



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



“Efecto de la expresión del gen de hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* en el metabolismo y producción de shikimato de la cepa sobreproductora *Escherichia coli* PB12.AR36”

T E S I S

Que para obtener el título de:

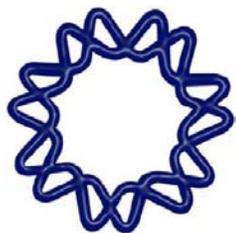
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

David Rodríguez Lozada

Director: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Asesora: QFB. Patricia Vidal Millán



IBt-UNAM

Ciudad de México, Junio de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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).

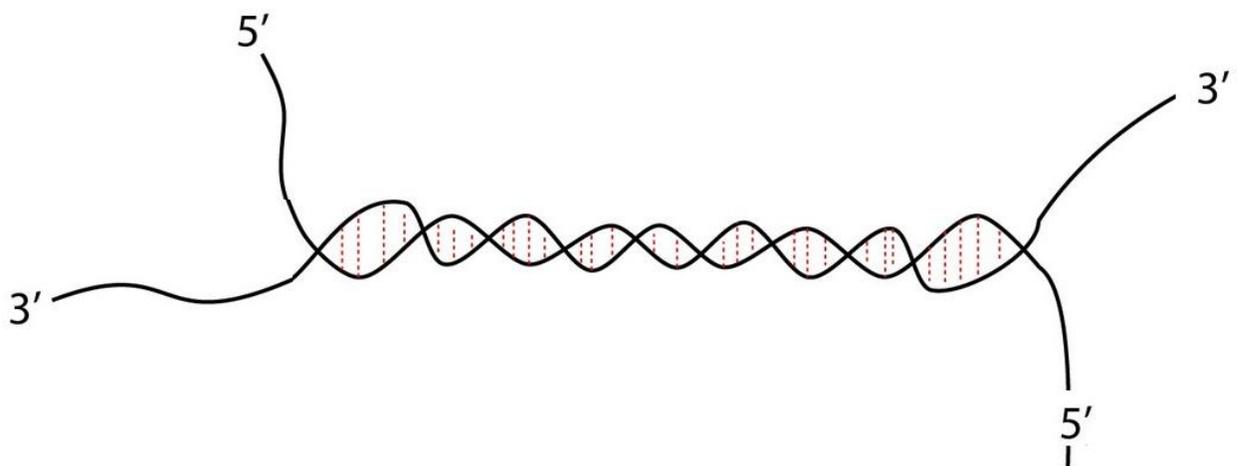
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 Dr. Francisco G. Bolívar Zapata del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la asesoría del M. en C. Juan Andrés Martínez Álvarez y bajo la dirección del Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

Para la realización del mismo, David Rodríguez Lozada fue financiado por el proyecto 740 Ingeniería Celular y Biocatálisis, y CONACYT Ciencia Básica 240519.





*A mis papás Martín y Luisa
A mi hermano Josué
Por ser la fuerza que impulsa a mis deseos de seguir adelante
Los amo.*

"Life is what happens to you while you're busy making others plans"

- John Lennon -



Agradecimientos

Al Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata por brindarme la oportunidad y confianza de poder aprender en su laboratorio de investigación y descubrir el maravilloso universo de la biotecnología, sin duda es una fuente de inspiración y un gran ejemplo a seguir.

Al M. en C. Juan Andrés Martínez por creer en mí desde el primer instante y por compartir conmigo una parte de su vasto conocimiento.

Al Dr. Adelfo Escalante Lozada por la confianza que me brindó y por su valiosa crítica y sugerencias que contribuyeron a la mejora de esta tesis.

A mis maestros de la facultad por ser una fuente del conocimiento invaluable. Agradecimiento especial a la maestra Paty Vidal, por ser una excelente maestra y sobre todo una excelente persona.

A mis amigos de la facultad Jessica, Ángel, Paola y Esteffy, por los momentos gratos de alegría, diversión y aprendizaje que compartimos juntos.

A mis amigas Ana, Lupita y Lidia, que desde la época del CBTis 03 Tlaxcala y hasta la fecha, me han brindado su amistad y apoyo eternos e incondicionales.

A John Lennon, Paul McCartney, George Harrison y Ringo Starr, porque su música que ha trascendido a través del universo me ha servido de inspiración y me ha acompañado a través de este largo y sinuoso camino.

A todas aquellas personas que he conocido en el transcurso de este camino y que de alguna u otra forma han contribuido en mi desarrollo personal y académico.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi máxima casa de estudios y por todo el apoyo otorgado durante el transcurso de mi carrera como universitario.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| I. Abstract | 1 |
| II. Resumen | 2 |
| III. Introducción | 3 |
| IV. Antecedentes | 5 |
| 4.1 Shikimato en la industria..... | 5 |
| 4.2 Producción fermentativa de shikimato | 8 |
| 4.2.1 Características de la cepa de <i>Escherichia coli</i> PB12..... | 10 |
| 4.2.2 Características de la cepa de <i>Escherichia coli</i> PB12.AR36..... | 11 |
| 4.3 Problemáticas de la producción de metabolitos a gran escala | 12 |
| 4.3.1 Efectos de la disponibilidad del oxígeno en cultivos de <i>E. coli</i> : respuesta metabólica y sistemas de regulación | 15 |
| 4.3.1.1 FNR como regulador transcripcional global | 17 |
| 4.3.1.2 El sistema de dos componentes ArcAB | 18 |
| 4.3.2 Estrategias aplicadas para mejorar el suministro de oxígeno en cultivos en cultivos celulares | 19 |
| 4.3.2.1 Control de procesos como estrategia para mejorar el suministro de oxígeno..... | 19 |
| 4.3.2.2 Ingeniería metabólica para mejorar el suministro de oxígeno..... | 20 |
| 4.3.2.2.1 Bioquímica y biología molecular de la hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i> (VHb) | 21 |
| 4.3.2.2.2 FNR, ArcA y CRP como reguladores positivos transcripcionales para la biosíntesis de la VHb..... | 23 |
| 4.3.2.2.3 Mecanismo de acción de la VHb | 25 |
| 4.3.2.2.4 Aplicación de la VHb en ingeniería metabólica..... | 27 |
| V. Planteamiento del problema | 28 |
| VI. Hipótesis | 29 |
| VII. Objetivo general | 29 |
| 7.1 Objetivos particulares..... | 29 |
| VIII. Materiales y métodos | 30 |
| 8.1 Cepas y plásmidos | 30 |
| 8.2 Técnicas de ingeniería genética..... | 31 |
| 8.2.1 Preparación de células electro-competentes de <i>E. coli</i> | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 8.2.2 | Trasformación bacteriana | 31 |
| 8.2.3 | Extracción y purificación de ADN..... | 31 |
| 8.2.4 | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 32 |
| 8.2.5 | Reacción de digestión con endonucleasas de restricción y reacción de ligación | 34 |
| 8.2.6 | Electroforesis de ADN en gel de agarosa | 34 |
| 8.2.7 | Síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de ADN..... | 34 |
| 8.3 | Medios de cultivo y condiciones de crecimiento | 34 |
| 8.3.1 | Medios de cultivo | 34 |
| 8.3.2 | Condiciones de crecimiento y aislamiento de <i>E. coli</i> | 35 |
| 8.3.3 | Composición del medio de producción | 35 |
| 8.3.4 | Preparación de inóculos en matraces agitados..... | 35 |
| 8.3.5 | Cultivos en biorreactores | 36 |
| 8.3.6 | Determinación del crecimiento celular | 36 |
| 8.3.7 | Cuantificación de metabolitos extracelulares | 36 |
| 8.4 | Cálculos | 37 |
| 8.4.1 | Cálculo de la concentración de biomasa | 37 |
| 8.4.2 | Cálculo de las concentraciones reales de biomasa, glucosa, shikimato y acetato | 37 |
| 8.4.3 | Cálculo de la velocidad específica de crecimiento | 37 |
| 8.4.4 | Cálculo del rendimiento shikimato/glucosa | 38 |
| 8.4.5 | Cálculo de la productividad volumétrica de shikimato y de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato | 38 |
| 8.4.6 | Cálculo de los rendimientos de biomasa/sustrato y producto/biomasa..... | 38 |
| 8.4.7 | Cálculo de la productividad específica y de la velocidad específica de consumo de sustrato..... | 39 |
| 8.5 | Construcción de los plásmidos para la expresión de la VHb y transformación de la cepa de <i>E. coli</i> PB12.AR36..... | 39 |
| IX. | Resultados y discusión | 41 |
| 9.1 | Construcción de los plásmidos pACYC _{CRP} v _{gb} y pACYC _w t _v g _b | 41 |
| 9.2 | Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa de <i>E. coli</i> PB12.AR36 evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento | 44 |
| 9.3 | Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa de <i>E. coli</i> PB12.AR36/pACYC184 evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento | 54 |

| | |
|---|-----------|
| 9.4 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa de <i>E. coli</i> PB12.AR36/pACYC _{CRP} <i>vgb</i> evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento | 56 |
| 9.5 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa de <i>E. coli</i> PB12.AR36/pACYC _{wt} <i>vgb</i> evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento | 58 |
| X. Conclusiones | 66 |
| XI. Perspectivas | 67 |
| XII. Anexos | 68 |
| Anexo 1. Secuencia nucleotídica del gen <i>vgb</i> que codifica para la hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i> | 68 |
| Anexo 2. Cuantificación de metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) | 69 |
| XIII. Referencias | 71 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Vía biosintética del shikimato en <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| Figura 2. Diversos productos farmacéuticos derivados del shikimato | 6 |
| Figura 3. Modificaciones genéticas aplicadas a la cepa de <i>E. coli</i> PB12 para la construcción de la cepa sobreproductora de shikimato PB12.AR36 | 11 |
| Figura 4. Comparación esquemática entre un biorreactor escala laboratorio y uno de gran escala presentando un mayor ambiente heterogéneo | 13 |
| Figura 5. Metabolismo del acetato y sobreflujo metabólico en <i>E. coli</i> | 14 |
| Figura 6. Mecanismo de acción del sistema de dos componentes ArcAB y su papel como regulador global de la expresión génica en <i>E. coli</i> | 19 |
| Figura 7. Fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP..... | 21 |
| Figura 8. Estructura cuaternaria de la VHb..... | 22 |
| Figura 9. Secuencia de la región promotora nativa (P_{wt}) del gen <i>vgb</i> que codifica para la VHb y su comparación con la secuencia de un promotor modificado (P_{CRP}) | 24 |
| Figura 10. Mecanismo de acción propuesto para la interacción entre la VHb y el complejo de citocromos para promover el metabolismo aeróbico y energético..... | 25 |
| Figura 11. Esquema simplificado de los pasos que fueron requeridos para la construcción de los vectores que tienen clonado el gen <i>vgb</i> que codifica para la VHb.. | 42 |
| Figura 12. Comprobación de las clonaciones por patrones de restricción y PCR | 43 |
| Figura 13. Perfiles de cultivo de las cepas AR36, AR36/pACYC184, AR36/pACYC _{CRP} <i>vgb</i> y AR36/pACYC _{wt} <i>vgb</i> cultivadas en biorreactores en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones aeróbicas de crecimiento ($\geq 20\%$ de TOD)..... | 45 |
| Figura 14. Perfiles de cultivo de las cepas AR36, AR36/pACYC184, AR36/pACYC _{CRP} <i>vgb</i> y AR36/pACYC _{wt} <i>vgb</i> cultivadas en biorreactores en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones microaeróbicas de crecimiento ($< 5\%$ de TOD) | 50 |
| Figura 15. Secuencia del gen <i>vgb</i> y de su región promotora | 68 |
| Figura 16. Curvas de calibración correspondientes a cada metabolito cuantificado en este trabajo | 70 |

Índice de tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plásmidos utilizados en este trabajo..... | 30 |
| Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo | 33 |
| Tabla 3. Distintas mezclas de reacción preparadas para las diferentes reacciones de PCR..... | 33 |
| Tabla 4. Composición de las mezclas para PCR..... | 33 |
| Tabla 5. Comparación de metabolitos medidos y parámetros cinéticos y estequiométricos calculados entre la cepa PB12.AR36 y sus tres derivadas, en cultivos en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones aeróbicas de crecimiento ($\geq 20\%$ de TOD)..... | 49 |
| Tabla 6. Comparación de metabolitos medidos y parámetros cinéticos y estequiométricos calculados entre la cepa PB12.AR36 y sus tres derivadas, en cultivos en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones microaeróbicas de crecimiento ($< 5\%$ de TOD)..... | 52 |
| Tabla 7. Cepas relevantes de <i>E. coli</i> que han sido modificadas para favorecer la producción de shikimato bajo diferentes condiciones de cultivo | 65 |

Nomenclatura utilizada

| | |
|-------|---|
| μ | velocidad específica de crecimiento |
| CADC | cultivos de alta densidad celular |
| E4P | eritrosa 4-fosfato |
| PEP | fosfoenolpiruvato |
| PPP | vía de las pentosas fosfato |
| PTS | sistema de fosfoenolpiruvato: carbohidrato fosfotransferasa |
| q_P | velocidad específica de producción |
| Q_P | velocidad volumétrica de producción |
| q_S | velocidad específica de consumo |
| Q_S | velocidad volumétrica de consumo |
| SHK | shikimato |
| TCA | ciclo de los ácidos tricarboxílicos |
| TOD | tensión de oxígeno disuelto |
| VHb | hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i> |
| X | biomasa |
| YE | extracto de levadura |

I. Abstract

Shikimate is a high valued chiral aromatic compound precursor for the synthesis of many chemical substances used in the chemical, pharmaceutical, and cosmetic industries. Shikimate is a key precursor for the chemical synthesis of oseltamivir phosphate (OSP), an efficient antiviral drug for prevention and treatment of seasonal influenza virus types A and B, avian influenza virus H5N1, and human influenza virus A/H1N1. The current OSP production has been estimated that would cover just 2% of the world population in case of severe influenza pandemic. Shikimate extraction from *Illicium* genus plants is not a suitable method for produce OSP and cover the world population in case of influenza pandemic. Engineered bacterial strains for the fermentative production of shikimate is an excellent and sustainable alternative to produce this precursor in industrial scales, at a competitive price, and in relatively short times production. Oxygen supply in *Escherichia coli* cultures is a determinant factor to favor bacterial growth and metabolites production. High-cell-density batch cultures at small-scale and large-scale naturally progress toward an oxygen-limited regimen of growth that affect negatively the bacterial growth and metabolites production. *Vitreoscilla stercoraria* hemoglobin (VHb) expression in diverse heterologous hosts has been demonstrated that improve the growth and metabolites production, still under oxygen-limited extracellular conditions. In this study, the effect of expressing the VHb in a shikimate-overproducing *E. coli* PB12.AR36 strain was investigated. The effect was evaluated in 1 L batch bioreactors using mineral medium with high glucose and yeast extract concentrations, under aerobic and microaerobic growth conditions. The shikimate-overproducing *E. coli* PB12.AR36/pACYC_{wt}vgb strain generated that express the vgb gene codifying for VHb, under its low-force native promoter, presented a 21% higher both shikimate production and yield, showed a 13% higher biomass and 34% lower acetate production, compared to the *E. coli* PB12.AR36 strain values evaluated under aerobic conditions. In the other hand, the *E. coli* PB12.AR36/pACY_{wt}vgb strain generated 38% lower acetate production and showed a shikimate yield three-fold higher than that obtained for *E. coli* PB12.AR36 strain under microaerobic growth conditions which mimics the oxygen-limited environment characteristic in a small-scale and large-scale bioprocesses.

II. Resumen

El shikimato es un compuesto aromático quiral de alto valor agregado y precursor para la síntesis de muchas sustancias químicas usadas en las industrias química, farmacéutica y cosmética. El shikimato es el precursor clave en la síntesis química del fármaco oseltamivir fosfato (OSP), un eficiente antiviral para la prevención y tratamiento de la influenza estacional A y B, influenza aviar H5N1 e influenza humana A/H1N1. Se ha estimado que la producción actual de OSP, cubriría tan solo el 2% de la población mundial en caso de pandemia por influenza. La extracción de shikimato a partir de plantas del género *Illicium* no es el método adecuado para producir OSP y cubrir a la población mundial en caso de pandemia de influenza severa. La producción fermentativa de shikimato a través de cepas bacterianas modificadas es una excelente y sustentable alternativa para producir este precursor a escalas industriales, a un precio competitivo y en tiempos de producción relativamente muy cortos. El suministro de oxígeno en cultivos de *Escherichia coli* es un factor determinante para favorecer el crecimiento y la producción de metabolitos. Los cultivos de alta densidad celular a pequeña y gran escala progresan naturalmente hacia un régimen de crecimiento limitado de oxígeno que afecta negativamente el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos. Se ha demostrado que la producción de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) en diferentes hospederos bacterianos heterólogos mejora el crecimiento y la producción de metabolitos, aún bajo condiciones limitadas de oxígeno extracelulares. En este estudio, fue investigado el efecto de la expresión de la VHb en la cepa sobreproductora de shikimato de *E. coli* PB12.AR36. El efecto fue evaluado en biorreactores de 1 litro en modo lote usando medio mineral con altas concentraciones de glucosa y extracto de levadura, en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento. La cepa sobreproductora de shikimato resultante *E. coli* PB12.AR36/pACYC_{w_t}vgb que expresa el gen *vgb* que codifica para la VHb, bajo su promotor nativo de baja fuerza, presentó un aumento del 21% en la producción y rendimiento de shikimato, mostró un aumento del 13% en la producción de biomasa y una disminución del 34% en la producción de acetato con respecto a los valores mostrados por la cepa *E. coli* PB12.AR36 evaluada en condiciones aeróbicas. Por otra parte, la cepa *E. coli* PB12.AR36/pACYC_{w_t}vgb presentó una disminución del 38% en la producción de acetato y un aumento del rendimiento de shikimato que fue tres veces mayor con respecto a los valores obtenidos por la cepa *E. coli* PB12.AR36 bajo condiciones microaeróbicas de crecimiento que simulan el ambiente limitado de oxígeno característico de un bioproceso a pequeña y gran escala.

III. Introducción

Los compuestos aromáticos son una clase de químicos utilizados principalmente como solventes orgánicos, colorantes y precursores para la síntesis de numerosos productos empleados en la industria farmacéutica, cosmética, química y de alimentos. Actualmente, la mayoría de los compuestos aromáticos son fabricados a partir de petróleo como materia prima. La preocupación acerca del uso excesivo de recursos no renovables como el petróleo, así como la contaminación generada a partir de los procesos de fabricación de los compuestos aromáticos, ha sido la fuerza motora encaminada al desarrollo de alternativas para la generación de nuevos métodos de producción sustentables.^(1,2) Las opciones biotecnológicas de producción a partir de fuentes renovables de carbono son una alternativa ideal. La importancia de estas nuevas alternativas va en aumento, debido a que en años recientes, el potencial económico de la industria biotecnológica se ha convertido en una contribución importante para la economía mundial. Hasta el año 2011, su valor se estimó en cerca de 500 mil millones de dólares.⁽³⁾

Las plantas y casi todas las especies bacterianas tienen la capacidad metabólica para sintetizar de manera natural diversos compuestos aromáticos. Estos metabolitos son originados a partir de la vía común aromática, la cual es una gran fuente de compuestos con un alto valor agregado comercial, tales como los metabolitos folato, ubiquinona, las vitaminas E y K, p-aminobenzoato, enterobactina y los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina.^(2,4) Debido a sus propiedades y aplicaciones, estos metabolitos pueden ser utilizados para sintetizar otros compuestos importantes para las diferentes industrias. Un ejemplo relevante es la fenilalanina, que es usada como materia prima para la elaboración del edulcorante dietético aspartame, mientras que la vía del triptófano puede ser modificada para producir índigo.⁽⁵⁾

El shikimato, otro compuesto aromático, ha retomado especial importancia por ser la materia prima para la síntesis química del fármaco oseltamivir fosfato (OSP), el único antiviral recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la prevención y tratamiento de la influenza, enfermedad causada por los virus de la influenza estacional A y B, la influenza aviar H5N1 y la influenza humana A/H1N1.⁽⁶⁻⁹⁾ Roche, la farmacéutica suiza que lo comercializa bajo el nombre de Tamiflu[®], utiliza SHK extraído de semillas de las plantas del género *Illicium* para su manufactura.⁽¹⁰⁾ Durante la pandemia por influenza humana en el año 2009, Roche reportó ventas de Tamiflu[®] por 2.9 billones de dólares y una capacidad de producción máxima de 400 millones de tratamientos por año, equivalente a 520,000 Kg de SHK.^(11,12) Esta capacidad de producción reportada, mediante el método actualmente utilizado, no podría satisfacer la demanda de SHK necesaria para la fabricación del antiviral en caso de un brote severo de influenza mundial y que se estima en 3.9 millones de Kg de SHK al año.⁽¹⁰⁾ La producción fermentativa de SHK mediante cepas bacterianas modificadas y a partir de recursos que sean renovables, es una alternativa atractiva para su producción sustentable a gran escala y en periodos de tiempo relativamente cortos.^(10,13)

La generación de estas cepas es gracias al uso racional y responsable de técnicas moleculares cuyo objetivo principal estriba en redirigir, interrumpir e incrementar los flujos

de carbono y las propiedades celulares, mediante la interrupción, modificación y/o introducción de nuevas vías metabólicas, así como ampliar el rango de sustratos que se utilizan, con el objetivo de aumentar la producción de metabolitos de interés para varios tipos de industrias, lo que se conoce como “ingeniería de vías metabólicas” (IVM).⁽¹⁴⁾ De esta forma se han construido diversas cepas productoras de SHK derivadas de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*.⁽¹⁵⁻²⁰⁾ Entre ellas, la mejor cepa productora de SHK construida hasta el momento ha sido la cepa SP1.1_{pts/pSC6.090B}, la cual logró alcanzar títulos de 84 g/L de SHK con un rendimiento del 0.33 mol_{SHK}/mol_{Glc} en biorreactores en modo lote alimentado.⁽¹⁵⁾

Desde hace ya varios años, el laboratorio del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata se ha dedicado principalmente a la generación de cepas de *E. coli* productoras de diversos compuestos aromáticos mediante la aplicación de IVM.^(16,17) Un caso excepcional de éxito ha sido la generación de la cepa de *E. coli* PB12.AR36 sobreproductora de SHK, la cual en biorreactores en modo lote logró obtener títulos de 43 g/L de SHK con rendimientos de hasta 0.42 mol_{SHK}/mol_{Glc}, el cual es el rendimiento más alto hasta ahora reportado. Debido a la alta capacidad de producción de SHK de esta cepa, ha sido promisorio su escalamiento a nivel de biorreactores industriales mediante estrategias adecuadas de cultivo alimentado.⁽¹⁶⁾ Pero para que esta y otras cepas puedan ser utilizadas por la industria, es necesario crear procesos de producción a bajo costo, manteniendo la eficiencia de la síntesis a gran escala, de forma que los costos de producción de metabolitos sean menores o similares a las síntesis y/o métodos tradicionales.^(10,13)

Sin embargo, el problema radica durante el proceso de escalamiento del cultivo a nivel de biorreactores industriales, ya que es típico la presencia de gradientes de sustrato, de pH y de tensión de oxígeno disuelto (TOD). Especialmente este último, tiene efectos negativos en los cultivos de la bacteria anaerobia facultativa *E. coli*, ya que en presencia de ambientes microaeróbicos o anaeróbicos, es capaz de producir metabolitos tóxicos como el acetato, producto que representa un desperdicio de sustrato y de energía, inhibe el crecimiento bacteriano y además favorece la reducción de la síntesis de metabolitos.⁽²¹⁾

La aplicación de la ingeniería metabólica es la aproximación más acertada para crear cepas productoras de metabolitos que sean más robustas ante los gradientes de oxígeno característicos en cultivos de alta densidad celular a pequeña y gran escala.^(14,21) Desde su descubrimiento en 1966 y desde su aplicación como estrategia en ingeniería metabólica en 1990, la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) mediante técnicas de ingeniería genética aplicadas en diferentes organismos, ha sido exitosa para mejorar su metabolismo aeróbico y energético, con el objetivo de favorecer su crecimiento y la síntesis de metabolitos aún en condiciones limitadas de oxígeno.⁽²²⁻²³⁾

El presente trabajo de investigación demuestra las bondades de la expresión de la VHb sobre los parámetros de crecimiento, producción de SHK y producción de acetato (un indicador del metabolismo anaeróbico) de la cepa *E. coli* PB12.AR36, cuando se le evaluó en condiciones aeróbicas y en condiciones microaeróbicas que simulan el ambiente limitado de oxígeno característico de un bioproceso a cualquier escala, usando cultivos en modo lote con altas concentraciones de glucosa y extracto de levadura (YE).

IV. Antecedentes

4.1 Shikimato en la industria

El shikimato (SHK) o ácido shikímico [ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico] es el intermediario clave de la vía del shikimato, ruta en común para la biosíntesis de diversos compuestos aromáticos. Esta vía está presente en bacterias, hongos, parásitos del filo *Apicomplexa* y en plantas, pero no en mamíferos.^(4,6,7) La vía del shikimato empieza con la condensación entre el fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente del metabolismo central de carbono, y la eritrosa 4-fosfato (E4P) proveniente de la vía de las pentosas fosfato para formar 3-desoxi-D-arabino-heptolusonato 7-fosfato (DAHP), que posteriormente es convertido mediante otras seis reacciones enzimáticas en corismato (Figura 1), el cual es precursor para la biosíntesis de vitaminas y de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano.⁽⁴⁾

El SHK es un compuesto altamente utilizado como precursor en la síntesis de muchas sustancias usadas en las industrias química, farmacéutica y cosmética.⁽⁸⁾ Dentro de las aplicaciones farmacéuticas del SHK se incluyen su uso directo como antipirético, antioxidante, anticoagulante, antitrombótico, anti-inflamatorio y como analgésico.^(6,8) Debido a su anillo cíclico de seis carbonos de alta funcionalidad y a sus tres centros asimétricos, el SHK es considerado como una materia prima atractiva para la síntesis de una gran variedad de compuestos biológicamente importantes, tales como agentes anticancerígenos, antibacteriales e incluso para la síntesis de hormonas (Figura 2).^(6,8,13)

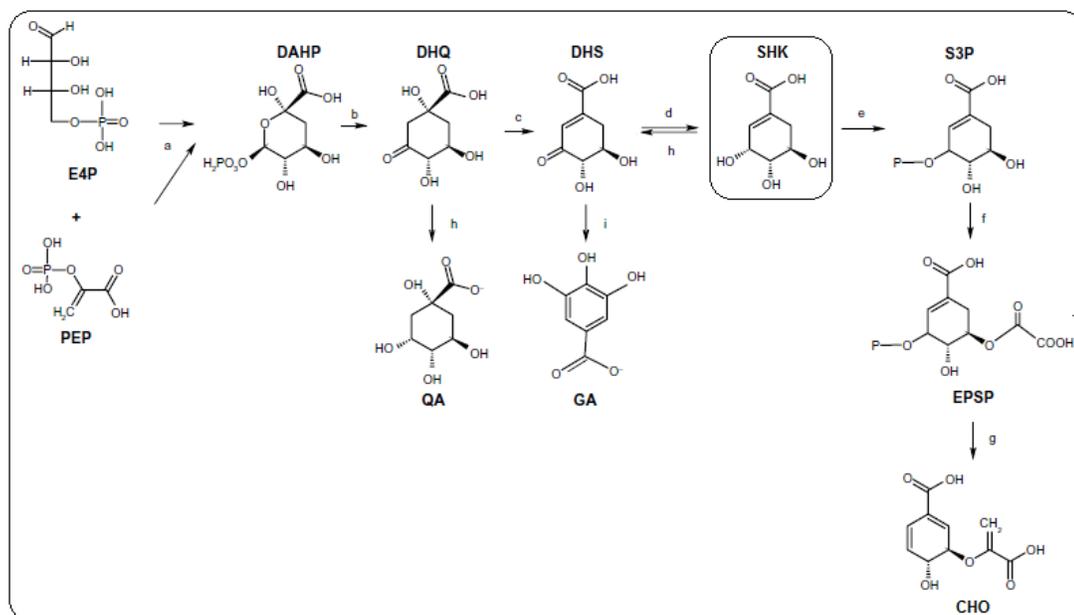


Figura 1. Vía biosintética del shikimato en *Escherichia coli*. Las enzimas y los genes que los codifican se indican. (a) isoenzimas DAHPs AroF, AroG, AroH (*aroF*, *aroG*, *aroH*, respectivamente); (b) DHQ sintasa (*aroB*); (c) DHQ deshidratasa (*aroD*); (d) SHK deshidrogenasa (*aroE*); (e) isoenzimas SHK cinasas I y II (*aroK* y *aroL*, respectivamente); (f) EPSP sintasa (*aroA*); (g) CHO sintasa (*aroC*); (h) SHK deshidrogenasa (*ydiB*); (i) SHK deshidrogenasa (*aroE*). **Abreviaciones:** CHO = corismato; DAHP = 3-desoxi-D-arabino-heptolusonato 7-fosfato; DAHPs = 3-desoxi-D-arabino-heptolusonato 7-fosfato sintasas; DHS = 3-dehidros hikimato; DHQ = 3-dehidroquinato; E4P = eritrosa 4-fosfato; EPSP = 3-enolpiruvil-shikimato 5-fosfato; PEP = fosfoenolpiruvato; SHK = shikimato; S3P = shikimato 3-fosfato; GA = ácido gálico; QA = ácido quínico. Figura modificada de Díaz *et al.*, 2014.⁽⁷⁾

