ambos sistemas de cultivo; es decir, la cepa W3110/pV21 fue la que tuvo el mayor  $q_{ac}$  mientras que las cepas WG/pV21 y WGX/pV21 tuvieron una  $q_{ac}$  al menos 9 veces menor. Sin embargo, las cepas WGM/pV21 y WGMC/pV21 acumularon acetato en 1 orden de magnitud menor que en matraz (figura 7 panel A y B; tablas 4 y 5). Se hipotetizó que la diferencia entre la cantidad de acetato acumulado por las cepas WGX/pV21, WGM/pV21 y WGMC/pV21 pudo haber sido por la carencia de control de pH y aireación en matraz. Pues a diferencia de los cultivos en biorreactor, donde se controlaron estos dos parámetros, estas cepas acumularon una menor cantidad de acetato. Por lo que se puede suponer que las mutaciones de estas cepas las vuelven más sensibles a las condiciones de estrés que se propician en matraz.

Respecto a la cantidad de GFP producida las cepas WG/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 tuvieron títulos similares a los obtenidos en matraz (figura 7). Sin embargo, las cepas W3110/pV21, WGX/pV21, WGM/pV21 y WGMC/pV21 tuvieron mayores niveles de producción en biorreactor. Probablemente, el control de pH favorece la producción de GFP, pues la cepa W3110/pV21, que generó una cantidad similar de acetato, produce 5 veces más GFP en biorreactor. El  $Y_{GFP/X}$  en las cepas WGX/pV21, WGM/pV21 y WGMC/pV21 fueron mayores en biorreactor, esto como resultado de una menor excreción de acetato, debido seguramente a las mejores condiciones de aireación y control de pH. Por su parte la cepa WG/pV21 tuvo una  $q_s$  y  $q_{ac}$  23% y 12 veces mayor que en matraz y acumuló 4 veces más acetato, por lo cual su  $Y_{GFP/X}$  disminuyó a un tercio de lo obtenido en matraz. Algo que hay que destacar es que todas las cepas mutantes tienen una  $q_s$  menor a la de la cepa parental y logran acumular una mayor cantidad de GFP. Lo mismo sucede con la  $q_{GFP}$  y  $Y_{GFP/X}$  que fueron mayores que la cepa W3110/pV21. Al comparar la producción de GFP de las cepas WG/pV21 en matraz y WGM/pV21 en

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

reactor, pudo observarse que los títulos fueron de 25 y 8.7 veces mayores que la cepa W3110/pV21. Justamente, las cepas WG/pV21 y WGM/pV21 son las mejores productoras en matraz y biorreactor, respectivamente. En la figura 8 se puede observar que en los dos sistemas de cultivo este máximo de producción de GFP,  $q_{GFP}$  y  $Y_{GFP/X}$  se encontraron entre las  $q_s$  de 0.8 y 0.9 g/g h, que es aproximadamente el 50% de la  $q_s$  máxima. Cuando la  $q_s$  es menor a 0.8 g/g h se presentó una disminución en la  $q_{GFP}$ , lo cual indica que el decremento en  $q_s$  no es benéfico para la producción de GFP. Como menciona (Peebo and Neubauer 2018) en cultivos continuos de *E. coli* en condiciones de producción de proteína recombinante, es frecuente que la producción de proteínas recombinantes tenga una relación entre la  $q_s/q_p$  que sigue el comportamiento de tipo campana. También se ha observado que el máximo de producción frecuentemente se alcanza en el rango medio de  $\mu$ . Dado que la  $\mu$  y la  $q_s$  tienen un alto grado de correlación en este sistema de cultivo aquí empleado, se puede afirmar que el máximo de producción se alcanza a una  $q_s$  cercana al 50% del máximo.

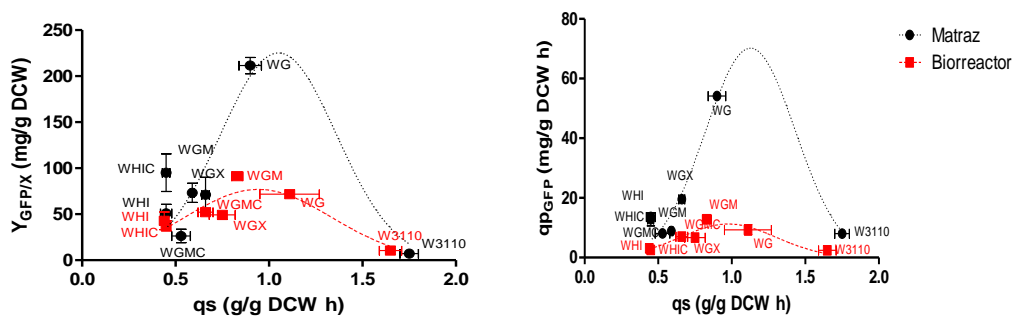


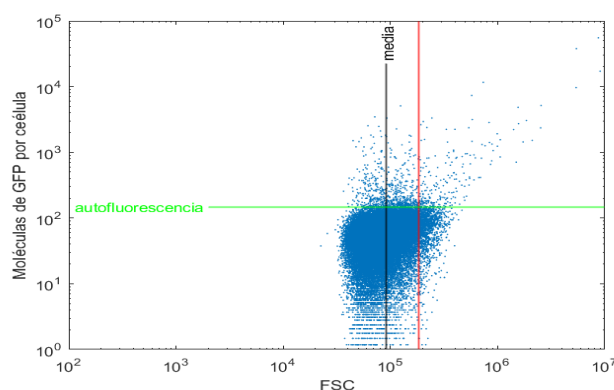
Figura 8. La producción máxima de GFP se da alrededor del 50% de la  $q_s$  máxima.  $Y_{GFP/X}$  como función de la  $q_s$  (izquierda),  $q_{GFP}$  en función de  $q_s$  (derecha) para las cepas transformadas con el plásmido pV21 cultivadas en matraz (círculos negros) y biorreactor (cuadros rojos) en medio M9 con 10 y 20 g/L de glucosa. Líneas punteadas representan tendencia de los puntos de los experimentos realizados en matras (línea negra) y biorreactor (línea roja).

### 4.1.3. Segregación poblacional en las cepas de *E. coli* W3110/pV21, WG/pV21, WGM/pV21, WGMC/pV21, WGX/pV21, WHI/pV21 y WHIC/pV21 usando medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores: coexistencia de estados de alta y baja producción.

En la sección anterior se describieron los resultados de las cinéticas de producción de GFP en matraz y biorreactor. Entonces se decidió analizar mediante citometría de flujo

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

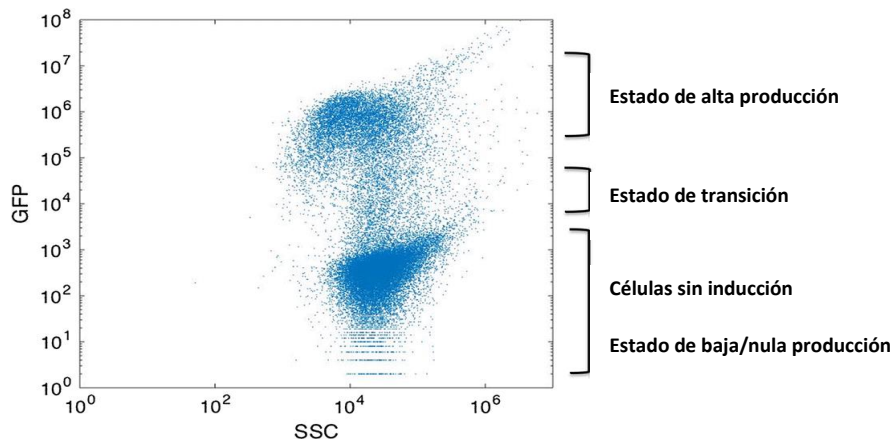
cada uno de los puntos muestrales de las cinéticas de los biorreactores, con el fin de medir la heterogeneidad poblacional de los cultivos. Para cada muestra se midieron 40 000 eventos donde se determinó el tamaño de las células, la concentración de GFP, así como la captación o no del ioduro de propídio (PI) adicionado a las muestras como indicador de viabilidad o permeabilidad de membranas. Para iniciar, se decidió caracterizar la población de células de la cepa W3110 en condiciones de cultivo sin la expresión de la GFP. En la figura 9 se muestran el gráfico de dispersión de las células de la cepa W3110 sin el plásmido pV21. En ella se muestra el valor de la media del tamaño determinada en el canal FSC, la cual corresponde a  $9.1469 \times 10^4$  unidades y su desviación estándar ( $\sigma$ ) fue de  $9.0875 \times 10^4$  unidades, la cual está representada como una línea roja (figura 9). Además, se consideraron a aquellos eventos en los que tuviesen una cantidad menor o igual a  $10^3$  unidades de fluorescencia (o bien 147.75 moléculas de GFP por célula) se consideraron como células no productoras señalada como una línea horizontal verde (figura 9).



**Figura 9. Determinación de los parámetros basales de tamaño y fluorescencia de *E. coli* W3110 en citómetro de flujo.** Gráfico de dispersión de la cepa W3110 sin plásmido pV21, eje Y "fisiológico" (número de moléculas de GFP por célula; FL1) contra eje X "tamaño/filamentación" (FSC; Forward scatter channel). Línea en negro valor de la media del tamaño/filamentación; línea en rojo +1 desviación estándar; línea en verde valor considerado como autofluorescencia.

En la sección anterior se describió como las 2 cepas con mayor producción GFP fueron WG/pV21 y WGM/pV21. Estas cepas alcanzaron una acumulación de GFP al menos diez veces mayor en comparación con la WT. Más concretamente, desde una perspectiva unicelular, tras 6 h de cultivo, estas cepas parecían fuertemente segregadas en cuanto a la acumulación de GFP con la coexistencia de estados fisiológicos de "alta/high" y "baja/low" productividad (Figura 10).

## Capítulo 4. Resultados y Discusión



**Figura 10. Coexistencia de fenotipos de alta y baja producción de GFP en cultivos de *E. coli* WG.** Ejemplo de segregación poblacional ocurrida durante el cultivo de la cepa WG en biorreactor. Muestra tomada después de 6 horas del inicio del cultivo. En el panel lateral se indican las poblaciones presentes denominadas de baja o nula producción (células que no producen GFP), en estado de transición (células diferenciándose hacia el estado de producción) y de alta producción (células altamente fluorescentes).

En este sentido, la segregación microbiana observada puede explicarse por la arquitectura del operón *lac*, ya que como se mencionó con anterioridad, la expresión del gen *gfp* se encuentra bajo el promotor nativo de este operón. Para entender el fenómeno se tiene que mencionar la arquitectura del operón *lac* el cual asegura que los genes *lacZ*, *lacA* y *lacY* son expresados únicamente en presencia de la alolactosa (o IPTG) y siempre y cuando la concentración de glucosa sea baja o esté ausente en el medio. De manera más concreta, si la lactosa está presente en el medio, el represor LacI de expresión constitutiva es inactivado por su unión a la alolactosa, liberándose de la región del promotor. Por otra parte, una concentración baja de glucosa o su ausencia promueve que la EIIA se encuentre mayormente fosforilada, lo cual a su vez promueve la actividad de la adenilato ciclasa y un incremento en la concentración del AMPc. El AMPc entonces se puede unir a su proteína receptora Crp la cual funge como activador de la transcripción del operón *lac*. En nuestro modelo de estudio, la concentración intracelular de glucosa esta mediada por la inactivación de proteínas PTS. Así, las células pueden detectar una concentración baja de glucosa al interior de la célula, incluso cuando la concentración de glucosa del medio sea alta. Con esto puede suponerse que el nivel de EIIA fosforilada es mayor en las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre; del mismo modo puede suponerse que la concentración de AMPc es mayor. Además, el medio de cultivo contenía IPTG el cual funciona como un análogo de la alolactosa para la desrepresión del operón



## Capítulo 4. Resultados y Discusión

*lac*. Entonces, la mayor concentración de AMPc dada por la menor capacidad de consumo de glucosa y la presencia de IPTG en el medio de cultivo favorecerían la expresión del gen *gfp* al estar activo Crp-AMPc e inactivo LacI. (Figura 11). Además, se sabe que la red transcripcional relacionada con el operón *lac* es conocida por exhibir biestabilidad (Veening, Smits, and Kuipers 2008) como la mayoría de los vectores clásicos utilizados para la producción de proteínas recombinantes de *E. coli*. En biología, un sistema biestable significa que en una red de regulación genética se pueden presentar dos o más niveles discretos de expresión génica, es decir, un estado alto y un estado bajo. En otras palabras, las células pueden estar en un estado de alta o baja expresión y el cambio a otro estado es un evento raro (Veening, Smits, and Kuipers 2008).

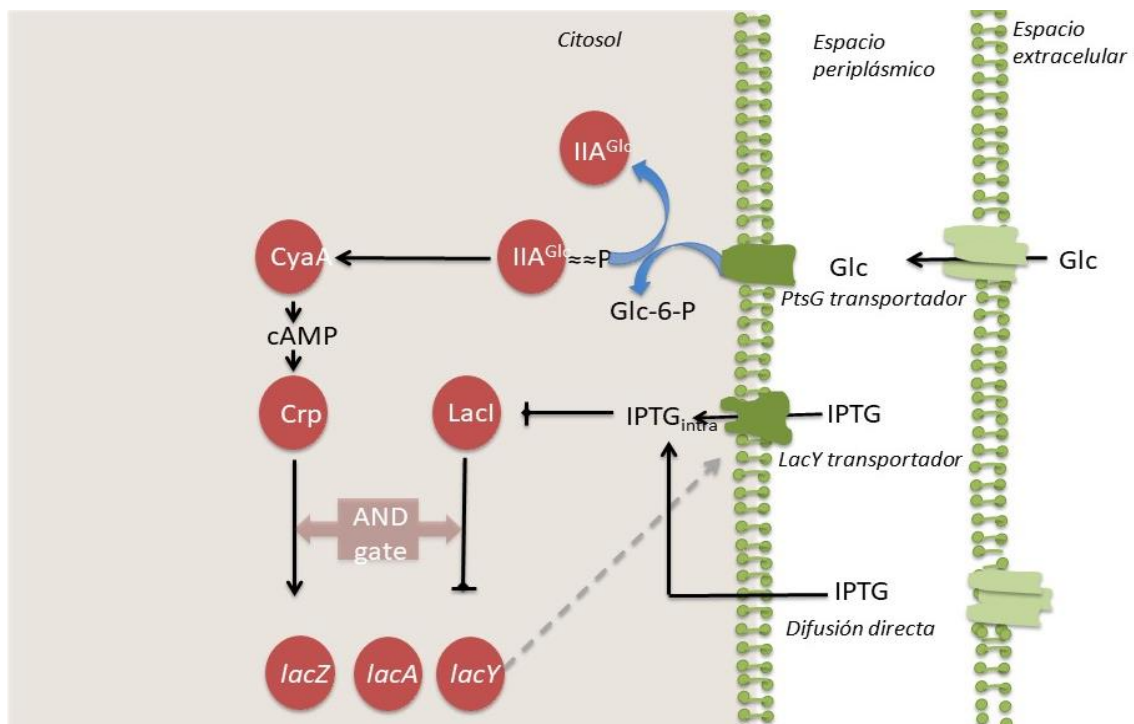


Figura 11. Esquema de la red de regulación transcripcional involucrada en la inducción del operón *lac* en *E. coli*.

Wurm y col. reportaron una cepa de *E. coli* BL21 utilizando un vector de expresión PET para producir una proteína recombinante (ScFv) utilizando IPTG como inductor. Ellos encontraron que a bajas  $q_s$  con una baja  $\mu$  concomitante la producción de la proteína recombinante es mayor. Sugieren que a bajas  $q_s$  el efecto de represión catabólica disminuye y que el IPTG puede ser transportado fácilmente a través de la lactosa permeasa aumentando el nivel de expresión (Wurm et al. 2016). Del mismo modo, se observó que existe un valor de  $q_s$  en el que la inducción del sistema de expresión es

## **Capítulo 4. Resultados y Discusión**

máxima, correspondiendo aproximadamente al 50% del valor mostrado por el tipo salvaje.

### **4.2. Caracterización del estado de alta producción de la cepa de *E. coli* WG/pV21 en reactores microfluídicos usando medio M9 con 20 g/L de glucosa: La acumulación de GFP puede provocar la filamentación celular.**

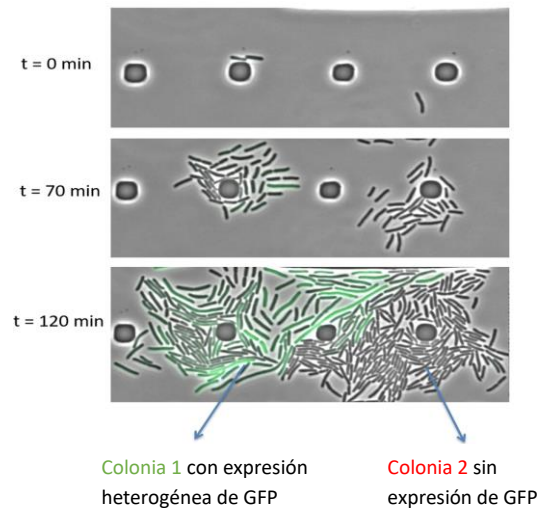
Una que las cepas transformadas con el plásmido de producción pV21 fueron caracterizadas a nivel de consumo de glucosa y producción de acetato y GFP. El siguiente objetivo fue observar, mediante el uso de captura de imágenes en reactores microfluídicos la heterogeneidad poblacional medida por citometría de flujo, así como la aparición y proliferación de los fenotipos filamentados y de alta producción de GFP.

#### **4.2.1. Imágenes en reactores microfluídicos**

Posteriormente, se procedió a investigar la fisiología del estado de "alta" productividad. En este sentido, el análisis de citometría de flujo proporciona patrones unicelulares para describir el ruido biológico durante el bioproceso (Brognaux et al. 2013). Sin embargo, este método no permite evaluar la diferenciación unicelular entre los estados de "alta" y "baja" productividad. En los sistemas biológicos, las señales nunca son discretas debido a las fluctuaciones aleatorias de las reacciones bioquímicas de la célula. Esta variación estocástica se denomina ruido (Veening, Smits, and Kuipers 2008). Para superar esta limitación técnica, en la siguiente sección se abordará la obtención de imágenes de células en tiempo real mediante un dispositivo de cultivo microfluídico.