El SHK ha tomado importancia por ser el sustrato ideal para la síntesis química del fármaco oseltamivir fosfato (OSP), conocido comercialmente como Tamiflu® (F.Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland), que es usado como un antiviral activo, debido a que es un eficiente inhibidor de la enzima superficial neuraminidasa (sialidasa) presente en los virus que causan la influenza estacional tipos A y B, de la influenza aviar H5N1 surgida en 1997, de la influenza humana A/H1N1 emergida entre los meses de marzo-abril del año 2009 y recientemente el tipo A/H3N2.^(7,8,10) El Tamiflu® ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible para la profilaxis así como para el tratamiento de los distintos tipos influenza, razones por las que la OMS lo ha recomendado para planes de pandemia, pues tras pruebas de laboratorio se ha demostrado su efectividad, disminuyendo eficaz y tempranamente los síntomas ocasionados por el virus.⁽⁹⁾

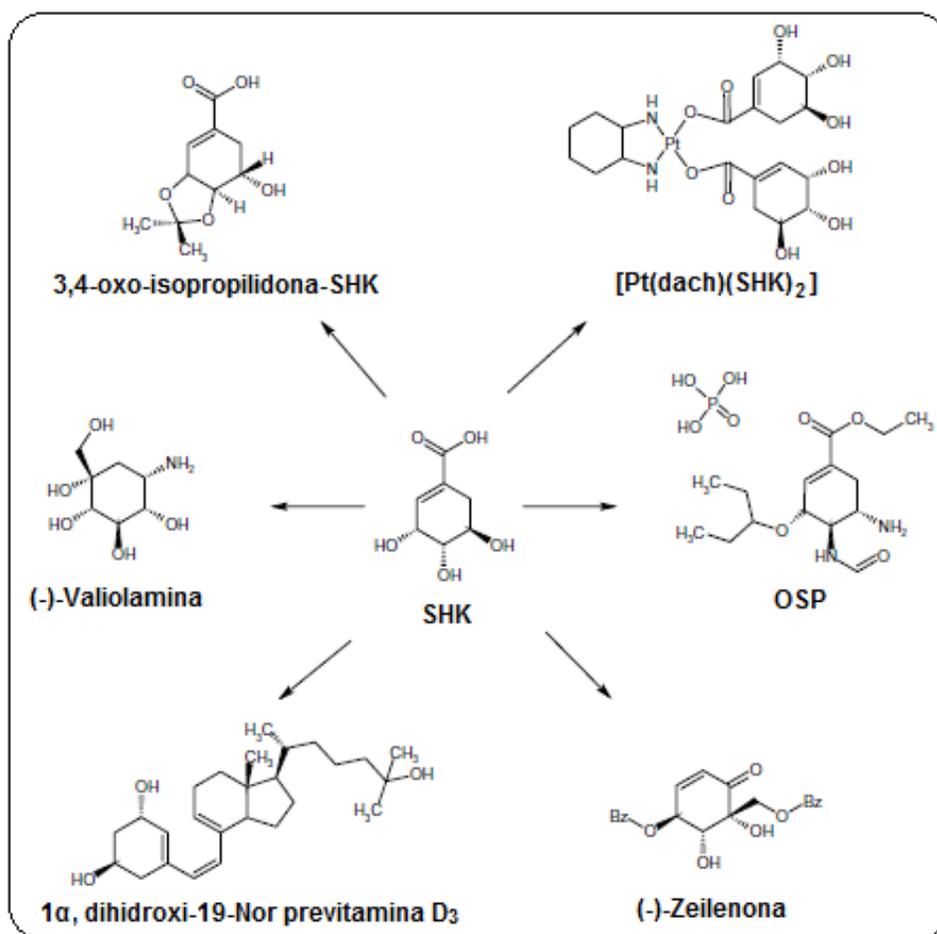


Figura 2. Diversos productos farmacéuticos derivados del shikimato (SHK). Oseltamivir fosfato (OSP) es un eficiente inhibidor de la neuraminidasa de los virus de la influenza tipos A y B, virus de la influenza aviar H5N1 y virus de la influenza humana A/H1N1. (-)-Zeilenona es un ciclohexano polioxygenado aislado a partir de *Uvaria grandiflora*, con actividad antiviral, anticancerígena y antibiótica. (-)-Valiolamina es una α-glucosidasa con actividad inhibitora contra las enzimas intestinales porcinas sucrasa, maltasa e isomaltasa, inicialmente aislada de *Streptomyces hygroscopicus* subsp *limoneus* IFO I2703. [PT(datch)(SHK)₂] es un compuesto activo contra la leucemia LI210. 3,4-oxo-isopropilidona-SHK posee actividad antitrombótica, inhibe la adhesión *in vitro* de los leucocitos polimorfonucleares a las células endoteliales inducidas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), y posee efectos anti-inflamatorios. Los análogos de 1α, dihidroxi-19-Nor previtamina D₃ muestran un efecto promisorio para el tratamiento de la osteoporosis y de otras malignidades. Figura modificada de Díaz *et al.*, 2014.⁽⁷⁾

Roche extrae SHK a partir de las semillas provenientes de los frutos de las plantas del anís estrella chino *Illicium anisatum* e *Illicium verum*, de las cuales se ha reportado que contienen alrededor del 4.99% al 17.45% de SHK, respectivamente.^(24,25) Sin embargo, el cultivo del anís estrella no es sencillo y además, a partir de su siembra, la planta toma alrededor de seis años de crecimiento para dar sus frutos.⁽²⁴⁾ El 90% del fruto que se cosecha entre los meses de marzo y mayo es utilizado para la fabricación de Tamiflu®.⁽¹⁰⁾ El SHK es extraído de estas plantas mediante un proceso de 10 etapas que toma un año, donde se necesitan aproximadamente 30 Kg de semillas para obtener 1 Kg de SHK.⁽²⁶⁾ Para la síntesis química de OSP, el SHK es convertido a un intermediario dietilcetal, el cual mediante dos pasos más es reducido a un epóxido que finalmente es transformado a Tamiflu®.⁽²⁴⁾

Durante la pandemia de influenza humana en el año 2009, Roche reportó ventas de Tamiflu® por 2.9 billones de dólares y la capacidad de producción máxima de 400 millones de tratamientos al año, equivalente a 520,000 Kg de SHK.⁽¹⁰⁻¹²⁾ Esta capacidad máxima de producción, mediante el método actualmente utilizado, no podría satisfacer la demanda de SHK necesaria para la fabricación del antiviral en caso de un brote severo de influenza pandémica,^(10,27) particularmente con cepas más patógenas e infectivas, y que se estima en una producción de 30 billones de tratamientos al año, equivalente a 3.9 millones de Kg de SHK. Se ha estimado que con el actual suministro de Tamiflu® se cubriría tan solo el 2% de la población mundial.⁽¹⁰⁾

Para producir cantidades a gran escala del fármaco, se requiere disponer de la materia prima suficiente para cubrir la demanda del número de tratamientos necesaria para atender a la población a nivel mundial, pero la extracción de SHK a partir del anís estrella Chino y de otras plantas no parecen ser la solución para lograrlo.^(10,24) Por lo que la industria farmacéutica está en busca de una alternativa para producir SHK a gran escala, de una manera sustentable y a un precio competitivo. Se ha estimado que las dos terceras partes de SHK destinadas para la producción de Tamiflu®, provienen a partir de la extracción del anís estrella, mientras que el resto se origina a través de procesos fermentativos, que dan una mayor flexibilidad a Roche y en particular le permite ser más independiente en caso de temporadas con mala cosecha.⁽¹⁰⁾

Ante los escenarios anteriormente planteados, es necesario contar con capacidades regionales y locales para producir este precursor antiviral a un nivel industrial y otras moléculas antivirales de nueva generación.⁽⁴⁾ Con el objetivo de aumentar las reservas de SHK, los procesos de producción fermentativos a través del desarrollo racional de cepas microbianas genética y metabólicamente mejoradas que sinteticen SHK a partir de recursos renovables como la glucosa, presentan una excelente e incluso una más sustentable alternativa para cubrir la actual demanda del mercado a un precio más competitivo.⁽¹³⁾ Además, existe otra ventaja de operar con cepas microbianas en procesos fermentativos: estos microorganismos pueden modificarse para realizar ligeras modificaciones estructurales sobre la molécula de SHK y esto permitiría producir análogos con propiedades farmacológicas ligeramente diferentes que podrían combatir potencialmente contra nuevas cepas de influenza emergentes, resultado de la capacidad de mutación, recombinación y rearreglo de los virus.^(10,28)

4.2 Producción fermentativa de shikimato

Para la producción fermentativa de SHK, se han utilizado principalmente cepas recombinantes de *Escherichia coli* y en menor medida cepas de *Bacillus subtilis* y *Citrobacter freundii*.^(10,13) La obtención de estas cepas es el resultado de la manipulación genética, alterando sus propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o a la introducción de otras nuevas, por medio del uso de la tecnología del ADN recombinante, para aumentar así su capacidad de formación de los productos de interés, lo que se conoce como VM.⁽¹⁴⁾

Entre los diversos organismos que pueden ser modificados para la producción de metabolitos, la bacteria Gram-negativa *E. coli* es usada por excelencia para el trabajo de ADN recombinante, debido a que posee las características ideales para la producción fermentativa de metabolitos a gran escala: tiempos cortos de duplicación, lo que deriva a tasas de crecimiento rápidas y la fácil obtención de cultivos de alta densidad celular, bajos costos de producción, conocimiento detallado y entendimiento de su metabolismo y lo más importante, la disponibilidad de excelentes herramientas moleculares para su modificación genética, es decir, se disponen de vectores de clonación asociados a *E. coli*, tales como plásmidos y bacteriófagos, y se cuenta con técnicas que permiten transportar eficazmente ADN de una célula bacteriana a otra. Por estas razones, *E. coli* es el organismo modelo para estudios biotecnológicos, donde ya se han obtenido mediante VM excelentes resultados en la producción de diversos metabolitos de alto valor agregado tanto autólogos como heterólogos.^(29,30)

Para los cultivos celulares de estas cepas modificadas se emplea usualmente un medio rico en glucosa. Este azúcar es hasta la fecha, la materia prima más utilizada en fermentaciones industriales de *E. coli*, y en parte esto se debe a que es relativamente barata, además de que es la fuente de carbono y energía preferida para esta bacteria. La glucosa provee átomos de carbono para la generación de biomasa y de producto. Además, la capacidad de la célula para el consumo y metabolización de este carbohidrato tiene un profundo impacto sobre su tasa de crecimiento y su productividad.⁽³¹⁾

En *E. coli*, la vía del SHK comprende siete reacciones enzimáticas. Esta vía empieza con la condensación de los intermediarios del metabolismo central del carbono (MCC), fosfoenolpiruvato (PEP) proveniente de la glucólisis y la eritrosa 4-fosfato (E4P) proveniente de la vía de las pentosas fosfato (PPP) para generar 3-desoxi-D-arabinoheptolusonato 7-fosfato (DAHP), reacción catalizada mediante la enzima DAHP sintasa. *E. coli* posee tres diferentes DAHP sintasas (DAHPs), las isoenzimas AroF, AroG y AroH (codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*, respectivamente). Estas tres enzimas están sujetas bajo control transcripcional y alostérico por los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano, respectivamente, porque cada isoenzima posee un distinto dominio regulatorio localizado dentro del núcleo de la enzima. El DAHP es transformado para generar el 3-dehidroquinato (DHQ); esta reacción es catalizada por la DHQ sintasa (codificada por *aroB*). En el siguiente paso, DHQ pierde una molécula de agua y es transformado a 3-dehidroshikimato (DHS) por la DHQ deshidratasa (codificada por *aroD*). El DHS es convertido a SHK por la SHK deshidrogenasa (codificada por *aroE*).

El siguiente paso en la vía, es la formación de shikimato 3-fosfato. En *E. coli*, este paso es catalizado por las isoenzimas shikimato cinasas I y II (codificadas por los genes *aroK* y *aroL*, respectivamente). Subsecuentemente, la 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP) sintasa (codificada por el gen *aroA*) cataliza la conversión de shikimato 3-P a EPSP; finalmente, la corismato (CHO) sintasa (codificada por el gene *aroC*) convierte EPSP a CHO. En *E. coli*, las enzimas DHQ sintasa, DHQ deshidratasa, y la SHK deshidrogenasa son expresadas constitutivamente, no como DAHPs y SHK cinasa II, las cuales están transcripcionalmente reguladas. Además, en *E. coli*, el DHQ y DHS son transformados enzimáticamente a ácido quínico (QA) y a ácido gálico (GA), respectivamente, otros subproductos aromáticos de la vía (Figura 1).^(4,7,8)

Gracias a la aplicación de MM en *E. coli*, se han logrado generar y patentar cepas sobreproductoras de SHK y de otros metabolitos derivados de la vía de los aminoácidos aromáticos.^(2,15-20,32) La cepa con mayor capacidad de producción de SHK hasta el momento ha sido la construida por Chandran *et al.*, 2003,⁽¹⁵⁾ la cual en un proceso fermentativo en biorreactor de 10 L en modo lote alimentado con glucosa en medio mineral y suplementado con 15 g/L de YE, logró alcanzar títulos de hasta 84 g/L con un rendimiento del 0.33 mol_{SHK}/mol_{Glc}. La estrategia utilizada fue la eliminación del sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) en la cepa SP1.1 con el fondo genético RB791 *aroB*⁺ *aroK*⁻ *aroL*⁻, lo cual permitió aumentar la disponibilidad de PEP hacia la vía aromática y acumular SHK. El bajo transporte y fosforilación de la glucosa causados por la inactivación de PTS fue re-establecida gracias a la sobreexpresión heteróloga de los genes *glf* y *glk* de *Zymomonas mobilis* que codifican para un facilitador y una cinasa de glucosa, respectivamente. Esto aunado a la sobreexpresión adicional de los genes *tktA*, *aroF*^{br} y *aroE* que codifican para la transcetolasa A, una DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica y una SHK deshidrogenasa, respectivamente, fueron las características determinantes para aumentar el flujo de carbono hacia la vía biosintética de SHK en la cepa de *E. coli* SP1.1*pts/pSC6.090B* resultante.⁽¹⁵⁾

Dentro del grupo de investigación del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata se han generado exitosamente cepas de *E. coli* productoras de SHK, derivadas de cepas que tienen eliminado el sistema PTS y que han logrado restaurar el fenotipo de consumo de glucosa (PTS⁻ Glc⁺) mediante un proceso de evolución adaptativa en laboratorio.^(16,17,33,34) Un claro ejemplo es la construcción de la cepa PB12.SA22, la cual tiene eliminado los dos genes que codifican para las SHK cinasas (*aroK* y *aroL*) con el propósito de interrumpir la vía del SHK y acumularlo, y en conjunto con la expresión de los genes *aroG*^{br}, *tktA*, *aroB* y *aroE*, éstos presentes en dos diferentes plásmidos y bajo el control de un promotor lacUV5 inducible con isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), se logró obtener títulos de 7.05 g/L de SHK con un rendimiento de 0.22 mol_{SHK}/mol_{Glc} en biorreactores con medio mineral con 25 g/L de glucosa y suplementado con 15 g/L de YE.⁽¹⁷⁾

Recientemente se reportó la construcción de la cepa de *E. coli* PB12.AR36.⁽¹⁶⁾ Debido a que esta cepa es de especial interés para el presente trabajo, a continuación se abordarán con mayor detalle sus características, así como la de su cepa parental PB12,^(33,34) ya que con ellas se logrará una mayor comprensión del presente trabajo.

4.2.1 Características de la cepa de *Escherichia coli* PB12

Mediante la estrategia de evolución adaptativa en laboratorio de la cepa PB11 (fenotipo PTS⁻ Glc⁻, obtenido por la inactivación del sistema PTS en la cepa silvestre JM101), se lograron aislar mutantes espontáneas con el fenotipo PTS⁻ Glc⁺, entre ellas la cepa PB12 que muestra un incremento del 400% en su velocidad específica de crecimiento con respecto a la cepa PB11 ($\mu = 0.44$ vs 0.1 h^{-1}). La cepa PB12, a causa de la eliminación del sistema PTS, también carece de represión catabólica por glucosa y es capaz de co-utilizar varias fuentes de carbono simultáneamente, de la misma forma que la cepa PB11.⁽³³⁻³⁵⁾

La cepa evolucionada recuperó la capacidad de crecer rápidamente en glucosa debido al doble nivel de expresión de transcritos del gen *glk* (que codifica para la glucocinasa Glk) en comparación con la cepa silvestre y PB11, y que cuya actividad específica que sigue el mismo orden, permitió un alto grado de fosforilación de la glucosa transportada en la cepa PB12 en comparación a la de su progenitora la cepa PB11.⁽³³⁻³⁵⁾ Además, en la cepa evolucionada los niveles de transcrito de *galP* (gen que codifica para el simportador permeasa de galactosa y de otros azúcares, GalP) fueron 12.4 veces mayor que en la cepa silvestre. De esta manera se concluyó que en la cepa PB12, la glucosa puede ser transportada por GalP en ausencia del sistema PTS y fosforilada a una alta tasa por Glk, lo cual permitió recuperar su alta tasa de crecimiento.⁽³³⁻³⁵⁾

Mediante la secuenciación del genoma completo de la cepa PB12 y su posterior comparación y análisis con el genoma de la cepa de referencia *E. coli* K-12 MG1655, se determinaron la mayoría de las mutaciones ocurridas durante el evento de evolución de la cepa PB11. Este evento causó principalmente la delección de un fragmento cromosomal de 10,328 pb, en el cual se encontraban los genes: *rppH*, responsable de codificar la enzima pirofosfohidrolasa y encargada de iniciar la hidrólisis de los ARN mensajeros por el extremo 5'-trifosfatado; *mutH*, que codifica a una endonucleasa encargada del sistema reparador del ADN; y *galR*, gen que codifica para la proteína represora del operón encargado del transporte y catabolismo de la galactosa.⁽³⁴⁾

A causa de la delección cromosomal la cepa evolucionada PB12: adquirió un mayor metabolismo glucolítico debido a un aumento de la vida media de los transcritos y por consecuencia a la alta expresión de las enzimas relacionadas a dicha vía; adquirió un incremento en la actividad de la permeasa de galactosa GalP (atribuida en parte a la delección de su represor); y adquirió una alta plasticidad metabólica, debido al aumento de 200 veces la tasa de mutación que la mostrada por la cepa silvestre JM101.⁽³⁴⁾ La suma del conjunto de las modificaciones genéticas aplicadas más las mutaciones adquiridas durante el evento de evolución adaptativa, hicieron de la cepa PB12 una cepa única, excepcional y adecuada para realizar IVM y así obtener una buena producción de diversos compuestos aromáticos de interés para la industria.^(34,35)

4.2.2 Características de la cepa de *Escherichia coli* PB12.AR36

Aplicando VM en la cepa PB12, se logró obtener la cepa sobreproductora de SHK PB12.AR36. Dentro de las estrategias que se utilizaron para la generación de dicha cepa, fueron la inactivación de los genes *aroK* y *aroL*, lo cual permitió el bloqueo absoluto de la vía del SHK y su posterior acumulación; inactivación por transducción del gen *pykF* para incrementar la disponibilidad del precursor PEP hacia la vía del SHK; y la inactivación del gen *lacI* que, en conjunto con la construcción de un plásmido de alto número de copias que tiene insertado un operón sintético en el cual se encuentran clonados los genes *aroB*, *tktA*, *aroG^{fbr}*, *aroE*, *aroD* y *zwf*, éstos bajo el control del promotor fuerte *trc* (pTrcAro6), se logró su expresión coordinada y constitutiva sin necesidad del inductor IPTG, con el objetivo de dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de SHK (Figura 3).⁽¹⁶⁾

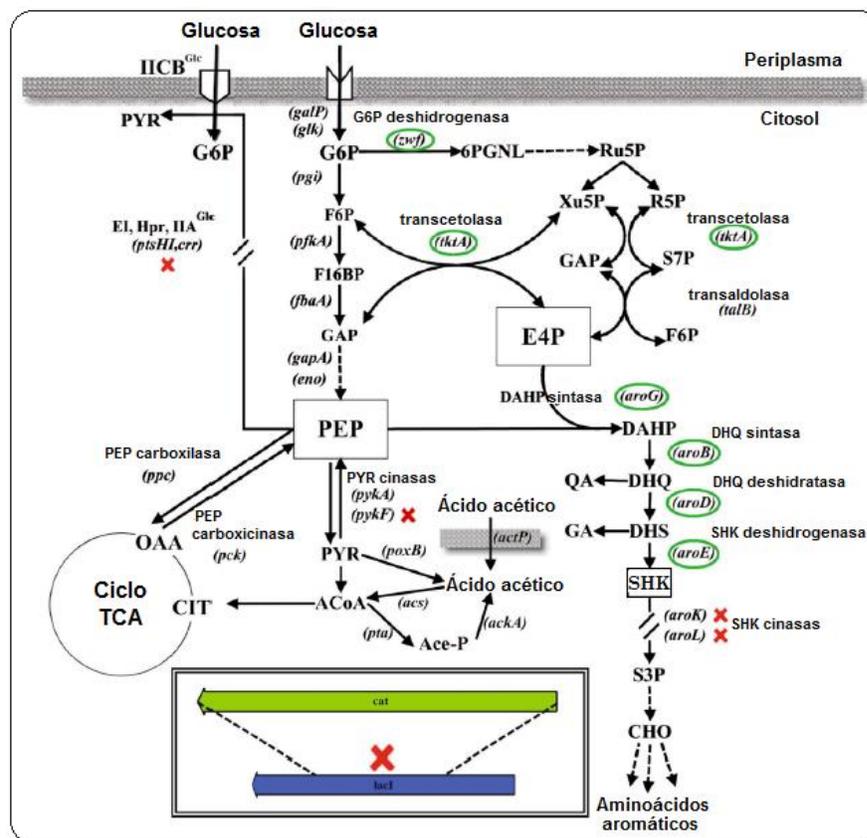


Figura 3. Modificaciones genéticas aplicadas a la cepa de *E. coli* PB12 para la construcción de la cepa sobreproductora de shikimato PB12.AR36. Los genes inactivados están indicados con cruces y los genes expresados en plásmido están encerrados en círculos. Las flechas punteadas indican más de un paso catalítico. G6P = glucosa 6-fosfato; F6P = fructosa 6-fosfato; GAP = gliceraldehído 3-fosfato; 6PGNL = 6-fosfogluconolactona; Ru5P = ribulosa 5-fosfato; R5P = ribosa 5-fosfato; Xu5P = xilulosa 5-fosfato; S7P = sedoheptulosa 7-fosfato; E4P = eritrosa 4-fosfato; PEP = fosfoenolpiruvato; PYR = piruvato; ACoA = acetil-coenzima A; Ace-P = acetil fosfato; CIT = citrato; OAA = oxalacetato; DAHP = 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato 7-fosfato; DHQ = 3-dehidroquinato; DHS = 3-dehidroshikimato; QA = ácido quínico; GA = ácido gálico; SHK = shikimato; S3P = shikimato 3-fosfato; CHO = corismato; IICB^{Glc} = componente membranal de la glucosa permeasa específica de PTS; E1 = enzima 1 de PTS; Hpr = proteína histidina de PTS; IIA^{Glc} = componente citosólico de la glucosa permeasa específica de PTS. Genes codificantes para las enzimas: *galP*, permeasa de galactosa; *glk*, glucocinasa; *pgi*, fosfogluconosa isomerasa; *pfkA*, 6-fosfofructocinasa; *fbaA*, fructosa bifosfato aldolasa clase II; *gapA*, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; *eno*, enolasa; *actP*, acetato permeasa; *acs*, acetil-coenzima A sintetasa; *pta*, fosfato acetiltransferasa; *ackA*, acetato cinasa; *poxB*, piruvatoxidasas. Figura modificada de Rodríguez *et al.*, 2013.⁽¹⁶⁾

Entre otras características del plásmido anteriormente mencionado están: tiene una región llamada locus *par* que le confiere una mayor estabilidad segregacional, además de poseer el origen de replicación del plásmido pBR322 perteneciente al grupo ColE1.^(36,37) Las estrategias de VM aplicadas a la cepa PB12 y la posterior evaluación de la cepa PB12.AR36 en biorreactores en modo lote, cultivada en medio mineral con 100 g/L de glucosa y suplementado con 30 g/L de YE, dieron como resultado títulos de 43 g/L de SHK y rendimientos de 0.42 mol_{SHK}/mol_{Glc}, el cual es el rendimiento más alto hasta ahora reportado, resultando en una cepa prometedora para aumentar la producción de SHK mediante técnicas de cultivo alimentado adecuadas.⁽¹⁶⁾

Es indispensable exponer la importancia sobre la generación de cepas PTS⁻, como las cepas PB11, PB12 y PB12.AR36. Existe una ventaja importante cuando se trabajan con cepas PTS⁻ que internalizan glucosa por GalP y es el ahorro de un mol de PEP. Mientras que el sistema PTS gasta un mol de PEP para internalizar y fosforilar un mol de glucosa para formar glucosa 6-fosfato, el transporte por GalP gasta un H⁺ para internalizar un mol de glucosa y un mol de ATP para fosforilarla. El PEP es precursor de una gran variedad de compuestos y aminoácidos aromáticos de importancia industrial y su reciclaje y alta disponibilidad hacia la vía común del SHK, representa una mejora del rendimiento del producto y una mejora en la productividad del proceso.⁽³¹⁾

4.3 Problemáticas de la producción de metabolitos en bioprocesos a gran escala

Para la producción de una gran variedad de metabolitos destinados para su uso como materia prima en la manufactura de diversos productos por las industrias química, farmacéutica, cosmética y de alimentos, es necesario producirlos mediante procesos a gran escala viables, sustentables y a un bajo costo, como son los procesos fermentativos. En los laboratorios de investigación, la caracterización del estado metabólico, crecimiento y producción de numerosas moléculas de interés por parte de los microorganismos, son llevadas a cabo en su mayor parte en sistemas de cultivos homogéneos, es decir, sistemas a nivel de matraces agitados y biorreactores a escala laboratorio, en donde se trabaja con volúmenes pequeños de cultivo.

Por otra parte, los bioprocesos industriales a gran escala en donde se trabaja con volúmenes de cultivo que van de los 10 hasta los 500 m³ (10,000 – 500,000 L) son sistemas heterogéneos, a causa del deficiente e ineficaz poder de mezclado. Esto impacta de manera importante en la distribución de nutrientes, cofactores, productos y células (especialmente en procesos donde se trabaja con más de una especie) dentro del cultivo. Desde hace mucho tiempo se ha observado que los perfiles de concentración dentro de los biorreactores de producción industrial están caracterizados por la aparición de una variedad de gradientes, por lo que las células que se desarrollan dentro de los reactores a gran escala son transportadas a través de diferentes zonas y sufren cambios constantes dentro de los microambientes que lo rodean. Eventualmente, las células experimentan historias diferentes con respecto a su fisiología, en comparación con los microorganismos que se hacen crecer rutinariamente en cultivos homogéneos donde el proceso de mezclado es más eficaz (Figura 4).⁽²⁰⁾

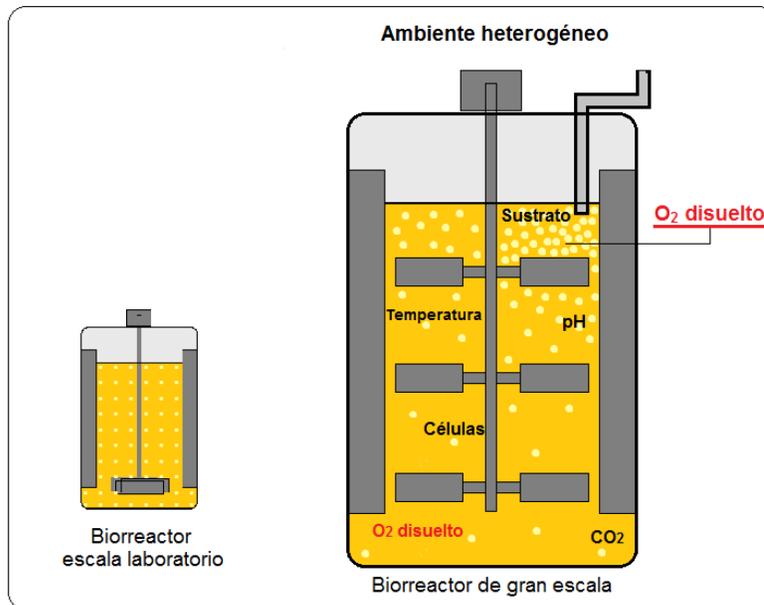


Figura 4. Comparación esquemática entre un biorreactor escala laboratorio y uno de gran escala presentando un mayor ambiente heterogéneo. Dentro de un biorreactor a escala laboratorio y en mayor medida en uno a gran escala, es típico la presencia de oscilaciones o gradientes en los parámetros de oxígeno disuelto, dióxido de carbono disuelto, sustrato, pH y temperatura, que entre otras causas generalmente se asocian a un deficiente poder de mezclado.