Se llevaron a cabo fermentaciones en reactores microfluídicos, tomando fotografías en diferentes lapsos de tiempo para seguir en tiempo real el proceso de linaje detrás de la expresión de GFP para la cepa WG utilizada en este estudio. Las imágenes se representan en la Figura 12.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión



**Figura 12. La filamentación celular puede estar relacionada con el fenotipo de alta producción de GFP.** Cultivo de la cepa WG de *E. coli*. Imágenes tomadas al inicio ( $t_0=0$  minutos), 70 minutos después ( $t_{70}=70$  minutos) y tiempo final ( $t_{120}=120$  minutos). En el  $t=120$  min, se muestra a la izquierda una colonia de células heterogénea (Colonia 1) con células de diferente tamaño, algunas células se observan claramente verdes, es decir produciendo GFP. A la derecha se muestra una colonia más homogénea (Colonia 2) con células de tamaño similar y sin fluorescencia.

De las imágenes presentadas en la figura 12 se pueden hacer varias observaciones: en primer lugar, las dos células inoculadas en  $t_0$  (0 minutos) proporcionan dos colonias con fisiologías fuertemente divergentes ya que una (a la izquierda) produjo GFP y la otra (a la derecha) no produjo GFP después de 120 minutos. En segundo lugar, entre las células productoras de GFP se observa una fuerte heterogeneidad fenotípica interna ya que sólo una fracción de las células acumula GFP, de tal manera que en la fotografía se ven con una coloración evidentemente verde. Por otra parte, y aunque no es tan evidente, se puede observar que las células de la colonia 1 (izquierda figura 12,  $t=120$  min) tienden a ser más grandes que las de la colonia dos (derecha). Esto puede deberse a que estas células agrandadas también estén acumulando GFP. Sin embargo, podría ser que la acumulación de la GFP no haya llegado al límite de detección de fluorescencia del equipo. Más concretamente, parece que las células que producen GFP adoptan también una morfología filamentosa. De hecho, se ha demostrado anteriormente que la sobreexpresión de proteína recombinante puede dar lugar a una respuesta al estrés y a la filamentación de las células (K. J. Jeong and Lee 2003).

Estos resultados señalan que la acumulación de GFP podría ser la causa de la filamentación celular. Esta observación puede interpretarse en relación con la fuerte

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

acumulación de la proteína recombinante en el citoplasma. En general, el número total de proteínas para las células *E. coli* silvestre es de unas  $3 \times 10^6$  copias/célula. Entre estas proteínas, las especies más abundantes están presentes hasta  $10^5$  copias/célula (Liebermeister et al. 2014; Milo 2013). Sin embargo, el análisis de citometría de flujo mostró que para la mayoría de las mutantes consideradas en este estudio, este valor se supera ampliamente hasta alcanzar unas  $2 \times 10^5$  copias/célula (Figura 13). De este modo, el empaquetamiento intracelular de GFP podría abarrotar el volumen citoplasmático y reducir la difusión de las enzimas y sus sustratos dentro del citoplasma, lo que podría afectar a otras funciones celulares.

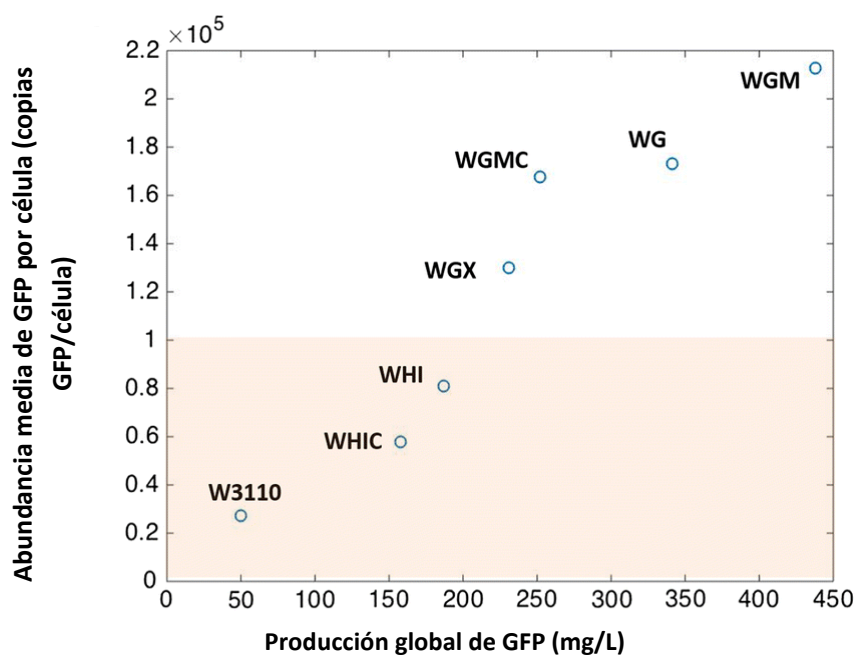
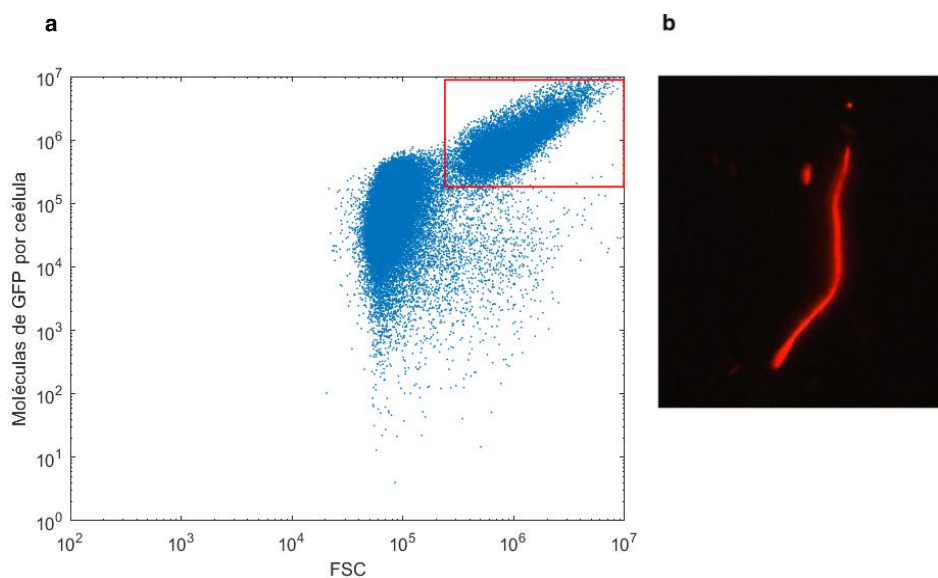


Figura 13. El incremento en la producción de GFP corresponde al incremento de GFP producido por célula. Correlación entre la producción de GFP a nivel de célula única y la producción global de GFP. El área sombreada corresponde a la abundancia de proteínas típica en *E. coli*.

Además, estudios anteriores demostraron que es posible desencadenar artificialmente la filamentación de *E. coli* mediante la inhibición de proteínas implicadas en la división celular, como FtsZ (Arends and Weiss 2004; Jiang and Chen 2016). Del mismo modo, en este estudio, el fenotipo filamentoso podría ser desencadenado por la saturación del citoplasma provocada por la sobreexpresión de la GFP. Observaciones adicionales mostraron que una disminución local de la fluorescencia dentro de una célula filamentosa se asocia a menudo con una septación celular localizada, lo que corrobora

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

esta hipótesis, datos no mostrados. Además, el análisis de los citogramas de la cepa WGM, que fue la mejor productora de GFP (figura 14a) confirmó que la población está totalmente diferenciada en el estado alto ( $> 1 \times 10^3$  en el canal FL-1 o bien 147.75 moléculas de GFP por célula). Además, entre esta población, las células más productivas parecen mostrar altos valores de canal de dispersión frontal (FSC) (Figura 14a). Más concretamente, se confirma que mediante microscopía de fluorescencia que las subpoblaciones de alto FSC corresponden a la fracción filamentosa (Figura 14b). La posibilidad de seguir tanto los rasgos fluorescentes como los morfológicos apoyan el potencial de la citometría de flujo como una herramienta para tratar de descifrar los mecanismos de diferenciación fenotípica entre las poblaciones microbianas.



**Figura 14.** La filamentación celular podría estar relacionada con el incremento de la permeabilidad de la membrana celular. (a) Gráfico de dispersión de una muestra de la cepa WG/pV21 de *E. coli* después de 12 horas de cultivo en biorreactor. Distribución de la población celular: eje X tamaño celular (FSC), eje Y contenido intracelular de GFP (FL-1 moléculas de GFP por célula). Recuadro color rojo se demarcaron la población de células con el mayor nivel de GFP por célula y mayor tamaño, cuadrante superior derecho del gráfico de dispersión. (b) microscopía de fluorescencia, célula filamentosa que exhibe alta afinidad por PI.

### 4.2.2. Rojas, pero no muertas

Por último, los filamentos celulares parecen ser muy permeables al yoduro de propidio (PI), como se muestra en la figura 14b, lo que sugiere una mayor permeabilidad de la membrana. El PI se ha utilizado comúnmente como un biosensor exógeno para

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

evaluar la viabilidad celular, ya que la molécula difunde libremente sólo a través de membranas porosas para formar un complejo rojo fluorescente con el ADN y las células teñidas con el colorante se denominan comúnmente como células inviables o muertas. En este caso, la fracción celular filamentosa y con mayor contenido de GFP, a su vez tienden a tener una alta afinidad por el PI (panel b figura 14). Estas células se denominan como "rojo-pero-no-muertas" (Davey 2011) ya que estas células mantienen su capacidad de división. Además, el aumento de la permeabilidad de la membrana conduce a una mayor difusión de IPTG, induciendo así la síntesis de GFP. De este modo, la correlación previamente observada entre los rasgos morfológicos [Filamentación; parámetro Forward Scatter Channel/Side Scatter Channel (FSC/SSC)] y fisiológicos (acumulación de GFP; parámetro FL-1) tiene sentido.

### 4.3. Caracterización fisiológica de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores de 1 L.

#### 4.3.1. Caracterización cinética de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en medio mínimo M9 con 20 g/L de glucosa en biorreactores de 1 L.

Con el fin de observar el crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC, se caracterizaron cinéticamente en cultivos realizados en medio mínimo M9 usando 20 g/L de glucosa. En la tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos y de fermentación provenientes de estos experimentos.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos y estequiométricos de los cultivos de *E. coli* y cepas mutantes derivadas en biorreactores de 1 L.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$q_S$ (g/g h)	$q_{ac}$ (g/g h)	Max acetato (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Max Biomasa (g/L)	Tiempo de cultivo (h)
W3110	0.67±0.03	1.52±0.14	0.433±0.005	1.94±0.04	0.43±0.03	8.4±1.21	10
WG	0.52±0.02	1.11±0.19	0.004±0.001	0.13±0.04	0.41±0.01	8.5±0.23	14
WGM	0.34±0.01	0.62±0.05	ND	ND	0.50±0.02	9.63±0.01	20
WGMC	0.37±0.00	0.62±0.01	0.015±0.001	0.32±0.02	0.44±0.02	7.14±0.64	18
WHIC	0.27±0.01	0.35±0.01	0.001±0.001	0.05±0.03	0.46±0.02	9.23±0.53	28

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

Las cepas desplegaron una  $\mu$  que fue de los 0.27 a los 0.67  $\text{h}^{-1}$ , con  $q_s$  de 0.35 a 1.52  $\text{g/g h}$ . Se pudo determinar que la  $q_s$  y la  $\mu$  tienen una correlación lineal de  $R^2 = 0.9948$ , esta relación se muestra en la figura 15.

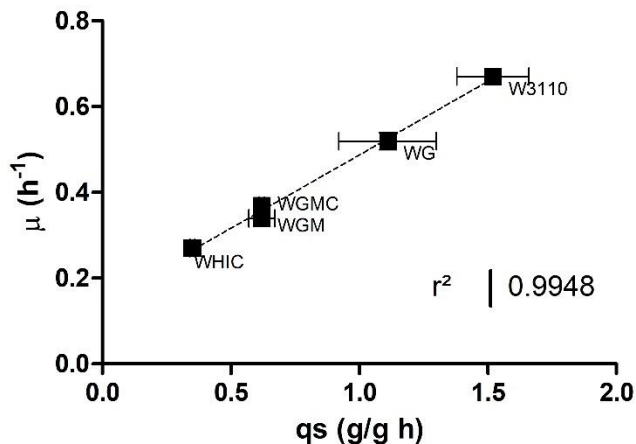


Figura 15. Correlación entre la  $q_s$  y  $\mu$ .  $\mu$  como función de la  $q_s$  de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC.

En los gráficos presentados en la figura 16 se muestran las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato.

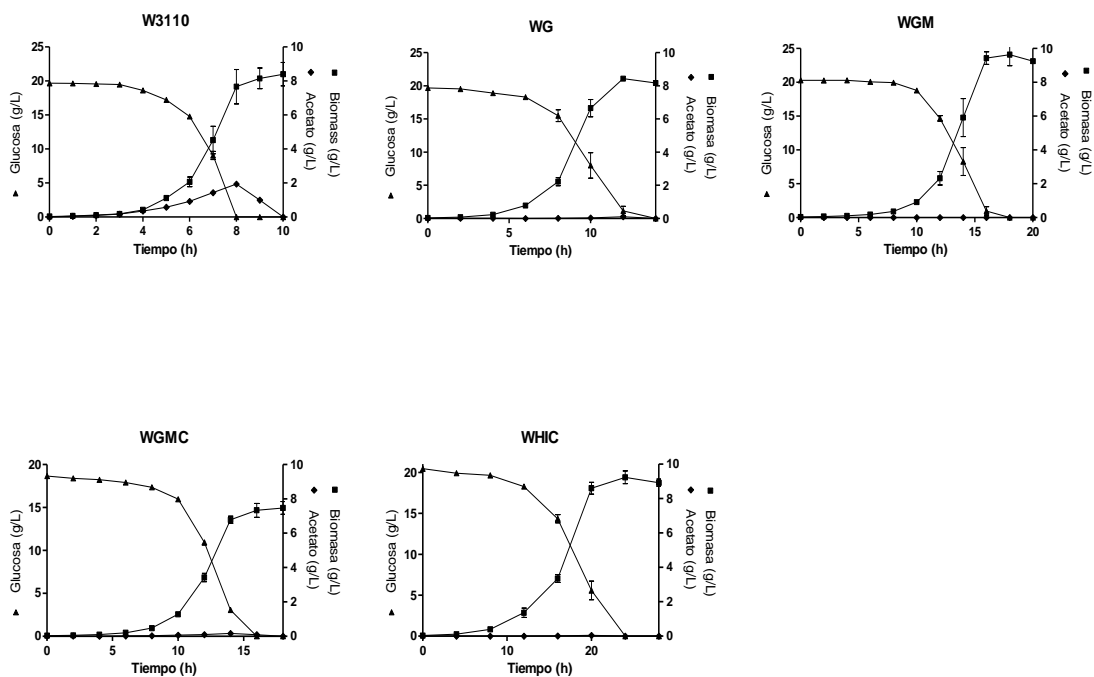


Figura 16. Caracterización de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de acetato de las cepas W3110 y mutantes WG, WGM, WGMC y WHIC.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

El tiempo de cultivo fue de 10 h para la cepa W3110, y hasta de 28 h para la cepa WHIC. Estas diferencias en los tiempos de cultivo se deben a las grandes diferencias presentadas entre las velocidades de consumo y crecimiento dadas entre las cepas mutantes y su cepa parental. Hay que mencionar que al término de los cultivos no se detectó glucosa residual en el medio. Por otra parte, las cepas W3110, WG, WGMC y WHIC excretaron acetato. El punto máximo de concentración de acetato en el medio correspondió al punto donde la glucosa catabolizó completamente. Posteriormente, las cepas que produjeron acetato lo consumieron en su totalidad. Sin embargo, para el caso de la cepa WGM no se detectó acetato en el sobrenadante. La cepa W3110 fue la cepa que más acetato excretó al medio de cultivo con 1.94 g/L, las demás cepas no produjeron acetato a más de 0.32 g/L, que fue para la cepa WGMC. También hay que mencionar que la cepa W3110 tuvo la  $q_{ac}$  más alta de todo este conjunto de cepas con 0.433 g/g h y la mayor  $q_{ac}$  para las cepas mutantes la tuvo la cepa WGMC con 0.015 g/g h. La  $q_{ac}$  de la cepa silvestre fue al menos 28.8 veces más alto con respecto a la cepa WGMC que fue la cepa mutante con la  $q_{ac}$  más alta. El  $Y_{X/S}$  de todas las cepas estuvo en el rango de los 0.41 a 0.50 g/g, no variando más allá del 16% (al comparar las cepas W3110 y WGM). Las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC fueron inicialmente caracterizadas en medio M9 con 2.5 g/L de glucosa en matraz a 37 °C por (Fuentes et al. 2013). Y aunque las condiciones de cultivo que usaron Fuentes y col. 2013 fueron diferentes a las empleadas en este estudio, en la tabla 7 se muestra una comparación entre los parámetros  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{ac}$  entre ambos estudios. Se puede apreciar que no hubo diferencia entre las  $\mu$  de las cepas W3110, WG y WGM, y fueron ligeramente mayores para las cepas WGMC y WHIC en biorreactor. Otros parámetros como  $q_s$  y la  $q_{ac}$  fueron también muy similares en ambos casos. Con esto se deduce que la  $q_s$  y  $\mu$  son muy similares sin importar el método y concentración de glucosa en el medio de cultivo. También se puede observar que estos parámetros no varían dependiendo de la concentración de glucosa en el rango de 2.5 a 20 g/L. Sin embargo, la  $q_{ac}$  de la cepa W3110 fue mayor, aproximadamente 2.3 veces mayor, esto se puede deber a que la  $q_s$  en biorreactor fue un 14% más alta o más bien debido a que la concentración de oxígeno en los matraces tiende a ser menor debido al mezclado y aireación menos eficiente. Para el caso de las demás cepas, se puede observar que las  $q_{ac}$  son muy cercanas a 0, probablemente se deba a las condiciones mejor controladas de aireación en los biorreactores, haciendo que la respiración aeróbica



## Capítulo 4. Resultados y Discusión

sea más eficiente. Con esto se puede deducir que los fenotipos preestablecidos dados por la inactivación de genes relacionados con el transporte de glucosa no varían en gran medida, es decir que son robustos. La robustez implica que estos sistemas pueden amortiguar ciertas condiciones de estrés y resistir el cambio o perturbaciones y seguir funcionando (Levin and Lubchenco 2008).