Para obtener cultivos de *E. coli* altamente productivos se deben de tomar en cuenta diferentes variables como: la fuente de carbono usada para el cultivo, la concentración de biomasa máxima que puede lograrse (X), la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s), el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) y la velocidad específica de crecimiento (μ). Generalmente existe una correlación directa entre la biomasa generada y la productividad volumétrica del metabolito producido y es debido a esto que, una de las estrategias más utilizadas para mejorar la producción a gran escala de varias biomoléculas es mediante los cultivos de alta densidad celular (CADC) donde se pueden obtener concentraciones de biomasa superiores a 50 g/L. Los CADC son la opción preferida para los bioprocesos a nivel industrial.⁽³⁸⁾

Una de las características para obtener CADC en biorreactores en modo lote, es que se requiere utilizar glucosa o cualquier otra fuente de carbono/energía al inicio de la fermentación y a altas concentraciones, sustrato que posteriormente será convertido a biomasa. En la práctica, no es adecuado suministrar la fuente de carbono necesaria (p. ej., de 40 hasta más de 200 g/L de glucosa) al inicio del cultivo, debido a que en condiciones completamente aeróbicas una cepa silvestre de *E. coli* que crece en exceso de glucosa, puede acumular acetato cuando es cultivada a una elevada q_s , y/o con altas velocidades específicas de consumo de oxígeno (q_{O_2}).^(38,39) El acetato es un subproducto indeseable que afecta el crecimiento, fisiología y propiedades de esta bacteria cuando es utilizada como fábrica celular (sección 4.3.1). La excreción de acetato de origen aeróbico en cultivos de *E. coli* ocurre cuando el flujo de carbono a través de glucólisis excede la capacidad del TCA para oxidar completamente el acetil-Coenzima A (acetil-CoA) producido, es decir, si la q_s de *E. coli* es mayor que la de su conversión a biomasa y CO_2 . Este desbalance se conoce como sobreflujo metabólico (Figura 5).^(40,41)

Los enfoques clásicos de ingeniería de bioprocesos para evitar el sobreflujo metabólico en cultivos de *E. coli*, se han centrado principalmente en suplementar la glucosa a una baja tasa, pero suficiente como para mantener una q_s por debajo del umbral de formación del acetato.^(38,42) Esta metodología es la base de los procesos en modo lote alimentado, en el cual soluciones concentradas de glucosa son suministradas al biorreactor bajo una variedad de estrategias de control.⁽³⁸⁾ Los CADC pueden ser fácilmente alcanzables por medio de cultivos en modo lote alimentado, que han sido implementados a muchas escalas para la producción de una gran variedad de productos.

A pesar de que se puede obtener una alta productividad volumétrica de metabolitos en CADC dentro de un proceso en modo lote alimentado, en la mayoría de los casos ocurre lo contrario. Eventualmente esta estrategia puede presentar varios inconvenientes: a causa de una baja q_s , la tasa de crecimiento específico (μ) también se reduce, la duración del cultivo se prolonga y como consecuencia de estas acciones, la productividad global del proceso disminuye. La realización de cultivos adecuados en modo lote alimentado a escalas industriales requiere de esquemas de control adicional, equipo extra, y la suma del esfuerzo operacional durante periodos prolongados, lo que inevitablemente provoca aumento en los costos de producción. Es así como la concentración de biomasa alcanzable puede variar o mejorarse dependiendo de la estrategia de cultivo utilizada, ya sea utilizando cultivos en modo lote o modo lote alimentado.⁽³⁸⁾

Dentro de los procesos en modo lote alimentado a gran escala, los gradientes de sustrato son muy característicos, y pueden causar efectos significativos en la fisiología celular. Debido a la acción de la agitación, las células pueden posicionarse y viajar a partir de áreas o espacios del bioreactor en donde la presencia de glucosa es limitada, hacia zonas con altas concentraciones de glucosa, como es el punto de alimentación o entrada de dicho sustrato. Este evento, puede crear una región anaeróbica, debido a que la tasa de respiración de las células aumenta importantemente durante su exposición a regiones concentradas de glucosa.^(20,38) Por otra parte, el uso de elevadas concentraciones de

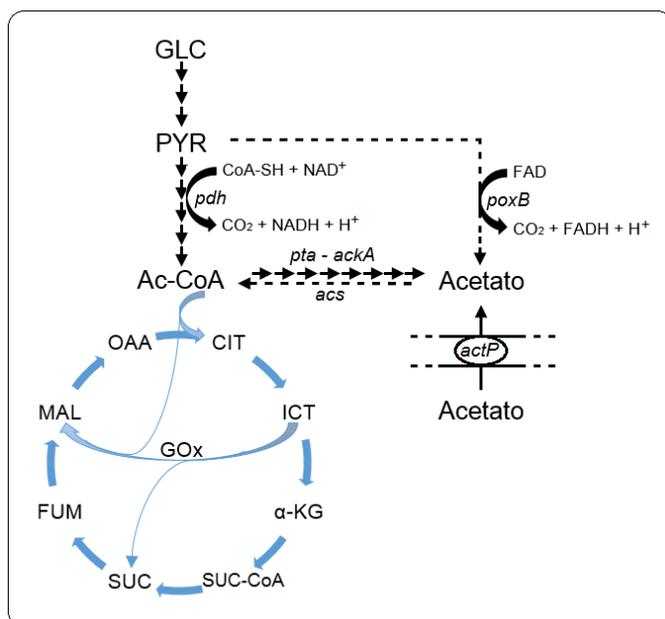


Figura 5. Metabolismo del acetato y sobreflujo metabólico en *E. coli*. Las flechas punteadas indican el metabolismo alternativo del PYR conformado por las enzimas PoxB y Acs codificadas por los genes *poxB* y *acs*, respectivamente. Las flechas cortas indican un alto flujo de carbono a través de glucólisis y la posterior conversión del Ac-CoA a acetato por la vía *pta-ackA*. Únicamente las flechas cortas de GLC a PYR indican más de un paso catalítico. GLC = glucosa; PYR = piruvato; Ac-CoA = acetil Coenzima A; GOx = ruta del glioxilato. Genes codificantes para: *pdh*, complejo piruvato deshidrogenasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *ackA*, acetato cinasa; *acs*, Ac-CoA sintetasa; *poxB*, piruvato oxidasa; *actP*, acetato permeasa. Figura adaptada de Wolfe, 2005.⁽⁴⁰⁾

glucosa al principio del cultivo elimina la existencia de gradientes de sustrato atribuido al deficiente poder de mezclado, en procesos en modo lote a gran escala.⁽³⁸⁾

Otro de los parámetros importantes dentro de los bioprocesos aeróbicos es la tensión de oxígeno disuelto (TOD). Los gradientes de TOD pueden estar presentes en cultivos a gran escala bajo diversas condiciones y/o estrategias de operación. En cultivos en modo lote alimentado los gradientes de oxígeno disuelto existen localmente en la zona de alimentación, a causa del evento anteriormente descrito. En cultivos en modo lote, los gradientes de TOD existen cuando se alcanzan concentraciones de biomasa menores o intermitentes a los 20 g/L.⁽³⁹⁾ La existencia de gradientes de TOD representa un problema importante ya que el comportamiento metabólico y fisiológico de las células es afectado por su continua exposición a ambientes oscilatorios de oxígeno.⁽²⁰⁾

Los gradientes de pH y temperatura y la alta producción de dióxido de carbono, también son problemas que se presentan en los bioprocesos a gran escala. Su presencia ejerce efectos negativos sobre los parámetros de crecimiento de *E. coli*, intervienen en la baja producción de los metabolitos de interés y además favorecen la producción de acetato.⁽²⁰⁾

El presente proyecto se ha enfocado en estudiar el problema de la baja disponibilidad de oxígeno y su relación con el crecimiento y la producción de metabolitos en CADC de la cepa de *E. coli* PB12.AR36, por lo que únicamente se expondrán las estrategias generales que se han implementado para su resolución.

4.3.1 Efectos de la disponibilidad de oxígeno en cultivos de *Escherichia coli*: respuesta metabólica y sistemas de regulación

En cultivos bacterianos como los de *E. coli*, pueden alcanzarse condiciones anaeróbicas cuando la demanda de oxígeno del cultivo, supera la capacidad de transferencia del gas por parte del biorreactor. En reactores de escala industrial en donde son típicos las heterogeneidades, y especialmente los diseñados para alcanzar CADC, se pueden encontrar múltiples regiones con limitaciones de oxígeno.^(20,38) Garantizar condiciones totalmente aerobias en un CADC es un reto a superar incluso a pequeña escala. Uno de los principales problemas para transferir oxígeno a un cultivo es la solubilidad del gas en agua (aproximadamente 7 mg/L a temperatura y presión ambiente).⁽⁴⁴⁾ La solubilidad del oxígeno disminuye principalmente conforme aumenta la temperatura, por la presencia de sales y por el uso de antiespumantes dentro del medio de cultivo. Adicionalmente, mientras aumenta la cantidad de biomasa, la demanda de oxígeno también aumentará.⁽³⁸⁾

En cultivos de *E. coli*, la alta disponibilidad de oxígeno es importante, ya que ambientes de microaerobiosis o de anaerobiosis generan una situación de estrés celular que activa a los genes que codifican para las distintas enzimas de la vía fermentativa y la inevitable formación de subproductos tóxicos parcialmente oxidados.⁽⁴⁵⁾ Incluso las exposiciones transitorias a ambientes anaeróbicos tan breves como de 2 segundos son perjudiciales para *E. coli*, y es el tiempo suficiente para inducir rápidamente su metabolismo fermentativo, produciendo una mezcla de ácidos orgánicos (acetato en su mayoría, también lactato, succinato y formato) y de etanol como subproductos tóxicos de desecho que pueden dañar su fisiología celular y que posteriormente pueden inhibir o reducir su

velocidad de crecimiento.^(45,46) Debido a que dichos subproductos se encuentran parcialmente oxidados, su producción representa un desperdicio de sustrato y de la energía que podría generarse por la oxidación completa de las diversas fuentes de carbono hasta CO₂ bajo condiciones totalmente aeróbicas, por lo que la generación de estos subproductos se correlaciona directamente con una baja productividad del proceso y un bajo rendimiento del producto de interés.^(38,40) Adicionalmente, la producción de acetato induce en *E. coli* una serie de respuestas como reducción en la μ (incluso en concentraciones tan pequeñas como 30 mg/L),⁽⁴⁰⁾ alteraciones en la curvatura del ADN,⁽⁴²⁾ reducción del PEP (precursor de diversos compuestos aromáticos de interés industrial),⁽⁴⁷⁾ y la reducción del pH.⁽²⁰⁾

El efecto negativo que el acetato ejerce sobre *E. coli*, es debido a que funciona como un desacoplador de la fuerza motriz de protones, por lo que eventualmente interfiere con la síntesis de ATP. El acetato, como cualquier otro ácido débil, es tóxico. A pH neutro, el acetato se presenta en su forma ionizada (CH₃COO⁻) y protonada (CH₃COOH). Esta última, debido a su alta naturaleza lipofílica, tiene la capacidad de penetrar fácilmente las membranas lipídicas. Una vez que el acetato atraviesa la membrana celular, se disocia en un protón (H⁺) y en un anión (CH₃COO⁻). El protón hace descender el pH del citoplasma, es decir lo acidifica, mientras que el anión aumenta la presión osmótica interna e interfiere con la biosíntesis de metionina. Adicionalmente, se generan en el medio, nuevas especies del acetato en su forma protonada a causa del equilibrio, causando una afluencia electroneutral neta de iones hidrógeno. El pH externo no cambiará drásticamente, puesto que en biorreactores siempre se controla y se mantiene cercano a un valor neutro por la adición constante de una base. Por otra parte, *E. coli* tiene la capacidad metabólica de consumir y oxidar parcialmente al acetato, lo cual representa una fuente potencial de energía.⁽⁴⁰⁾

El metabolismo del acetato está controlado por diferentes vías. Una vez que el piruvato (PYR) ha sido sintetizado a partir de PEP, puede ser transformado a acetil-CoA, principalmente por el complejo PYR deshidrogenasa (Pdh) codificado por *aceE*, *aceF* y *ldp* que conforman al operón *pdh*, para ser incorporado dentro del ciclo TCA y/o a la ruta del glioxilato. La vía fosfotransacetilasa - acetato cinasa (codificados por *pta* y *ackA*, respectivamente) es la encargada de fosforilar el acetil-CoA y convertirlo en acetato para que posteriormente sea excretado. Por otra parte el acetato extracelular puede ingresar a la célula a través de la acetato permeasa (codificado por *actP*) y ser convertido a acetil-CoA por medio de la acetil-CoA sintetasa (codificado por *acs*), estos dos conforman la vía *Acs* y regulan el flujo de acetato al ciclo TCA (Figura 5).⁽⁴⁰⁾

Se ha determinado que cuando se alcanzan valores menores al 10% de saturación o de TOD en cultivos de *E. coli*, este empieza a desatar una serie de cambios metabólicos en respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno, que eventualmente afectará de manera negativa a su crecimiento y fisiología celular. Por estas razones es prescindible mantener en todo momento un valor mayor a 10% de TOD para evitar la activación del metabolismo fermentativo de *E. coli* y así garantizar condiciones aeróbicas dentro del cultivo.⁽⁴⁸⁾ Las células responden a las fluctuaciones en la TOD mediante la modulación de sus vías metabólicas centrales para el flujo de carbono y energía. *E. coli* puede controlar muchas

de estas vías en respuesta a la disponibilidad de oxígeno mediante la alteración de sus niveles de expresión génica. Por ejemplo, la expresión de los genes involucrados en la utilización de oxígeno son apagados al mismo tiempo que el oxígeno está completamente ausente en el ambiente. En una forma recíproca, la expresión de los genes que codifican para vías alternas anaeróbicas del transporte de electrones, o genes que se necesitan para la fermentación, son encendidos. Muchas de estas transiciones metabólicas están controladas a un nivel transcripcional por diversos reguladores globales, entre ellos principalmente están FNR y el sistema de dos componentes ArcAB.⁽⁴⁹⁾ A continuación se detallará un poco más sobre ellos y posteriormente se expondrá brevemente sobre los diversos enfoques que se han aplicado para contender con el problema del suministro de oxígeno en cultivos celulares de *E. coli*.

4.3.1.1 FNR como regulador transcripcional global

La proteína de un componente fumarato nitrato reductasa (FNR), es el regulador transcripcional primario que media la transición del crecimiento aeróbico a anaeróbico a través de la regulación de cientos de genes. Generalmente, esta proteína activa genes involucrados en el metabolismo anaeróbico y reprime genes involucrados en el metabolismo aeróbico.⁽⁵⁰⁾ Actualmente se sabe que alrededor de 70 genes distribuidos en 31 operones pertenecen a la red reguladora génica de FNR. Muchos de esos genes están involucrados en los procesos aeróbicos y anaeróbicos: flujo de electrones a través del TCA y/o vías fermentativas; biosíntesis de pequeñas moléculas; síntesis macromolecular; y una variedad de vías para el consumo y excreción de nutrientes. Sin embargo, se ha calculado que la expresión de una tercera parte de los genes expresados durante el crecimiento en condiciones aeróbicas son alterados cuando las células de *E. coli* pasan a un estado de crecimiento anaeróbico, y que la expresión de 712 (49%) de estos genes están directa o indirectamente regulados por FNR.⁽⁴⁹⁾ Bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, la transcripción del gen *fnr* es autorregulado negativamente.⁽⁵⁰⁾

La concentración celular de FNR es similar durante el crecimiento aeróbico y anaeróbico, pero su actividad está regulada directamente por el oxígeno, por lo que FNR normalmente está inactivo bajo condiciones aeróbicas y microaeróbicas, pero es activo en condiciones estrictamente anaeróbicas.⁽⁵¹⁾ FNR contiene un grupo hierro-azufre [Fe-S] lábil al oxígeno, como elemento sensor de la anaerobiosis. Bajo estas condiciones, el grupo de FNR adquiere una forma [4Fe-4S] que causa un cambio conformacional y la dimerización de la proteína, la cual que hace que se active. Por otra parte, la presencia de oxígeno resulta en la inactivación de FNR vía oxidación de [4Fe-4S] a [2Fe-2S] que causa el desensamble del dímero. Después de la prolongada exposición al oxígeno, el grupo [2Fe-2S] es destruido. Un apo-FNR, que carece del grupo Fe-S, es la forma primaria de FNR en aerobiosis. La conformación activada de FNR es capaz de unirse a una secuencia palindrómica específica del ADN con la secuencia consenso 5'-TTGATNNNNATCAA-3'. FNR posee un dominio sensorial N-terminal, un dominio C-terminal de unión al ADN y un motivo de dimerización entre ellos. El dominio sensorial de FNR contiene cinco residuos de cisteína, de los cuales cuatro son esenciales para su ligación al grupo [4Fe-4S].⁽⁵⁰⁾

4.3.1.2 El sistema de dos componentes ArcAB

El sistema de dos componentes para el control redox anóxico AB (ArcAB), media la respuesta de *E. coli* al cambio de condiciones respiratorias, es decir, es un regulador global de la expresión génica bajo transiciones microaeróbicas a anaeróbicas. El sistema comprende a ArcB (codificada por *arcB*) un sensor de cinasa y una fosfatasa asociada a membrana, y a ArcA (codificada por *arcA*) un factor de transcripción citosólico.⁽⁵⁰⁾

La forma fosforilada y activa de ArcA (ArcA-P) actúa principalmente como un regulador transcripcional negativo bajo condiciones anaeróbicas. Arc-P regula directamente la expresión de 85 operones bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, donde 74 operones son reprimidos y 11 son activados. Arc-P reprime a los operones involucrados en el metabolismo respiratorio, es decir a los del citocromo *o* oxidasa (*cyoABCDE*) y del citocromo *d* oxidasa (*cydAB*); reprime a los genes que codifican para las enzimas pertenecientes al ciclo TCA (*sdhCDAB*, *icd*, *fumA*, *mdh*, *glta*, *acnA* y *acnB*); genes para el metabolismo del PYR y del superóxido dismutasa (*pfl* y *sodA*); enzimas de la ruta del glioxilato; y enzimas de la vía de la degradación de los ácidos grasos.^(49,50)

ArcA-P activa unos cuantos operones que codifican proteínas involucradas en el metabolismo fermentativo y también se ha identificado como un represor global de las vías oxidativas del carbono. Mediante el análisis de microarreglos se ha determinado que el sistema Arc y la red regulatoria FNR trabajan en conjunto hasta un cierto punto, involucrándose en la expresión génica. Se ha sugerido que el rol más significativo de ArcA es bajo condiciones microaeróbicas, mientras que FNR trabaja bajo condiciones estrictamente anaeróbicas y que para la expresión total del gen *arcA*, se requiere tanto de ArcA como de FNR. ArcA reprime la transcripción uniéndose directamente al promotor. Como un activador, parece ser que actúa como parte de un complejo nucleoprotéico.⁽⁵⁰⁾

El sensor de cinasa ArcB posee tres dominios citoplasmáticos: un dominio transmisor primario con un conservado residuo de histidina (His₂₉₂), un dominio central aceptor con un conservado residuo de aspartato (Asp₅₇₆) y un dominio de fosfotransferencia (Hpt) con un conservado residuo de histidina (His₇₁₇). Bajo condiciones anaeróbicas ArcB se autofosforila y transfosforila a ArcA vía cuatro pasos ArcB_{His292}-P → ArcB_{Asp576}-P → ArcB_{His717}-P → ArcA_{Asp54}-P (Figura 6). La autofosforilación de ArcB es estimulada por los inductores D-lactado, PYR y acetato. La autofosforilación de ArcB es una reacción intramolecular y requiere que el sitio de unión a ATP y el sitio de autofosforilación (His₂₉₂) estén presentes en la misma molécula de ArcB.^(50,52)

Bajo condiciones aeróbicas, la ubiquinona transportadora de electrones oxida a dos cisteínas citosólicas involucradas en los enlaces disulfuro intermoleculares (Cys₁₈₀ y Cys₂₄₁) y apaga la actividad cinasa de ArcB. La actividad cinasa de ArcB es regulada por el estado redox de la poza de menaquinonas durante la transición de condiciones microaeróbicas a anaeróbicas. Bajo condiciones aeróbicas, ArcB actúa como una fosfatasa y cataliza la desfosforilación de ArcA-P por la vía de fosforilación inversa ArcA_{Asp54}-P → ArcB_{His717}-P → ArcB_{Asp576}-P → Pi, liberándose así de su rol como regulador transcripcional. ArcB es oxidado específicamente por quinonas y es insensible al oxígeno molecular y al peróxido de hidrógeno.⁽⁵⁰⁾

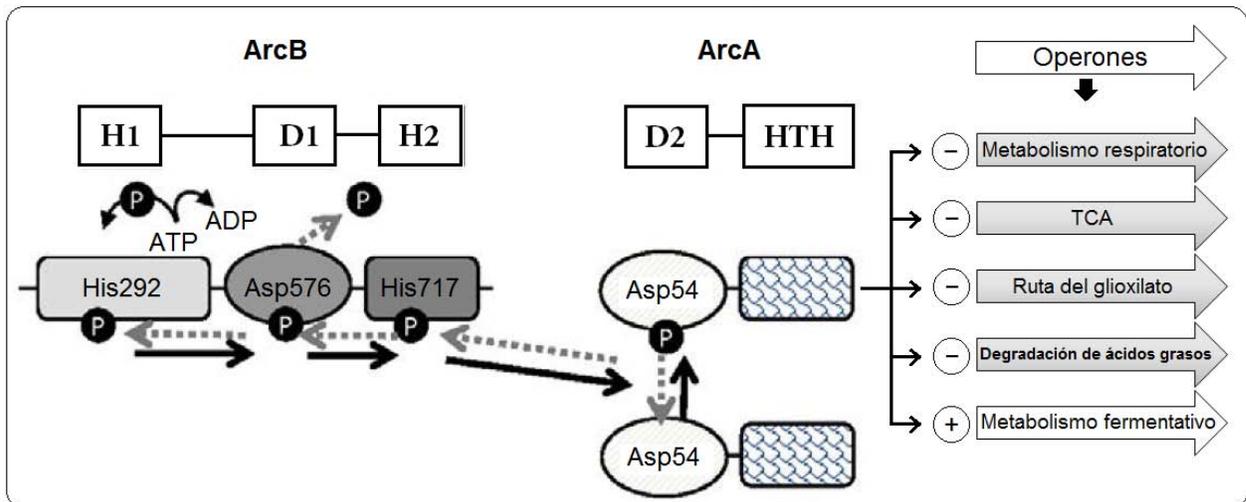


Figura 6. Mecanismo de acción del sistema de dos componentes ArcAB y su papel como regulador global de la expresión génica en *E. coli*. Principalmente, la forma activa ArcA-P regula de forma negativa la transcripción de varios operones bajo condiciones microaeróbicas de crecimiento. Las flechas sólidas indican la vía de transferencia del grupo fosforilo que resulta en ArcA-P. Las flechas punteadas representan el fosforelevo inverso que resulta de la desfosforilación de ArcA-P. (+) Indica que existe una regulación positiva y (-) indica que existe una regulación negativa hacia el operón. H1 = dominio transmisor primario; D1 = dominio receptor primario; D2 = Dominio receptor secundario; H2 (Hpt) = dominio de fosfotransferencia. Figura modificada de Georgellis *et al.*, 1997.⁽⁵²⁾

4.3.2 Estrategias aplicadas para mejorar el suministro de oxígeno en cultivos celulares

4.3.2.1 Control de procesos como estrategia para mejorar el suministro de oxígeno

En décadas pasadas, las estrategias como el control de procesos y las modificaciones genéticas/moleculares en diversos microorganismos, han sido aplicadas para mejorar la eficiencia en el suministro de oxígeno dentro de los cultivos, lo que a su vez ha permitido la generación de energía, mejorar el crecimiento celular y la producción de metabolitos.⁽⁵³⁾

Dentro de las estrategias para mejorar la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor se encuentran: reducir la temperatura del cultivo a un rango de 30 °C a 26 °C para que la bacteria crezca lentamente y tenga una baja q_{O_2} ;⁽⁵⁴⁾ mejorar la transferencia de masa a través del diseño de diferentes estrategias de mezclado;⁽⁵⁵⁾ el uso de una elevada presión de oxígeno en el biorreactor;⁽⁵⁶⁾ aumentar la tasa de aireación a través de la velocidad de agitación del biorreactor;⁽⁵⁷⁾ suministrar aire enriquecido con oxígeno puro o éste último solo;⁽⁵⁶⁾ y adicionar compuestos químicos que sirvan como vectores del oxígeno, tales como *n*-hexano, *n*-heptano y *n*-dodecano, con el objetivo de que el oxígeno sea más soluble en el caldo de cultivo.⁽⁵⁸⁾

Aun cuando todas estas alternativas cumplan parcialmente con su objetivo, suelen ser imprácticas debido a que ocasionan estrés celular o provocan incrementos en los costos de producción y el uso de energéticos.⁽⁵⁴⁾

4.3.2.2 Ingeniería metabólica para mejorar el suministro de oxígeno

Una alternativa a la sobreexpresión e inactivación de genes pertenecientes a vías metabólicas específicas, es la de manipular el flujo de carbono y nitrógeno hacia ciertas vías que así lo requieran con la aplicación de la ingeniería metabólica. Está bien documentado que los cofactores ATP/ADP (adenosina trifosfato/adenosina difosfato), NADH/NAD (nicotinamida adenina dinucleótido reducido/nicotinamida adenina dinucleótido oxidado) y acetil-CoA/CoA, son compartidos entre vías metabólicas diferentes y juegan papeles centrales en la distribución metabólica del carbono.^(53,59)

El ATP es la fuente de energía más importante para las diferentes reacciones y vías metabólicas que existen en la naturaleza. El ATP sirve ampliamente como un sustrato, producto, activador y/o inhibidor de diversas redes metabólicas. En base a estas cuatro funciones básicas, la demanda y suministro de ATP podría afectar el transporte activo, el plegamiento de péptidos, el ensamble de subunidades, la fosforilación de proteínas, la morfología celular, la transducción de señales y la respuesta a diversos factores que generen estrés. A través de estos procesos biológicos complejos, el ATP posee un papel vital en el crecimiento de los organismos para la producción de diferentes metabolitos industrialmente importantes.⁽⁵³⁾

La regeneración de ATP en los microorganismos ocurre de dos formas diferentes, mediante la fosforilación a nivel de sustrato y la fosforilación oxidativa. La fosforilación a nivel de sustrato es la formación de ATP por la transferencia de un grupo fosforilo a ADP, grupo proveniente de sustratos tales como 1,3-bifosfoglicerato o fosfoenolpiruvato; y la fosforilación oxidativa que consta de dos partes que están acopladas entre sí: una oxidativa que comprende una serie de reacciones de transferencia de electrones a partir de la oxidación de sustratos y una fosforilante, en la cual el P_i se esterifica al ADP para formar ATP (Figura 7). La manipulación de la fosforilación oxidativa parece ser el camino más eficiente para regular la concentración de ATP intracelular, debido a que, bajo condiciones aeróbicas, la mayor producción de ATP proviene de esta vía. Es concebible pensar que la disponibilidad de NADH, la cadena transportadora de electrones, el gradiente de protones, la actividad de F_0F_1 -ATPasa y el suministro de oxígeno, podrían ser blancos para manipular la disponibilidad de ATP intracelular.⁽⁵³⁾

La aplicación de la ingeniería metabólica en cepas bacterianas ha repercutido de manera importante en el aumento del metabolismo energético y subsecuente mejora en el crecimiento y en la producción de metabolitos. Por mencionar algunos ejemplos, se ha logrado aumentar la producción de proteínas recombinantes en una cepa de *E. coli* que sobre-expresa el gen *nox* de *Streptococcus pneumoniae*, que codifica para una NADH oxidasa, de esta forma el NADH es oxidado directamente a NAD^+ y agua.⁽⁶⁰⁾ Otro ejemplo de gran éxito, ha sido la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) en varios hospederos para mejorar el crecimiento y la biosíntesis de metabolitos, esto gracias a la transferencia de oxígeno a los citocromos oxidasas terminales, mediante su unión al oxígeno a bajas concentraciones extracelulares de este.^(21,22) Debido a que en el presente trabajo es de interés la expresión de la VHb por primera vez en una cepa de *E. coli* sobreproductora de SHK, a continuación se abordará el tema con detalle.