**Tabla 7.** Comparación de parámetros cinéticos y de fermentación de las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC en dos sistemas de cultivo: matraz con 2.5 g/L de glucosa y biorreactor con 20 g/L de glucosa en medio M9.

Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		$q_s$ (g/g h)		$q_{ac}$ (g/g h)	
	Matraz	Biorreactor	Matraz	Biorreactor	Matraz	Biorreactor
W3110	0.65±0.02	0.67±0.03	1.33±0.04	1.52±0.14	0.19±0.02	0.433±0.005
WG	0.51±0.01	0.52±0.02	1.05±0.12	1.11±0.19	0.07±0.05	0.004±0.001
WGM	0.36±0.03	0.34±0.01	0.65±0.05	0.62±0.05	0	ND
WGMC	0.31±0.01	0.37±0.00	0.68±0.00	0.62±0.01	0	0.015±0.001
WHIC	0.20±0.01	0.27±0.01	0.32±0.02	0.35±0.01	0	0.001±0.001

### 4.3.2. Análisis de expresión diferencial, abundancia de lecturas y mapeo.

Con el fin de determinar los cambios en la fisiología celular a nivel de transcriptoma, causados por las inactivaciones de genes relacionados al transporte de glucosa y su concomitante reducción de  $q_s$ , en las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC se realizaron experimentos de RNA-seq. Las muestras obtenidas en biorreactores con medio mínimo M9 y 20 g/L fueron secuenciadas como se describe en la sección de material y métodos y se obtuvieron alrededor de 40 millones de lecturas (*reads*). Posteriormente, se realizó la cuantificación del transcriptoma usando el programa Salmon (PATRO R 2015). En la tabla 8 se muestra los datos estadísticos del tamaño de las bibliotecas del RNA-seq y de la cuantificación de las lecturas. Como puede observarse se obtuvo una cantidad similar de información en todos los casos. Los archivos de las lecturas fueron depositados en Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA, European Nucleotide Archive) en EMBL-EBI bajo el número de acceso PRJEB32273 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB32273>). A pesar de que se recupera aproximadamente el 10% de la información como lecturas mapeadas, se obtuvo una

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

cobertura mayor al 95% de los genes con al menos una lectura mapeada para todas las muestras secuenciadas.

**Tabla 8.** Estadísticos de las librerías y mapeos de las bibliotecas del RNA-seq.

Cepa	Tamaño de biblioteca (millones de lecturas)	Tamaño promedio de las librerías (millones de lecturas)	Lecturas mapeadas (millones de lecturas)	Lecturas mapeadas promedio (millones de lecturas)
W3110	48,37,42	43 ± 5.7	4.7,2.9,2.3	3.3 ± 1.2
WG	59,31,33	41 ± 15.9	4.2,1.4,1.7	2.4 ± 1.2
WGM	32,52,53	46 ± 11.7	2.2,4.2,2.5	3.0 ± 1.1
WGMC	51,56,35	47 ± 11.2	4.7,5.9,1.8	4.2 ± 2.1
WHIC	52,54,54	53 ± 1.5	2.9,2.7,2.3	2.6 ± 0.3

### 4.3.3. Respuesta transcriptómica global entre las cepas con capacidad reducida de consumo de glucosa.

Las cepas W3110, WG, WGM, WGMC, y WHIC fueron cultivadas en biorreactores de 1 L en medio M9 con 20 g/L de glucosa, se tomaron muestras a la mitad de la fase exponencial del crecimiento para ser secuenciadas, *RNA-seq*. Posteriormente, se realizó el análisis de expresión diferencial usando a la cepa W3110 como la condición control o parámetro de comparación contra las cepas WG, WGM, WGMC y WHIC, resultados mostrados en la figura 17. Es evidente que el número de genes sobre expresados son mayores que los sub expresados, de ellos los COGs más abundantes fueron el de función desconocida (S), producción y conversión de energía (C), metabolismo y transporte de carbohidratos (G), metabolismo y transporte de aminoácidos (E) y transcripción (K). De estas comparaciones se discutirá más adelante en la sección 4.4. **Correlación entre la *qs* y los niveles de expresión.**

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

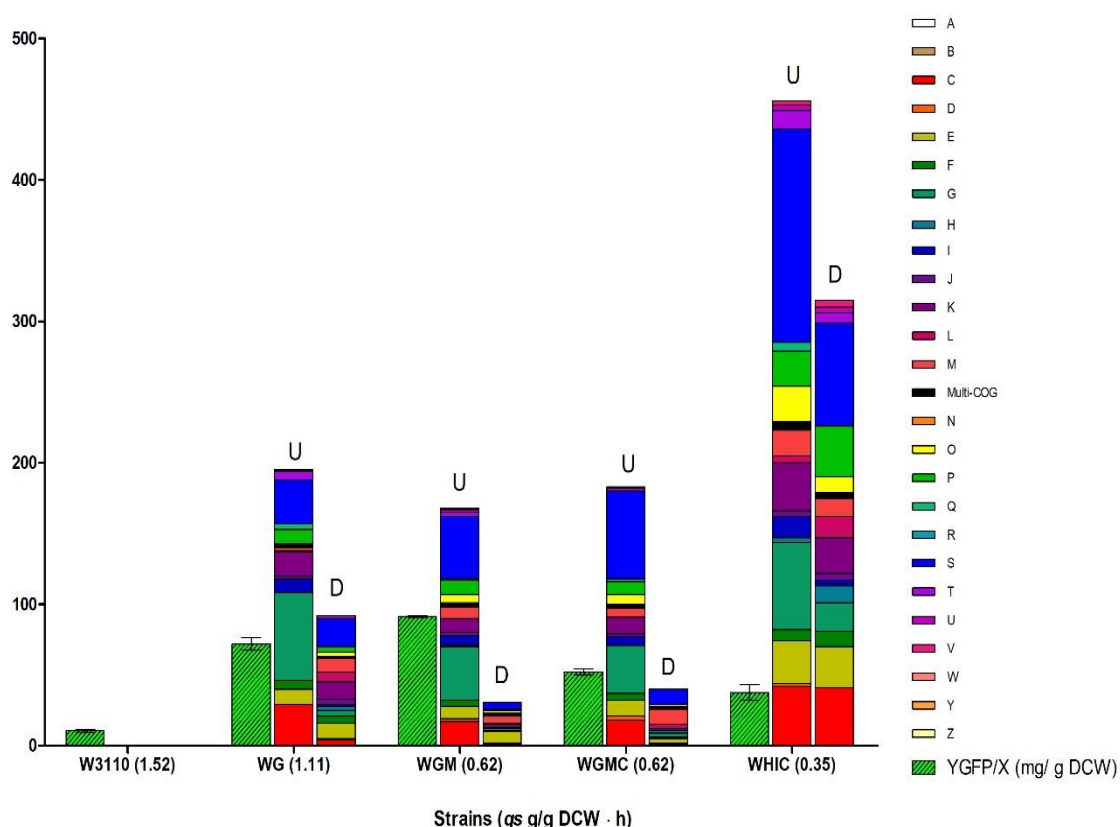


Figura 17. La disminución de  $q_s$  genera patrones específicos de expresión de genes, mayoritariamente aquellos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos y de generación de energía (COGs C, E y G). Distribución de los genes expresados diferencialmente entre las cepas mutantes en COGs al comparar los transcriptomas de W3110 con las cepas mutantes WG, WGM, WGMC y WHIC. El valor de  $q_s$  para cada cepa se muestra entre paréntesis y se presenta como (g/g h). Los valores para el  $Y_{GFP/X}$  se expresan como mg GFP/g DCW y son presentados en la tabla 5. Los nombres de los COGs están presentes en la tabla 10.

### 4.3.4. Descripción de los transcriptomas de las cepas mutantes

#### 4.3.4.1. Cepas mutantes comparadas contra la cepa W3110

Para determinar los efectos del cambio de  $q_s$  ( $\Delta q_s$ ) entre cepas, se realizó un análisis de expresión diferencial comparando pares de cepas con valores de  $q_s$  progresivamente más bajos: W3110-WG ( $\Delta q_s = 0.41$  g/g h), WG-WGM ( $\Delta q_s = 0.49$  g/g h) y WGMC-WHIC ( $\Delta q_s = 0.27$  g/g h), excepto por la comparación WGM-WGMC ya que estas cepas, tuvieron la misma  $q_s$  ( $\Delta q_s = 0$  g/g h) (tabla 9). Al realizar estas comparaciones, se puede observar que el COG más numeroso fue el S (función desconocida; Tabla 10 y Figura 18). Es importante destacar que no se puede descartar que los genes incluidos en COG S tengan una función relacionada con la fisiología y desempeño como fábricas microbianas de

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

estas cepas. Sin embargo, dado que en muchos casos no se conocen las funciones de estos genes, no se siguieron considerando en este estudio. La mayoría de los genes con funciones conocidas pertenecían a los COGs C, E, G y K (producción y conversión de energía, transporte y metabolismo de aminoácidos, transporte y metabolismo de carbohidratos y transcripción). La Tabla 9 muestra el número de genes expresados diferencialmente para cada comparación por pares. Se puede observar que la magnitud de este número muestra una correlación parcial con el  $\Delta q_s$ , con lo que se deduce que al disminuirse la entrada de carbono a la célula estas son capaces de detectar la disminución en la disponibilidad de carbono, esto provocando un incremento en la respuesta de estrés o supervivencia y así el número de genes diferencialmente expresados. Una excepción a este comportamiento es la cepa WHIC-WGMC, con un número de genes expresados diferencialmente mayor de lo esperado en relación con el  $\Delta q_s$  observado. Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que el operón *ptsHlcr* se eliminó en la cepa WHIC, lo que provocó la completa interrupción de la actividad de los sistemas de tipo PTS. La inactivación del operón *ptsHlcr* no sólo elimina varias funciones de importación de carbohidratos, sino que también perjudica algunas funciones reguladoras globales como la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa vía EIIA (codificada en el gene *crr*) (Gosset 2005; Plumbridge 2002).

En comparación con el transcriptoma de la cepa W3110, todas las cepas mutantes mostraron un número relativamente grande de genes expresados de forma diferencial. Las proporciones de genes sobre y sub expresados correspondieron a 2.2, 5.5, 4.6 y 1.4 veces para las cepas WG, WGM, WGMC y WHIC, respectivamente. Cabe destacar que, aunque estas cepas mostraron una respuesta transcriptómica principalmente con genes sobre expresados, todas ellas han mostrado una mayor capacidad para la producción de proteínas recombinantes en comparación con W3110 (Fragoso-Jiménez et al. 2019). Una estrategia de optimización de las cepas para la producción de proteínas recombinantes podría ser el evitar la expresión de genes de funciones no esenciales. Este enfoque, también conocido como ingeniería de asignación de recursos, ha demostrado ser eficaz para mejorar las fábricas de células microbianas (Lastiri-Pancardo et al. 2020). En el caso de las cepas mutantes empleadas en este estudio, la ingeniería de asignación de recursos podría emplearse para determinar si al evitar la inducción de funciones de consumo de fuentes alternativas de carbono, que no están presentes en el medio de cultivo y otras

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

funciones no esenciales mejoraría el rendimiento para la producción de proteínas recombinantes. Cabe señalar que varios grupos de investigación han informado de la mejora de las cepas de *E. coli* para producir proteínas recombinantes mediante el empleo de mutantes con tasas reducidas de importación de glucosa obteniendo un incremento de 4 veces más producción de GFP (De Anda et al. 2006) o del 50 % de  $\beta$ -galactosidasa (Bäcklund et al. 2008).

**Tabla 9.** Número de genes diferencialmente expresados entre pares de cepas.

Comparación entre cepas	WG- W3110	WGM- WG	WGMC- WGM	WHIC- WGMC	WGM- W3110	WGMC- W3110	WHIC- W3110
Cuentas y dirección del cambio							
Sobre expresión (>0)	194	116	1	218	170	182	459
Represión (<0)	88	136	11	203	31	40	320
Total	281	252	12	421	201	222	779
$\Delta qs$	0.41	0.49	0	0.27	0.9	0.9	1.17

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 10. Número de genes diferencialmente expresados clasificados por COGs\*

\*U, Sobre expresados; D, Subexpresados; T, total.

COG	Comparación	WG-W3110			WGM-WG			WGMC-WGM			WHIC-WGMC			WGM-W3110			WGMC-W3110			WHIC-W3110		
		U	D	T	U	D	T	U	D	T	U	D	T	U	D	T	U	D	T	U	D	T
A	Procesamiento y modificación de ARN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	Dinámica y estructura de cromatina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	Producción y conversión de energía	29	4	33	8	28	36	0	0	0	24	35	59	17	1	18	18	1	19	42	41	83
D	Control de ciclo celular, división celular, repartición de cromosomas	0	1	1	2	0	2	0	0	0	2	2	4	2	1	3	3	1	4	2	0	2
E	Transporte y metabolismo de aminoácidos	11	11	22	12	20	32	0	0	0	15	23	38	9	8	17	11	3	14	30	29	59
F	Transporte y metabolismo de nucleótidos	6	5	11	3	4	7	0	0	0	4	10	14	4	1	5	5	1	6	8	11	19
G	Transporte y metabolismo de carbohidratos	62	4	66	16	28	44	0	2	2	24	22	46	38	1	39	34	3	37	62	20	82
H	Transporte y metabolismo de coenzimas	0	3	3	0	0	0	0	0	0	4	3	7	1	1	2	0	2	2	3	12	15
I	Transporte y metabolismo de lípidos	10	1	11	1	9	10	0	0	0	11	2	13	7	0	7	6	0	6	15	4	19
J	Traducción, biogénesis y estructura ribosomal	2	4	6	3	0	3	0	0	0	1	0	1	2	0	2	2	0	2	4	5	9
K	Transcripción	17	8	25	13	14	27	1	1	2	15	25	40	10	2	12	12	1	13	34	25	59
L	Replicación, recombinación y reparación	1	6	7	1	0	2	0	0	0	1	5	6	0	1	1	0	3	3	5	15	20
M	Biogénesis de pared celular/membrana/envoltura	2	10	12	7	3	10	0	1	1	16	4	20	8	5	13	6	11	17	18	13	31
N	Movilidad celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O	Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas	0	3	3	3	1	4	0	0	0	9	6	15	6	2	8	7	1	8	25	11	36
P	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	10	4	14	6	6	12	0	0	0	11	19	30	10	1	11	9	0	9	25	36	61
Q	Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	4	0	4	1	1	2	0	0	0	2	0	2	1	0	1	2	0	2	6	0	6
R	Predicción de la función general	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	Función desconocida	29	19	48	32	14	46	0	4	4	59	35	94	44	5	49	62	11	73	151	73	224
T	Mecanismos de transducción de señales	6	2	8	0	5	5	0	0	0	9	6	15	3	0	3	2	0	2	13	7	20
U	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	1	0	1	3	0	3	0	1	1	3	2	5	2	0	2	0	0	0	4	4	8
V	Mecanismos de defensa	0	1	1	2	0	2	0	0	0	3	1	4	1	0	1	1	0	1	3	5	8
W	Estructuras extracelulares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Y	Estructura nuclear	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z	Citoesqueleto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*	Multi-COG	3	1	4	3	3	6	0	2	2	5	3	8	3	2	5	0	2	2	6	4	10
-	Sin COG	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0	2	3	5	8

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

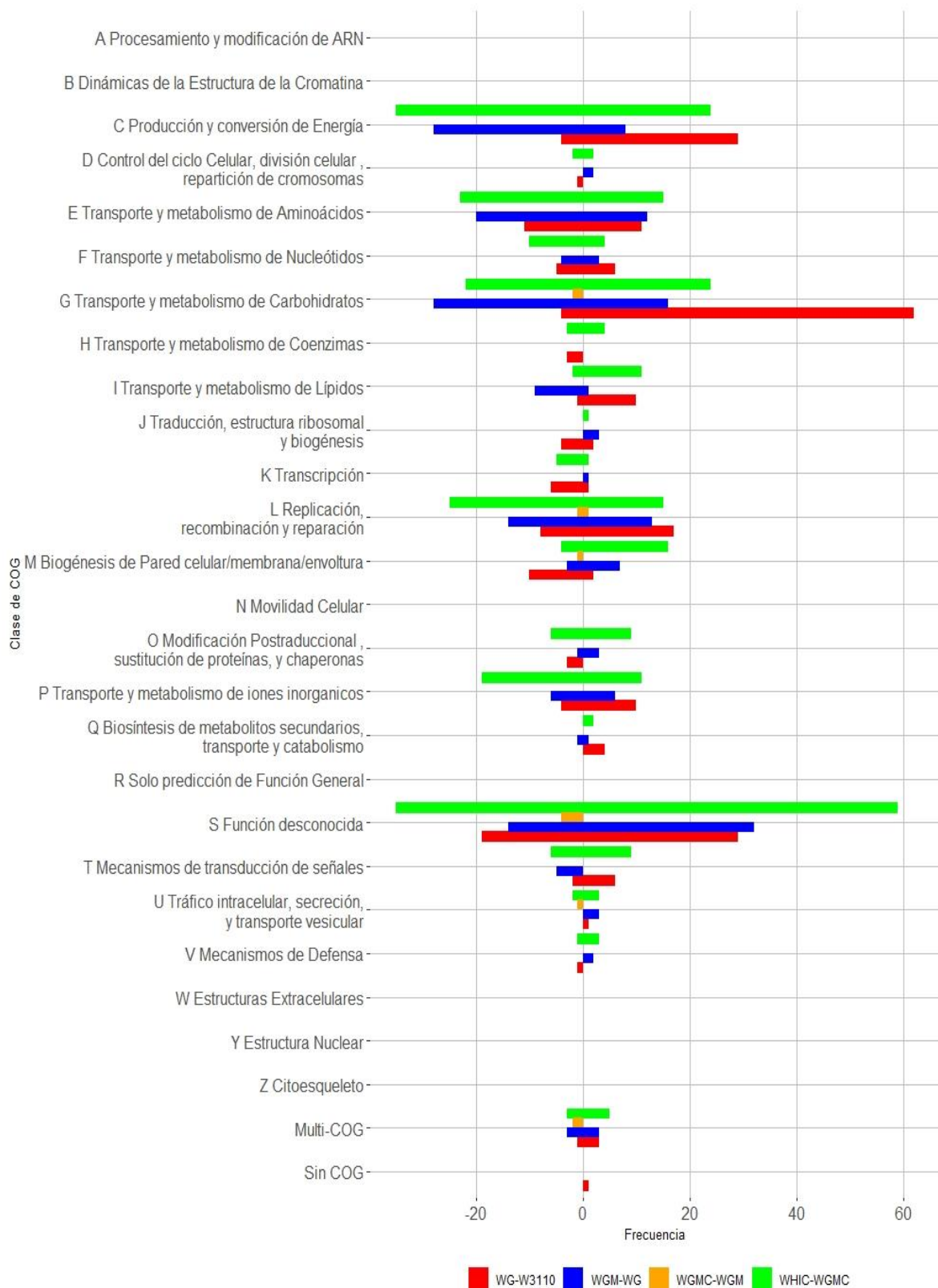


Figura 18. Distribución de los genes expresados diferencialmente entre pares de cepas clasificados por clase de COGs. Se indica el número de genes regulados al alza (valor positivo) o a la baja (valor negativo) de cada COG. Comparaciones del transcriptoma: WG-W3110 (amarillo), WGM-WG (azul), WGMC-WGM (naranja) y WHIC-WGMC (rojo).

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

### 4.3.5. Comparaciones ente pares de cepas

El número de genes expresados diferencialmente al comparar WG-W3110 y WGM-WG fue similar, indicando una correlación con la relación  $qs$  entre cada par de cepas (Tabla 9). En cambio, las cepas WGMC y WGM mostraron valores de  $qs$  casi idénticos. La única diferencia entre estas cepas es la supresión del operón *mglABC*. En este caso, se encontraron 12 genes que se expresaban de forma diferencial. Mientras que la cepa WGMC produjo 0.32 g/L de ácido acético, para el caso de la cepa WGM no fueron detectados (tabla 6). Esta diferencia fenotípica podría explicar el reducido número de genes expresados diferencialmente entre las cepas WGM y WGMC. Sin embargo, quizás se tendría que realizar una caracterización de tipo fluxómica y metabolómica de estas cepas para verificar esta suposición. Al comparar las cepas WHIC y WGMC el  $\Delta qs$  es aproximadamente la mitad del detectado para WG-W3110 y WGM-WG. Sin embargo, el número de genes expresados diferencialmente fue aproximadamente el doble. Estos resultados muestran que la respuesta transcriptómica no tiene una relación lineal con los cambios en  $qs$ . Hay que tener en cuenta que el valor de  $qs$  de la cepa WHIC sólo representa el 23% de la  $qs$  de la cepa W3110. En la cepa WHIC, la delección del operón *ptsHlcr* elimina la síntesis de la proteína EIIA, interrumpiendo así la estimulación de la síntesis de AMPc por la enzima adenilato ciclasa. Por lo tanto, la expresión de los genes del regulón CRP debería estar disminuida en la cepa WHIC, para sostener esta hipótesis puede ser necesario medir los niveles de AMPc. En este sentido, se encontró que en la comparación WHIC-WGMC había 48 genes regulados por CRP que estaban diferencialmente expresados (33 pertenecientes a los COGs C, E, G y K). Este número fue menor que el detectado al comparar WG-W3110, 76 genes (53 de los COGs C, E, G, y K) y WGM-WG 56 genes (39 de los COGs C, E, G, y K). El factor de transcripción CRP-cAMP regula varios cientos de genes en *E. coli*, y algunos de ellos son también reguladores transcripcionales (Gosset et al. 2004). Los datos obtenidos sugieren que la respuesta transcriptómica observada en WHIC es el efecto combinado de una  $qs$  muy baja, que induciría muchos genes relacionados con la limitación de la fuente de carbono, y la disrupción indirecta del regulón CRP.



## Capítulo 4. Resultados y Discusión

### 4.3.5.1. Comparación entre la cepa W3110 y WG:

Al comparar los transcriptomas de las cepas WG carente del transportador PTS de glucosa (PtsG), cuya *qs* representa el 73% del de la cepa W3110 (archivo suplementario 5 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15>, Figura 19), se detectaron genes sobre expresados que codifican para transportadores de tipo PTS, no PTS y proteínas relacionadas con el catabolismo de fuentes alternativas de carbono diferentes a glucosa. Dentro de los sistemas PTS se encontraron genes relacionados al consumo de N-acetilgalactosamina (*agaV*, 4.3 veces), fructosa (*fruABK*, 9.1, 13.8, 12.4 veces), galactitol (*gatBC*, 4.2 y 4.5 veces), manosa (*manXYZ*, 4.3, 3.7 y 4.2 veces), manitol (*mtIA*, 2.4 veces), glucitol/sorbitol (*srlABED*, 6.3, 7.8, 7.3 y 5.7 veces), N-acetilglucosamina (*nagBE*, 2 y 4.2 veces) y trealosa (*treBC*, 19.9 y 18.6 veces). También se detectaron genes sobre expresados de sistemas no PTS para la maltosa (*malEFG*, *malk* y *malM*; 8.8-18.1 veces), ribosa (*rbsABCK* y *rpiB*, 13.6, 4.2, 12.7, 3.9 y 4.3 veces), galactosa/glucosa (*mglABC*, 7.2, 22 y 5.8 veces), arabinosa (*araF*, 2.6 veces), inositol (*agp*, 3.5 veces), 2-dehidro-3-deoxigalactosa (*dgoK*, 2.1 veces), fuculosa (*fucA* y *fucl*, 3.3 y 3.1 veces), 5-ceto-4-deoxi-D-glucarato y 2-keto-3-deoxi-D-glucarato (*garL*, 2.7 veces), tagatosa (*gatYZ*, 5.4 y 4 veces), maltosa y maltodextrina (*malPQ*, *malS* y *malZ*; 4.7, 3.9, 5.7 y 2 veces), N-acetilmanosamina (*nanEK*, 3.6 y 2.2 veces), 2-metilisocitrato (*prpB*, 5.1 veces), glucuronato (*uidA* y *uxaC*, 2.3 y 2.4 veces), altronato (*uxaA*, 3.1 veces), manonato (*uxuAB*, 3.4 y 2.5 veces) y 5-dehidro-4-deoxi-D-glucuronato (*kdul*, 2.6 veces). Cabe destacar que ninguna de estas fuentes alternativas de carbono se encuentra presentes en el medio de cultivo. Los genes *acs* (17.4 veces) y *actP* (18 veces) forman un operón, y se encontraron regulados al alza. El operón *acs-actP* codifica proteínas de una vía de asimilación de acetato, que posiblemente contribuye a reducir la acumulación de este ácido orgánico en el medio de cultivo. También se detectaron genes sobre expresados que codifican proteínas de transporte de glicerol (*glpF*, 5.6 veces), la porina codificada por *lamB* (14.9 veces) y el antiportador de hexosa-6-fosfato:fosfato (*uhpT*, 3.5 veces). Otro gen sobre expresado fue *glk* (2 veces). La sobre expresión de *glk*, que codifica la enzima glucosa cinasa, sugiere su participación en la fosforilación de moléculas de glucosa que no son internalizadas y fosforiladas por la PTS. Las proteínas de transporte codificadas por el operón *mglABC* y *lamB* constituyen una vía de alta afinidad para la importación de glucosa que es independiente de la actividad del PTS. La inducción de

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

estos genes indica un estado de limitación de la fuente de carbono (Ferenci 2006). En la cepa WG se detectó un menor nivel de transcripción del gen *pykF* (-2.1 veces), que codifica para la piruvato cinasa 1 de la vía glucolítica. Esta enzima está implicada en la formación de piruvato, por lo que la regulación a la baja de *pykF* sugiere una disminución del flujo glucolítico en WG en comparación con W3110, lo que da lugar al metabolismo de sobre flujo en la cepa silvestre. Entre los genes del COG C que incrementaron su expresión se encuentran algunos genes del ciclo del glioxilato y del TCA (*aceA*, 3.1 veces; *acnB*, 2.1 veces; *fumC*, 2.3 veces; *glcB*, 4.2 veces; *gltA*, 2.6 veces; y *sdhAB*, 2.4 y 2.2 veces). También los genes *maeB* (2 veces) y *pckA* (2.9 veces) que participan en la gluconeogénesis. En la cepa WG se detectó la inducción del gen *pka* (3 veces) que está relacionado con la acetilación de proteínas. Se ha determinado que la delección de *pka* conduce a una menor resistencia al calor y al estrés oxidativo (Christensen et al. 2018).

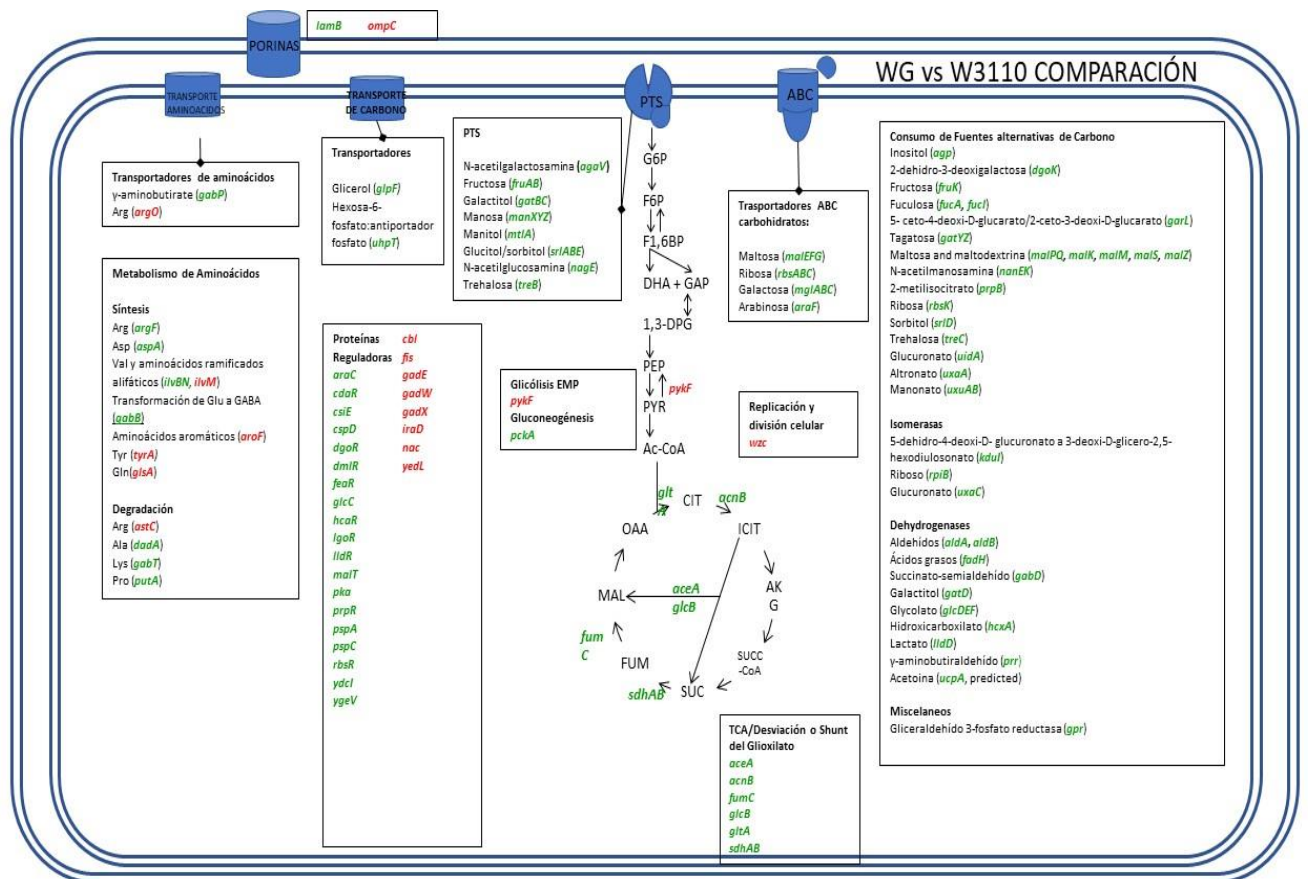


Figura 19. Genes diferencialmente expresados en la cepa WG con respecto a la cepa W3110 relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes esta presentado en color verde (sobrexpresados) y rojo (subexpresados)

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

La cepa WG es isogénica a la W3110, excepto por la delección del gen *ptsG* que codifica para las EIICB del sistema PTS de glucosa. Esta modificación genética provocó una respuesta transcripcional consistente con la *carbon starvation* y *hunger response* caracterizada por una disminución del nivel de transcripción de los genes que codifican funciones relacionadas con la actividad glucolítica y un aumento de la expresión de los genes del metabolismo gluconeogénico. Como se esperaba, se observó la reducción de la excreción de acetato ya que únicamente tuvo un 6.7% del título de acetato detectado en los cultivos con W3110 (Tabla 6); es decir, se redujo el sobre flujo metabólico. Como parte de la “*hunger response*”, los genes implicados en el transporte y la utilización de varios carbohidratos y aminoácidos diferentes se sobre expresaron. Cabe destacar que los compuestos que serían objetivo de los genes de transporte y catabolismo de fuentes alternativas de carbono no estaban presentes en el medio de cultivo. Por lo que la respuesta observada debería ser una estrategia de preparación para el consuno de fuentes de carbono alternativas. Además, varios genes relacionados con la síntesis de aminoácidos fueron regulados a la baja, posiblemente debido a que la tasa de crecimiento de WG es un 22% más baja que la de W3110, lo que resulta en una menor demanda de aminoácidos.

### 4.3.5.2. Comparación entre la cepa WG y WGM:

La comparación realizada entre los transcriptomas de las cepas WGM (que carece de los transportadores PtsG y ManX) y WG, las cuales tienen una diferencia de  $q_s$  de 0.49 g/g DCW h, mostró un aumento adicional en los niveles de expresión para genes que codifican las proteínas de transporte y enzimas necesarias para el catabolismo de las siguientes fuentes de carbono: quitobiosa, trehalosa, maltosa y N-acetilglucosamina. La respuesta opuesta se observó para los genes de transporte y catabólicos para fructosa, galactitol, glucitol arabinosa, glicerol, ribosa, galactosa, trehalosa, altronato y manonato. Además, se detectó un mayor nivel de transcripción en WGM para los genes *pykF* (2.5 veces), *talA* (2.3 veces) y *tktB* (2.2 veces), lo que indica que puede haber potencialmente un mayor flujo en las vías EMP y PPP (archivo suplementario 5 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15>, figura 20). A diferencia de WG, en la cepa WGM se observó la represión de genes de las vías TCA y de la derivación del glioxilato *gltA* (-2.7 veces), *aceA* (-2.5 veces), *acnB* (-3.1 veces), *fumAC* (-2.7 y -2.5 veces), *sdhAB* (-2.5 y -2.2 veces) y *glcB* (-3.1 veces). Estos datos sugieren que la

## **Capítulo 4. Resultados y Discusión**

capacidad de producción de energía y poder reductor a través del TCA podrían ser menores en WGM comparado con WG. Cabe destacar que los genes implicados en la gluconeogénesis, así como el metabolismo PEP/PYR, *ppsA* (-2.6 veces), *pckA* (-3 veces) y el gen *glpK* (-3.4 veces), que codifica para la glicerol cinasa, fueron regulados a la baja en esta comparación, pero mostraron la respuesta opuesta en la comparación con WG y W3110. También se detectó un aumento del gen *iraP* (2.7 veces). El gen *iraP* codifica para una proteína necesaria para la estabilización de  $\sigma^S$  durante deprivación de fosfato o nitrógeno y durante la fase estacionaria, esto también podría estar dictado por la menor velocidad de crecimiento de la cepa WGM ( $0.34 \text{ h}^{-1}$ ) con respecto a la WG ( $0.52 \text{ h}^{-1}$ ). Se detectó también un mayor nivel de transcripción para los genes *gadX* (4.8 veces) y *gadW* (5.9 veces) en WGM. Estos dos genes forman un operón complejo y codifican reguladores transcripcionales que controlan el sistema de resistencia al ácido glutámico descarboxilasa. Los genes pertenecientes a este sistema se encontraron inducidos: *gadA* (17.3), *gadB* (22.9) *gadC* (26.5) y *gadE* (22.9). Cabe destacar que el pH fue controlado y mantenido en un valor neutro en los cultivos con estas cepas. Por lo tanto, el papel fisiológico de este sistema de resistencia al ácido en estas condiciones no está claro.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

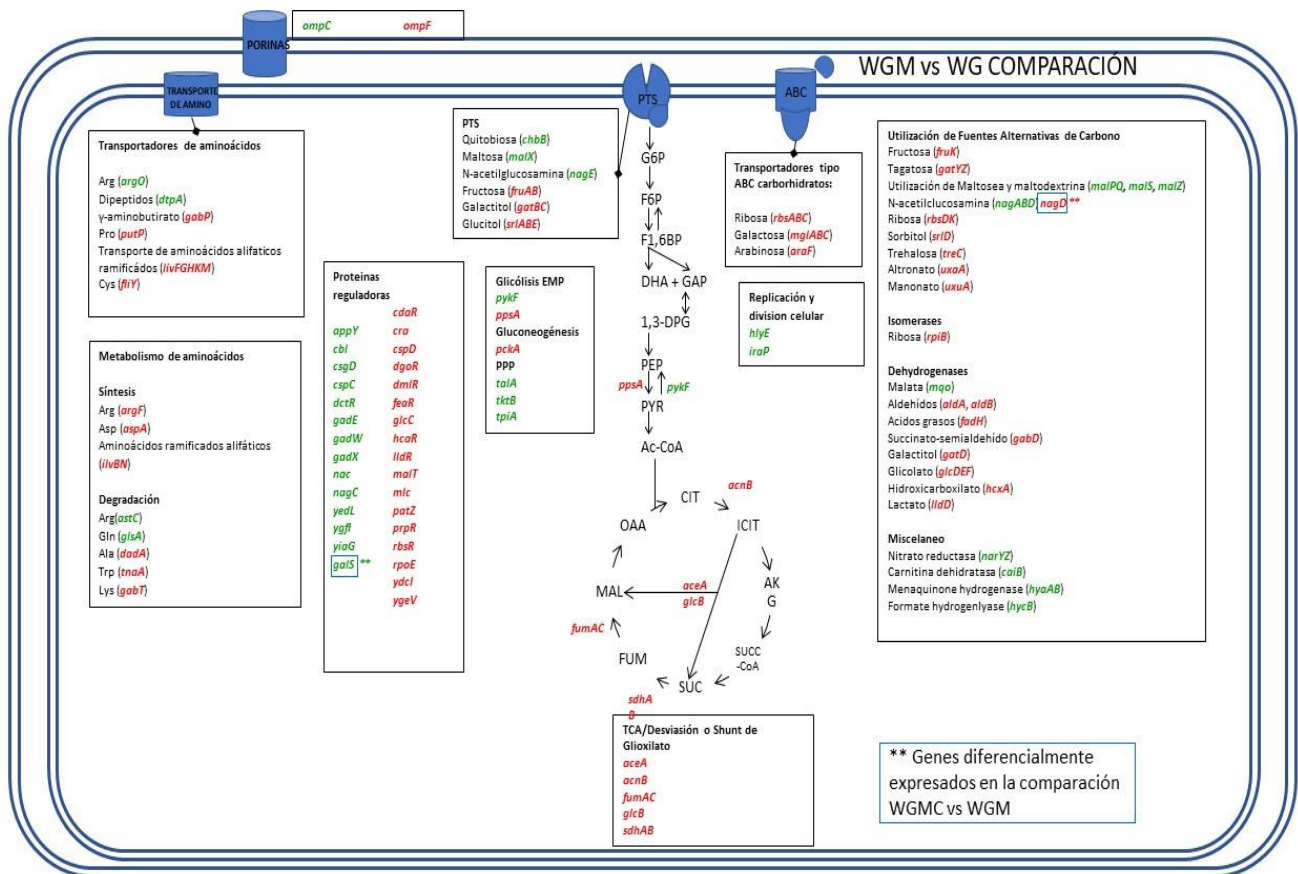


Figura 20. Genes diferencialmente expresados en la cepa WGM con respecto a la cepa WG relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes está presentado en color verde (sobresuportados) y rojo (subexpresados). Además, en rectángulos de color azul se muestran dos genes que fueron diferencialmente expresados en la cepa WGM con respecto a la cepa WG.