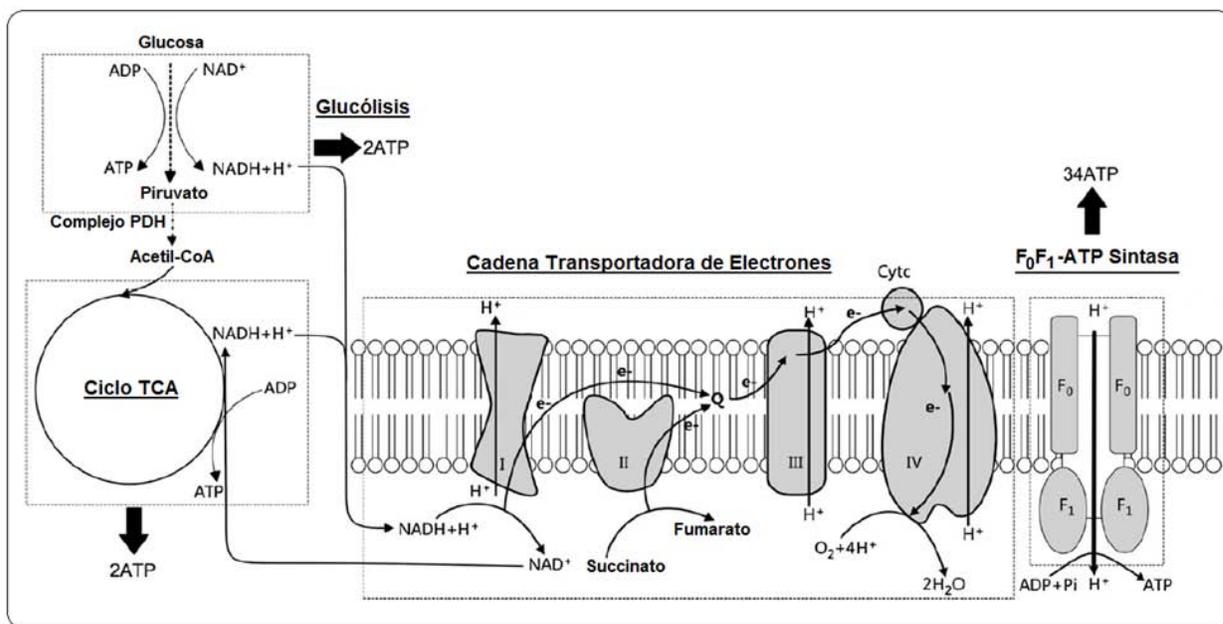


Figura 7. Fosforilación oxidativa para la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa consta de una fase oxidativa la cual comprende una serie de reacciones de transferencia de electrones a partir de la oxidación del sustrato, y la fase fosforilante la cual conduce a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , a través de la ATPasa. En *E. coli*, el flujo de electrones a través de los complejos I y IV es acompañado por un flujo de protones que parten del citoplasma hacia el espacio periplásmico. La energía electroquímica inherente en la diferencia de concentraciones de protones y separación de cargas, representa una conservación temporal de mucha de la energía originada de los electrones transportados. La energía almacenada en forma de gradiente, se denomina fuerza motriz de protones. Cuando los protones fluyen espontáneamente bajo su gradiente electroquímico, la energía electroquímica presente en el gradiente de protones conduce a la síntesis de ATP. Q = ubiquinona; I = complejo NADH deshidrogenasa; II = complejo succinato deshidrogenasa; III = complejo citocromo bc_1 ; Cyt c = transportador móvil citocromo c; IV = citocromo oxidasa. Figura modificada de Zhou *et al.*, 2009.^(30,53)

4.3.2.2.1 Bioquímica y biología molecular de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb)

Vitreoscilla stercoraria es una bacteria filamentosa Gram-negativa perteneciente a la familia *Beggiatoa* y de metabolismo estrictamente aeróbico. Puede habitar en sedimentos de agua fresca, en estiércol de vaca y en materia vegetal en descomposición, donde la disponibilidad de oxígeno es limitada.^(61,62) Para contender con las condiciones hipóxicas, *V. stercoraria* sintetiza una hemoglobina soluble (VHb) conformada por dos subunidades idénticas (homodimérica). Cada monómero está estructurado por 146 residuos de aminoácidos con una masa molecular relativa de 15,775 Da, posee un dominio simple y contiene un grupo hemo *b* (Figura 8).

En su hospedero nativo, la síntesis de la hemoglobina es promovida cuando el organismo crece en ambientes hipóxicos. La secuenciación de aminoácidos y su alineación y comparación con otras globinas de animales y plantas, han demostrado que la VHb tiene una homología estructural con varias hemoglobinas eucarióticas, pero difiere de otras en la región N-terminal y en que carece de una hélice-A. La VHb muestra una secuencia de homología máxima del 24% con respecto a la leghemoglobina de *Lupin sp.*, mientras que la homología con la cadena α y β , que estructuran a la hemoglobina humana, es tan solo del 11% por cadena.⁽⁶¹⁾

Comparada con otras hemoglobinas, la VHb posee una constante de asociación al oxígeno promedio (k_{on}) de $78/\mu\text{Ms}$, mientras que su constante de disociación/liberación del oxígeno (k_{off}) es de $5600/\text{s}$, y esta última es ciento de veces más grande que las de otras globinas. La constante k_{on} refleja una moderada afinidad por el oxígeno, pero su k_{off} que es mucho más grande, le permite a la hemoglobina liberar al oxígeno más rápidamente que muchas otras hemoglobinas. Esta k_{off} inusualmente alta se correlaciona de manera correcta con su función propuesta de transferir el oxígeno a su hospedero en condiciones limitadas de oxígeno, especialmente para mejorar la respiración.⁽⁶³⁾ Estudios de inmunolocalización en *V. stercoraria* y en *E. coli* que expresan el gen *vgb* (441 pb), indican que la VHb tiene una localización citoplásmica (no periplásmica), justo por debajo de la membrana plasmática, esto permitiría una mejora en el consumo de oxígeno y de la actividad del ubiquinol oxidasa de las membranas respiratorias. Estas características le permitirían a la VHb la interacción con el oxígeno y su entrega a los citocromos oxidasa terminales.⁽⁶⁴⁾

La estructura del monómero de la VHb, aunque está conformada por el clásico plegamiento tres-sobre-tres característico de las globinas, posee sitios hemo distal y proximal distintos de las hemoglobinas eucarióticas y carece de una apropiada hélice E y E7 para la entrada y salida de los ligandos. Una rotación de 90° del anillo de imidazol perteneciente a la histidina proximal en F8 (HisF8), resulta en una única red de enlaces de hidrógeno involucrando la interacción Fe-HisF8-GluH23-TyrG5 que determina el potencial redox y la estructura electrónica del hierro (Fe) hémico. La región D del monómero de la VHb, carece de una estructura ordenada y definida, la cual impone una alta flexibilidad estructural a esta región. Se han determinado las posiciones de los residuos de aminoácidos Asp₄₄, Arg₄₇ y Glu₄₉ que son específicos y pertenecientes a la región D de la VHb. Estos residuos de aminoácidos forman una vuelta pronunciada hacia el hemo, la cual favorece la interacción globina-hemo. La alta flexibilidad estructural de la región D puede permitirle a la VHb interactuar con varias proteínas asociadas (citocromos o y d, flavin reductasa, oxigenasas, OxyR, FNR y quizás otras), y por ende, puede involucrarse en una gran variedad de funciones celulares.^(21,65-67)

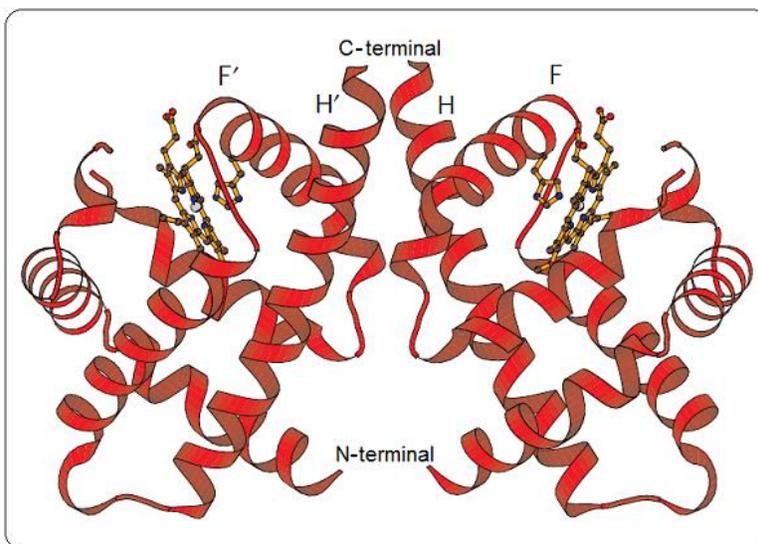


Figura 8. Estructura cuaternaria de la VHb. Cada monómero de la VHb está conformado por 146 residuos de aminoácidos. Se indican sus extremos C-terminal y N-terminal, además se muestran los dos grupos hemo *b* (en color naranja) y el anillo de imidazol perteneciente al residuo de histidina proximal His85(F8) que se coordina con el hierro hémico. Figura modificada de Tarricone *et al.*, 1997.⁽⁶⁵⁾

4.3.2.2.2 FNR, ArcA y CRP como reguladores positivos transcripcionales para la biosíntesis de la VHb

Los primeros trabajos de investigación sobre *V. stercoraria* mostraron que la expresión de la VHb es inducida bajo condiciones limitadas de oxígeno. Estudios posteriores demostraron que la regulación estimulada por el oxígeno era transcripcional y que este modo de regulación opera en su hospedero nativo *V. stercoraria* y de forma similar en el hospedero heterólogo *E. coli*, éste último cuando expresa el gen *vgb* bajo el control de su promotor nativo.⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾

Se ha reportado que el promotor nativo de la VHb, posee secuencias de unión para los reguladores globales FNR, ArcA, así como para CRP (Figura 9).^(62,69) Las dos primeras son proteínas que censan la disponibilidad de oxígeno en el medio y por lo tanto son activas en condiciones microaeróbicas y anaeróbicas. En *E. coli*, la inducción del promotor nativo de la VHb es maximizado bajo condiciones microaeróbicas, a niveles por debajo del 2% de saturación de oxígeno. Sin embargo, los niveles de transcripción del gen *vgb* disminuyen significativamente conforme se trasciende a condiciones anaeróbicas.⁽⁶⁸⁾ Para obtener la máxima transcripción de *vgb* se requiere que ambos sistemas FNR y ArcA sean funcionales, mientras que la inducción a bajas concentraciones de oxígeno requiere al menos de uno de estos dos inductores.⁽⁶²⁾

El papel de CRP también ha sido de relevancia para obtener la máxima inducción del promotor nativo del gen *vgb*.⁽⁶⁹⁾ Anteriormente (secciones 4.3.1.1 y 4.3.1.2), se han abordado los papeles fundamentales que ejerce la proteína FNR y el sistema de dos componentes ArcAB en la regulación génica de *E. coli* cuando se le somete a condiciones que trascienden de las aeróbicas a las anaeróbicas. Por lo que en esta sección únicamente se discutirá de forma resumida el papel que ejerce CRP en la regulación génica de *E. coli*.

El regulador transcripcional CRP (proteína receptora de AMPc), regula la expresión de alrededor de 180 genes en *E. coli*. Entre algunos ejemplos de los operones y genes que regula CRP están: los genes relacionados con el catabolismo de la galactosa (operón *galETK* y el gen *galS*), el catabolismo del acetato (gen *acs*) y algunos genes del TCA. Muchos de estos genes están involucrados en el catabolismo de fuentes de carbono secundarios a la glucosa, ya que esta es la fuente de carbono preferida por *E. coli*. La expresión de CRP es positiva y negativamente autorregulada.

CRP funciona como un dímero que se une al AMPc para formar el complejo CRP-AMPc, que regula la iniciación de la transcripción mediante su unión a la secuencia simétrica consenso de ADN 5'-TGTGATCTAGATCACA-3', localizada cerca o dentro de las regiones promotoras. En promotores dependientes de CRP, esta activa la transcripción de los genes mediante el contacto directo proteína-proteína con la ARN polimerasa. La represión catabólica dependiente de AMPc juega un papel importante en la regulación del consumo de otros azúcares.⁽⁵⁰⁾

El sistema PTS es capaz de modular coordinadamente las concentraciones de AMPc y de los inductores intracelulares que controlan la represión catabólica en *E. coli*. El mecanismo de control inicia cuando la proteína efectora, en este caso la enzima IIA^{Glc} del

sistema PTS, se encuentra desfosforilada cuando la glucosa está presente en el medio; en este estado la proteína se une a varias permeasas no PTS, inhibiendo el consumo de azúcares secundarios o azúcares no PTS. Cuando no existe glucosa en el medio, el componente IIA^{Glc} se mantiene principalmente en su forma fosforilada. La proteína IIA^{Glc}-P regula positivamente a la enzima adenilato ciclasa, induciendo su actividad biosintética de convertir el ATP a AMPc. Bajo estas circunstancias la concentración de AMPc se incrementa e interacciona con el dímero CRP; este complejo CRP-AMPc se encarga de inducir los genes que están bajo represión catabólica.⁽⁵⁰⁾

La caracterización de la región promotora nativa de la VHb, ha demostrado que también posee una región de significativa homología con la secuencia de unión al complejo CRP-AMPc, que es similar a la secuencia encontrada en la región promotora del operón *lac* de *E. coli*. Se ha evaluado la actividad de la región promotora de la VHb en mutantes *crp*⁻ y *cya*⁻, y se ha determinado que la formación del complejo funcional CRP-AMPc es requerida para inducir al promotor bajo un nivel de actividad normal y esto se ha relacionado con la observación de que cuando existe glucosa en el medio, también existe una disminución en la producción de la VHb en *E. coli*, debido a que la presencia de glucosa en el medio de cultivo hace disminuir los niveles de AMPc intracelulares.⁽⁶⁹⁾

Se ha reportado que el reemplazo de la secuencia débil Crp por la inserción de una secuencia fuerte CRP en el promotor nativo alrededor de las -100 pb corriente arriba del codón de inicio del gen *vgb* (Figura 9), aumenta los niveles de producción de la VHb en un 25%, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas, esto en comparación a las células de *E. coli* que expresaban la VHb bajo su promotor nativo.⁽⁷¹⁾ De esta forma, queda claro que CRP puede regular positivamente la transcripción y subsecuente producción de la VHb en *E. coli*.

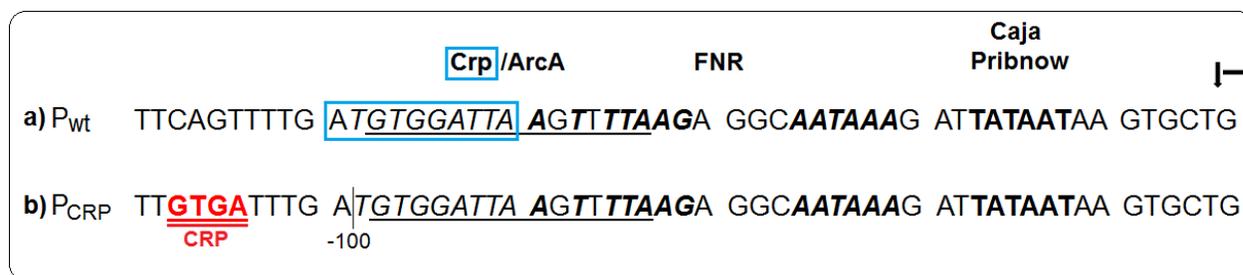


Figura 9. Secuencia de la región promotora nativa (P_{wt}) del gen *vgb* que codifica para la VHb y su comparación con la secuencia de un promotor modificado (P_{CRP}). a) letras en negritas: caja pribnow; letras subrayadas: presuntiva secuencia ArcA; en itálicas (no en negritas): presuntiva secuencia Crp; en itálicas y en negritas: presuntiva secuencia Fnr. La flecha vertical indica el inicio transcripcional. La flecha horizontal indica la dirección de la transcripción. La presuntiva secuencia débil Crp del promotor nativo, tiene fuerte similitud con la secuencia Crp del operón *lac* de *E. coli* (se indica encerrado dentro de un rectángulo azul) y posee un 73% de identidad con la secuencia consenso ArcA de *E. coli*, la presuntiva secuencia ArcA tiene fuerte similitud a la secuencia consenso ArcA de *E. coli* y la presuntiva secuencia FNR tiene una similitud significativa con la secuencia consenso FNR así como la capacidad de unirse a la proteína FNR. **b)** Se ha reportado que la inserción de una secuencia fuerte CRP (se indica con un doble subrayado) alrededor de las -100 pb corriente arriba del codón de inicio del gen *vgb*, aumenta la producción de proteína en un 25% en condiciones aeróbicas como microaeróbicas, esto en cultivos de *E. coli*.^(62,69,71)

4.3.2.2.3 Mecanismo de acción de la VHb

Se ha estudiado el efecto de la expresión de la VHb en células de *E. coli* a las cuales, de forma independiente, se les ha eliminado el complejo citocromo *o* (oxidasa aeróbica terminal) y citocromo *d* (oxidasa microaeróbica terminal). Los resultados indicaron que existe un aumento de 5 veces la actividad del citocromo *o* (para la mutante *cyd*⁻, cepa *cyo*⁺) y un ligero aumento de 1.5 veces la actividad del citocromo *d* (para la mutante *cyo*⁻, cepa *cyd*⁺), esto en comparación a las actividades de los citocromos de la células control.⁽⁷²⁾ A partir de este resultado y en base a las observaciones de los parámetros energéticos de las células de *E. coli* que expresaban la VHb, Kallio *et al.*, 1994,⁽⁷³⁾ formuló la hipótesis que hasta ahora es la más aceptada sobre su mecanismo de acción: la VHb actúa como una fuente adicional de oxígeno, aumenta la concentración intracelular de oxígeno disuelto en condiciones microaeróbicas extracelulares, y el incremento de la TOD intracelular aumenta la actividad de los complejos citocromos *o* y de los citocromos *d*; la actividad específica del citocromo *o* se elevará más rápidamente que la actividad del citocromo *d*. Este evento causará un aumento en la eficiencia del bombeo de protones. Como la mayor función de la extrusión de protones es la de generar ATP cuando estos reingresan al citoplasma vía ATPasa, el aumento en la eficiencia del bombeo de protones resulta en un incremento en la eficiencia de la síntesis de ATP (Figura 10). Este modelo está respaldado por varias investigaciones sobre el metabolismo energético en *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.^(73,74)

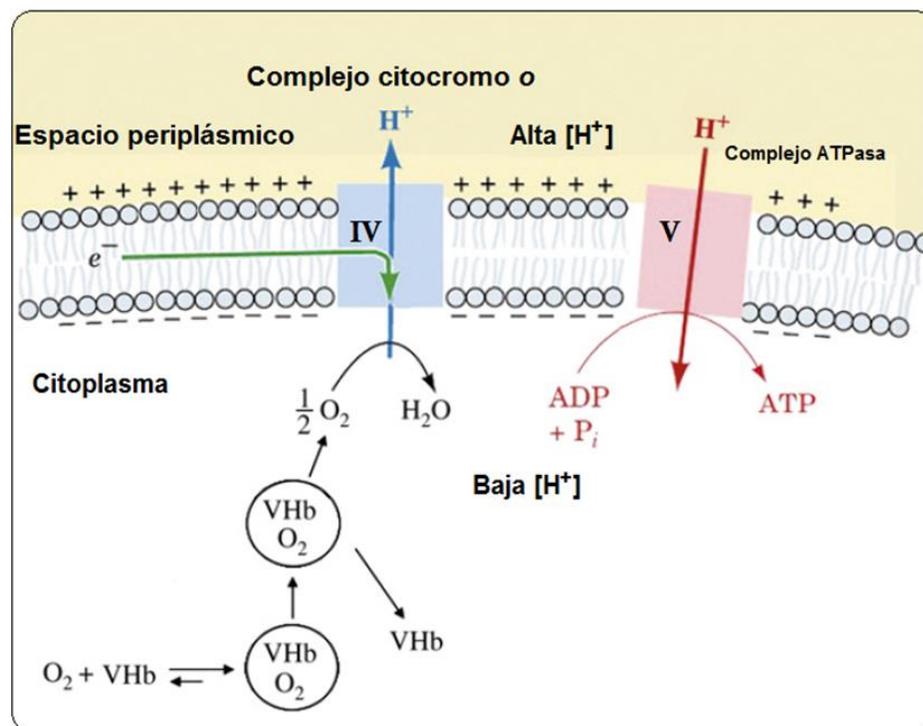


Figura 10. Mecanismo de acción propuesto para la interacción entre la VHb y el complejo de citocromos para promover el metabolismo aeróbico y energético. Se indican los complejos citocromo *o* oxidasa (IV) y ATPasa (V). Figura modificada de Zhang *et al.*, 2007.⁽²²⁾

El complejo citocromo *o* es caracterizado por su alta actividad translocadora de protones por molécula de oxígeno reducido (H^+/O) que la del complejo citocromo *d*, es decir, mientras el complejo citocromo *o* es capaz de extrudir dos protones por molécula de oxígeno reducido, el complejo citocromo *d* no tiene la capacidad de extrudir protones, puesto que no funciona como una bomba de protones.⁽⁷⁵⁾ Se ha documentado que las células de *E. coli* que expresan la VHb poseen una alta eficiencia del bombeo de protones por el complejo citocromo *o*, por lo que presentan un alto gradiente transmembranal de protones y un alto rendimiento de protones translocados por molécula de oxígeno reducido, cuando se les compara con los valores de las células control.^(72,73)

Se ha demostrado que una mutante de *E. coli* carente de ambos complejos citocromos (doble mutante *cyo⁻ cyd⁻*), es capaz de crecer en condiciones aeróbicas utilizando succinato o lactato como fuentes de carbono, postulando que, además de facilitar el acarreo y entrega de oxígeno principalmente al complejo citocromo *o*, probablemente la VHb por sí misma trabaje como una oxidasa terminal,⁽⁷⁶⁾ función que explicaría la gran cantidad de protones translocados por molécula de oxígeno reducido y que formarían parte del alto gradiente transmembranal característico de las células que expresan la VHb. Las observaciones anteriormente descritas correlacionan perfectamente con el aumento del 30% de la actividad de ATPasa y un aumento de la producción de ATP que sigue la misma magnitud, por parte de las células de *E. coli* que expresan la VHb, en comparación de las que no la expresan.^(73,77)

Con base en los antecedentes arriba descritos, se investigó el efecto que ejerce la VHb sobre el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria en *E. coli*. Este estudio reveló que existía un nivel intracelular de NADH 1.8 veces menor en las células que expresaban la VHb, en comparación de las que no la expresaban, esto bajo condiciones microaeróbicas de crecimiento.⁽⁷⁸⁾ Se concluyó que las células de *E. coli* que expresaban la VHb, estaban en un estado más reducido, presentando una alta actividad de la cadena transportadora de electrones aún en condiciones limitadas de oxígeno y como consecuencia se sugirió que estos efectos podrían alterar de manera pronunciada el flujo de carbono dentro de las vías metabólicas centrales de *E. coli*.⁽⁷⁹⁾ Posteriormente, mediante un modelo que analiza el flujo metabólico del carbono, se sugirió que las células que expresan la VHb dirigen una alta fracción de la glucosa hacia la PPP y canalizan menos acetil-CoA hacia el TCA.⁽⁸⁰⁾ El flujo adicional de glucosa hacia la PPP puede generar una excesiva cantidad de NADPH que puede resultar en una reacción de transhidrogenación, la cual puede crear un flujo de H^+ de NADPH a NAD^+ , razón por la cual se sugiere que la expresión de la VHb, mantiene a *E. coli* en un estado más reducido que oxidado.^(79,80)

4.3.2.2.4 Aplicación de la VHb en ingeniería metabólica

En un intento de resolver el problema del suministro de oxígeno en los cultivos microbianos, Khosla *et al.*, 1988, 1990,^(81,82) expresó la VHb en *E. coli* y encontró que mediante su expresión, el crecimiento y la producción de proteínas fueron mejoradas en condiciones microaeróbicas. Desde su primer uso en 1990 para mejorar la producción de α -amilasa en *E. coli*,⁽⁸³⁾ la expresión de la VHb en varias especies bacterianas modificadas mediante estrategias convencionales de ingeniería genética, ha sido hasta la fecha una estrategia exitosa ampliamente usada para mejorar la producción de una variedad de bioproductos, estimular la biorremediación y aumentar el crecimiento y supervivencia de estos hospederos aún en condiciones limitadas de oxígeno.^(21,22)

Algunas de las aplicaciones en donde la expresión de la VHb ha sido correlacionada con el aumento de la producción de biomoléculas, en comparación a la producción de sus cepas parentales, incluyen: el aumento del 29.5% en la producción del antibiótico rifamicina B por *Amycolatopsis mediterranei* en condiciones bajas de aireación;⁽⁸⁴⁾ el aumento del 30% en la producción del ácido poli- γ -glutámico (biomolécula usada en una amplia variedad de aplicaciones comerciales) por *Bacillus amyloliquefaciens*, esta mejora fue correlacionada con la expresión de la VHb, a partir del gen *vgb* que fue integrado de forma estable en el cromosoma de su hospedero;⁽⁸⁵⁾ el aumento del 17% en la producción de L-arginina por *Corynebacterium crenatum*;⁽⁸⁶⁾ el aumento del 27% en la producción de goma gellan por *Sphigomonas elodea*;⁽⁸⁷⁾ al aumento del 175% en la producción del antifúngico natamicina por *Streptomyces gilvosporeus*;⁽⁸⁸⁾ y el aumento del 210% en la producción del antifúngico y anticancerígeno toyocamicina por *S. diastatochromogenes*.⁽⁸⁹⁾ Por mencionar solo un ejemplo en relación a la mejora del crecimiento, se ha reportado que la expresión de la VHb en una cepa de *E. coli* PTS⁻, mejoró la generación de biomasa en un 33% y 11% cuando se le evaluó en cultivos con 25 y 50 g/L de glucosa, respectivamente.⁽⁹⁰⁾

V. Planteamiento del problema

El SHK es utilizado como materia prima para la síntesis química del fármaco OSP, un eficiente inhibidor de la enzima superficial neuraminidasa de los diferentes virus que causan la influenza. Hasta la fecha, Roche la farmacéutica que lo comercializa bajo el nombre de Tamiflu[®], extrae SHK a partir de las plantas del género *Illicium*. Se ha estimado que la capacidad de producción de SHK, y por ende la de Tamiflu[®], sería insuficiente para cubrir a la población mundial en caso de presentarse un brote severo de influenza. La producción fermentativa de SHK mediante cepas de *E. coli* modificadas metabólicamente es la aproximación ideal para producir este metabolito a escalas industriales, en un tiempo relativamente corto y a un precio competitivo.^(10,12)

Los CADC son el sistema preferido para la obtención de metabolitos tanto autólogos como heterólogos en *E. coli*. Sin embargo, los CADC a pequeña y gran escala operados en modo lote o modo lote alimentado, alcanzan progresivamente un régimen de crecimiento limitado de oxígeno, condición que hace disminuir el crecimiento celular, el título y rendimiento de metabolitos, y la productividad del bioproceso.^(20,38,39)

Se ha reportado que en cultivos de la cepa de *E. coli* PB12.AR36 sobreproductora de SHK, se pueden alcanzar altas densidades celulares de hasta 60 g/L para cultivos en modo lote alimentado y alrededor de 20 g/L para cultivos en lote.^(91,92) La biomasa máxima alcanzada en cultivos de la cepa PB12.AR36 está directamente ligada con la concentración de YE que se emplee al inicio del cultivo, por lo que es probable obtener densidades celulares superiores.⁽⁹¹⁾ El conjunto de estos sistemas y condiciones de crecimiento puede limitar la máxima biomasa y producción de SHK que se puede lograr con la cepa de *E. coli* PB12.AR36.

La construcción de una cepa derivada de *E. coli* PB12.AR36 que sintetice la VHb, puede ser una estrategia de ingeniería metabólica que le permita ser más robusta ante las condiciones de crecimiento limitadas de oxígeno características en CADC, puesto que se ha demostrado que la expresión de la VHb en diferentes hospederos, mejora su metabolismo aeróbico y energético.^(21,22) De esta forma se podría maximizar la capacidad productora de SHK de esta cepa.

VI. Hipótesis

La expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* en la cepa *Escherichia coli* PB12.AR36 mejorará su metabolismo aeróbico y esto se reflejará en la mejora de su crecimiento así como en la producción de shikimato y la disminución de la síntesis de acetato.

VII. Objetivo general

Generar cepas derivadas de *E. coli* PB12.AR36 que expresen con diferente fuerza la hemoglobina de *V. stercoraria* y evaluar su efecto en cuanto a los perfiles cinéticos de crecimiento, producción de shikimato y producción de acetato en cultivos con altas concentraciones de glucosa y extracto de levadura, esto en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento.

7.1 Objetivos particulares

- Construcción de un vector compatible en la cepa PB12.AR36, que tenga clonado el gen *vgb* bajo el control de su promotor nativo oxígeno-dependiente y que posteriormente sea transformado en la cepa de interés.
- Construcción de un segundo vector compatible en la cepa PB12.AR36, que tenga clonado el gen *vgb* bajo el control del promotor fuerte CRP y que posteriormente sea transformado en la cepa de interés.
- Evaluar la capacidad de crecimiento, consumo de glucosa, producción de shikimato y producción de acetato de la cepa PB12.AR36 y de sus derivadas que expresan la hemoglobina de *V. stercoraria*, en biorreactores escala laboratorio en modo lote usando medio mineral con altas concentraciones de glucosa (120 g/L) y extracto de levadura (45 g/L), y en condiciones aeróbicas ($\geq 20\%$ de TOD) y microaeróbicas ($< 5\%$ de TOD) de crecimiento.
- Discutir los perfiles cinéticos de crecimiento, producción de shikimato y producción de acetato como consecuencia de la expresión del gen de hemoglobina de *V. stercoraria* en las cepas derivadas de PB12.AR36.