La cepa WGM carece del gen *manX*, por lo que los componentes PTS IIA y IIB del sistema PTS de manosa no se sintetizan. Esta cepa muestra los valores de  $\mu$  y  $q_s$  que corresponden al 65 y 56% de los observados para WG (tabla 6), respectivamente. Los datos del transcriptoma mostraron que la mayor disminución de la capacidad de transporte de glucosa en la cepa WGM, en comparación con WG, provocó la inducción de genes adicionales que codifican para proteínas PTS y no PTS implicadas en la captación y el catabolismo de otras fuentes de carbono, aun cuando estas no estaban presentes en el medio de cultivo. Curiosamente, la respuesta transcripcional observada incluyó la inducción de varios genes de las vías EMP y PPP. Por otra parte, se detectaron genes con un menor nivel transcripcional pertenecientes al TCA. Esta respuesta sugiere una disminución de la capacidad de producción de energía para la cepa WGM en comparación con la WG, probablemente debido a la menor tasa de crecimiento. La cepa WGM mostró

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

un mayor nivel de transcripción del gen *iraP* (2.7 veces), que codifica una pequeña proteína antiadaptadora que se requiere para la estabilización del factor sigma alternativo  $\sigma^S$ . La expresión de *iraP* depende de la falta de fosfato y, en menor medida, de la limitación de carbono, y esta respuesta depende de la ppGpp (Bougdour and Gottesman 2007). Estos datos sugieren una implicación de  $\sigma^S$  en la respuesta transcripcional observada en WGM. Los datos del transcriptoma son indicativos de una limitación de carbono más severa al comparar WGM con WG. Cabe destacar que no se detectó acumulación de acetato en los cultivos con la cepa WGM, por lo que el sobre flujo metabólico fue eliminado en esta cepa (tabla 6). Un derivado de la cepa WGM al ser cultivada en biorreactor y que expresa GFP mostró un aumento de 1.4 veces en la  $q_{GFP}$  y su  $Y_{X/S}$  en comparación la cepa WG. La cepa WGM mostró una mayor capacidad de producción de GFP en comparación con las cepas de producción derivadas de todos los mutantes de este estudio (tabla 5). Esta mejora en la capacidad de producción de proteínas recombinantes para WGM cuando se compara con otras cepas en este estudio, puede atribuirse en parte al estado específico de limitación de la fuente de carbono, y a la eliminación completa del sobre flujo de carbono.

### 4.3.5.3. Comparación entre la cepa WGM y WGMC:

Las cepas WGM y WGMC mostraron un valor de  $q_s$  idéntico (0.62 g/g h) en las condiciones de crecimiento empleadas en este estudio. Este resultado sugiere que el transportador de alta afinidad MglABC, ausente en la cepa WGMC, no contribuye a la importación de glucosa en la cepa WGM o que su función fue sustituida por otras proteínas en esa cepa. A pesar de que la  $q_s$  fue idéntica, la cepa WGMC acumuló 0.32 g/L de acetato, mientras que no se detectó en los cultivos con WGM. Este resultado indica que la delección del operón *mglABC* influye en el metabolismo por un mecanismo desconocido que causa un aumento en la producción de ácido acético (Notley and Ferenci 1995; Boos and Shuman 1998; Notley-McRobb et al. 2006). El análisis del transcriptoma arrojó 12 genes expresados diferencialmente al comparar el WGMC con el WGM, la mayoría de ellos sin una función definida (archivo suplementario 5 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15> y figura 20). Entre estos genes, *galS* se encontró regulado al alza (20 veces). Sin embargo, no se detectó ningún aumento en el nivel de transcripción de los miembros de su regulón. El gen *galS*, codifica para el isorrepresor de galactosa, un TF que reprime la transcripción de los genes

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

implicados en el catabolismo de la galactosa (Semsey et al. 2007). Se ha informado que el crecimiento bajo una baja concentración de glucosa provoca la síntesis de galactosa como autoinductor del regulón gal (Ferenci 2006; Geanacopoulos and Adhya 1997). El regulón gal contiene genes que codifican proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de la galactosa. Cabe destacar que las proteínas de transporte que son miembros de este regulón; es decir, GalP y MglABC, también pueden emplear glucosa como sustrato (Fuentes et al. 2013; Aguilar et al. 2012). Es interesante observar la falta de correlación entre los valores de  $q_s$  y  $q_{ac}$  al comparar las cepas WGM y WGMC. Asumiendo que MglABC no tiene un papel importante en la importación de glucosa en la cepa WGM, el transporte de glucosa puede que sea a través de sistemas PTS o de la fuerza motriz de protones (GalP). Esta modificación podría alterar el estado energético de la célula y los flujos metabólicos centrales, afectando indirectamente a la producción de acetato en WGMC. Una mayor caracterización de las cepas, incluyendo la medición del estado energético, así como la determinación del flujo de carbono en las vías centrales, debería ayudar a comprender las consecuencias de esta modificación.

También se observó que el gen *nagD* que fue reprimido (-2.2 veces). El gen *nagD*, forma parte del operón de utilización de la N-acetilglucosamina y codifica una fosfatasa ribonucleotídica (Tremblay, Dunaway-Mariano, and Allen 2006). Se ha determinado que la sobreexpresión de *nagD* resulta en la inducción de genes relacionados con la envoltura celular y el estrés por choque térmico. La coexpresión de *nagD* y de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) de mamíferos en *E. coli* dio como resultado un aumento de 3 a 10 veces en el rendimiento de estos últimos (Skretas et al. 2012). Este resultado puede explicarse considerando que la inducción de proteínas relacionadas con el estrés proporciona un entorno favorable para la producción de proteínas recombinantes. Queda por determinar si el menor nivel de transcripción de *nagD* en WGMC podría explicar en parte por qué esta cepa mostró 40% menos de producción de GFP en comparación con WGM (tabla 5). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el aumento de la producción de acetato y posiblemente también represión de *nagD*. Sin embargo, con los datos disponibles, no es posible determinar cómo la delección del operón *mglABC* causó tales efectos.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

### 4.3.5.4. Comparación entre la cepa WGMC y WHIC:

La comparación del transcriptoma de WHIC contra el de WGMC, que a pesar de que comparten la ausencia del transportador MglABC, difieren en las mutaciones adicionales. Mientras que la cepa WGMC carece de los transportadores ManX y PtsG, la cepa WHIC care de las proteínas generales EI, Hpr y EII, con lo cual los sistemas de transporte de tipo PTS son inactivados. Además, tienen una diferencia de  $qs$  de 0.27 g/g DCW h. Al realizar la comparación entre las cepas WGMC y WHIC se encontró la sobre expresión de genes que codifican proteínas de transporte y catabólicas para el consumo de fructosa, arabinosa, O-acetilserina/cisteína,  $\alpha$ -cetoglutarato, 3-hidroxifenilpropionato/3-hidroxicinamato, glicerol, maltosa/maltodextrina, manosa, ribosa y trehalosa (archivo suplementario 5 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15>, figura 21). En contraste con la respuesta observada en las cepas mutantes WG y WGM, el gen *lamB* fue reprimido (-3.1 veces). Este resultado es coherente con la represión de este gen en condiciones de exceso de glucosa y de falta de glucosa, siendo su máximo de expresión cuando la glucosa se encuentra en una concentración cercana a 1  $\mu$ M (0.18 g/L). Con esta evidencia se podría deducir que la cepa WHIC detecta que se encuentra en una severa limitación de carbono (Ferenci 2006). Se detectó un mayor nivel de expresión para los genes gluconeogénicos *fbp* (2.1 veces) y *ppsA* (3.9 veces) (archivo suplementario 5 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15>, figura 21). Por el contrario, varios genes de la vía EMP fueron reprimidos (*gapA*, -2.5 veces; *gpml*, -3.7 veces; *pfkA*, -2,3 veces). El gen *cydA*, relacionado con la cadena respiratoria, también se encontró reprimido (-2.8 veces). Se detectaron menores niveles de transcripción de los genes que codifican parte de la piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, 3.2 y -2.6 veces) y del gen *ackA* (-2.9 veces) relacionado con la asimilación/producción de ácido acético. Los genes relacionados con la síntesis de glutamina, asparagina, cisteína y lisina fueron reprimidos (*glnA* -7.7 veces, *asnAB* -5.6 y -5.9 veces, *cysK* -3.2 veces, *lysA* -2 veces). Se observó que el gen *iraP* fue reprimido (-2.8 veces). En este caso, la respuesta de este gen fue opuesta a la observada en las comparaciones del transcriptoma de WG-W3110 y WGM-WG. Los genes que codifican funciones relacionadas con la síntesis del polisacárido extracelular ácido colónico, el cual mostró un mayor nivel de transcripción en la cepa WHIC: *wcaA* (3.9 veces), *wcaC* (3.2 veces), *wcaD* (4.5 veces), *wcaE* (6.6 veces), *wcaF* (8.7 veces), *wcaI* (4 veces), *wcaJ* (4 veces), *wza* (7.7 veces), *wzb* (7.4 veces) y *wzc*



## Capítulo 4. Resultados y Discusión

(3.2 veces). La cepa WHIC tuvo la *qs* más baja entre las mutantes estudiadas y la respuesta del transcriptoma observada es característica de una severa limitación de carbono y energía.

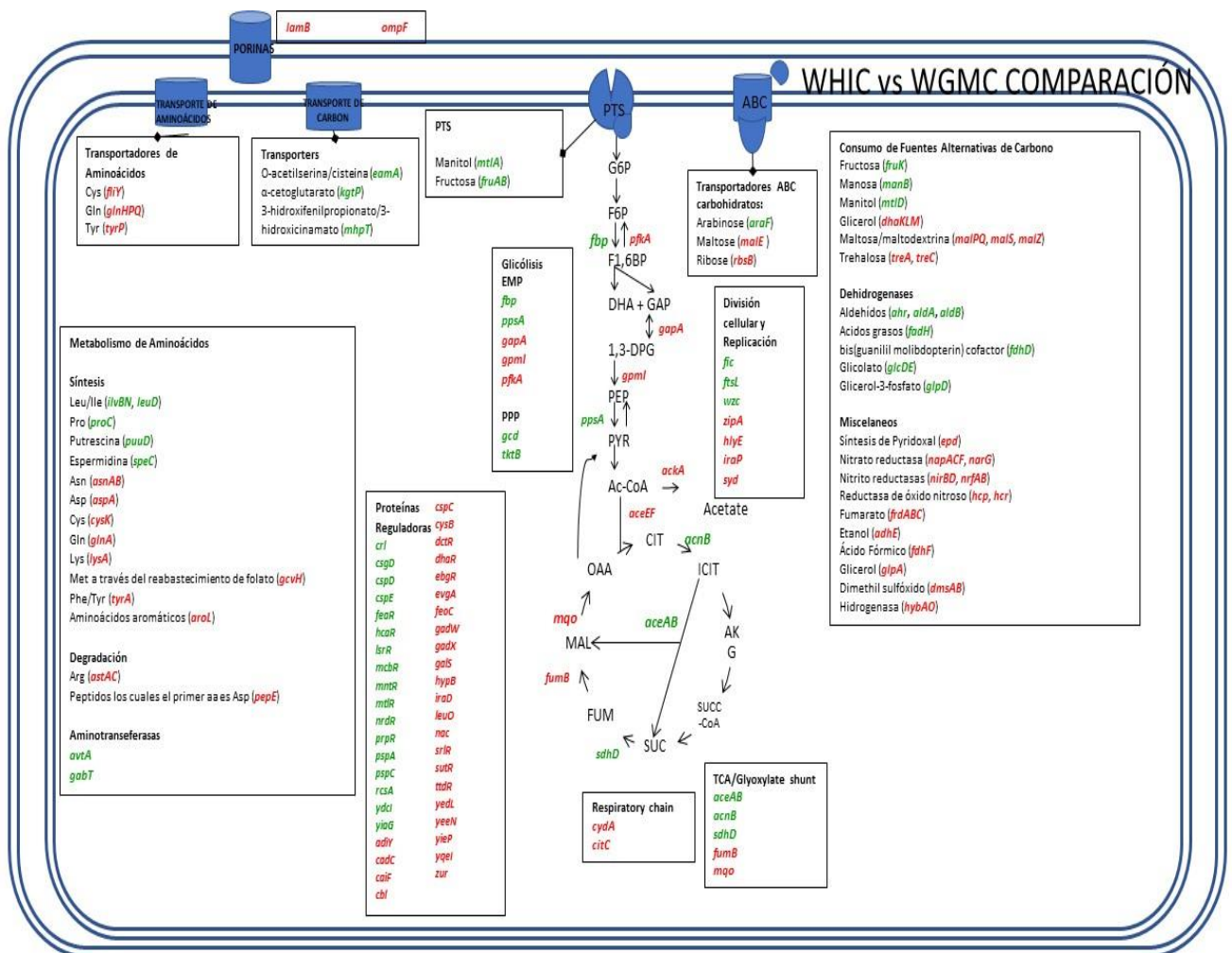


Figura 21. Genes diferencialmente expresados en la cepa WGMC con respecto a la cepa WHIC relacionados con los COGs C, E, G y K. Los genes fueron agrupados dependiendo de su función y el nombre de los genes esta presentado en color verde (sobrexpresados) y rojo (subexpresados)

La cepa WHIC también mostró los valores más bajos de  $\mu$  y *qs* entre las cepas estudiadas y un nivel a penas detectable de producción de acetato (tabla 6). La cepa WHIC tuvo el mayor número de genes diferencialmente expresados en comparación con las otras cepas de este estudio. Incluso al comparar los datos del transcriptoma de WHIC con la cepa que mostraba el valor de *qs* más cercano, WGMC, se encontró que 421 genes se expresaron diferencialmente. En esta comparación, varios genes que codifican componentes de sistemas PTS, así como genes que codifican proteínas para el transporte y el metabolismo de fuentes alternativas de carbono fueron sobre expresados en WHIC.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

En el contexto de la producción de GFP, esta cepa mostró un título 3 veces mayor en comparación con una cepa productora isogénica derivada de W3110 (tabla 5). Sin embargo, WHIC mostró el título más bajo de GFP en comparación con las otras cepas mutantes de este estudio. El perfil del transcriptoma mostrado por WHIC sugiere que esta cepa al tener la menor *qs* también sufre el nivel más severo de limitación de carbono y energía en comparación con las otras cepas mutantes. El sobre flujo metabólico es casi inexistente en WHIC; sin embargo, el estado de hambre extrema mostrado por esta cepa puede considerarse la causa de la capacidad de producción de GFP relativamente baja.

### 4.3.6. Validación de la expresión génica por qPCR.

Se realizaron experimentos de RT-qPCR para los siguientes genes que mostraban una expresión diferencial en los resultados de RNA-seq: *galP*, *manX*, *nagE*, *lamB*, *ompC*, *ompF*, *mglB*, *gltA*, *acs*, *poxB* y *ppsA* (tabla 11 y figura 22). Se decidió usar los genes *galP*, *manX*, *nagE*, *lamB*, *ompC*, *ompF*, *mglB* relacionados a transportadores de carbohidratos y porinas que se intuía podían estar siendo participes del transporte de glucosa en las cepas mutantes. Dado a que se midió los niveles de producción de acetato de las cepas, se decidió incluir a los genes *acs* y *poxB*. También se incluyeron dos genes, *gltA* el cual codifica para la citrato sintasa que es el paso de entrada al TCA y *ppsA* el cual es expresado en condiciones de baja concentración de glucosa y cepas PTS<sup>-</sup>. La magnitud de los niveles de expresión detectados por qPCR fue diferente a los observados en los experimentos de RNA-seq, pero la tendencia general en cuanto a la regulación al alza o a la baja se mantuvo para la mayoría de los genes: *manX*, *nagE*, *lamB*, *ompC*, *mglB*, *gltA*, *acs*, *poxB* y *ppsA*.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

Tabla 11. Comparación de resultados de los experimentos de qPCR y *RNA-seq* de genes relacionados al transporte de carbohidratos, TCA y producción/consumo de acetato.