VIII. Materiales y Métodos

8.1 Cepas y plásmidos

La cepa de *E. coli* PB12.AR36 forma parte de la colección de cepas productoras de shikimato que se han construido en el laboratorio del Dr. Francisco G. Bolívar Zapata, del Instituto de Biotecnología, UNAM. La cepa TOP10 se obtuvo de manera comercial.

Los plásmidos pUC8:16 y pNKD1 que contienen la secuencia del gen *vgb* que codifica para la VHb, fueron donados amablemente por el Profesor Benjamin C. Stark del Illinois Institute of Technology, en Chicago. El plásmido pACYC184 se obtuvo de manera comercial.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos utilizados en este trabajo.

| Cepas | Características | Referencias |
|--|--|--------------|
| <i>E. coli</i> PB12.AR36 | Tc ^R . JM101 ($\Delta ptsHlcr$ $\Delta aroK$ $\Delta aroL$ $\Delta lacI$ $\Delta pykF$) + pTrcAro6 (Trc/ <i>aroB</i> ⁺ <i>tktA</i> ⁺ <i>aroG</i> ^{fbr+} <i>aroE</i> ⁺ <i>aroD</i> ⁺ <i>zwf</i> ⁺) | (16) |
| <i>E. coli</i> PB12.AR36/ pACYC _{wt} <i>vgb</i> | Tc ^R y Cm ^R . PB12.AR36 + pACYC _{wt} <i>vgb</i> . | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> PB12.AR36/ pACYC _{CRP} <i>vgb</i> | Tc ^R y Cm ^R . PB12.AR36 + pACYC _{CRP} <i>vgb</i> . | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> PB12.AR36/ pACYC184 | Tc ^R y Cm ^R . PB12.AR36 + pACYC184. | Este trabajo |
| <i>E. coli</i> Top10 | Cepa competente a eficiencias altas. Especializada para la propagación, clonación y construcción de plásmidos. | Invitrogen |
| Plásmidos | Características | Referencias |
| pUC8:16 | Cb ^R . Derivado de pUC8, tiene clonado un fragmento de 1.4 Kb de ADN de <i>V. stercoraria</i> conteniendo el gen <i>vgb</i> bajo el control de su promotor nativo oxígeno-dependiente ($P_{wt} = P_{Crp/ArcA/Fnr}$). | (68,70) |
| pNKD1 | Cb ^R . Derivado de pBlueScript, tiene clonado un fragmento de ADN que contiene el gen <i>vgb</i> , bajo el control del promotor nativo modificado mediante la inserción de una secuencia fuerte CRP (P_{CRP}) a -100 pb corriente arriba del codón de inicio, el cual permite su expresión en condiciones aerobias. Una cepa de <i>E. coli</i> transformada con este plásmido produce alrededor de 25% más VHb que una cepa transformada con el plásmido pUC8:16, tanto en condiciones aeróbicas como microaeróbicas. | (71) |
| pACYC184 | Cm ^R y Tc ^R . Diseñado con el origen de replicación P15A para coexistir en células con plásmidos del grupo ColE1 (p. ej., pBR322, pUC8, pTrcAro6). 18 copias por célula. | (37) |
| pACYC _{wt} <i>vgb</i> | Cm ^R . Derivado de pUC8:16, posee el origen de replicación P15A de pACYC184 y tiene clonado el gen <i>vgb</i> bajo el control del promotor P_{wt} . 18 copias por célula. | Este trabajo |
| pACYC _{CRP} <i>vgb</i> | Cm ^R . Derivado pNKD1, posee el origen de replicación P15A de pACYC184 y tiene clonado el gen <i>vgb</i> bajo el control del promotor P_{CRP} . 18 copias por célula. | Este trabajo |

Cb^R, Cm^R y Tc^R: contienen genes que confieren de resistencia a los antibióticos carbenicilina, cloranfenicol y tetraciclina, respectivamente.

8.2 Técnicas de ingeniería genética

8.2.1 Preparación de células electro-competentes de *E. coli*

Una asada proveniente de un stock de glicerol de la cepa de interés (partes iguales del cultivo saturado de la cepa de interés con glicerol estéril al 80%, congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), se inoculó en 5 mL de medio YENB contenido en un tubo de 16 x 150 mm y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 250 rpm durante toda una noche. Se determinó la DO_{600} y se realizó el cálculo para obtener el volumen de cultivo necesario para inocular 50 mL de medio YENB, contenido en un matraz baffleado de 500 mL, esto para iniciar aproximadamente a una DO_{600} de 0.05. Las células se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 250 rpm por el tiempo necesario para alcanzar una DO_{600} de entre 0.5 – 0.9. Posteriormente el matraz se incubó en hielo durante 15 minutos y los 50 mL de cultivo se traspasaron a un tubo cónico estéril de la misma capacidad, el cual se centrifugó a 8,000 rpm, durante 5 minutos y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una ultracentrifuga marca Thermo Scientific previamente enfriada. El sobrenadante obtenido se decantó y la pastilla de células se resuspendió y lavó con 10 mL de agua milli-Q estéril y se centrifugó con las mismas condiciones que en el paso anterior. Bajo las mismas condiciones de lavado y centrifugación, se realizaron dos lavados más con 10 mL de agua milli-Q y después un lavado con 10 mL de glicerol al 10% estéril. Las células se traspasaron a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se realizaron dos lavados más con 1 mL de glicerol al 10%. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 μL de glicerol y se repartieron alícuotas de 50 μL en tubos eppendorf de 600 μL que posteriormente se congelaron en hielo seco y se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador.

8.2.2 Transformación bacteriana

A 50 μL de células electro-competentes de *E. coli* contenidas en un tubo Eppendorf estéril, se le agregaron de 100-200 ng de ADN plasmídico, la mezcla se agitó ligeramente en vórtex y se dejó incubando en hielo durante 1 minuto. Pasado este tiempo, el contenido se transfirió a una celda de electroporación marca Bio-Rad con capacidad de 50 μL previamente enfriada y se hizo electroporar utilizando un electroporador marca Eppendorf modelo 2510 a 1800 volts. Posteriormente las células se recuperaron en medio SOC a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 250 rpm durante 3 horas.

8.2.3 Extracción y purificación de ADN

- **Miniprep por lisis alcalina**

Para la verificación de los plásmidos construidos, el ADN plasmídico se extrajo mediante el método de miniprep por lisis alcalina que permite la recuperación de ADN plasmídico sin ADN genómico. A partir de un cultivo saturado de *E. coli* en medio Luria-Bertani (LB), se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un tubo eppendorf de la misma capacidad y se centrifugó a 13,000 rpm en una microcentrifuga marca Eppendorf durante 1 minuto y una vez transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante. La pastilla de células resultante se lavó con 1 mL de solución SET fría, se le dio vortex hasta resuspendarla completamente, después se centrifugó a las mismas rpm y se desechó el sobrenadante.

Se agregaron 150 μ L de solución SET y 5 μ L de RNasa y se resuspendió la pastilla mediante vórtex. Se agregaron 350 μ L de la solución II, el tubo se mezcló por inmersión de 5 a 6 veces y se incubó en hielo al menos durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 250 μ L de la solución III fría, el tubo se mezcló por inmersión y se incubó nuevamente en hielo durante 15 minutos. El tubo se centrifugó durante 5 minutos y posteriormente se recuperó únicamente el sobrenadante resultante en un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 650 μ L de isopropanol, se agitó por inversión 6 veces, se centrifugó durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se agregó 1 mL de etanol al 70% directamente a la pastilla, se le dio vórtex vigoroso hasta suspenderla completamente, se centrifugó durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla resultante se secó en un concentrador, marca Eppendorf modelo 5301, al vacío y a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se resuspendió la pastilla en 50 μ L de agua milli-Q estéril.

Soluciones usadas en este método.

SET: Sacarosa 20%, Tris-HCl 0.05 M y EDTA 0.05 M ajustado a pH 8.0.

RNasa: RNasa 1% (Ribonucleasa A pancreática bovina), acetato de sodio 100 mM y EDTA 0.3 mM.

Solución II: Se preparó individualmente y al momento de usar, mezclando partes iguales de SDS 2% y NaOH 0.4 N.

Solución III: CH₃COONa anhidro 3 M ajustado a pH 4.8 con ácido acético glacial.

- **Kits de purificación de ADN**

Los productos de amplificación obtenidos por PCR se purificaron usando el kit Thermo Scientific GeneJET PCR, mientras que los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión de los productos de PCR y de plásmidos, se purificaron mediante el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction, como lo describen los fabricantes.

Por otra parte, los plásmidos construidos, de los cuales se secuenciaron únicamente los fragmentos de ADN clonados, se purificaron mediante el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

8.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones de PCR llevadas a cabo, se utilizó la polimerasa “KAPA HiFi DNA Polymerase” (KAPABIOSYSTEMS) de alta fidelidad (1 error por cada 3.6×10^6 nucleótidos incorporados). Los diferentes oligonucleótidos utilizados (Tabla 1), las diferentes mezclas de reacción de PCR (Tabla 2) y los componentes utilizados para cada mezcla de reacción (Tabla 3), se muestran a continuación:

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| N° | Nombre | Secuencia |
|------------------|---------------------------------------|---|
| 1 ^(a) | P _{CRP} v _{gb} _fwd | 5'-GGT <u>CGAC</u> AGAATTCGGGGTTAAAAGTATTTGTGATTTGATCACAATTA-3' |
| 2 ^(a) | P _{wt} v _{gb} _fwd | 5'-GGT <u>CGAC</u> GTGGATTAAGTTTTAAGAGGCAATAAAG-3 |
| 3 ^(b) | v _{gb} _rvs | 5'-GACTGGATCCTTATTC AACCGCTTGAGCGTAC-3' |
| 4 | pACYCv _{gb} _fwd | 5'-AGCACTGTCCGACCGCTTTG-3' |
| 5 | pACYCv _{gb} _rvs | 5'-TCATATGTGCGGCGACGATAG-3' |

Las secuencias de bases subrayadas indican: el sitio de restricción para las enzimas (a) *SalI* y (b) *BamHI*.

Tabla 3. Distintas mezclas de reacción preparadas para las diferentes reacciones de PCR.

| Reacción de PCR | ADN templado | Oligonucleótidos | Tamaño (pb) |
|-----------------|--------------------------------------|------------------|-------------|
| A | pNKD1 | 1 y 3 | 590 |
| B | pUC8:16 | 2 y 3 | 557 |
| C | pACYC _{CRP} v _{gb} | 1 y 3 | 590 |
| D | pACYC _{wt} v _{gb} | 2 y 3 | 557 |

Tabla 4. Composición de las mezclas para PCR.

| Componente | Volumen por reacción de 50 µL | Concentración final |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Buffer Mg ²⁺ 5X (10 mM) | 10 µL | 1X (2mM) |
| Mezcla de dNTP's 10 mM | 1.5 µL | 0.3mM |
| Oligo Forward 10 µM | 1.0 µL | 0.2µM |
| Oligo Reverse 10 µM | 1.0 µL | 0.2µM |
| ADN plasmídico | 0.1 – 1 ng | --- |
| ADN polimerasa 1U/µL | 1.0 µL | 1U |
| Agua grado PCR | Cuanto baste para 50 µL | --- |

Para el proceso de amplificación, las mezclas de reacción se incubaron en un Termociclador Thermal Cycler C1000™ marca BIO-RAD en tres etapas:

1. Un ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
2. 25 ciclos de amplificación, cada uno con paso de desnaturalización (98 °C durante 20 segundos), alineamiento (dependiendo de la mezcla de reacción: 30 °C para las mezclas A y C, 62 °C para B y D) y polimerización (72 °C durante 1 min).
3. Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 2 minutos.

8.2.5 Reacción de digestión con endonucleasas de restricción y reacción de ligación

Para la construcción y comprobación de los vectores multicopia, los diferentes plásmidos utilizados y productos de PCR generados, se digirieron con enzimas de restricción. Las enzimas que se utilizaron fueron *Sall* y *Bam*HI, estas dos de la marca Thermo Scientific y utilizadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para la construcción de los nuevos plásmidos a partir de la digestión de productos de PCR y digestión de otros plásmidos, se utilizó la T4 DNA ligasa de la marca Thermo Scientific de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

8.2.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la selección en el proceso de generación de productos de PCR, reacciones de digestión, ligación y construcción de los nuevos plásmidos, se corrieron las muestras de ADN en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), a 110 volts en una cámara para electroforesis durante 1.5 horas y posteriormente visualizados en un fotodocumentador GelDoc™ XR + Imaging system marca Bio-Rad. Para el proceso de purificación en gel de las digestiones de los productos de PCR y digestiones de plásmidos, se corrieron las muestras en gel de agarosa al 0.8%, a 60 volts y durante 3 horas aproximadamente. Para hacer la carga de las muestras de ADN dentro del gel de agarosa, se utilizó buffer de carga azul de bromofenol 6X, es decir, para hacer la carga de 6 µL de muestra de ADN, se hizo mezclar con 1 µL del buffer 6X. Para la determinación subjetiva de los tamaños de los fragmentos de ADN generados, se corrieron las muestras a la par de un marcador de peso molecular (MPM).

8.2.7 Síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de ADN

La síntesis química de los oligonucleótidos se llevó a cabo mediante el método de fosfitotriéster en fase sólida, mientras que la secuenciación de los fragmentos de ADN clonados se realizó por el método de Sanger. Ambas se realizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

8.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

8.3.1 Medios de cultivo

A continuación, se describen los medios de cultivo utilizados (fórmula por litro):

Caldo Luria-Bertani (LB): triptona (10 g), extracto de levadura (5 g) y NaCl (5 g).

Medio LB sólido: Caldo LB más agar agar bacteriológico (15 g).

Medio bajo en sales YENB: extracto de levadura (7.5 g) y caldo nutritivo (8 g).

Medio SOC: triptona (20 g), extracto de levadura (5 g), NaCl (0.58 g), KCl (0.186 g), MgSO₄ (1.2 g), MgCl₂ (2 g) y glucosa (3.6 g).

Composición nutricional del Bacto™ extracto de levadura (autolizado de *Saccharomyces cerevisiae*): péptidos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, cloruro de sodio, otros cloruros, fosfatos, sulfatos, calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro (55.3 µg/gramo de extracto de levadura).

8.3.2 Condiciones de crecimiento y aislamiento de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* manejadas en nuestro laboratorio, se hacen crecer rutinariamente en medio LB. Para aislar las colonias de *E. coli* que tuvieron una exitosa transformación, se utilizaron diversos antibióticos como marcadores de selección, esto de acuerdo a los genes de resistencia a antibióticos presentes en los diferentes plásmidos. Para aislar células transformadas con los plásmidos, se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos (se indican las concentraciones finales en medio LB): Cb 100 µg/mL, Cm 30 µg/mL y Tc 30 µg/mL. Los cultivos en medio sólido se hicieron crecer a 37 °C en una incubadora marca Yamato modelo IC100W, y a 37 °C y 250 rpm en una incubadora/agitadora de piso marca New Brunswick Scientific Serie 25 para cultivos en medio líquido contenidos en matraces baffleados o en tubos de ensaye con tapón.

8.3.3 Composición del medio de producción

El medio de producción de SHK (ajustado a pH 7.0 con NaOH 10N) contiene por litro: K₂HPO₄ (7.5 g), KH₂PO₄ (7.5 g), ácido cítrico monohidratado (2.1 g), citrato de amonio férrico (0.3 g), H₂SO₄ concentrado (1.2 mL), MgSO₄ (0.64 g), CaCl₂ (0.06 g), (NH₄)₆(Mo₇O₂₄) (0.0037 g), ZnSO₄ (0.0029 g), H₃BO₃ (0.0247 g), CuSO₄ (0.0025 g), MnCl₂ (0.0158), CoCl₂ (0.00129 g), clorhidrato de tiamina (0.001 g) y betaína (0.234 g) como osmoprotector. Se añadió también Tc (30 µg/mL) y/o Cm (30 µg/mL) a inóculos y cultivos para el mantenimiento de plásmidos, dependiendo de la cepa que se maneja. El medio mineral se enriqueció con glucosa (esterilizada en autoclave) y YE (adicionado antes de esterilizar en autoclave) a las concentraciones requeridas para cada experimento. La glucosa en polvo fue obtenida de JT Baker (USA) y el Bacto™ YE de BD Difco (USA).

8.3.4 Preparación de inóculos en matraces agitados

La preparación de los inóculos empezó mediante una asada, proveniente de gliceroles de las cepas de interés, a matraces baffleados de 500 mL con 50 mL del medio mineral o de producción suplementado con glucosa (25 g/L) y YE (15 g/L). Los inóculos fueron crecidos a 37° C y 250 rpm hasta la mitad de la fase exponencial (aproximadamente a 7 DO₆₀₀ obtenidas después de 20 horas de incubación y agitación), donde se transfirió aproximadamente el 4% del volumen final a los biorreactores previamente preparados con medio de producción.

8.3.5 Cultivos en biorreactores

Se llevaron a cabo cultivos en modo lote, al menos por duplicado, utilizando jarras de vidrio autoclavables de 1 L (Applikon, Países Bajos), trabajados con un volumen de 500 mL de medio de producción con 120 g/L de glucosa y suplementado con 45 g/L de YE. Los biorreactores fueron conectados a un controlador Applikon ADI 1010 para monitorear la temperatura, el pH, la velocidad de agitación y la TOD. La temperatura se mantuvo a 37 °C durante el transcurso de los cultivos. El pH se mantuvo en 7.0 mediante la adición automática de las soluciones de H₃PO₃ (3.33%) y NH₄OH (10%) preparadas con agua milli-Q estéril. La TOD dentro del medio de cultivo se mantuvo mediante la adición constante de aire filtrado, 1 volumen de aire por volumen de líquido por minuto (vvm) o hasta 2 vvm en caso de que se requiriera, y controlando la velocidad del impulsor (de 500 hasta 1200 rpm) para asegurarse que en cultivos aeróbicos la TOD se mantuviera por un valor arriba del 20% en todo momento. Para los cultivos microaeróbicos que simulan el ambiente heterogéneo de oxígeno típico de un bioproceso a pequeña y gran escala, estas condiciones se lograron conforme la densidad y la tasa de respiración celular dentro del cultivo aumentaban, por lo que sólo en este caso se mantuvo el flujo de aire en 1 vvm y una velocidad de agitación constante de 500 rpm. Los fermentadores fueron inoculados con aproximadamente el 4% del volumen final de trabajo del biorreactor, inóculos provenientes de los preparados previamente en matraces agitados. Todas las fermentaciones empezaron aproximadamente en 0.3 DO₆₀₀. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en presencia de Tc (30 µg/mL) y/o Cm (30 µg/mL), dependiendo de la cepa que así lo requiriera. Las muestras se tomaron en tubos eppendorf de manera periódica. Una vez determinadas las DO₆₀₀ de las muestras tomadas, estas fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 3 minutos y los sobrenadantes fueron almacenados a -20 °C para la posterior cuantificación de metabolitos.

8.3.6 Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular se midió al cuantificar la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en un espectrofotómetro DU[®]70 marca Beckman (USA). Se realizaron diluciones 1:2, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 cuando fue necesario, esto para obtener lecturas alrededor de 0.5 y no más de 0.8 DO₆₀₀. Las diluciones y el blanqueo de las muestras se realizaron con agua destilada/desionizada (agua milli-Q).

8.3.7 Cuantificación de metabolitos extracelulares

Se realizaron diluciones 1:2, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200, de los sobrenadantes de cada muestra con agua milli-Q, para que los valores obtenidos entraran dentro de las curvas de calibración de cada metabolito (Anexo 2). Las muestras diluidas se filtraron con membranas de nylon de 0.45 µm. Se determinaron las concentraciones de SHK, acetato y glucosa por HPLC mediante un sistema Waters (bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, y detectores de índice de refracción 2410 y arreglo de diodos 996, USA) equipado con una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm; 9 µm, BioRad, USA). El sistema fue controlado por el software para cromatografía de Waters denominado

Empower 2. La fase móvil utilizada fue compuesta de H₂SO₄ 5 mM con flujo de 0.5 mL/min, mantenido a 50 °C.

8.4 Cálculos

8.4.1 Cálculo de la concentración de biomasa

Para el cálculo de la concentración de biomasa (X) en este trabajo, se usó la curva de calibración que previamente se había determinado para la cepa PB12.AR36,⁽¹⁶⁾ y cuya ecuación es:

$$X \text{ (g/L)} = 0.3587 * DO_{600}$$

donde 0.3587 es el factor de conversión y DO₆₀₀ es el valor de densidad óptica a 600 nm medida por el espectrofotómetro.

8.4.2 Cálculo de las concentraciones reales de biomasa, glucosa, shikimato y acetato

Las concentraciones medidas de biomasa y metabolitos fueron normalizados al volumen inicial para tomar en cuenta los cambios de volumen como consecuencia de la adición automática de las soluciones para el control de pH dentro de los cultivos. Se midió el volumen de ácido más base adicionado al cultivo en el tiempo x (V_{tx}) y se sumó al volumen inicial de trabajo (500 mL de medio cultivo). Con estos datos se puede calcular el factor de dilución (FD) en base a la siguiente ecuación:

$$FD = \frac{500 \text{ mL} + V_{tx}}{500 \text{ mL}}$$

A partir de los factores de dilución determinados, se puede calcular las concentraciones reales de biomasa, glucosa, SHK y acetato, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración real (g/L)} = \text{Concentración medida} * FD$$

8.4.3 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica crecimiento (μ) se determinó al ajustar linealmente la concentración de biomasa con respecto al tiempo durante la fase exponencial de crecimiento con la ecuación $\ln X = \ln X_0 + \mu * t$, y que al despejar μ se obtiene:

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t \text{ (h)}}$$

donde $\ln X$ es el logaritmo natural de la biomasa en un punto de tiempo dentro de la fase exponencial de crecimiento, $\ln X_0$ es el logaritmo natural de la concentración inicial de biomasa en el tiempo 0 y t es el tiempo en la cual se alcanza X. Los valores de μ calculados mostraron valores de coeficiente de correlación (R^2) superiores a 0.97.

8.4.4 Cálculo del rendimiento shikimato/glucosa

El rendimiento de SHK a partir de glucosa ($Y_{SHK/Glc}$) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Y_{SHK/Glc} (\text{mol}_{SHK}/\text{mol}_{Glc}) = \frac{\text{mol SHK}}{\text{mol Glc}}$$

donde mol_{SHK} representa la mayor concentración de moles de SHK producidos en un punto de tiempo definido y mol_{Glc} representa los moles de Glc consumidos dentro del mismo tiempo.

8.4.5 Cálculo de la productividad volumétrica de shikimato y de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato

La productividad volumétrica global de SHK ($Q_{Pglobal}$) se calculó con la ecuación:

$$Q_{Pglobal} (\text{gSHK}/\text{L}^*\text{h}) = \frac{[SHK]}{t(\text{h})}$$

donde [SHK] indica el título o la concentración máxima de SHK alcanzada y t el tiempo en la cual se alcanzó.

La velocidad volumétrica global de consumo de Glc ($Q_{Sglobal}$) se calculó con la ecuación:

$$Q_{Sglobal} (\text{gGlc}/\text{L}^*\text{h}) = \frac{[Glc]}{t(\text{h})}$$

donde [Glc] son los gramos totales de Glc consumidos por litro de medio y t es el tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración de SHK.

8.4.6 Cálculo de los rendimientos de biomasa/sustrato y producto/biomasa

Se llevaron a cabo linearizaciones para obtener rendimientos aparentes de biomasa sobre sustrato y producto sobre biomasa. Aunque estos rendimientos aparentes no toman en cuenta el consumo de YE, los cálculos permiten hacer comparaciones entre ellos.

El rendimiento aparente de biomasa a partir de sustrato ($Y_{X/S}$) se calculó con la ecuación:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{exp}}{[Glc]_{exp}}$$

donde X_{exp} es la biomasa máxima obtenida en fase de crecimiento exponencial y [Glc] es la concentración de glucosa consumida durante la misma fase de crecimiento.

El rendimiento aparente de producto a partir de biomasa ($Y_{P/X}$) se calculó con la ecuación:

$$Y_{P/X} = \frac{[SHK]_{exp}}{X_{exp}}$$

donde [SHK] es la concentración de SHK obtenida en la fase exponencial de crecimiento.

8.4.7 Cálculo de la productividad específica y de la velocidad específica de consumo de sustrato

$Y_{X/S}$ y $Y_{P/X}$ se usaron para calcular la productividad específica y la velocidad específica de consumo de sustrato en fase exponencial (q_{Pexp} y q_{Sexp} , respectivamente) con las siguientes ecuaciones:

$$q_{Pexp} \text{ (gSHK/gDCW*h)} = Y_{P/X} * \mu$$
$$q_{Sexp} \text{ (gGlc/gDCW*h)} = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$$

donde q_{Pexp} expresa los gramos de SHK producidos por gramo de biomasa en peso seco celular (gDCW) durante una hora de cultivo (gGlc/gDCW*h) y q_{Sexp} expresa los gramos de Glc consumidos por gramo de peso seco celular durante una hora de cultivo (gGlc/gDCW*h), estos en la fase exponencial de crecimiento.

La productividad volumétrica y la velocidad volumétrica de consumo de Glc en fase estacionaria (q_{Psta} y q_{Ssta} , respectivamente) se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$q_{Psta} \text{ (gSHK/gDCW*h)} = \frac{[SHK]_{sta}}{X_{prom} * t(h)}$$
$$q_{Ssta} \text{ (gSHK/gDCW*h)} = \frac{[Glc]_{sta}}{X_{prom} * t(h)}$$

donde [SHK] y [Glc] son los gramos de SHK y Glc, producidos y consumidos, respectivamente, durante la fase estacionaria, X_{prom} es la biomasa promedio y t es el intervalo de tiempo dentro de la misma fase de crecimiento.

Los datos experimentales provenientes de dos experimentos independientes se promediaron y se presentaron en gráficas, donde las barras de error indican la desviación estándar para cada punto.

8.5 Construcción de los plásmidos para la expresión de la VHb y transformación de la cepa de *E. coli* PB12.AR36

Para la construcción del vector de expresión pACYC_{CRP}v_{gb}, el gen *vgb* bajo el control del promotor con la secuencia fuerte CRP, fue amplificado a partir del plásmido pNKD1 (Tabla 1). El amplicón generado contiene sitios de restricción en sus extremos para las enzimas *Bam*HI y *Sal*I. El plásmido pACYC184 se utilizó como receptor para la clonación del gen *vgb*. Este plásmido contiene dos genes que confieren resistencia a los antibióticos cloranfenicol (Cm) y tetraciclina (Tc). Dentro de la secuencia de este último, se ubican los mismos sitios de restricción para *Bam*HI y *Sal*I (Figura 11). El fragmento lineal obtenido de la mezcla A de PCR (Tabla 3) y el vector pACYC184 se digirieron, de forma independiente, con las enzimas de restricción correspondientes para formar dos distintos fragmentos de ADN lineales con extremos adherentes que coinciden para la reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa.

Para el rastreo de ligaciones de ADN, se utilizaron como hospedero las células TOP10 de *E. coli*. Mediante la técnica de electroporación, se transformó la reacción de ligación

en células TOP10 electro-competentes, las cuales se recuperaron en medio SOC y posteriormente se inocularon en placas de medio LB con Cm (30 µg/mL). Después de incubarse, se escogieron al azar 10 colonias, las cuales se inocularon en una placa de LB con Tc (30 µg/mL). Las clonas positivas seleccionadas fueron aquellas que presentaron una resistencia al antibiótico Cm, pero no a Tc, puesto que durante el proceso de digestión y clonación, el gen que confiere resistencia a Tc dentro de pACYC184, se interrumpe. Para el análisis del patrón de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos construidos y confirmación por PCR de los fragmentos clonados de ADN, se visualizaron los tamaños de los fragmentos de ADN generados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para la construcción del vector de expresión pACYC_{wt}*vgb*, el gen *vgb* bajo el control de su promotor nativo, fue amplificado a partir del plásmido pUC8:16 (Tabla 1). El mismo procedimiento para el aislamiento del segundo vector plasmídico, fue similar al arriba descrito para pACYC_{CRP}*vgb*, solo que en este caso el ADN lineal usado fue el proveniente de la mezcla B de PCR (Tabla 3).

Para la construcción del vector pACYC_{CRP}*vgb*, el uso del par de oligonucleótidos 1 y 3 (Tabla 2) en la reacción A de PCR (Tabla 3), permite obtener la secuencia completa y reportada del promotor con la secuencia fuerte CRP (Figura 9). Por otra parte, para la construcción del vector pACYC_{wt}*vgb*, mediante mutagénesis sitio-dirigida con el uso de los oligonucleótidos 2 y 3 (Tabla 2), se puede obtener una mutación puntual que cambia una T por una C dentro de la secuencia Crp, mutación ubicada específicamente a -100 pb corriente arriba del codón de inicio. Esto se realizó con el propósito de disminuir la afinidad de la secuencia Crp por el complejo CRP-AMPc, puesto que la secuencia débil Crp con la mutación puntual generada ACGTGGATTA, hace disminuir su similitud con la secuencia Crp ATGTGGATTA ubicada dentro de la región promotora nativa del gen *vgb* (Figura 9). Los oligonucleótidos 4 y 5 (Tabla 2) se utilizaron para secuenciar los fragmentos de ADN clonados dentro de pACYC184. De esta manera se verificó la obtención de las correctas secuencias esperadas para el gen *vgb* y para ambas regiones promotoras (Anexo 1).

Una vez obtenidos los vectores y verificadas las secuencias clonadas, de forma independiente, se transformaron los tres plásmidos (pACYC184, pACYC_{CRP}*vgb* y pACYC_{wt}*vgb*) en células electro-competentes de la cepa PB12.AR36 previamente preparadas. Las células se dejaron recuperar en medio SOC durante 3 horas y posteriormente se inocularon en placas de LB con Tc (30 µg/mL) y Cm (30 µg/mL). Se prepararon cultivos saturados de las diferentes colonias aisladas en caldo LB con las mismas concentraciones de los antibióticos usados previamente (esto con el objetivo de mantener los plásmidos) y por último se prepararon soluciones stock de gliceroles de las diferentes cepas obtenidas, para su posterior evaluación de crecimiento y producción de metabolitos principalmente en cultivos con biorreactores escala laboratorio en modo lote usando medio mineral con 120 g/L de glucosa y suplementado con 45 g/L de YE. La cepa de *E. coli* PB12.AR36 y sus derivadas, de ahora en adelante, por simplicidad, serán llamadas como AR36, AR36/pACYC184, AR36/pACYC_{CRP}*vgb* y AR36/pACYC_{wt}*vgb*.

IX. Resultados y discusión

9.1 Construcción de los plásmidos pACYC_{CRP}*vgb* y pACYC_{wt}*vgb*

Muchos de los trabajos de ingeniería metabólica sobre la expresión de la VHb en diferentes hospederos, se han enfocado en expresar constitutivamente a la proteína, utilizando principalmente promotores inducibles de alta fuerza con inductores no metabolizables y que no dependen de la concentración de oxígeno extracelular, esto para obtener su máxima expresión y actividad desde el principio del cultivo.^(84,85,87) Así como se han usado vectores multicopia para expresar un gran número de copias del gen y por consecuencia de la proteína, también se ha integrado el gen *vgb* dentro del cromosoma de varios microorganismos, garantizando la estabilidad de las cepas modificadas.^(85,88)

Tomando en cuenta que la cepa PB12.AR36 funciona en base a un vector multicopia de gran tamaño (11,837 pb) que expresa constitutivamente los genes codificantes para las enzimas que dirigen el flujo de carbono hacia la síntesis de SHK, se decidió expresar el gen *vgb* a través de un vector que fuera independiente de pTrcAro6. El plásmido pACYC184 posee el origen de replicación del miniplásmido PA15 y puede ser replicado dentro de las células de *E. coli* que contengan otros plásmidos con replicones diferentes, como los del grupo ColE1.^(36,37) El vector pTrcAro6 se deriva del plásmido pBR322, por lo que también posee el replicón ColE1. De esta manera la clonación del gen *vgb* dentro del vector pACYC184 y su posterior transformación en la cepa de interés, garantiza la coexistencia estable de ambos plásmidos dentro del mismo hospedero.

Es así como a partir de pACYC184, se generaron dos distintos plásmidos con las siguientes características: los dos vectores construidos poseen el replicón PA15; contienen un gen de resistencia a Cm para favorecer la selección de las clonas transformadas y el mantenimiento de los plásmidos; al igual que su vector parental, deberían estar presentes en 18 copias por célula; y contienen el gen *vgb* que codifica para la VHb bajo el control de promotores similares pero no iguales, ambos inducibles con reguladores globales naturales propios de *E. coli* (Figura 11), lo cual evita el uso de inductores no metabolizables como el IPTG que pueden causar efectos deletéreos en la fisiología bacteriana y sus altos costos generan un gasto adicional e impiden el uso de estas cepas en cultivos industriales.

El vector pACYC_{CRP}*vgb* tiene clonado el gen *vgb* bajo el control de un promotor con la inserción de una secuencia fuerte CRP, por lo que el control positivo transcripcional de *vgb* debe quedar principalmente a expensas del complejo CRP-AMPc en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, y secundariamente por FNR y ArcA en condiciones microaeróbicas de crecimiento. El vector pACYC_{wt}*vgb* tiene clonado el gen *vgb* bajo el control de su promotor nativo oxígeno-dependiente con una mutación puntual dentro de la secuencia Crp que cambia una T por una C, resultando en una baja afinidad de esta secuencia por el complejo CRP-AMPc (sección 8.5). La regulación transcripcional positiva de *vgb* también debería ser favorecida por FNR y ArcA en condiciones microaeróbicas.

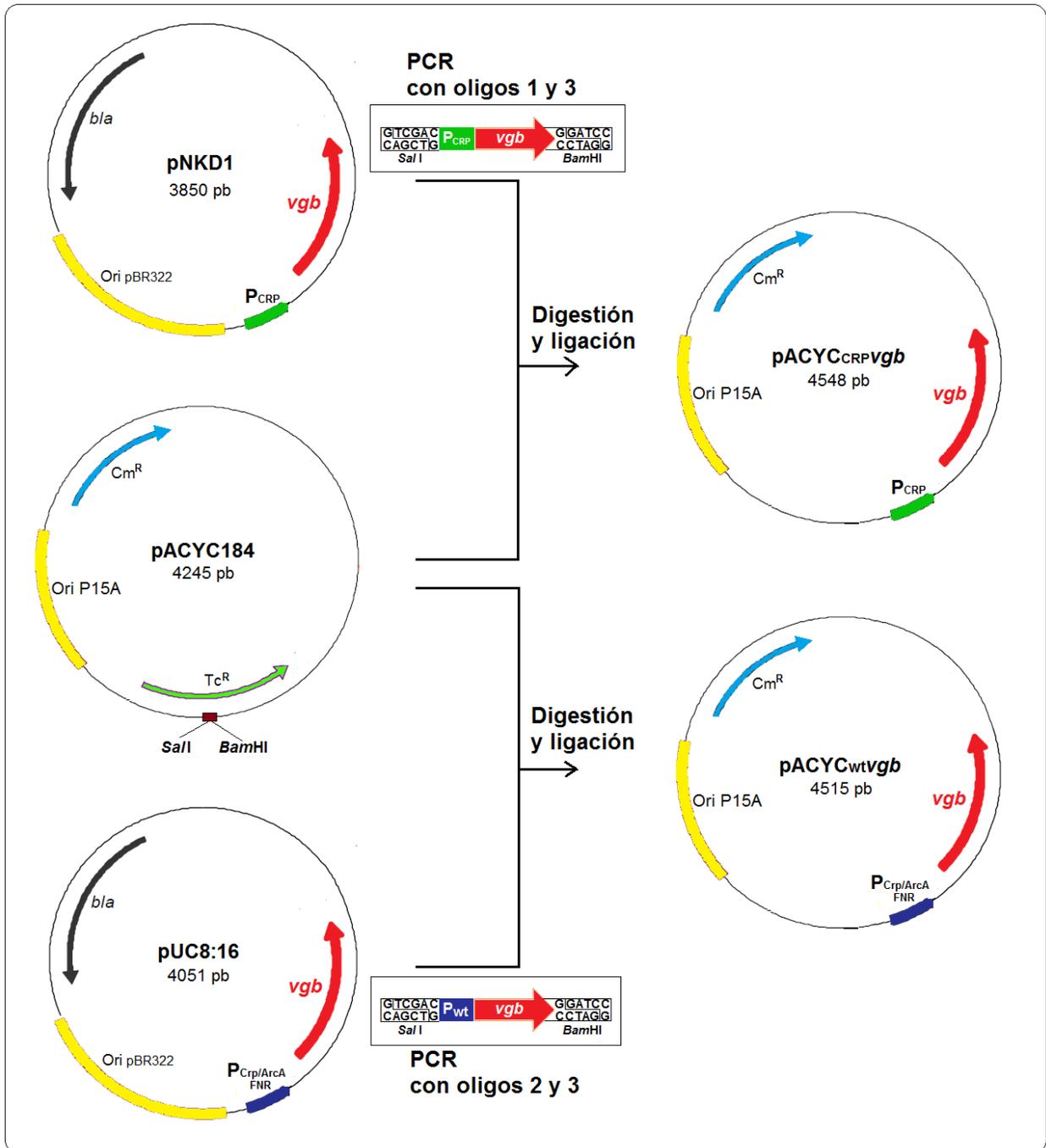


Figura 11. Esquema simplificado de los pasos que fueron requeridos para la construcción de los vectores que tienen clonado el gen *vgb* que codifica para la Vhb. El vector pACYC_{wt}v_{gb} derivado de pUC8:16, contiene el gen *vgb* bajo el promotor nativo oxígeno-dependiente que posee las secuencias de unión a Crp, ArcA y FNR (P_{Crp/ArcA/FNR}). El vector pACYC_{CRP}v_{gb} derivado de pNKD1, contiene el mismo gen, pero bajo el control del promotor modificado debido a una inserción de una secuencia fuerte CRP (P_{CRP}). Los nuevos vectores contienen el sistema de replicación proveniente del miniplásmido PA15, por lo que pueden coexistir en células con plásmidos del grupo ColE1. La cepa PB12.AR36 esta transformada con el vector pTrcAro6 el cual es un plásmido perteneciente al mismo grupo. Las secuencias Crp y CRP denotan la afinidad débil y fuerte, respectivamente, que poseen para el complejo regulador CRP-AMPc.

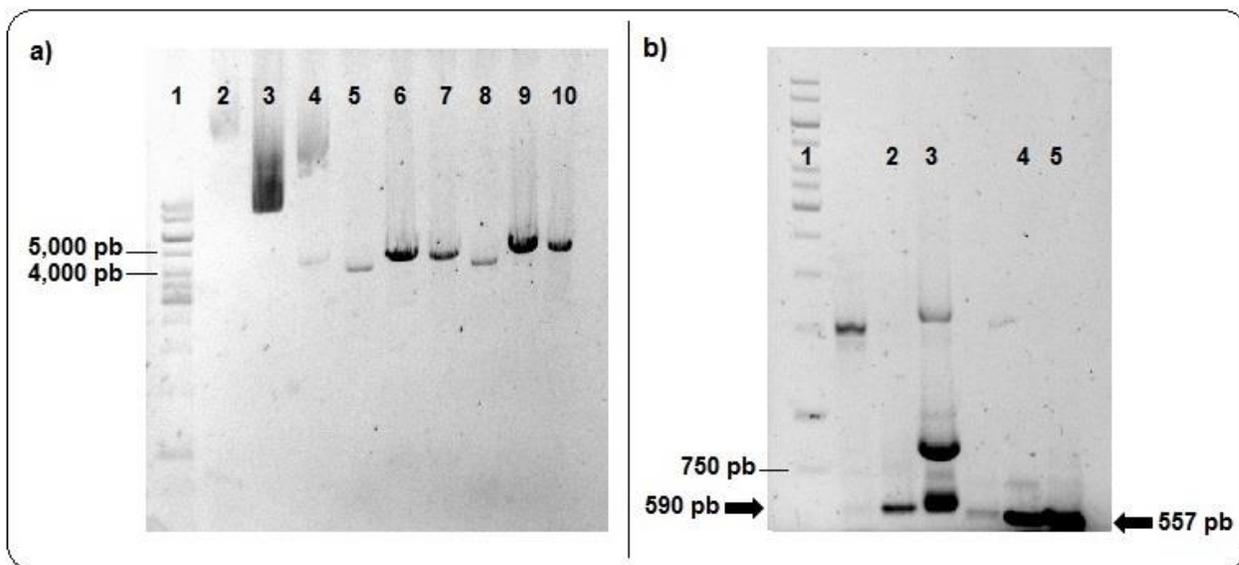


Figura 12. Comprobación de las clonaciones por patrones de restricción y PCR. a) **Patrones de restricción.** Carril 1 = MPM; 2, 3 y 4 = pACYC184, pACYC_{CRP}vgb y pACYC_{wt}vgb sin digerir, respectivamente; 5, 6 y 7 = mismos plásmidos en el mismo orden, digeridos con *Bam*HI; 8, 9 y 10 = mismos plásmidos en el mismo orden, digeridos con *Sall*. b) **PCR's.** Carril 1 = MPM; 2 = PCR de pNKD1 (control +, mezcla A); 3 = PCR de pACYC_{CRP}vgb (mezcla C); 4 = PCR de pUC8:16 (control +, mezcla B); 5 = PCR de pACYC_{wt}vgb (mezcla D), (consultar Tabla 3).

En primer lugar, a través de patrones de digestión con las enzimas de restricción manejadas, se aseguró que se obtuvieran los tamaños esperados para los nuevos plásmidos. De forma independiente se llevaron a cabo digestiones de pACYC184 y de los dos vectores derivados de este. Mediante electroforesis en gel de agarosa se pudo observar que los tamaños de los nuevos vectores eran más grandes con respecto al tamaño de su plásmido parental (Figura 12), lo que concuerda con los tamaños esperados de 4,515 y 4,548 pb para pACYC_{wt}vgb y pACYC_{CRP}vgb, respectivamente, en comparación con las 4,245 pb del plásmido original pACY184 (Figura 11).

Posteriormente, se realizó PCR a los plásmidos aislados con las mismas condiciones manejadas para los controles pNKD1 y pUC8:16, con el objetivo de determinar la presencia de los fragmentos de ADN clonados. Se obtuvieron amplicones con el mismo tamaño que las de los controles positivos, es decir de 590 y 557 pb para pACYC_{CRP}vgb y pACYC_{wt}vgb, respectivamente (Figura 12).

Las muestras de los plásmidos aislados se purificaron y se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos 4 y 5 (Tabla 2). Los fragmentos clonados dentro de pACYC184 para la construcción de los vectores pACYC_{wt}vgb y pACYC_{CRP}vgb, poseen las secuencias nucleotídicas correctas esperadas de acuerdo a los resultados de su secuenciación, incluso la mutación puntual descrita (sección 8.5) para la región promotora del gen *vgb* en el vector pACYC_{wt}vgb (Anexo 1).

9.2 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa de *E. coli* PB12.AR36 evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento

La cepa AR36 al igual que las cepas derivadas de esta, se evaluaron en cultivos aeróbicos en modo lote usando medio de producción con 120 g/L de glucosa y suplementado con 45 g/L de YE, las cuales son condiciones con concentraciones de sustratos más altas que las usadas por Rodríguez *et al.*, 2013.⁽¹⁶⁾ De la misma forma, se evaluaron las mismas cepas bajo las mismas condiciones nutricionales pero en condiciones microaeróbicas de crecimiento, con el fin de conocer el impacto de la expresión de la VHb sobre el crecimiento y la producción de metabolitos bajo estas condiciones.

La evaluación de la cepa AR36 en las condiciones aeróbicas de cultivo (Figura 13a), parece tener un comportamiento metabólico similar al originalmente reportado para cultivos aeróbicos de la cepa AR36 con 100 g/L de glucosa y 30 g/L de YE, es decir, la glucosa fue consumida totalmente y la cantidad de biomasa generada, alrededor de 19 g/L, fue similar a la predicha, puesto que se ha determinado que la cantidad de YE utilizada en cultivos de la cepa AR36 esta correlacionada con la concentración de biomasa que puede alcanzarse.⁽¹⁶⁾ Además, no se detectó el efecto de sobreflujo metabólico como consecuencia de utilizar excesivas concentraciones de glucosa al inicio del cultivo de la cepa AR36, lo que sugiere que aún existe un eficiente direccionamiento del carbono hacia la vía del SHK.

De igual manera, no se detectó una producción considerable de acetato durante la fase de crecimiento exponencial, de hecho, la pequeña cantidad de acetato producida en esta fase (alrededor de 3.6 g/L) fue consumida en horas posteriores. Este mismo comportamiento ya ha sido observado en cultivos de la cepa AR36 realizados por Rodríguez *et al.*, 2013,⁽¹⁶⁾ estudio en el cual se determinó que el consumo de acetato producido después de algunas horas de cultivo se atribuye a la característica de una cepa PTS⁻ que es capaz de co-utilizar simultáneamente diversas fuentes de carbono a causa de la falta de represión catabólica que normalmente, en una cepa silvestre de *E. coli*, es ejercida por la presencia de PTS. Adicionalmente, en el mismo estudio se demostró que la alta expresión de los genes *actP* y *acs* en fase exponencial favoreció el consumo de acetato acumulado en los cultivos aeróbicos de la cepa AR36.⁽¹⁴⁾ En base a estos resultados, y en base al mismo comportamiento de la cepa AR36 observado en este trabajo, se sugiere que el consumo de acetato acumulado durante las primeras horas de cultivo se debe probablemente a las mismas razones anteriormente descritas.

Sin embargo, la capacidad de poder metabolizar el acetato extracelular de la cepa AR36, parece haber desaparecido en fase estacionaria. Este comportamiento se ha relacionado con la baja transcripción de los genes *actP* y *acs* en esta fase de crecimiento, comportamiento que también ha sido detectado previamente en cultivos de la cepa AR36.⁽¹⁶⁾ Esto es de esperarse, puesto que los genes *acs* y *actP* forman parte del operón *acs*, el cual su inducción en condiciones aeróbicas y en fase exponencial de crecimiento depende del factor de transcripción sigma 70 (σ^{70}) que transcribe la mayoría de los genes en *E. coli* bajo estas condiciones. Por otra parte, cuando *E. coli* entra a fase estacionaria de crecimiento debido a la limitación de las fuentes de carbono, se induce la respuesta

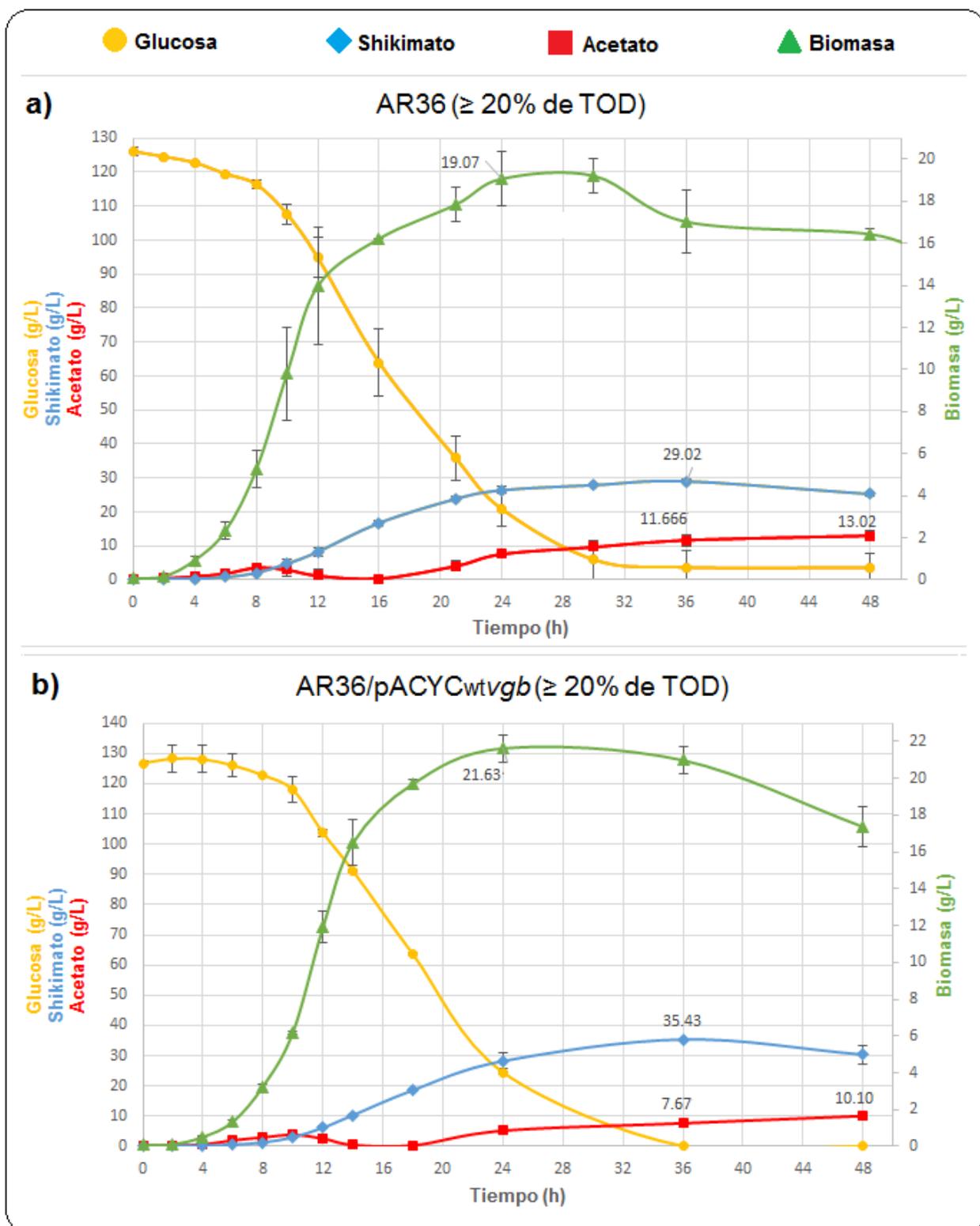


Figura 13. Perfiles de cultivo de las cepas AR36, AR36/pACYC184, AR36/pACYC_{CRP}v_{gb} y AR36/pACYC_Mv_{gb} cultivadas en biorreactores en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones aeróbicas de crecimiento (≥ 20% de TOD). Las barras de error indican la desviación estándar de cada punto experimental. Glucosa: círculos; shikimato: rombos; acetato: cuadrados; biomasa: triángulos.

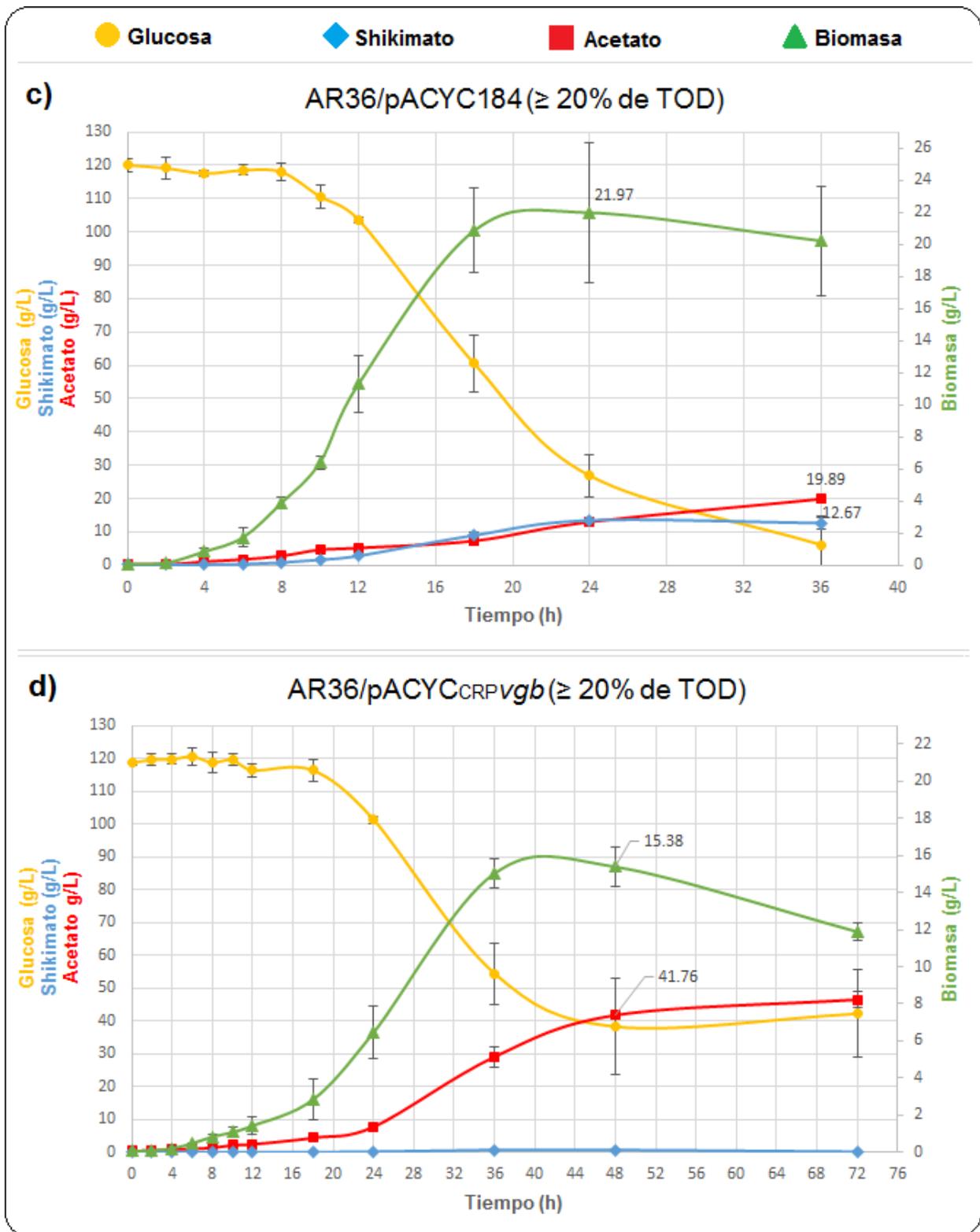


Figura 13. (Continuación).

de estrés celular, la cual está regulada principalmente por el factor de transcripción sigma S (σ^S), y que puede inhibir la transcripción del operón *acs* a través de la competición con el factor σ^{70} por el núcleo de la ARN polimerasa.⁽⁴⁰⁾ Este evento reduciría la transcripción de los genes *actP* y *acs*, y por lo tanto, esta propuesta explicaría la cantidad de acetato acumulado después de que la cepa AR36 entró a la fase estacionaria de crecimiento.

Por otra parte, Rodríguez *et al.*, 2015,⁽⁹¹⁾ propuso una teoría aplicada en particular para la cepa AR36 y que podría explicar adicionalmente la alta producción de acetato ocurrida durante el transcurso de la fase estacionaria: los componentes nutricionales del YE (péptidos, aminoácidos y carbohidratos principalmente) pueden entrar en las diferentes vías de la red metabólica de *E. coli*, pero mayoritariamente contribuyen en proveerle a la cepa AR36 los intermediarios del TCA para la posterior generación de biomasa. Cuando la cepa AR36 agota el intermediario oxaloacetato del TCA (o de sus precursores aspartato o glutamato provenientes del YE), como consecuencia de la alta expresión del gen *pckA* y la baja expresión del gen *ppc* que en última instancia dificultan la regeneración de oxaloacetato, la ausencia de este intermediario puede bloquear la entrada de acetil-CoA al TCA y el acetil-CoA puede estar disponible para ser metabolizado por la vía de síntesis del acetato.⁽⁹¹⁾

Además de la producción de acetato, la ausencia de oxaloacetato puede inhabilitar completamente la funcionalidad del TCA, por lo que el crecimiento y por ende la formación de biomasa puede cesar. Este último evento se observó únicamente en el actual cultivo aeróbico de la cepa AR36, donde a partir de la hora 12 hasta la hora 24 de cultivo, esta cepa presentó un segundo valor de μ_2 (0.025) mucho menor que el valor de μ inicial (0.56) lo cual asemeja a una fase pseudo-estacionaria, característica que ya se había observado previamente para cultivos de esta misma cepa. Por otra parte, se ha determinado que el cese de crecimiento de la cepa PB12.SA22, aun cuando existe una concentración abundante de glucosa en el medio de cultivo, está relacionado con el consumo total del aminoácido aromático triptófano proveniente del YE.⁽¹⁷⁾ Es evidente que el agotamiento total de uno o más componentes nutricionales esenciales provenientes del YE en los cultivos de la cepa AR36, es una limitante de la biomasa máxima que puede alcanzarse y por ende de los títulos y rendimientos de SHK que pueden obtenerse.

En el cultivo aeróbico de la cepa AR36 se lograron alcanzar densidades celulares de alrededor de los 19 g/L y sin duda el requerimiento de oxígeno en el transcurso del cultivo de esta cepa fue elevado y constante. Además, se detectaron altos títulos de acetato de alrededor de 17 g/L al final del cultivo (Figura 13a). En este mismo trabajo la expresión del gen *vgb*, que codifica para la Vhb, en la cepa AR36 cultivada en condiciones aeróbicas (para más detalles ver sección 9.5), contribuyó eficientemente en la disminución del 34% en la síntesis de acetato, metabolito que generalmente se asocia como un producto del metabolismo anaeróbico de *E. coli*. Este resultado, soporta aún más la idea de que inclusive en CADC aeróbicos a pequeña escala, pueden aparecer regiones limitadas de oxígeno concurrentes que estimulan el encendido de aquellos genes involucrados en el metabolismo anaeróbico que últimamente favorece la producción de subproductos parcialmente oxidados como el acetato.