	RT-qPCR*									RNA-seq			
	Gene	WG		WGM		WGMC		WHIC		WG	WGM	WGMC	WHIC
		AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD				
Sistemas de transporte	<i>galP</i>	1.19	0.01	1.63	0.29	1.48	0.18	1.59	0.37	-0.43	0.18	0.58	1.40
	<i>manX</i>	5.88	1.25	ND	ND	ND	ND	1.19	0	2.11	ND	ND	1.80
	<i>nagE</i>	4.38	0.54	43.34	4.43	53.34	3.83	30.95	11.49	2.08	5.10	5.04	5.96
	<i>lamB</i>	22.73	4.61	8.42	0.18	7.27	0.45	1.64	0.2	3.89	3.69	3.86	2.25
	<i>ompC</i>	0.25	0.11	0.73	0.06	0.91	0.27	0.96	0.14	-1.00	0.46	0.5	0.55
	<i>ompF</i>	2.93	0.07	0.58	0	0.56	0.08	0.14	0.02	0.97	-0.61	-0.26	-1.55
	<i>mglB</i>	29.11	10.46	4.55	0.62	ND	ND	ND	ND	4.46	1.88	ND	ND
TCA	RT-qPCR									RNA-seq			
	Gene	WG		WGM		WGMC		WHIC		WG	WGM	WGMC	WHIC
		AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD				
<i>gltA</i>	3.2	1	0.65	0.02	0.93	0.05	1.39	0.24	1.35	-0.10	0.20	0.80	
Acetato	RT-qPCR									RNA-seq			
	Gene	WG		WGM		WGMC		WHIC		WG	WGM	WGMC	WHIC
		AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD				
	<i>acs</i>	27.58	4.97	3.42	0.39	3.83	0.32	3.13	0.44	4.12	1.74	1.84	2.61
<i>poxB</i>	0.44	0.02	1.78	0.23	1.84	0.37	1.55	0.2	0.38	1.16	1.21	1.98	
<i>ppsA</i>	1.82	0.37	0.41	0.06	1.89	0.53	3.72	0.4	0.98	-0.39	0.48	2.37	

\*Los valores representan el logaritmo del factor de cambio al comparar los valores de expresión génica de los genes de cada cepa frente a la cepa *E. coli* W3110. Los valores de confianza no se presentan para los resultados de RNA-seq, pero pueden consultarse en los archivos tablas correspondientes.

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

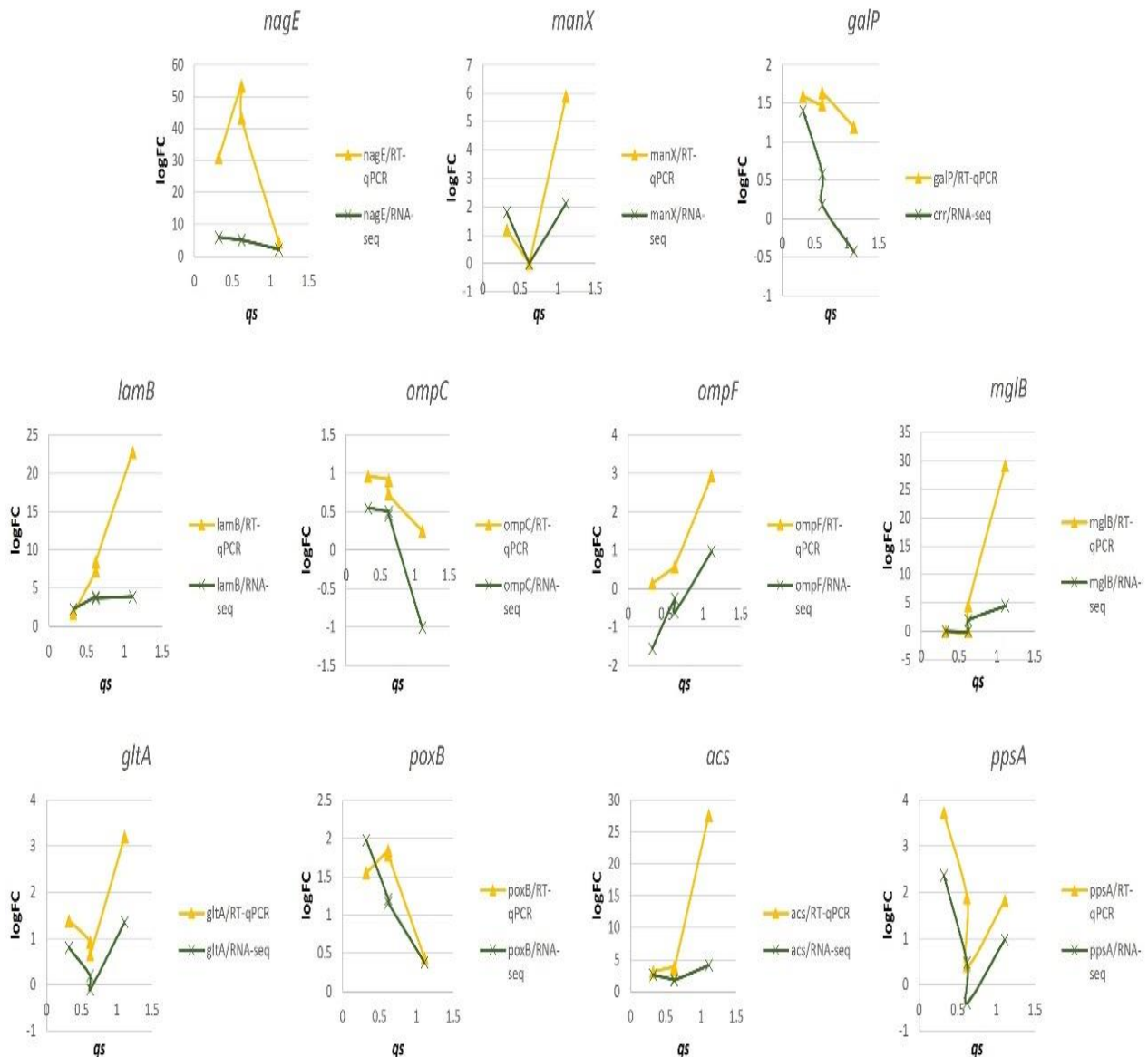


Figura 22. Perfiles de expresión de genes relacionados con el transporte y metabolismo de carbohidratos (COG G). Comparación de los niveles de expresión como función de la  $qs$  de los experimentos de qPCR y RNA-seq de genes relacionados al transporte de carbohidratos, TCA y producción/consumo de acetato.

### 4.4. Correlación entre la $qs$ y los niveles de expresión.

En este estudio se encontró un grupo de genes que tenían relación entre los niveles de expresión y la  $qs$ . Esta respuesta se determinó calculando el cociente de la correlación de Pearson entre  $qs$  y el logaritmo del factor de cambio ( $\logFC$ ;  $Pearson/\logFactor\ de\ cambio \cdot qs$ ). Además, se definió que los coeficientes ( $\Delta\logFC/\Delta qs$ ) mayores de 1.5 o menores de -1.5 fueron considerados como diferencialmente expresados entre todo el conjunto de cepas, significando que al menos

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

entre la cepa con mayor *qs* (WG) y la de menor *qs* (WHIC) se tendría el doble en nivel de expresión y viceversa. En resumen, una correlación negativa significa que los genes aumentan sus valores de expresión mientras el valor de *qs* disminuye. Por el contrario, una correlación positiva significa que los genes disminuyen su nivel de expresión mientras que el valor de *qs* está disminuyendo. Las listas de genes que muestran correlaciones positivas y negativas con la *qs* se incluyen en el archivo suplementario 6 y 7 revisar en <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-022-01909-y#Sec15>. Los resultados se organizaron en clases de COG para facilitar su análisis. De los 292 genes que presentan una correlación positiva o negativa, el 47% no se clasificó en una clase COG. Los 138 genes restantes se distribuyeron en las clases O, P, M, K, C, E, S y G.

En la clase C hubo 20 genes que tuvieron correlación positiva con *qs*, entre ellos el operón *nuoFGHIJKLM* y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pckA*). También las deshidrogenasas para glicerol (*glpA*), sorbitol (*srlD*), galactitol (*gatD*), hidroxicarboxilato (*hcxA*) y acetoína (*ucpA*). Por el contrario, 13 genes con correlación negativa como la piruvato deshidrogenasa (*poxB*), ubiquinol reductasa (*appBC*), 2-metilcitrato sintasa (*prpC*), y una alcohol/etanol deshidrogenasa (*adhP*). A partir de este conjunto, la respuesta de los genes *nuo* puede explicarse considerando que los requerimientos de producción de energía son menores bajo las tasas de crecimiento reducidas de las cepas mutantes. Esta suposición debe comprobarse experimentalmente, ya que *E. coli* tiene una segunda NADH deshidrogenasa codificada por *ndh*. El operón *nuo* forma parte del regulón del TF dual Fis de unión al ADN, se ha demostrado que la represión por Fis, un regulador dependiente del crecimiento se produce cuando este factor de transcripción está en altas concentraciones (Wackwitz et al. 1999).

También, se encontraron 16 genes pertenecientes al COG E con correlación positiva y 9 con negativa. Entre los primeros, había genes relacionados con la síntesis de arginina (*argB* y *argF*), ácido aspártico (*aspA*), cisteína (*cysK*, *fliY*), histidina (*hysG*), serina/treonina (*sstT*), prolina (*proW*). Se puede esperar una menor expresión de los genes que codifican funciones relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos debido a las menores tasas de crecimiento de las cepas mutantes con los valores de *qs* más bajos. Sin embargo, no está claro por qué esta respuesta es selectiva para algunos aminoácidos. Entre los genes que tuvieron una correlación negativa con *qs* se encuentran *gadA* y *gadBC* que codifican proteínas del sistema de resistencia al ácido dependiente del glutamato 2. La expresión

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

de estos genes aumenta en las cepas mutantes que muestran los valores más bajos de *qs*. Dado que el pH se mantiene en un valor neutro en estos cultivos, la regulación al alza de estos genes debería depender de otro tipo de estrés o señal metabólica. Hay que tener en cuenta que estos genes están sujetos a una compleja regulación por parte de los factores transcripcionales GadX, GadW, Fis y CRP (Tramonti et al. 2006).

Del COG G se hallaron 22 y 19 genes con correlaciones positivas y negativas, respectivamente. Los genes que muestran una correlación positiva con *qs* codifican proteínas con funciones relacionadas a los sistemas de transporte de tipo PTS de galactitol, glucitol/sorbitol, trealosa (*gatC*, *srlABC* y *treB*), de los transportadores ABC de ribosa (*rbsBC*) y maltosa (*malG*), así como un conjunto de genes que codifican proteínas para la utilización de la ribosa (*rbsDK*), la trealosa (*treC*), la fucosa (*fucA* y *fucI*), la tagatosa (*gatZ*), el galactonato (*dgoA*), el metilglioxal (*mgsA*) y el altronato (*uxaAC* y *uxaB*). Estos genes son probablemente inducidos como respuesta a la limitación de carbono en la cepa WG. Paradójicamente, su expresión se reduce progresivamente en las cepas con menor *qs*, posiblemente como resultado de la limitación energética u otro tipo de perturbación metabólica. En cambio, los genes que codifican las proteínas de transporte PTS para la quitobiosa (*chbB*) y la N-acetilglucosamina (*nagE*), y el simportador de galactosa no PTS (*galP*) mostraron una correlación negativa. De estas proteínas, se ha demostrado que GalP sustituye la función de transporte de glucosa dependiente del PTS en un mutante que carece de un sistema PTS funcional (Hernández-Montalvo et al. 2003). Por lo tanto, GalP puede estar contribuyendo a la importación de glucosa en algunos de estos mutantes. Curiosamente, algunas cepas mutantes mostraron una mayor expresión de *glk*, que codifica la enzima glucosa cinasa que puede fosforilar la glucosa internalizada por GalP. Por otra parte, Fuentes LG y col. (Fuentes et al. 2013) observaron que al eliminar el gen *nagE* en el fondo genético de WGM, la *qs* obtenida es prácticamente igual al de la cepa WHI, suponiendo que el transportador PTS NagE sustituye a los transportadores PtsG y ManX una vez que estos son inactivados, lo que significaría su papel en el transporte de glucosa en esas mutantes y a menores *qs*.

Tres genes de esta clase COG J mostraron una correlación negativa (*argS*, *rmf* y *sra*). El gen *argS* codifica para la arginil-tRNA sintetasa. El gene *rmf* codifica para un factor de modificación de ribosomas (*Ribosome Modification Factor*) que convierte reversiblemente los ribosomas 70S activos en su forma dimérica 100S inactiva durante la

## **Capítulo 4. Resultados y Discusión**

transición del crecimiento exponencial a la fase estacionaria (Wada et al. 1990). El gen *sra* codifica para una proteína asociada a la subunidad 30S ribosomal durante la fase estacionaria (Izutsu et al. 2001). El patrón de expresión observado para los genes *sra* y *rmf* indica que las cepas mutantes con los valores más bajos de  $q_s$  tienen un estado fisiológico como el observado en la fase estacionaria o bien funcionan como reguladores de funciones que limitan la velocidad de síntesis de proteínas. Estos resultados podrían indicar que las cepas con valores de  $q_s$  más bajos tienen un estado fisiológico que no es óptimo para la producción de proteínas recombinantes.

*Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Productos*

# Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Productos



## **Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Productos**

### **5.1. Conclusiones**

Es posible aumentar la tasa de producción de proteína recombinante mediante la modificación de los sistemas de transporte de fuentes de carbono. Los genotipos usados en este estudio dan como resultado fenotipos estables de consumo de glucosa.

Las cepas productoras de GFP presentaron fenotipos coexistentes de alta y baja producción de GFP. El análisis por citometría de flujo reveló que la fisiología del estado de alta producción exhibe una acumulación de GFP que va más allá del umbral natural de contenido proteico de las células. Por otra parte, las imágenes obtenidas en reactores microfluídicos sugieren que la principal consecuencia de la acumulación de GFP podría ser la filamentación celular. Además, la filamentación va acompañada de un incremento en la permeabilidad de la membrana, evidenciado por la adquisición del yoduro de propidio por las células. Por lo cual, se sugiere un aumento en la permeabilidad de la membrana por el IPTG y, en consecuencia, una inducción máxima de la expresión de la GFP. Sin embargo, el mecanismo por el cual se incrementa la permeabilidad de la membrana se desconoce. También las cepas WG y WGM presentaron los mejores rendimientos de producción de GFP y a su vez fueron los sistemas más heterogéneos en cuanto a la acumulación de GFP y la morfología celular.

Es posible reproducir el comportamiento tipo campana entre la  $q_{GFP}$  y la  $q_s$ , utilizando un conjunto de cepas mutantes con diferentes capacidades de consumo de glucosa de forma semejante a lo observado al producir de proteína recombinante en cultivo continuo. Sin embargo, nuestro enfoque es más conveniente para la producción pues estas cepas pueden ser cultivadas en modo lote de manera más sencilla que los cultivos continuos o alimentados, facilitando así los procesos de producción. También es importante destacar que las cepas mutantes exhibieron una menor o nula capacidad de producción de acetato y, por lo tanto, podrían ser mejores candidatos para el cultivo en reactores de mayor escala al emplear altas concentraciones de glucosa para generar elevadas densidades celulares. El hecho de que los cultivos con las mejores cepas de producción fueran los sistemas más heterogéneos, confronta el paradigma que afirma que las poblaciones homogéneas son más deseables para la producción. Se debe resaltar

## **Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Productos**

que estas observaciones se realizaron en condiciones operativas casi ideales, ya que los biorreactores fueron considerados como sistemas homogéneos de mezclado.

Finalmente, mediante el análisis del transcriptoma de las cepas mutantes se determinó que la respuesta asociada a la reducción de la velocidad específica de consumo de glucosa es coherente con un estado de hambre (*hunger response*). Lo cual provoca que la expresión de conjuntos de genes que codifican funciones de consumo y metabolismo de fuentes alternativas de carbono sea dominante. Esto acompañado de la represión de genes relacionados a la generación de biomasa causada por la reducción de la velocidad de consumo de glucosa y de crecimiento. En las cepas con *qs* más bajo, el patrón de la expresión génica es coherente con la limitación energética y dependientes de RpoS. Estos estados fisiológicos podrían explicar por qué estas cepas muestran una menor capacidad de producción de proteínas recombinantes.

### **5.2. Perspectivas**

- Determinar si el aumento de la velocidad de agitación es suficiente para dañar a las células filamentosas de *E. coli* mediante la realización de cinéticas de producción de GFP en reactores manteniendo la velocidad de agitación y suplementando O<sub>2</sub>.
- Realizar un análisis transcriptómico y proteómico entre la cepa silvestre W3110 y las cepas con mayor producción de GFP WG/pV21 y WGM/pV21.
- Determinar el estado energético de las cepas no productoras y productoras a nivel de población y de célula única mediante el empleo de un fluoróforo metabolizable RSG (Redox Sensor Green).
- Realizar ensayos de fluxómica/metabolómica en las cepas WGM y WGMC para tratar de dilucidar las diferencias en su desempeño como productoras de proteína recombinante.
- Medir los niveles de cAMP en las cepas W3110, WG, WGM, WGMC y WHIC, para tratar de determinar si existe una relación entre el nivel de cAMP y los genes diferencialmente expresados regulados por CRP.
- Mediante la implementación un cultivo continuo, comprobar si solo la velocidad de consumo de glucosa óptima encontrada para la producción de GFP es reproducible en la cepa W3110/pV21, o bien no solo *qs* es responsable del fenómeno observado sino de las mutaciones propias de cada cepa.

## **Capítulo 5. Conclusiones, Perspectivas y Productos**

### **5.3. Productos**

Fragoso-Jiménez, Juan Carlos, Jonathan Baert, Thai Minh Nguyen, Wenzheng Liu, Hosni Sassi, Frédéric Goormaghtigh, Laurence Van Melderen, et al. 2019. "Growth-Dependent Recombinant Product Formation Kinetics Can Be Reproduced through Engineering of Glucose Transport and Is Prone to Phenotypic Heterogeneity." *Microbial Cell Factories* 18 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>

Fragoso-Jiménez, Juan Carlos, Rosa María Gutierrez-Rios, Noemí Flores, Alfredo Martinez, Alvaro R. Lara, Frank Delvigne, and Guillermo Gosset. 2022. "Glucose Consumption Rate-Dependent Transcriptome Profiling of Escherichia Coli Provides Insight on Performance as Microbial Factories." *Microbial Cell Factories* 21 (1): 189. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01909-Y/TABLES/6>.

Rodríguez-Ochoa, J.I., Fragoso-Jiménez, J.C., Flores, N. et al. Global transcriptomic response of Escherichia coli to p-coumaric acid. *Microb Cell Fact* 21, 148 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01874-6>

## **Anexo I. Referencias.**

# Anexo I. Referencias

- Aguilar, César, Adelfo Escalante, Noemí Flores, Ramón de Anda, Fernando Riveros-McKay, Guillermo Gosset, Enrique Morett, and Francisco Bolívar. 2012. "Genetic Changes during a Laboratory Adaptive Evolution Process That Allowed Fast Growth in Glucose to an Escherichia Coli Strain Lacking the Major Glucose Transport System." *BMC Genomics* 13 (January): 385. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-385>.
- Anda, Ramón De, Alvaro R Lara, Vanessa Hernández, Verónica Hernández-Montalvo, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, and Octavio T Ramírez. 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." *Metabolic Engineering* 8 (3): 281–90. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.01.002>.
- Andersen, K. B., and K. Von Meyenburg. 1980. "Are Growth Rates of Escherichia Coli in Batch Cultures Limited by Respiration?" *Journal of Bacteriology* 144 (1): 114–23. <https://doi.org/10.1128/JB.144.1.114-123.1980>.
- Arends, S. J. Ryan, and David S. Weiss. 2004. "Inhibiting Cell Division in Escherichia Coli Has Little If Any Effect on Gene Expression." *Journal of Bacteriology* 186 (3): 880–84.
- Aristidou, Aristos A, Ka-Yiu San, and George N Bennett. 1999. "Improvement of Biomass Yield and Recombinant Gene Expression in Escherichia Coli by Using Fructose as the Primary Carbon Source." <https://doi.org/10.1021/bp980115v>.
- Bachmann, B J. 1972. "Pedigrees of Some Mutant Strains of Escherichia Coli K-12." *Bacteriol Rev* 36 (4): 525–57.
- Bäcklund, Emma, A E Katrin, Markland Ae, Gen Larsson, Katrin Markland, and Gen Larsson. 2008. "Cell Engineering of Escherichia Coli Allows High Cell Density Accumulation without Fed-Batch Process Control." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0144-x>.
- Bauer, K. A., A. Ben-Bassat, M. Dawson, V. T. De La Puente, and J. O. Neway. 1990. "Improved Expression of Human Interleukin-2 in High-Cell-Density Fermentor Cultures of Escherichia Coli K-12 by a Phosphotransacetylase Mutant." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (5): 1296–1302. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.5.1296-1302.1990>.
- Benjamini, Yoav, and Yosef Hochberg. 1995. "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Source: Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289–300.
- Boos, Winfried, and Howard Shuman. 1998. "Maltose/Maltodextrin System of Escherichia Coli : Transport, Metabolism, and Regulation ." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (1): 204–29. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.204-229.1998>.
- Bougdour, Alexandre, and Susan Gottesman. 2007. "PpGpp Regulation of RpoS Degradation via Anti-Adaptor Protein IraP." *PNAS*. Vol. 104.
- Brognaux, Alison, Shanshan Han, Søren J Sørensen, Frédéric Lebeau, Philippe Thonart, and Frank Delvigne. 2013. "A Low-Cost, Multiplexable, Automated Flow Cytometry Procedure for the Characterization of Microbial Stress Dynamics in Bioreactors." *Microbial Cell Factories* 12

## **Anexo I. Referencias.**

- (1): 100. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-100>.
- Chang, Dong Eun, Soan Shin, Joon Shick Rhee, and Jae Gu Pan. 1999. "Acetate Metabolism in a Pta Mutant of Escherichia Coli W3110: Importance of Maintaining Acetyl Coenzyme A Flux for Growth and Survival." *Journal of Bacteriology* 181 (21): 6656–63. <https://doi.org/10.1128/JB.181.21.6656-6663.1999>.
- Chen, Xin’Ai, Peilin Cen, and Jishuang Chen. 2005. "Enhanced Production of Human Epidermal Growth Factor by a Recombinant Escherichia Coli Integrated with in Situ Exchange of Acetic Acid by Macroporous Ion-Exchange Resin." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (5): 579–81. <https://doi.org/10.1263/JBB.100.579>.
- Cho, Hang Sik, Akihiko Kimura, Shigeham Ukai, and Masayuki Fujiwara. 2005. "High-Level Recombinant Protein Production by Overexpression of Mlc in Escherichia Coli." *Journal of Biotechnology* 119 (2): 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.03.008>.
- Chou, Chih-hsiung, George N Bennett, and Ka-yiu Sari. 1994. "Effect of Modified Glucose Uptake Using Genetic Engineering Techniques on High-Level Recombinant Protein Production in Escherichia Coli Dense Cultures." *Biotechnology Advances* 44: 952–60.
- Christensen, D.G., J.G. Meyer, J.T. Baumgartner, A.K. D’souza, S.H. Payne, M.L. Kuhn, B. Schilling, A.J. Wolfe, and W.C. Nelson. 2018. "Identification of Novel Protein Lysine Acetyltransferases in Escherichia Coli." *MBio* 9 (5): 1–24. <https://doi.org/10.1128/mbio.01905-18>.
- Curless, C. E., P. D. Forrer, M. B. Mann, D. M. Fenton, and L. B. Tsai. 1989. "Chemostat Study of Kinetics of Human Lymphokine Synthesis in Recombinant Escherichia Coli." *Biotechnology and Bioengineering* 34 (3): 415–21. <https://doi.org/10.1002/BIT.260340318>.
- Davey, H. M. 2011. "Red but Not Dead ? Membranes of Stressed Saccharomyces Cerevisiae Are Permeable to Propidium Iodide." *Environmental Microbiology* 13: 163–71.
- Death, Alison, and Thomas Ferenci. 1994. "Between Feast and Famine : Endogenous Inducer Synthesis in the Adaptation of Escherichia Coli to Growth with Limiting Carbohydrates." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 176 (16): 5101–7. <https://journals.asm.org/journal/jb>.
- Eiteman, Mark a, and Elliot Altman. 2006. "Overcoming Acetate in Escherichia Coli Recombinant Protein Fermentations." *Trends in Biotechnology* 24 (11): 530–36. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.001>.
- Emmerling, M., M. Dauner, A. Ponti, J. Fiaux, M. Hochuli, T. Szyperski, K. Wüthrich, J. E. Bailey, and U. Sauer. 2002. "Metabolic Flux Responses to Pyruvate Kinase Knockout in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 184 (1): 152–64. <https://doi.org/10.1128/JB.184.1.152-164.2002>.
- Enriqueta Muñoz, Ma, and Elizabeth Ponce. 2003. "Pyruvate Kinase: Current Status of Regulatory and Functional Properties." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 135 (2): 197–218. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00081-2).
- Farmer, William R., and James C. Liao. 1997. "Reduction of Aerobic Acetate Production by Escherichia Coli." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3205–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3205-3210.1997>.

## **Anexo I. Referencias.**

- Ferenci, Thomas. 2006. "Hungry Bacteria - Definition and Properties of a Nutritional State." *Environmental Microbiol.* 3 (2001): 605–11.
- Flickinger, Michael C., and Michael P. Rouse. 1993. "Sustaining Protein Synthesis in the Absence of Rapid Cell Division: An Investigation of Plasmid-Encoded Protein Expression in *Escherichia Coli* during Very Slow Growth." *Biotechnology Progress* 9 (6): 555–72. <https://doi.org/10.1021/BP00024A001>.
- Flores, Noemí, Salvador Flores, Adelfo Escalante, Ramón De Anda, Lidia Leal, Roxana Malpica, Dimitris Georgellis, Guillermo Gosset, and Francisco Bolívar. 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." *Metabolic Engineering* 7 (2): 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.10.002>.
- Fragoso-Jiménez, Juan Carlos, Jonathan Baert, Thai Minh Nguyen, Wenzheng Liu, Hosni Sassi, Frédéric Goormaghtigh, Laurence Van Melderen, et al. 2019. "Growth-Dependent Recombinant Product Formation Kinetics Can Be Reproduced through Engineering of Glucose Transport and Is Prone to Phenotypic Heterogeneity." *Microbial Cell Factories* 18 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>.
- Fragoso-Jiménez, Juan Carlos, Rosa María Gutierrez-Rios, Noemí Flores, Alfredo Martínez, Alvaro R. Lara, Frank Delvigne, and Guillermo Gosset. 2022. "Glucose Consumption Rate-Dependent Transcriptome Profiling of *Escherichia Coli* Provides Insight on Performance as Microbial Factories." *Microbial Cell Factories* 21 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01909-y>.
- Fuchs, C., D. Köster, S. Wiebusch, K. Mahr, G. Eisbrenner, and H. Märkl. 2002. "Scale-up of Dialysis Fermentation for High Cell Density Cultivation of *Escherichia Coli*." *Journal of Biotechnology* 93 (3): 243–51. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00402-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00402-3).
- Fuentes, Laura G, Alvaro R Lara, Luz M Martínez, Octavio T Ramírez, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar, and Guillermo Gosset. 2013. "Modification of Glucose Import Capacity in *Escherichia Coli*: Physiologic Consequences and Utility for Improving DNA Vaccine Production." *Microb. Cell Fact.* 12 (January): 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-42>.
- Geanacopoulos, Mark, and Sankar Adhya. 1997. "Functional Characterization of Roles of GalR and GalS as Regulators of the Gal Regulon." *Journal of Bacteriology* 179 (1): 228–34. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.228-234.1997>.
- Georgellis, D., O. Kwon, and E. C.C. Lin. 2001. "Quinones as the Redox Signal for the Arc Two-Component System of Bacteria." *Science* 292 (5525): 2314–16. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1059361>.
- Gokarn, R. R., J. D. Evans, J. R. Walker, S. A. Martin, M. A. Eiteman, and E. Altman. 2001. "The Physiological Effects and Metabolic Alterations Caused by the Expression of *Rhizobium EtlI* Pyruvate Carboxylase in *Escherichia Coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1–2): 188–95. <https://doi.org/10.1007/s002530100661>.
- Görke, Boris, and Jörg Stülke. 2008. "Carbon Catabolite Repression in Bacteria: Many Ways to Make the Most out of Nutrients." *Nature Reviews. Microbiology* 6 (8): 613–24. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>.

## **Anexo I. Referencias.**

- Gosset, Guillermo. 2005. "Improvement of Escherichia Coli Production Strains by Modification of the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System." *Microbial Cell Factories* 4: 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-14>.
- Gosset, Guillermo, Zhongge Zhang, Samir Nayyar, William A. Cuevas, and Milton H. Saier. 2004. "Transcriptome Analysis of Crp-Dependent Catabolite Control of Gene Expression in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 186 (11): 3516–24. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3516-3524.2004/ASSET/17C72F02-D547-48EF-BF4E-60A10D5E76D8/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0110437310T2C.JPEG>.
- Hahm, D H, J Pan, and J S Rhee. 1994. "Characterization and Evaluation of a Pta (Phosphotransacetylase) Negative Mutant of Escherichia Coli HBI01 as Production Host of Foreign Lipase." *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 42.
- Han, Cong, Wei-Cai Zhang, Song You, and Liu-Yu Huang. 2004. "[Knockout of the PtsG Gene in Escherichia Coli and Cultural Characterization of the Mutants]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology* 20 (1): 16–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16108482>.
- Han, Keehyun, Keehyun Han, Henry C. Lim, Henry C. Lim, Juan Hong, and Juan Hong. 1992. "Acetic Acid Formation in Escherichia Coli Fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 39 (6): 663–71. <https://doi.org/10.1002/bit.260390611>.
- Han, Keehyun, Juan Hong, and Henry C. Lim. 1993. "Relieving Effects of Glycine and Methionine from Acetic Acid Inhibition in Escherichia Coli Fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 41 (3): 316–24. <https://doi.org/10.1002/bit.260410305>.
- Hernández-Montalvo, Verónica, Alfredo Martínez, Georgina Hernández-Chavez, Francisco Bolivar, Fernando Valle, and Guillermo Gosset. 2003. "Expression of GalP and Glk in a Escherichia Coli PTS Mutant Restores Glucose Transport and Increases Glycolytic Flux to Fermentation Products." *Biotechnol. Bioeng.* 83 (6): 687–94. <https://doi.org/10.1002/bit.10702>.
- Iuchi, S., and E. C.C. Lin. 1988. "ArcA (Dye), a Global Regulatory Gene in Escherichia Coli Mediating Repression of Enzymes in Aerobic Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (6): 1888–92. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.6.1888>.
- Izutsu, Kaori, Chieko Wada, Yuriko Komine, † Tomoyuki Sako, Chiharu Ueguchi, ‡ Satomi Nakura, and Akira Wada. 2001. "Escherichia Coli Ribosome-Associated Protein SRA, Whose Copy Number Increases during Stationary Phase." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 183 (9): 2765–73. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2765-2773.2001>.
- Jensen, E Bech, and S Carlen. 1990. "Production of Recombinant Human Growth Hormone in Escherichia Coli; Expression of Different Precursors and Physiological Effects of Glucose, Acetate, and Salts" 36: 1–11.
- Jeong, Jin-Young, You-Jin Kim, Namwook Cho, Dongwoo Shin, Tae-Wook Nam, Sangryeol Ryu, and Yeong-Jae Seok. 2004. "Expression of PtsG Encoding the Major Glucose Transporter Is Regulated by ArcA in Escherichia Coli\*." *Journal of Biological Chemistry* 279 (37): 38513–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406667200>.
- Jeong, Ki Jun, and Sang Yup Lee. 2003. "Enhanced Production of Recombinant Proteins in Escherichia Coli by Filamentation Suppression." *Applied and Environmental Microbiology*

## **Anexo I. Referencias.**

- 69 (2): 1295–98. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1295-1298.2003>.
- Jiang, Xiao-Ran Ran, and Guo-Qiang Qiang Chen. 2016. "Morphology Engineering of Bacteria for Bio-Production." *Biotechnology Advances* 34 (4): 435–40. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501530063X>.
- Kim, Jaon Y.H., and Hyung Joon Cha. 2003. "Down-Regulation of Acetate Pathway through Antisense Strategy in Escherichia Coli: Improved Foreign Protein Production." *Biotechnology and Bioengineering* 83 (7): 841–53. <https://doi.org/10.1002/BIT.10735>.
- Kim, Soon Young, Tae Wook Nam, Dongwoo Shin, Byoung Mo Koo, Yeong Jae Seok, and Sangryeol Ryu. 1999. "Purification of Mlc and Analysis of Its Effects on the Pts Expression in Escherichia Coli." *Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25398–402. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25398>.
- Kimata, Keiko, Toshifumi Inada, Hideaki Tagami, and Hiroji Aiba. 1998. "A Global Repressor (Mlc) Is Involved in Glucose Induction of the PtsG Gene Encoding Major Glucose Transporter in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 29 (6): 1509–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01035.x>.
- Kremling, Andreas, Katja Bettenbrock, and Ernst Dieter Gilles. 2007. "Analysis of Global Control of Escherichia Coli Carbohydrate Uptake." <https://doi.org/10.1186/1752-0509-1-42>.
- Kumari, S., R. Tishel, M. Eisenbach, and A. J. Wolfe. 1995. "Cloning, Characterization, and Functional Expression of Acs, the Gene Which Encodes Acetyl Coenzyme A Synthetase in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 177 (10): 2878–86. <https://doi.org/10.1128/JB.177.10.2878-2886.1995>.
- Lara, Alvaro R., Janet Galindo, Karim E. Jaén, Mariana Juárez, and Juan Carlos Sigala. 2020. "Physiological Response of Escherichia Coli W3110 and BL21 to the Aerobic Expression of Vitreoscilla Hemoglobin." *J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (10): 1592–96. <https://doi.org/10.4014/JMB.2004.04030>.
- Lara, Alvaro R, Lidia Leal, Noemí Flores, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, and Octavio T Ramírez. 2006. "Transcriptional and Metabolic Response of Recombinant Escherichia Coli to Spatial Dissolved Oxygen Tension Gradients Simulated in a Scale-down System." *Biotechnology and Bioengineering* 93 (2): 372–85. <https://doi.org/10.1002/bit.20704>.
- Lara, Alvaro, Consuelo Vazquez Limón, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar, Agustín López-Munguía, and Octavio T. Ramírez. 2006. "Engineering Escherichia Coli to Improve Culture Performance and Reduce Formation of By-Products during Recombinant Protein Production under Transient Intermittent Anaerobic Conditions." *Biotechnology and Bioengineering* 94 (6): 1164–75. <https://doi.org/10.1002/BIT.20954>.
- Lastiri-Pancardo, Gustavo, Jonathan S. Mercado-Hernández, Juhyun Kim, José I. Jiménez, and José Utrilla. 2020. "A Quantitative Method for Proteome Reallocation Using Minimal Regulatory Interventions." *Nature Chemical Biology* 16 (9): 1026–33. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0593-y>.
- Lecina, Martí, Enric Sarró, Antoni Casablanças, Francesc Gòdia, and Jordi J. Cairó. 2013. "IPTG Limitation Avoids Metabolic Burden and Acetic Acid Accumulation in Induced Fed-Batch Cultures of Escherichia Coli M15 under Glucose Limiting Conditions." *Biochemical Engineering Journal* 70 (January): 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.10.006>.



## **Anexo I. Referencias.**

- Lee, Jeongseok, Sang Yup Lee, Sunwon Park, and Anton P.J. Middelberg. 1999. "Control of Fed-Batch Fermentations." *Biotechnology Advances* 17 (1): 29–48. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00015-9).
- Levin, Simon A., and Jane Lubchenco. 2008. "Resilience, Robustness, and Marine Ecosystem-Based Management." *BioScience* 58 (1): 27–32. <https://doi.org/10.1641/B580107>.
- Liebermeister, Wolfram, Elad Noor, Avi Flamholz, Dan Davidi, Jörg Bernhardt, and Ron Milo. 2014. "Visual Account of Protein Investment in Cellular Functions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (23): 8488–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314810111>.
- Lin, Henry, George N. G.N. Bennett, and K.-Y. Ka Yiu San. 2005. "Metabolic Engineering of Aerobic Succinate Production Systems in Escherichia Coli to Improve Process Productivity and Achieve the Maximum Theoretical Succinate Yield." *Metabolic Engineering* 7 (2): 116–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.10.003>.
- Livak, K J, and T D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lunin, Vladimir V., Yunge Li, Joseph D. Schrag, Pietro Iannuzzi, Miroslaw Cygler, and Allan Matte. 2004. "Crystal Structures of Escherichia Coli ATP-Dependent Glucokinase and Its Complex with Glucose." *Journal of Bacteriology* 186 (20): 6915–27. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6915-6927.2004>.
- Luo Ya-Ling Shen Dong-Zhi Wei Wei Cao, Qingping. 2006. "Optimization of Culture on the Overproduction of TRAIL in High-Cell-Density Culture by Recombinant Escherichia Coli." *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 184–91. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0131-6>.
- March, J C, M A Eiteman, and E Altman. 2002. "Expression of an Anaplerotic Enzyme , Pyruvate Carboxylase , Improves Recombinant Protein Production in Escherichia Coli Expression of an Anaplerotic Enzyme , Pyruvate Carboxylase , Improves Recombinant Protein Production in Escherichia Coli." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11): 5620–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5620>.
- McDonald, T. P., a. R. Walmsley, and P. J. F. Henderson. 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." *Journal of Biological Chemistry* 272 (24): 15189–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15189>.
- Mey, Marjan De, Sofie De Maeseneire, Soetaert Wim, and Erick Vandamme. 2007. "Minimizing Acetate Formation in E. Coli Fermentations." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34: 689–700. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0244-2>.
- Milo, Ron. 2013. "What Is the Total Number of Protein Molecules per Cell Volume? A Call to Rethink Some Published Values." *BioEssays* 35 (12): 1050–55. <https://doi.org/10.1002/bies.201300066>.
- Molgat, Gilles F., Lynda J. Donald, and Harry W. Duckworth. 1992. "Chimeric Allosteric Citrate Synthases: Construction and Properties of Citrate Synthases Containing Domains from Two Different Enzymes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298 (1): 238–46. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90118-G](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90118-G).