Con respecto a la producción de SHK, previamente se ha reportado que en condiciones de 100 g/L de glucosa y 30 g/L de YE, la cepa AR36 logra títulos de 43 g/L de SHK, con rendimientos de $0.42 \text{ mol}_{\text{SHK}}/\text{mol}_{\text{Glc}}$.⁽¹⁶⁾ El rendimiento de SHK obtenido bajo las condiciones de cultivo manejadas en este trabajo fue de 0.23, casi la mitad del valor que se ha reportado originalmente. La discrepancia en cuanto a los perfiles de producción de SHK de la cepa AR36 observados por Rodríguez *et al.*, 2013,⁽¹⁴⁾ y los perfiles mostrados por la misma cepa en el presente estudio (Tabla 5), se deben probablemente a algún tipo de mutación espontánea que últimamente ocasionó este tipo de diferencias en las capacidades metabólicas de producción de SHK. Se tiene el conocimiento de que diversas situaciones de estrés celular, métodos de almacenamiento y manejo de inóculos, son responsables de la aparición espontánea de estas mutaciones. Si fuera el caso, en el presente estudio no se sabe con certeza en qué momento pudo haber ocurrido este evento. Sin embargo, debido a la aceptable fidelidad de las réplicas en cuanto a los valores experimentales determinados para la biomasa, consumo de glucosa y producción de SHK de la cepa AR36, así como la de sus cepas derivadas, se descarta que el probable evento anteriormente planteado haya sucedido durante el proceso de construcción de las nuevas cepas y se descarta que haya pasado durante el transcurso y traspaso de los cultivos preparados en matraces agitados (inóculos) a los posteriores cultivos en biorreactores. Por lo tanto, se cree que este evento ocurrió durante la propagación de la cepa AR36 para su almacenamiento, mucho antes de realizar el presente estudio. Por otra parte, en el actual estudio la cepa AR36 presentó un aumento del 25% en la velocidad de crecimiento en comparación con el valor que se había reportado previamente originalmente (0.56 vs 0.45 h^{-1} , respectivamente) para condiciones similares de alta concentración de glucosa y YE, lo cual probablemente puede atribuirse a las mismas razones antes descritas.

La estrategia de cultivo utilizada en el presente trabajo para alcanzar condiciones limitadas de oxígeno dentro de los biorreactores, le permite a la cepa AR36 y a sus derivadas presentar al inicio del cultivo un metabolismo aeróbico, seguido de un metabolismo anaeróbico conforme transcurren algunas horas y la demanda de oxígeno por parte del creciente número de células se hace cada vez más grande (Figura 14). La fase aeróbica de crecimiento estuvo presente desde el inicio del cultivo (tiempo 0) hasta el momento (tiempo 4) en que la concentración de oxígeno alcanzó un valor menor al 5% de TOD. La fase microaeróbica que favorece el metabolismo anaeróbico de la cepa AR36, estuvo presente a partir del tiempo 4, hasta el final del cultivo (Figura 14a). A pesar que las primeras cuatro horas del cultivo fueron suficientes para generar la biomasa necesaria para la posterior evaluación del comportamiento metabólico en la fase microaeróbica de la cepa AR36 así como de sus cepas derivadas, estas no lograron mantener una velocidad específica de crecimiento constante del tipo exponencial durante el transcurso de la fase microaeróbica de crecimiento y tampoco se observó una fase estacionaria en todos los cultivos microaeróbicos, por lo que los parámetros q_{Pexp} , q_{Sexp} , q_{Psta} y q_{Ssta} no se calcularon y por ende no se tomaron en cuenta para la presente discusión de resultados.

Tabla 5. Comparación de metabolitos medidos y parámetros cinéticos y estequiométricos calculados entre la cepa PB12.AR36 y sus tres derivadas, en cultivos en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones aeróbicas de crecimiento ($\geq 20\%$ de TOD).

| Cepa | AR36 | AR36/pACYC184 | AR36/pACYC _{CRP} vgb | AR36/pACYC _w vgb |
|---|-------------------|-------------------|-------------------------------|--|
| Título de SHK (g/L) | 29.03 \pm 0.57 | 12.68 \pm 1.66 | 0.69 \pm 0.25 | 35.43 \pm 0.01 ($\uparrow 22.1\% \pm 3.3$) |
| Glc consumida (g/L) | 126.17 \pm 1.26 | 113.99 \pm 6.53 | 75.30 \pm 7.04 | 126.79 \pm 0.63 |
| Duración del cultivo (h) | 36 | 36 | >48 | 36 |
| Y _{SHK/Glc} (mol/mol) | 0.238 \pm 0.003 | 0.115 \pm 0.012 | 0.009 \pm 0.004 | 0.289 \pm 0.001 ($\uparrow 21.4\% \pm 1.0$) |
| Título de acetato (g/L) | 11.67 \pm 1.67 | 19.89 \pm 1.12 | >41.76 \pm 0.91 | 7.67 \pm 0.94 ($\downarrow 34.0\% \pm 1.9$) |
| X _{max} (g/L) | 19.07 \pm 1.30 | 21.98 \pm 4.40 | 15.39 \pm 1.08 | 21.63 \pm 0.74 ($\uparrow 13.7\% \pm 5.5$) |
| μ (h ⁻¹) | 0.56 \pm 0.02 | 0.43 \pm 0.02 | 0.11 \pm 0.005 | 0.44 \pm 0.01 ($\downarrow 20.5\% \pm 3$) |
| Q _p _{global} (gSHK/L*h) | 0.81 \pm 0.02 | 0.35 \pm 0.07 | 0.014 \pm 0.007 | 0.98 \pm 0.00 ($\uparrow 21\% \pm 4$) |
| Q _s _{global} (gGlc/L*h) | -3.50 \pm 0.05 | -3.17 \pm 0.26 | -1.57 \pm 0.21 | -3.52 \pm 0.02 |
| q _{Pexp} (gSHK/gDCW*h) | 0.20 \pm 0.1 | 0.10 \pm 0.00 | 0.005 \pm 0.003 | 0.23 \pm 0.03 |
| q _{Sexp} (gGlc/gDCW*h) | -1.06 \pm 0.07 | -0.65 \pm 0.16 | -0.51 \pm 0.01 | -0.93 \pm 0.11 |
| q _{Psta} (gSHK/gDCW*h) | 0.02 \pm 0.00 | 0.009 \pm 0.001 | 0.0002 \pm 0.0 | 0.04 \pm 0.00 |
| q _{Ssta} (gGlc/gDCW*h) | -0.12 \pm 0.01 | -0.13 \pm 0.00 | -0.09 \pm 0.04 | -0.17 \pm 0.00 |

Y_{SHK/Glc} = rendimiento de SHK a partir de Glc; X_{max} = biomasa máxima alcanzada expresada como peso seco celular (DCW); Q_p_{global} = productividad volumétrica de SHK para la fermentación completa; Q_s_{global} = velocidad volumétrica de consumo de Glc para la fermentación completa; q_{Pexp} = productividad específica de SHK en fase exponencial; q_{Sexp} = velocidad específica de consumo de Glc en fase exponencial; q_{Psta} = productividad específica de SHK en fase estacionaria; q_{Ssta} = velocidad específica de consumo de Glc en fase estacionaria; μ = velocidad específica de crecimiento. \uparrow y \downarrow indican el aumento o disminución (en porcentaje) del valor determinado para la cepa AR36/pACYC_wvgb, en comparación con el determinado para la cepa AR36. El signo negativo (-) que acompaña a sus correspondientes cifras, únicamente denota que existe consumo o disminución de la concentración de sustrato.

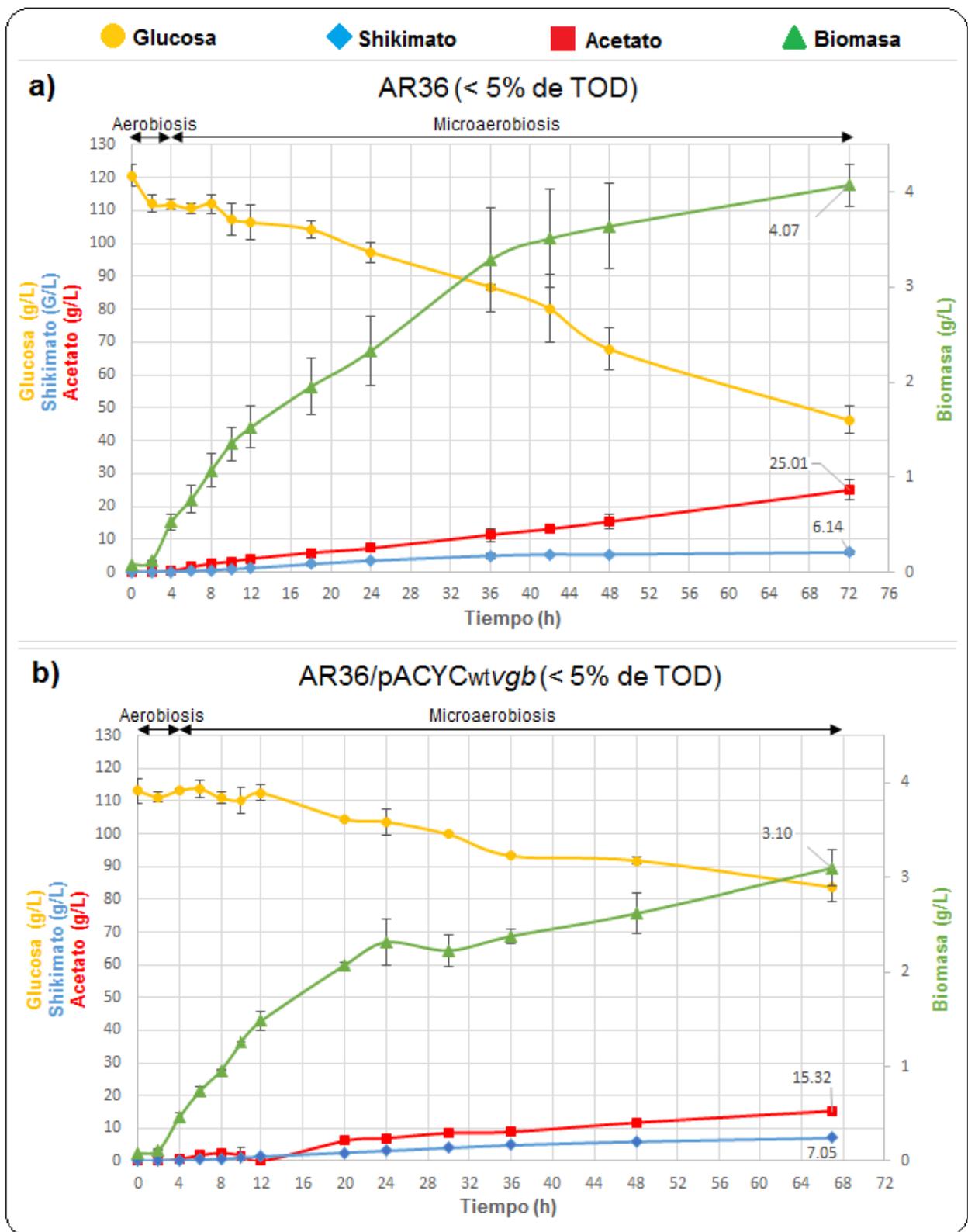


Figura 14. Perfiles de cultivo de las cepas AR36, AR36/pACYC184, AR36/pACYC_{CRP}vgb y AR36/pACYC_{wtv}gb cultivadas en biorreactores en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones microaeróbicas de crecimiento (< 5% de TOD). Las barras de error indican la desviación estándar de cada punto experimental. Las flechas indican los intervalos de tiempo en los cuales las condiciones aeróbicas y microaeróbicas estuvieron presentes. Glucosa: círculos; shikimato: rombos; acetato: cuadrados; biomasa: triángulos.

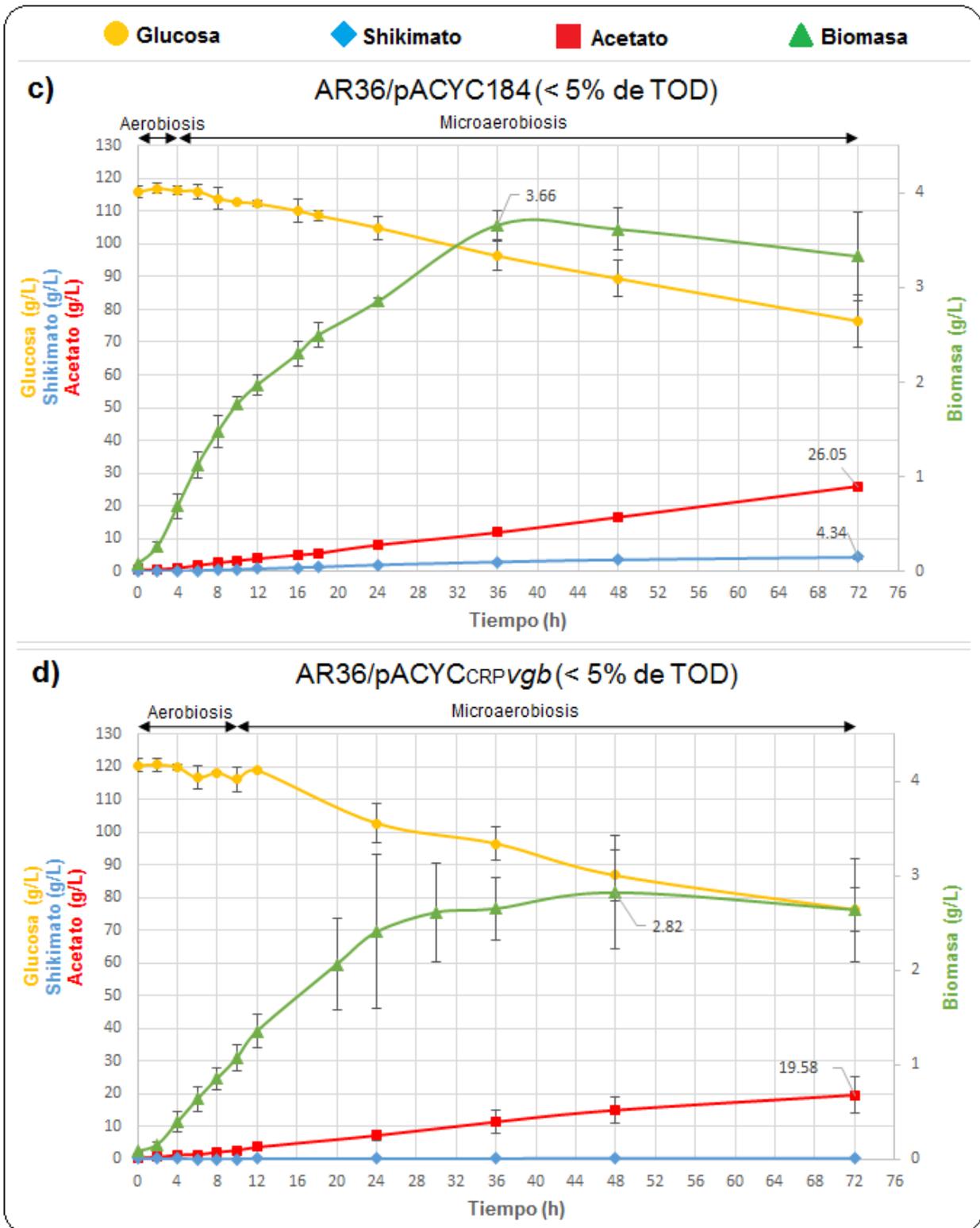


Figura 14. (Continuación).

Tabla 6. Comparación de metabolitos medidos y parámetros cinéticos y estequiométricos calculados entre la cepa PB12.AR36 y sus tres derivadas, en cultivos en modo lote con 120 g/L de glucosa y 45 g/L de extracto de levadura y en condiciones microaeróbicas de crecimiento (< 5% de TOD).

| Cepa | AR36 | AR36/pACYC184 | AR36/pACYC _{CRP} vgb | AR36/pACYC _w vgb |
|---------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Título de SHK (g/L) | 6.15 ± 0.55 | 4.35 ± 0.67 | 0.19 ± 0.05 | 7.05 ± 0.37 |
| Glc consumida (g/L) | 74.23 ± 0.93 | 39.41 ± 9.96 | 44.16 ± 8.98 | 29.38 ± 8.35 |
| Duración del cultivo (h) | 72 | 72 | 72 | 67 |
| Y _{SHK/Glc} (mol/mol) | 0.086 ± 0.007 | 0.12 ± 0.05 | 0.005 ± 0.000 | 0.257 ± 0.060 (↑295% ± 64) |
| Título de acetato (g/L) | 25.01 ± 3.00 | 26.06 ± 0.04 | 19.58 ± 5.47 | 15.32 ± 0.97 (↓38.3% ± 4.9) |
| X _{max} (g/L) | 4.07 ± 0.22 | 3.66 ± 0.15 | 2.82 ± 0.60 | 3.10 ± 0.19 |
| Q _{Pglobal} (gSHK/L*h) | 0.085 ± 0.007 | 0.060 ± 0.009 | 0.003 ± 0.001 | 0.105 ± 0.006 (↑24.3% ± 7.8) |
| Q _{Sglobal} (gGlc/L*h) | -1.031 ± 0.013 | -0.547 ± 0.138 | -0.616 ± 0.125 | -0.439 ± 0.125 |

Y_{SHK/Glc} = rendimiento de SHK a partir de Glc; X_{max} = biomasa máxima alcanzada expresada como peso seco celular (DCW); Q_{Pglobal} = productividad volumétrica de SHK para la fermentación completa; Q_{Sglobal} = velocidad volumétrica de consumo de Glc para la fermentación completa; μ = velocidad específica de crecimiento. ↑ y ↓ indican el aumento o disminución (en porcentaje) del valor determinado para la cepa AR36/pACYC_wvgb, en comparación con el determinado para la cepa AR36. El signo negativo (-) que acompaña a sus correspondientes cifras, únicamente denota que existe consumo o disminución de la concentración de sustrato.

A 72 horas del cultivo en condiciones microaeróbicas, la cepa AR36 logró consumir alrededor de 74 g/L de glucosa y como se esperaba hubo una mayor producción de acetato (27 g/L), una menor generación de biomasa y una menor producción de SHK, en comparación con los cultivos aeróbicos de la cepa AR36 (Tabla 6). La alta producción de acetato sugiere que existió un prevalente metabolismo anaeróbico en el transcurso del cultivo de la cepa AR36. Las condiciones limitadas de oxígeno supone un importante factor de estrés celular, aún en presencia de las altas concentraciones de sustrato en el medio extracelular, que puede inhibir la transcripción de los genes *actP* y *acs* dependientes del factor de transcripción σ^{70} en la cepa AR36 cultivada en condiciones microaeróbicas. Esto explicaría por qué el consumo de acetato no se favoreció en estas condiciones de crecimiento, si no que se fue acumulando conforme transcurrió el tiempo. Las bajas concentraciones de biomasa y SHK obtenidas sugieren que la baja o nula disponibilidad de oxígeno y por ende de energía, a causa de una limitada actividad del TCA en los cultivos de la cepa AR36, restringe drásticamente su capacidad para obtener las máximas concentraciones de biomasa y SHK que se pueden obtener en condiciones aeróbicas. Es evidente que si se hubiese prolongado el tiempo de cultivo, probablemente la glucosa se hubiese consumido completamente o parcialmente hasta un punto donde la alta concentración de acetato producido hubiese cesado con el crecimiento celular y por ende con el consumo de glucosa y la producción de SHK.

Es notorio que la cantidad de masa de productos formada, es decir, los gramos de SHK y acetato producidos (excluyendo la formación de biomasa puesto que se asume se forma principalmente a partir del YE), representa menos del 45% de la cantidad de glucosa consumida en los cultivos de la cepa AR36 para ambas condiciones de cultivo, lo cual esto sugiere la existencia de un gran escape de carbono hacia la biosíntesis de otros metabolitos secundarios. Un comportamiento similar está presente en los cultivos de las cepas derivadas de AR36 que se generaron. Aunque el presente trabajo se limitó únicamente en cuantificar la producción de SHK y acetato, es de esperarse que se hayan sintetizado y excretado otros metabolitos hacia el medio extracelular.

Como resultado de un alto direccionamiento del carbono hacia la vía aromática de la cepa AR36, generalmente la síntesis de SHK va acompañada con la producción de los subproductos aromáticos DAHP, DHQ, DHS, QA y GA, los cuales, aunque en pequeñas cantidades, previamente se ha determinado su presencia en el medio de cultivo de la cepa AR36.⁽¹⁶⁾ Adicionalmente, además de la producción del acetato, principal subproducto del metabolismo anaeróbico de *E. coli*, en estas condiciones de crecimiento también suele existir la producción de lactato, succinato, formato y etanol. En general, la producción de los subproductos anteriormente mencionados, y de muchos otros, representa un desperdicio del sustrato que pudo haberse utilizado para la síntesis de SHK, por lo que, el porcentaje de glucosa restante que también fue metabolizado por la cepa AR36 y por sus derivadas, pero que no formó parte de los productos formados y cuantificados en este estudio, probablemente se incluyó en la biosíntesis de otros metabolitos secundarios no cuantificados.

9.3 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa PB12.AR36/pACYC184 evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento

El primer paso para valorar el efecto de la expresión de la VHB sobre el metabolismo de la cepa AR36, consistió en evaluar y descartar los efectos en cuanto al crecimiento y la producción de metabolitos, que ejerce la simple introducción del plásmido vacío (pACYC184) dentro de la cepa de interés, efectos que pueden enmascarar las bondades atribuidas a la expresión heteróloga de la VHB en su hospedero. En esta ocasión, la presencia del plásmido vacío (o mejor dicho la presencia de 18 copias adicionales del plásmido) en la cepa AR36/pACYC184, disminuyó en un 40, 23 y 56% la q_{Sexp} , la μ y la síntesis de SHK, respectivamente, y aumentó en un 73% la síntesis de acetato en comparación con los valores obtenidos por los cultivos aeróbicos de la cepa AR36 (Figura 13c y Tabla 5).

Se sabe que los intermediarios R5P (ribosa 5-fosfato) y E4P pertenecientes a la PPP, son algunos de los bloques para la biosíntesis y la energía requerida para replicar el ADN recombinante, por lo que el evento de replicación de ADN plasmídico, puede afectar negativamente a la generación de NADPH, de aminoácidos y de muchos otros precursores metabólicos en *E. coli*.^(30,59) El NADPH participa mayoritariamente en diversas reacciones biosintéticas y bajo condiciones normales de crecimiento, alrededor del 60% de este cofactor es requerido exclusivamente para la biosíntesis de proteínas. La disminución del crecimiento, la reducción en la síntesis de proteínas y la acumulación de subproductos tóxicos como el acetato, son efectos negativos directos de una limitada disponibilidad de NADPH causada por el desbalance en la PPP.⁽⁵⁹⁾ En el actual contexto, se sugiere que la baja disponibilidad de NADPH, a causa de la carga metabólica impuesta por la replicación adicional del plásmido vacío y de su contenido genético en la cepa AR36/pACYC184, disminuyó considerablemente la producción y actividad de muchas de las enzimas encargadas del transporte de la glucosa, de las pertenecientes a la vía glucolítica y de las enzimas encargadas de dirigir el flujo de carbono hacia la biosíntesis de SHK. Por lo que, una baja en la síntesis del simportador GalP y de la enzima Glk, por mencionar solo algunas, explicaría la disminución de q_{Sexp} y por consecuencia la disminución de μ ; mientras que la baja en la síntesis de las enzimas AroG^{fb}, AroB, AroD y AroE (su actividad enzimática es dependiente de NADPH), todas pertenecientes a la vía aromática, explicaría el bajo título y rendimiento de SHK observados en el cultivo de la cepa AR36/pACYC184, en comparación con los valores presentados por la cepa AR36.

Por otra parte, está bien documentado que la disminución en la biosíntesis de diversos cofactores, entre ellos el ATP y el NADPH que son compartidos entre diferentes vías metabólicas, puede cambiar la distribución del flujo de carbono en el metabolismo de *E. coli*, el cual puede restringir la actividad enzimática y direccionar el flujo de carbono hacia vías alternas que conlleven a la formación de subproductos.^(53,59) Mencionado lo anterior, la baja actividad enzimática de las proteínas ActP y Acs (codificadas por los genes *actP* y *acs*, respectivamente) y el direccionamiento del carbono hacia la vía de síntesis de acetato, explicarían la ausencia de la actividad de ActP y Acs en la asimilación del acetato, evento que se observó en el transcurso de la fase exponencial en los cultivos

aeróbicos de la cepa AR36, y por ende también explicaría la alta concentración de acetato que se acumuló desde el inicio hasta el final de los cultivos de la cepa AR36/pACYC184.

La simple introducción del ADN plasmídico generalmente disminuye la tasa de crecimiento celular y el rendimiento de biomasa de *E. coli* y en general este evento suele ser muy agresivo y puede alterar el metabolismo de su hospedero. Esto es causado por el desvío de la energía, de los precursores para la formación de biomasa (precursores generalmente asociados a glucólisis y al TCA), de aminoácidos y de los nucleótidos que podrían ser aprovechados para la generación de biomasa, hacia la replicación, transcripción y expresión del ADN recombinante presentes en los plásmidos.⁽⁵⁹⁾ Mencionado lo anterior, se sugiere que el efecto de carga metabólica impuesta entre otras cosas por la replicación y la manutención de las 18 copias del plásmido pACYC184 y a la transcripción y traducción de los genes que confieren resistencia a los antibióticos Tc y Cm contenidos dentro de este vector, fueron los principales factores que causaron la disminución del 23% en el valor de μ de la cepa AR36/pACYC184 en comparación con el valor de μ presentado por la cepa AR36. A pesar de esto, aparentemente no existió una afectación negativa en cuanto al rendimiento de biomasa obtenido por la cepa AR36/pACYC184, si no que esta se mantuvo a un nivel similar al de la biomasa máxima alcanzada por la cepa AR36.

En cuanto a la evaluación de la cepa AR36/pACYC184 en condiciones microaeróbicas de crecimiento (Figura 14c), nuevamente se observa una baja tasa de consumo de glucosa en comparación con el cultivo de la cepa AR36 en las mismas condiciones, puesto que, el valor de $Q_{Sglobal}$ de la cepa AR36/pACYC184 fue alrededor de la mitad del valor presentado para la cepa AR36, lo cual este suceso se explicaría con la misma hipótesis arriba planteada para el cultivo aeróbico de la cepa AR36/pACYC184. Algo que llama la atención es que la cepa AR36 es capaz de soportar el crecimiento microaeróbico más eficientemente que la cepa AR36/pACYC184, puesto que después de pasado 72 horas de cultivo parece ser que la cepa AR36 hubiese seguido creciendo, mientras que en la cepa AR36/pACYC184 el crecimiento cesó alrededor de las 36 horas de cultivo, lo cual no puede atribuirse a inhibición de crecimiento por la alta concentración de acetato generado en el transcurso del cultivo, puesto que en ambos casos se produjeron cantidades similares al final de estos.

Como consecuencia de una baja tasa de consumo de glucosa, en 72 horas de cultivo la cepa AR36/pACYC184 logró consumir alrededor de la mitad de la cantidad de glucosa consumida por la cepa AR36, evento que sugiere que esta cepa conserva un mayor metabolismo glucolítico en comparación con la cepa AR36/pACYC184. Una eficiente vía glucolítica significaría una eficiente producción de energía o ATP proveniente mayoritariamente de la fosforilación a nivel de sustrato, lo cual favorecería prioritariamente a la cepa AR36 que a la cepa AR36/pACYC184 con respecto al crecimiento y la producción de SHK en condiciones microaeróbicas de crecimiento.

9.4 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa PB12.AR36/pACYC_{CRP}vgb evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento

En comparación con la cepa AR36/pACYC184, la cepa AR36/pACYC_{CRP}vgb mostró efectos aún más drásticos en condiciones aeróbicas, en cuanto a los perfiles de crecimiento y producción de metabolitos. En esta ocasión, se observó una fase lag (de latencia) muy prolongada de ocho horas a partir del inicio del cultivo y fue después de este tiempo cuando esta cepa empezó a crecer notablemente, manteniendo una fase exponencial con una μ de 0.11, valor que representa una disminución de cinco y cuatro veces de la velocidad de crecimiento presentada por las cepas AR36 y AR36/pACYC184, respectivamente, en condiciones aeróbicas. El consumo de glucosa empezó a ser notorio después de la hora 10 y cesó en la hora 48, tiempo en que el crecimiento celular se detuvo y cuando la concentración de acetato había alcanzado valores arriba de los 40 g/L (Figura 13d).