## **Anexo I. Referencias.**

- Nakano, K, M Rischke, S Sato, and H Maè. 1997. "Influence of Acetic Acid on the Growth of Escherichia Coli K12 during High-Cell-Density Cultivation in a Dialysis Reactor." *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 597–601.
- Notley-McRobb, Lucinda, Thomas Ferenci, Thomas Ferenci Notley-McRobb, Lucinda Notley-McRobb, and Thomas Ferenci. 2006. "Adaptive Mgl-Regulatory Mutations and Genetic Diversity Evolving in Glucose-Limited Escherichia Coli Populations." *Environmental Microbiology* 1 (1): 33–43. <https://doi.org/10.1046/J.1462-2920.1999.00002.X>.
- Notley, Lucinda, and Thomas Ferenci. 1995. "Differential Expression of Mal Genes under CAMP and Endogenous Inducer Control in Nutrient-stressed Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 16 (1): 121–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02397.x>.
- Pablos, Tania E., Juan Carlos Sigala, Sylvie Le Borgne, and Alvaro R. Lara. 2014. "Aerobic Expression of Vitreoscilla Hemoglobin Efficiently Reduces Overflow Metabolism in Escherichia Coli." *Biotechnology Journal* 9 (6): 791–99. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201300388>.
- Pablos, Tania E., René Soto, Eugenio Meza Mora, Sylvie Le Borgne, Octavio T. Ramírez, Guillermo Gosset, and Alvaro R. Lara. 2012. "Enhanced Production of Plasmid DNA by Engineered Escherichia Coli Strains." *Journal of Biotechnology* 158 (4): 211–14. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2011.04.015>.
- Patro, Rob, Geet Duggal, and Carl Kingsford. 2015. "Salmon: Accurate, Versatile and Ultrafast Quantification from RNA-Seq Data Using Lightweight-Alignment." *BioRxiv*, 021592. <https://doi.org/10.1101/021592>.
- Peebo, Karl, and Peter Neubauer. 2018. "Application of Continuous Culture Methods to Recombinant Protein Production in Microorganisms." *Microorganisms* 6 (3). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS6030056>.
- Picon, A, M.J. Teixeira de Mattos, and P.W. Postma. 2005. "Reducing the Glucose Uptake Rate InEscherichia Coli Affects Growth Rate but Not Protein Production." *Biotechnology and Bioengineering* 90 (2): 191–200. <https://doi.org/10.1002/bit.20387>.
- Plumbridge, Jacqueline. 2002. "Regulation of Gene Expression in the PTS in Escherichia Coli: The Role and Interactions of Mlc." *Current Opinion in Microbiology* 5 (2): 187–93. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00296-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00296-5).
- Robinson, Mark D, Davis J Mccarthy, and Gordon K Smyth. 2010. "EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data." *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE* 26 (1): 139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Roldan-Salgado, Abigail, Celidee Sanchez-Barreto, and Paul Gaytan. 2016. "LanFP10-A, First Functional Fluorescent Protein Whose Chromophore Contains the Elusive Mutation G67A." *Gene* 591 (2): 281–90. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.026>.
- Semsey, Szabolcs, Sandeep Krishna, Kim Sneppen, and Sankar Adhya. 2007. "Signal Integration in the Galactose Network of Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 65 (2): 465–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05798.x>.

## **Anexo I. Referencias.**

- Seo, Jin-Ho -H, and James E. Bailey. 1986. "Continuous Cultivation of Recombinant Escherichia Coli: Existence of an Optimum Dilution Rate for Maximum Plasmid and Gene Product Concentration." *Biotechnology and Bioengineering* 28 (10): 1590–94. <https://doi.org/10.1002/BIT.260281018>.
- Shen, Ya-Ling, Yue Zhang, Ai-You Sun, Xiao-Xia Xia, Dong-Zhi Wei, and Sheng-Li Yang. 2004. "High-Level Production of Soluble Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Apo2L/TRAIL) in High-Density Cultivation of Recombinant Escherichia Coli Using a Combined Feeding Strategy." *Biotechnology Letters*. Vol. 26.
- Sigüenza, R., N Flores, G. Hernández, A. Martínez, F Bolivar, and F Valle. 1999. "Kinetic Characterization in Batch and Continuous Culture of Escherichia Coli Mutants Affected in Phosphoenolpyruvate Metabolism: Differences in Acetic Acid Production." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15 (5): 587–92. <https://doi.org/10.1023/A:1008934810150>.
- Skretas, Georgios, Tomohiro Makino, Navin Varadarajan, Mark Pogson, and George Georgiou. 2012. "Multi-Copy Genes That Enhance the Yield of Mammalian G Protein-Coupled Receptors in Escherichia Coli." *Metabolic Engineering* 14 (5): 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.05.001>.
- Sreeranjit, C.V.K., and J.J. Lal. 2003. "GLUCOSE | Properties and Analysis." In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 3:2898–2903. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00557-5>.
- Steinsiek, Sonja, and Katja Bettenbrock. 2012. "Glucose Transport in Escherichia Coli Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems." *Journal of Bacteriology* 194 (21): 5897–5908. <https://doi.org/10.1128/JB.01502-12>.
- Taymaz-Nikerel, Hilal, and Alvaro R Lara. 2021. "Vitreoscilla Haemoglobin: A Tool to Reduce Overflow Metabolism." *Microorganisms* 10 (1): 43. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010043>.
- Tchieu, Jason H, Vic Norris, Jeremy S Edwards, and Milton H Saier. 2001. "The Complete Phosphotransferase System in Escherichia Coli." *Journal of Molecular Biotechnology* 3: 329–46.
- Tramonti, Angela, Michele De Canio, Isabel Delany, Vincenzo Scarlato, and Daniela De Biase. 2006. "Mechanisms of Transcription Activation Exerted by GadX and GadW at the GadA and GadBC Gene Promoters of the Glutamate-Based Acid Resistance System in Escherichia Coli." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 188 (23): 8118–27. <https://doi.org/10.1128/JB.01044-06>.
- Tremblay, Lee W., Debra Dunaway-Mariano, and Karen N. Allen. 2006. "Structure and Activity Analyses of Escherichia Coli K-12 NagD Provide Insight into the Evolution of Biochemical Function in the Haloalkanoic Acid Dehalogenase Superfamily." *Biochemistry* 45 (4): 1183–93. <https://doi.org/10.1021/bi051842j>.
- Veening, Jan-Willem, Wiep Klaas Smits, and Oscar P Kuipers. 2008. "Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria." <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>.

## **Anexo I. Referencias.**

- Veit, Andrea, Tino Polen, and Volker F. Wendisch. 2007. "Global Gene Expression Analysis of Glucose Overflow Metabolism in Escherichia Coli and Reduction of Aerobic Acetate Formation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (2): 406–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0680-3>.
- Vemuri, G N, E Altman, D P Sangurdekar, a B Khodursky, and M a Eiteman. 2006. "Overflow Metabolism in Escherichia Coli during Steady-State Growth: Transcriptional Regulation and Effect of the Redox Ratio." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5): 3653–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3653-3661.2006>.
- W., Johnston, R Cord-Ruwisch, and Cooney M. 2002. "Industrial Control of Recombinant E. Coli Fed-Batch Culture: New Perspectives on Traditional Controlled Variables." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25 (2): 111–20. <https://doi.org/10.1007/s00449-002-0287-8>.
- Wackwitz, B., J. Bongaerts, S. D. Goodman, and G. Unden. 1999. "Growth Phase-Dependent Regulation of NuoA-N Expression in Escherichia Coli K-12 by the Fis Protein: Upstream Binding Sites and Bioenergetic Significance." *Molecular and General Genetics* 262 (4–5): 876–83. <https://doi.org/10.1007/S004380051153>.
- Wada, Akira, Yukiko Yamazakit, Nobuyuki Fujitat, and Akira Ishihamatt. 1990. "Structure and Probable Genetic Location of a 'Ribosome Modulation Factor' Associated with 100S Ribosomes in Stationary-Phase Escherichia Coli Cells (Growth-Dependent Control/Translation Regulation/Two-Dimensional Gel Electrophoresis)." *Proc. Nadl. Acad. Sci. USA* 87: 2657–61.
- Wolfe, Alan J. 2005. "The Acetate Switch." *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 69 (1): 12–50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.12-50.2005>.
- Wurm, David Johannes, Lukas Veiter, Sophia Ulonska, Britta Eggenreich, Christoph Herwig, and Oliver Spadiut. 2016. "The E. Coli PET Expression System Revisited—Mechanistic Correlation between Glucose and Lactose Uptake." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (20): 8721–29. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7620-7>.
- Zawada, James, and James Swartz. 2005. "Maintaining Rapid Growth in Moderate-Density Escherichia Coli Fermentations." <https://doi.org/10.1002/bit.20369>.

## ANEXO II. Publicaciones.

Fragoso-Jiménez et al. *Microb Cell Fact* (2019) 18:26  
https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5

Microbial Cell Factories

RESEARCH

Open Access

### Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity



Juan Carlos Fragoso-Jiménez<sup>1</sup>, Jonathan Baert<sup>2</sup>, Thai Minh Nguyen<sup>2</sup>, Wenzheng Liu<sup>2</sup>, Hosni Sassi<sup>2</sup>, Frédéric Goormaghtigh<sup>3</sup>, Laurence Van Melderen<sup>3</sup>, Paul Gaytán<sup>1</sup>, Georgina Hernández-Chávez<sup>1</sup>, Alfredo Martínez<sup>1</sup>, Frank Delvigne<sup>2\*</sup> and Guillermo Gosset<sup>1\*</sup>

#### Abstract

**Background:** *Escherichia coli* W3110 and a group of six isogenic derivatives, each displaying distinct specific rates of glucose consumption were characterized to determine levels of GFP production and population heterogeneity. These strains have single or combinatory deletions in genes encoding phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) permeases as PtsG and ManX, as well as common components EI, Hpr protein and EIIA, also the non-PTS *Mgl* galactose/glucose ABC transporter. They have been transformed for expressing GFP based on a *lac*-based expression vector, which is subject to bistability.

**Results:** These strains displayed specific glucose consumption and growth rates ranging from 1.75 to 0.45 g/g h and 0.54 to 0.16 h<sup>-1</sup>, respectively. The rate of acetate production was strongly reduced in all mutant strains when compared with W3110/pV21. In bioreactor cultures, wild type W3110/pV21 produced 50.51 mg/L GFP, whereas strains WG/pV21 with inactive *PTS IICBGl*c and WGM/pV21 with the additional inactivation of *PTS IIBMAn* showed the highest titers of GFP, corresponding to 342 and 438 mg/L, respectively. Moreover, we showed experimentally that bistable expression systems, as *lac*-based ones, induce strong phenotypic segregation among microbial populations.

**Conclusions:** We have demonstrated that reduction on glucose consumption rate in *E. coli* leads to an improvement of GFP production. Furthermore, from the perspective of phenotypic heterogeneity, we observed in this case that heterogeneous systems are also the ones leading to the highest performance. This observation suggests reconsidering the generally accepted proposition stating that phenotypic heterogeneity is generally unwanted in bioprocess applications.

**Keywords:** Single cell, Metabolic engineering, Filamentation, Flow cytometry, Microfluidic imaging

#### Introduction

The bacterium *Escherichia coli* has been employed for the last 30 years as a host to produce recombinant proteins

having medical applications. This organism has proven to be highly versatile, enabling the development of industrial production processes that have resulted in the successful placement of novel therapeutic proteins in the market. The cultivation of recombinant *E. coli* production strains commonly employs media containing glucose, since this carbohydrate is relatively inexpensive, and it is the preferred carbon and energy source for this bacterium. In *E. coli*, the entry of glucose into the periplasmic space is mainly dependent on the porin proteins *OmpC*, *OmpF* and *LamB* [1]. Once it is in the periplasm,

\*Correspondence: F.Delvigne@ulbgeo.be; gosset@ibt.unam.mx  
<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México  
<sup>2</sup> Tera Research and Teaching Centre, Microbial Processes and Interactions (MPI), Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, Gembloux, Belgium  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## RESEARCH

## Open Access

Global transcriptomic response  
of *Escherichia coli* to *p*-coumaric acidJosé Ignacio Rodríguez-Ochoa, Juan Carlos Fragosó-Jiménez, Noemí Flores, Luz María Martínez,  
Francisco Bolívar, Alfredo Martínez and Guillermo Gosset\***Abstract**

The aromatic compound *p*-coumaric acid (*p*-CA) is a secondary metabolite produced by plants. This aromatic acid and derived compounds have positive effects on human health, so there is interest in producing them in biotechnological processes with recombinant *Escherichia coli* strains. To determine the physiologic response of *E. coli* W3110 to *p*-CA, dynamic expression analysis of selected genes fused to a fluorescent protein reporter as well as RNA-seq and RT-qPCR were performed. The observed transcriptional profile revealed the induction of genes involved in functions related to *p*-CA active export, synthesis of cell wall and membrane components, synthesis of amino acids, detoxification of formaldehyde, phosphate limitation, acid stress, protein folding and degradation. Downregulation of genes encoding proteins involved in energy production, carbohydrate import and metabolism, as well as several outer and plasma membrane proteins was detected. This response is indicative of cell envelope damage causing the leakage of intracellular components including amino acids and phosphate-containing compounds. The cellular functions responding to *p*-CA that were identified in this study will help in defining targets for production strains improvement.

**Keywords:** Transcriptome, *p*-Coumaric acid, Aromatic compounds, Toxic compounds, Efflux systems

**Introduction**

The phenylpropanoids are a large family of compounds synthesized by plants, having roles mainly related to protection from biotic and abiotic stress and as precursors of lignin [1]. The shikimate pathway provides the aromatic amino acids phenylalanine and tyrosine, the precursors of the phenylpropanoid pathway. The enzymes phenylalanine ammonia lyase (PAL) and tyrosine ammonia lyase (TAL) catalyze the non-oxidative deamination of their substrates to generate *trans*-cinnamic acid and *p*-coumaric acid (*p*-CA), respectively. In plants, *trans*-cinnamic acid is the main precursor of the phenylpropanoid pathway. The enzyme cinnamate 4-hydroxylase (C4H) transforms *trans*-cinnamic acid to *p*-CA, the branchpoint in phenylpropanoid biosynthesis [2].

The aromatic acid *p*-CA is a dietary micronutrient. It is a valuable compound having anti-inflammatory and antioxidant properties [3, 4]. More recently, anxiolytic, antiproliferative, neuroprotective and nephroprotective effects have been reported for this compound [5–8]. This aromatic acid is a precursor of chemicals used for the synthesis of novel adhesives, coatings, thermoplastics, aromas, flavoring agents, cosmetics, nutrition, and health products [9, 10]. It is known that *p*-CA can be found in most plant species. However, extraction from plant sources is a complex process, mostly because this compound is found at a low concentration. A viable alternative to overcome the limitations of traditional extraction methods is based on the generation of engineered microorganisms [11]. The microbial species routinely employed in biotechnology lack the natural capacity to synthesize phenylpropanoids. To overcome this limitation, genetic engineering has been employed to generate microbial *p*-CA production strains. The basic strategy

\*Correspondence: guillermo.gosset@ibt.unam.mx

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatalistas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## RESEARCH

## Open Access



# Glucose consumption rate-dependent transcriptome profiling of *Escherichia coli* provides insight on performance as microbial factories

Juan Carlos Fragoso-Jiménez<sup>1</sup>, Rosa María Gutierrez-Rios<sup>1</sup>, Noemí Flores<sup>1</sup>, Alfredo Martínez<sup>1</sup>, Alvaro R. Lara<sup>2</sup>, Frank Delvigne<sup>3</sup> and Guillermo Gosset<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** The modification of glucose import capacity is an engineering strategy that has been shown to improve the characteristics of *Escherichia coli* as a microbial factory. A reduction in glucose import capacity can have a positive effect on production strain performance, however, this is not always the case. In this study, *E. coli* W3110 and a group of four isogenic derivative strains, harboring single or multiple deletions of genes encoding phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS)-dependent transporters as well as non-PTS transporters were characterized by determining their transcriptomic response to reduced glucose import capacity.

**Results:** These strains were grown in bioreactors with M9 mineral salts medium containing 20 g/L of glucose, where they displayed specific growth rates ranging from 0.67 to 0.27 h<sup>-1</sup>, and specific glucose consumption rates ( $q_s$ ) ranging from 1.78 to 0.37 g/g h. RNA-seq analysis revealed a transcriptional response consistent with carbon source limitation among all the mutant strains, involving functions related to transport and metabolism of alternate carbon sources and characterized by a decrease in genes encoding glycolytic enzymes and an increase in gluconeogenic functions. A total of 107 and 185 genes displayed positive and negative correlations with  $q_s$ , respectively. Functions displaying positive correlation included energy generation, amino acid biosynthesis, and sugar import.

**Conclusion:** Changes in gene expression of *E. coli* strains with impaired glucose import capacity could be correlated with  $q_s$  values and this allowed an inference of the physiological state of each mutant. In strains with lower  $q_s$  values, a gene expression pattern is consistent with energy limitation and entry into the stationary phase. This physiological state could explain why these strains display a lower capacity to produce recombinant protein, even when they show very low rates of acetate production. The comparison of the transcriptomes of the engineered strains employed as microbial factories is an effective approach for identifying favorable phenotypes with the potential to improve the synthesis of biotechnological products.

**Keywords:** Transcriptome, Glucose transport, Mutant, RNA-seq, Physiology

**Introduction**

The bacterium *Escherichia coli* is widely used both in academia and industry. The culture media for growing this organism usually contains glucose, since this carbohydrate is relatively inexpensive, and is the preferred

\*Correspondence: guillermo.gosset@ibt.unam.mx

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, Cuernavaca, México  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.