La producción de SHK también se vio drásticamente afectada, puesto que apenas se detectaron cantidades menores a un gramo de este metabolito (Tabla 5). Aparentemente la expresión de la VHb le confirió a la cepa AR36 efectos negativos más que positivos, y definitivamente alteró todas las capacidades metabólicas de esta cepa. La disponibilidad de aspartato (principal precursor en la síntesis del grupo hemo en bacterias) y la disponibilidad de hierro y su presencia en estado férrico Fe^{3+} (esta forma impide la unión con el oxígeno), son algunas limitantes nutricionales que pueden afectar considerablemente la actividad de la VHb como la de cualquier otra hemoproteína (p. ej., citocromos).⁽³⁰⁾ Sin embargo, hay que resaltar que el medio de cultivo que se empleó para crecer las cepas manejadas y evaluar la producción de metabolitos, es muy rico en aminoácidos y también en hierro (~ 66.2 mg/L de Fe), el cual este último es aportado mayoritariamente por el citrato de amonio férrico (~ 63.7 mg/L) y por el YE (2.5 mg/L) que forman parte del medio de producción. Mencionado lo anterior, es razonable pensar que el estado metabólico presentado por la cepa AR36/pACYC_{CRP}vgb no puede ser causado por factores de baja disponibilidad nutricional, y por ende no puede ser causado por una baja o nula actividad de la producción excesiva de una hemoglobina disfuncional.

Por otra parte, fue notorio que la producción de la VHb recombinante estuvo presente en el transcurso de los cultivos de la cepa AR36/pACYC_{CRP}vgb, ya que particularmente en éstos se observó un característico color rojizo, aspecto atribuido a la alta biosíntesis de la hemoglobina, y que fue más evidente al momento de centrifugar las muestras de cultivos tomadas para obtener los botones celulares y los sobrenadantes para la posterior realización de electroforesis de proteínas y cuantificación de metabolitos, respectivamente. La electroforesis de proteínas, demostró que la expresión de la VHb era alta, puesto que este método reveló una mancha con el tamaño igual al esperado para la VHb en su forma homodimérica, en comparación con las cepas control negativas AR36 y AR36/pACYC184, en los cuales se encontraban ausentes como era de esperarse (resultados no mostrados).

La alta producción de la proteína en la cepa AR36/pACYC_{CRP}vgb se puede correlacionar con la alta fuerza que posee la secuencia fuerte CRP dentro del promotor perteneciente a *vgb* en pACYC_{CRP}vgb. El efecto multicopia que ejercen los plásmidos y en conjunto con

el contenido de genes que están bajo el control de promotores de alta fuerza con el objetivo de obtener una alta transcripción de estos, pueden llevar a una situación de estrés metabólico celular, este efecto generalmente es conocido como “carga metabólica”. La carga metabólica se define como la cantidad de recursos que la célula utiliza para el mantenimiento, replicación, transcripción y traducción de la información genética contenida en los vectores sintéticos, donde se favorece la sobreproducción de ciertas proteínas mediante la sobreexpresión de genes específicos. Entre los efectos de la carga metabólica se encuentran diversas alteraciones metabólicas y fisiológicas, que ocasionan entre otras cosas: disminución en la velocidad específica de crecimiento, reducción en el rendimiento biomasa/sustrato, alteraciones del ciclo celular, activación de la respuesta a diferentes tipos de estrés celular, etc.⁽⁵⁹⁾

Se ha determinado que la cepa PB12 a pesar de ser una cepa PTS⁻, produce suficiente complejo CRP-AMPc para activar a aquellos genes pertenecientes al regulón *gal* y a otros pertenecientes al ciclo TCA, y esto está soportado debido a que el nivel de transcripción del gen *crp* (que codifica para CRP) es similar al presentado por la cepa silvestre JM101, mientras que el gen *cyaA* está ligeramente sobre-expresado en la cepa PB12 y se ha sugerido que esta regulación positiva de *cyaA*, que normalmente es activada por el componente IIA^{Glc} del sistema PTS, podría ser activada por otras enzimas.⁽³⁵⁾ Estas razones podrían sugerir que la cepa AR36 (parental de la cepa PB12) puede presentar una importante concentración de AMPc intracelular y como consecuencia una alta producción del complejo CRP-AMPc, lo que sumado a la alta afinidad de la secuencia CRP (que regula positivamente a *vgb*) por este complejo, se sugiere que ambas causas provocaron una enorme transcripción de *vgb* y una alta traducción y producción de la VHb y que en última instancia, generan carga metabólica en la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb*.

Tan grande sería el flujo de precursores provenientes de la PPP y destinados hacia la replicación de ADN y generación de transcritos de *vgb*, hasta el grado en que no podría existir la disponibilidad del precursor E4P para que la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* logre sintetizar DAHP, el primer precursor aromático de la vía del SHK. Es razonable pensar que el PEP que se haya sintetizado y acumulado, quedó disponible para ser metabolizado por vías alternas, principalmente por la vía de síntesis de acetato, por lo que, aunado a la cantidad de acetato contribuida por el mismo efecto de carga metabólica, estas pudieron haber sido las causas por las cuales se observó una alta producción de este metabolito bajo condiciones aeróbicas de crecimiento de hasta 46 g/L al final del cultivo (Figura 13d).

Anteriormente, ya se había evaluado el efecto de la expresión multicopia del gen *vgb* bajo el control del mismo promotor con la secuencia fuerte CRP en la cepa de *E. coli* VH33 con el fenotipo PTS⁻ Glc⁺ (fondo W3110 $\Delta ptsHI$, $\Delta lacl$, P_{trc} *galP*⁺).⁽⁹⁰⁾ Contrario al efecto observado por la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* en este trabajo de investigación, la expresión de la VHb en la cepa VH33/pNKD1 se correlacionó con el aumento del 33% y 11% en la producción de biomasa en CADC en modo lote con 25 g/L de glucosa más 10 g/L de YE y en CADC en modo lote con 50 g/L de glucosa más 20 g/L de YE, respectivamente.⁽⁹⁰⁾ A pesar de que ambas cepas (AR36/pACYC_{CRP}*vgb* y VH33/pNKD1) comparten algunas características similares, probablemente la gran diferencia en cuanto al efecto biológico

causado por la expresión de la VHb en estas, radique en la cantidad de proteína sintetizada en cada cepa.

Es necesario puntualizar que en principio existe una alta producción de proteínas por parte de la cepa AR36 desde el inicio hasta el final del cultivo, debido a la expresión constitutiva de los seis genes que codifican para las enzimas pertenecientes a la vía del SHK y a la PPP, presentes en un plásmido con un alto número de copias. Es probable que la expresión adicional de un nuevo gen, en este caso *vgb*, sobrepasó el umbral en el cual la cepa AR36 puede tolerar la carga ejercida por la producción de nuevas proteínas recombinantes, lo que sugiere que la competencia de precursores es favorecida para la generación de estas y disminuida para las rutas que generen biomasa y energía.

En relación a la evaluación de la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* en condiciones microaeróbicas de crecimiento (Figura 14d), el comportamiento metabólico de esta cepa siguió la misma tendencia a la arriba descrita para los cultivos aeróbicos. Las condiciones limitadas de oxígeno y la carga metabólica ejercida por el plásmido y la alta replicación y transcripción de su material genético, suponen importantes factores de estrés celular que pueden inhibir la transcripción de los genes *actP* y *acs* dependientes del factor de transcripción σ^{70} necesarios para favorecer la asimilación del acetato. Esto explicaría por qué el consumo de este metabolito no se presentó en la fase exponencial de los cultivos aeróbicos y tampoco en el transcurso de los cultivos microaeróbicos de las cepas AR36/pACYC_{CRP}*vgb* y AR36/pACYC184, contrario a lo que se sugiere ocurrió en el cultivo aeróbico de la cepa AR36. Hasta este punto, se puede concluir que la carga metabólica ejercida por la excesiva expresión de *vgb* en la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* no es representativa para la mejora del metabolismo aeróbico y energético, y no lo es para la producción de metabolitos en ambas condiciones de crecimiento.

9.5 Obtención de los perfiles de cultivo de la cepa PB12.AR36/pACYC_{wt}*vgb* evaluada en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento

Contrario al efecto mostrado por la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* (Figura 13d), en esta ocasión la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* cultivada en condiciones aeróbicas presentó un incremento del 22 y 13% en la producción de SHK y biomasa máxima alcanzada, respectivamente, y una disminución del 34% y 20% en la producción de acetato y en la μ , respectivamente, estos en comparación con los valores obtenidos por la cepa AR36 (Figura 14b y Tabla 5). Es necesario resaltar que la única diferencia entre las cepas AR36/pACYC_{wt}*vgb* y AR36/pACYC_{CRP}*vgb*, es el promotor que controla la fuerza de transcripción del gen *vgb* en cada uno. Mientras que en la cepa la AR36/pACYC_{CRP}*vgb* el gen *vgb* está bajo el control de un promotor de alta fuerza que posee una secuencia de elevada afinidad por el complejo CRP-AMPc y que favorece la sobreproducción de la VHb (y cuya característica logró alterar de forma negativa todas sus capacidades metabólicas), en la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* el mismo gen está bajo el control de su promotor nativo ligeramente modificado y que se puede considerar débil para la transcripción de *vgb* (sección 8.5).

Como se discutió anteriormente, mediante mutagénesis sitio-dirigida se obtuvo una mutación puntual en la región promotora nativa del gen *vgb*, específicamente dentro de la presuntiva secuencia Crp, que cambia una T por una C, resultando en la secuencia débil Crp ACCGTGGATTA, en lugar de la secuencia original ATGTGGATTA (Anexo 1). Adicionalmente, se ha determinado que la presuntiva secuencia Crp comparte espacio con la presuntiva secuencia ArcA (Figura 9).⁽⁶²⁾ Tomando en cuenta que el cambio de una T por una C, afectó a ambas presuntivas secuencias de unión para el complejo CRP-AMPc y para ArcA-P, se propuso que esta combinación alteraría negativamente la fuerza de transcripción de *vgb*, puesto que se hizo disminuir su similitud con la secuencia Crp ATGTGGATTA ubicada dentro de la región promotora nativa del gen *vgb*.

Se ha observado que una mutación puntual dentro de la secuencia promotora de un gen, puede aumentar o disminuir por varias órdenes de magnitud la eficiencia de unión de la ARN polimerasa o de la proteína reguladora a la secuencia del promotor localizado dentro de la hebra de ADN y por ende también puede alterar la fuerza de su transcripción, por lo que afecta directamente a la cantidad de proteína producida.⁽³⁰⁾ Un ejemplo clásico, es la mutación denominada *lac^f* que genera un cambio de una C por una T dentro de la secuencia promotora -35 del gen *lacI* (que codifica para el represor del operón de la lactosa), resultando en la secuencia: GCGCAA→GTGCAA. Esta mutación puntual ocasiona una producción de 100 moléculas del represor por célula, mientras que las células que no poseen esta mutación producen alrededor de 10 moléculas del represor por célula.

En el actual trabajo, se propuso que la mutación puntual generada disminuiría considerablemente la fuerza de expresión de *vgb in vivo* y por ende la producción de la proteína sería muy escasa, y esto fue así, puesto que con el método cualitativo de electroforesis de proteínas realizado a la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb*, no se detectó el tamaño esperado para la VHb (resultados no mostrados). Por lo que en esta ocasión, se propone el uso de estudios complementarios de mayor sensibilidad que permitan detectar y comprobar la transcripción del gen *vgb* en la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb*, como es la cuantificación de transcritos por PCR cuantitativo de tiempo real (RT-qPCR).

Anteriormente se determinó que una cepa de *E. coli* que expresa el gen *vgb* bajo el promotor con la secuencia fuerte CRP, produce alrededor de 25% más VHb en condiciones aeróbicas y microaeróbicas, que la misma cepa que expresa el gen *vgb* bajo el control del promotor que posee la secuencia débil Crp.⁽⁷¹⁾ Con base a esta observación, se esperaba que la misma tendencia en cuanto a la producción de la VHb esté presente en ambas cepas derivadas de AR36 que expresan el gen *vgb*. Sin embargo, la mutación puntual generada dentro de la secuencia débil Crp (anteriormente descrita), haría posible que la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* produzca mucho menos VHb que la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb*, es decir, esta última cepa produciría una cantidad de VHb mucho mayor al 25% que la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb*.

Se ha determinado que la máxima producción de la VHb en *E. coli*, es llevada a cabo bajo condiciones microaeróbicas cercanas al 2% de TOD, ya que la transcripción de *vgb* queda principalmente a expensas de FNR y ArcA que son activas en estas condiciones de crecimiento.^(62,69) Sin embargo, se ha determinado que existe una menor transcripción

de *vgb* y por lo tanto una menor producción de la VHb en *E. coli* cuando se cultiva en condiciones aeróbicas, por lo que en esta situación es coherente pensar que la transcripción de *vgb* es regulada positiva y mayoritariamente por el complejo CRP-AMPc. En relación a lo anteriormente discutido, Yang *et al.*, 2005,⁽⁶²⁾ evaluó el papel de los sistemas ArcA y FNR en la regulación de la VHb, mediante la comparación de la actividad de promotores mutantes de *vgb* que tenían alteradas las presuntivas secuencias de unión para ArcA/Crp y FNR, y en combinación con el uso de cepas de *E. coli* con las variantes genotípicas *fnr⁺/fnr⁻* y *arcA⁺/arcA⁻*. En esta investigación se encontró que la cepa con los genotipos *fnr⁺/arcA⁺* que expresaba *vgb* bajo el control de su promotor nativo con sus presuntivas secuencias de unión íntegras ArcA/Crp⁺ FNR⁺, producía alrededor de 4 veces menos de la proteína activa en condiciones aeróbicas (20% de TOD) que la producida en condiciones microaeróbicas de crecimiento (5% de TOD); mientras que esta misma cepa con las mismas características y cultivada en condiciones aeróbicas, producía alrededor de 1.2 veces más proteína que una cepa de *E. coli* crecida en las mismas condiciones, con los fenotipos *fnr⁺/arcA⁺* y que expresaba el gen *vgb* bajo el control del promotor mutante ArcA/Crp⁻ FNR⁺,⁽⁶²⁾ (situación aproximada para la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb*).

Hablando particularmente de algunas características de la cepa PB12, se ha sugerido que esta cepa puede producir la forma activa ArcA-P a pesar de poseer una mutación puntual en *arcB*, y como se discutió en la sección anterior, también puede producir la cantidad suficiente del complejo CRP-AMPc para regular a aquellos genes u operones que así lo requieran.^(34,35,96) Puesto que la cepa AR36 es progenitora de la cepa PB12, se esperaría que la primera adquirió las características de la segunda. Todos los puntos arriba discutidos soportan la idea de que la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* es capaz de sintetizar la VHb a pesar de la baja fuerza de su promotor y a pesar de las condiciones aeróbicas de crecimiento manejadas. También se asume que la expresión del gen *vgb* sucede desde el inicio del cultivo hasta el final de este. Contrario a la cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb*, la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* se mantiene en un estado metabólico apropiado en el que se sugiere, es capaz de sintetizar la VHb recombinante en una cantidad mínima necesaria para llevar a cabo su actividad biológica, sin afectar seriamente sus capacidades de crecimiento y producción de SHK.

La expresión de la VHb en la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* logró restaurar y mejorar la mayoría de las características perdidas debido al efecto de introducción del plásmido vacío en la cepa AR36/pACYC184. En primer lugar, el valor de la μ mostrada por la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* disminuyó en un 20% del valor presentado por la cepa AR36, pero prácticamente es el mismo valor al presentado por la cepa AR36/pACYC184. Sin embargo, la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* logró restaurar y mejorar la q_{Sexp} y q_{Ssta} , respectivamente, al nivel de las tasas de consumo de glucosa presentadas por la cepa AR36 (Tabla 5). Estos resultados sugieren que en ambas cepas existe un nivel de actividad similar de GalP y de Glk, por lo que el catabolismo de la glucosa por parte de la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* debe de ser igual de eficiente que el mostrado por la cepa AR36.

Como ya se ha discutido, los resultados mostrados por la cepa AR36/pACYC184 (sección 9.3), sugieren que el mantenimiento del plásmido vacío por esta cepa, disminuye la síntesis de las enzimas involucradas en el catabolismo glucolítico debido a un probable

decremento de la síntesis de NADPH. Sin embargo, se ha determinado que la producción de la Vhb en *E. coli*, puede dirigir una alta fracción de la glucosa consumida hacia la PPP y generar una gran cantidad de NADPH.⁽⁷⁹⁾ Este hecho sugiere que como consecuencia de la expresión de la Vhb en la cepa AR36/pACYC_{wtvgb}, probablemente esta haya producido la cantidad de precursores suficientes para replicar el plásmido y para generar la cantidad de NADPH necesaria para asistir a la síntesis de las enzimas involucradas en el catabolismo de la glucosa y de muchas otras enzimas. Además, es muy probable que el flujo adicional de carbono hacia la PPP haya intervenido en la mejora de la síntesis de SHK en la cepa AR36/pACYC_{wtvgb}, puesto que se ha detectado que la limitación del precursor E4P probablemente restringe el rendimiento de SHK que puede ser alcanzado por la cepa AR36.⁽⁹¹⁾

Una característica de los CADC, es que requieren de una gran demanda de oxígeno en el transcurso de estos, y para los cultivos de las cepas AR36 y AR36/pACYC_{wtvgb} esta observación no fue la excepción. Como consecuencia de la presencia de un gran número de células, el consumo de oxígeno por célula no se vuelve uniforme, por lo que son típicos los gradientes de oxígeno aún en CADC de pequeña escala que generalmente reducen la capacidad de crecimiento celular y la producción de los metabolitos de interés y favorecen la síntesis de subproductos. La expresión de la Vhb en la cepa AR36/pACYC_{wtvgb} le fue favorable a tal grado que mostró una mejora en el crecimiento, disminución en la síntesis de acetato y, aunados al probable flujo adicional de carbono hacia la PPP, se asume que estos tres factores fueron determinantes para mejorar el título y rendimiento de SHK y la productividad del proceso, todas superiores al 21% en comparación a los valores mostrados por la cepa AR36 (Tabla 5).

En la presente investigación, también se decidió evaluar a la cepa AR36 y a sus derivadas, en condiciones limitadas de oxígeno con el objetivo de determinar qué tan favorable le era la expresión del gen *vgb* en las cepas derivadas de la cepa AR36 en cuanto al crecimiento y producción de metabolitos. Estas condiciones fueron alcanzadas debido a la eventual alta demanda de oxígeno requerida por el mismo cultivo. De esta forma fue que después de 4 horas transcurridas del cultivo de la cepa AR36/pACYC_{wtvgb}, el sistema detectó condiciones de 0% de TOD. Aparentemente este valor sugiere que el sistema se encuentra en condiciones cercanas a las anóxicas o estrictamente anaeróbicas. Sin embargo, la tasa de inyección de aire filtrado (1 vvm) se mantuvo constante desde el inicio hasta el final de cultivo. Es evidente que la fuente de oxígeno suministrada dentro del cultivo, favorece mayoritariamente a las células circundantes que logran acercarse al punto o región de inyección de la fuente de oxígeno. Posteriormente, por la acción de la constante agitación, estas mismas células viajarán a otras regiones dentro del biorreactor donde la disponibilidad de oxígeno es limitada o nula y que tiempo después retornarán al mismo punto de inyección de la fuente de oxígeno, por lo que tendrán idealmente un tiempo de circulación definido (y difícil de estimar para este método manejado) de la región aeróbica a la anaeróbica. Por estas razones se ha sugerido que el método aquí manejado simula el ambiente heterogéneo de oxígeno, típico de un biorreactor de mayor escala, y a pesar de que el sistema detectó concentraciones iguales al 0% de saturación de oxígeno que en primera instancia sugieren un ambiente anaeróbico, en el presente trabajo estas condiciones se trataron como microaeróbicas,

puesto que siempre existió una tasa de inyección de aire filtrado constante a lo largo de todos los cultivos.

La evaluación de la cepa AR36/pACYC_{wtv}gb en condiciones microaeróbicas resultó en un ligera tendencia del aumento y disminución de la producción de SHK y de la biomasa máxima alcanzada, respectivamente, en comparación con los valores obtenidos por la cepa AR36 en las mismas condiciones de cultivo (Figura 14b). Sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos. A pesar de esto, un evento interesante a exhibir, es el hecho de que la cepa AR36/pACYC_{wtv}gb consumió menos de la mitad de la glucosa consumida por la cepa AR36 en un lapso cercano a las 70 horas de cultivo (Tabla 6). Previamente se ha discutido que la cepa AR36/pACYC_{wtv}gb logró restaurar la capacidad catabólica de glucosa a la par de la mostrada por la cepa AR36 en condiciones aeróbicas de crecimiento. Sin embargo, la respuesta de la cepa AR36/pACYC_{wtv}gb en condiciones microaeróbicas aparentemente no puede soportar este hecho, lo cual sugiere nueva y aparentemente una limitación en la actividad de las enzimas relacionadas con el catabolismo de la glucosa o una limitación y/o regulación en la expresión de los genes que las codifican, particularmente en condiciones limitadas de oxígeno. Este interesante resultado, soporta aún más la idea de que la VHb podría intervenir como un factor de control transcripcional para la regulación de la expresión génica en *V. stercoraria* y en *E. coli* bajo condiciones limitadas de oxígeno.

Se ha determinado que la expresión de la VHb en *E. coli*, afecta significativamente la expresión de cientos de genes, por lo que se ha propuesto que la VHb funciona como un factor de control transcripcional de ellos y por ende interviene sobre el metabolismo de *E. coli*. Particularmente, se ha demostrado que la síntesis de la VHb en *E. coli* y su interacción con las proteínas OxyR y FNR, puede autorregular la propia biosíntesis de la VHb y activar simultáneamente el regulón del estrés oxidativo involucrado en contrarrestar los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno. Estos resultados sugieren la participación de la VHb en el control transcripcional de otros genes.⁽²¹⁾ Mencionado lo anterior, no se descarta que la baja tasa de consumo de glucosa representada por $Q_{Sglobal}$, observada en el cultivo microaeróbico de la cepa AR36/pACYC_{wtv}gb que expresa la VHb, en comparación con la tasa de consumo exhibida por la cepa AR36 en las mismas condiciones, este asociada con un posible control transcripcional de la VHb sobre los genes involucrados en el catabolismo de los carbohidratos o sobre aquellos del TCA.

Es de esperarse que en las condiciones cercanas a las anaeróbicas manejadas en el presente trabajo, la proteína FNR sea activa, por lo que, tomando en cuenta lo poco que se conoce sobre la labor de la VHb como factor de control transcripcional, tampoco se descarta que su interacción con FNR y otras proteínas, intervenga en la transcripción de muchos otros genes del metabolismo de la cepa AR36. Para poder aceptar la anterior hipótesis planteada, se necesitan de estudios complementarios más profundos que la soporten. Cabe resaltar que las cepas AR36/pACYC184 y AR36/pACYC_{CRP}v_{gb} también presentan $Q_{Sglobales}$ inferiores a la presentada por la cepa AR36 en condiciones microaeróbicas, pero como ya se ha discutido previamente, las bajas tasas de consumo de glucosa presentadas por estas cepas, se atribuyeron básicamente al efecto de carga

metabólica otorgada por la replicación del mismo plásmido y por la transcripción y traducción de los genes heterólogos que lo acompañan.

A pesar de que la producción de SHK por las cepas AR36 y AR36pACYC_{wt}vgb en condiciones microaeróbicas fue similar, hay que tomar en cuenta que la cantidad producida por la cepa AR36pACYC_{wt}vgb fue en base a la cantidad de sustrato que esta cepa consumió, y que representa 2.5 veces menos la cantidad de glucosa consumida por la cepa AR36 (Tabla 6). Otro aspecto importante a resaltar, es que mientras la cepa AR36 logró consumir más glucosa que las demás, esta fue destinada mayoritariamente a la síntesis de acetato como consecuencia de un metabolismo microaerófilico que estuvo presente en el transcurso del cultivo. Por el contrario, la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb redujo en un 38% la síntesis de acetato, en comparación con la cantidad producida por la cepa AR36, lo cual sugiere que la Vhb le confirió a la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb la capacidad de contender eficazmente con las oscilaciones y bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

Interesantemente, en condiciones microaeróbicas la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb logró consumir todo el acetato que acumuló desde el principio del cultivo hasta antes de la hora 12, tiempo donde se había consumido completamente (Figura 14b). Este comportamiento fue similar al presentado por la misma cepa en condiciones aeróbicas (Figura 13b). Por el contrario, la cepa AR36 que mostró este comportamiento en condiciones aeróbicas (Figura 13a), no lo mostró en condiciones microaeróbicas (Figura 14a). Estos eventos sugieren que gracias a la expresión del gen *vgb*, la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb fue capaz de mantener un metabolismo aeróbico constante y eficaz hasta el final del cultivo a pesar de las condiciones limitadas de oxígeno manejadas. Este evento tuvo un enorme impacto sobre lo que quizás es la mayor mejora en cuanto a los parámetros de producción en el proceso microaeróbico de la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb que expresa el gen *vgb* que codifica para la Vhb, y esto es el aumento de 3 veces el rendimiento de SHK que el obtenido por la cepa AR36, y que representa cerca del 90% del valor obtenido por la misma cepa cultivada en condiciones aeróbicas de crecimiento (Tabla 6).

Se ha resaltado que uno de los efectos biológicos fundamentales de la expresión de la Vhb en diversos hospederos, es la de mejorar su crecimiento aún en condiciones limitadas de oxígeno. Sin embargo, para la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb evaluada en condiciones microaeróbicas no hubo un cambio significativo en relación a este parámetro. Es de esperarse que la transcripción de *vgb* y la producción de la Vhb en la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb sea mayor en condiciones microaeróbicas que en las aeróbicas de crecimiento, puesto que además del complejo CRP-AMP_c, en condiciones microaeróbicas existe una regulación transcripcional positiva complementaria por los reguladores transcripcionales globales ArcA-P y FNR. Por esta razón, es probable que en la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb exista una competencia marcada de los precursores destinados hacia la generación de biomasa y a los destinados para la síntesis de proteínas recombinantes, favoreciendo en última instancia a la síntesis de la Vhb, y es probable que este evento haya enmascarado el efecto de la Vhb sobre la mejora del crecimiento de la cepa AR36/pACYC_{wt}vgb en condiciones microaeróbicas. Probablemente la cepa AR36 haya sobrepasado su capacidad metabólica para seguir produciendo nuevas proteínas, por lo que hay que tomar con mucha precaución, la

decisión de seguir realizando modificaciones genéticas adicionales en ella y que puedan agravar aún más el efecto de carga metabólica, en particular si se quiere sobre-expresar otros genes heterólogos o que sean específicos de otras vías biosintéticas.

Existen características relevantes que hacen de la cepa AR36 un organismo atractivo para la producción fermentativa de SHK y competitivo con otras cepas productoras de SHK que han sido reportadas en la literatura (Tabla 7). Por una parte está su capacidad de poder tolerar elevadas concentraciones de glucosa al inicio del cultivo sin que genere grandes cantidades de acetato por sobreflujo metabólico. Además, la cepa AR36 toma la ventaja de ser una cepa PTS⁻ y de poder asimilar el acetato acumulado en la fase exponencial de crecimiento e incluso se ha sugerido que también podría asimilar algunos componentes del YE que en conjunto con el acetato, estos contribuirían de manera significativa a la generación de los altos títulos y rendimientos de SHK y a la alta productividad del proceso.

Con base a los resultados obtenidos en los cultivos aeróbicos y microaeróbicos de la cepa AR36/pACYC_wtvgb, se puede sugerir ahora que esta cepa adquirió una característica adicional de mucha importancia, y esto es la capacidad de ser más robusta ante ambientes limitados de oxígeno. La decisión de elegir entre un bioproceso en modo lote o modo lote alimentado en los cuales está bien documentado que en ambos modos de operación se pueden presentar regiones anaeróbicas, ya no sería un problema en particular para la cepa derivada de AR36 que expresa el gen vgb. Esto daría una mayor flexibilidad al momento de elegir las estrategias adecuadas de cultivo para poder explotar al máximo la capacidad productora de SHK que posee la cepa AR36. Al final, los resultados mostrados en este trabajo de investigación pueden tener una especial repercusión sobre el escalamiento de la cepa AR36 que expresa el gen vgb, a cultivos de un mayor volumen donde el problema sobre la limitación del oxígeno es aún más pronunciable.

A pesar de que una gran variedad de cepas derivadas de *E. coli* han sido modificadas para la producción de SHK, estas cepas muestran parámetros de producción que aún están lejos de los óptimos deseables. Sin embargo, los parámetros de producción de SHK de la cepa AR36/pACYC_wtvgb obtenida en este trabajo, siguen siendo competitivos en comparación a los que se han obtenido por otras cepas de *E. coli* productoras de SHK que han sido modificadas y evaluadas bajo diferentes estrategias y condiciones de cultivo por otros grupos de investigación (Tabla 7). Esto representa un avance importante para la obtención SHK principalmente a partir de bioprocesos prácticos que eventualmente pueden reemplazar de manera definitiva a aquellos procesos poco eficientes y costosos en donde la obtención de SHK y de otros compuestos aromáticos es dependiente de la extracción y/o fabricación a partir de recursos naturales no renovables.

Tabla 7. Cepas relevantes de *E. coli* que han sido modificadas para favorecer la producción de shikimato bajo diferentes condiciones de cultivo.

| Cepa | Características relevantes | Título (g/L) | Rendimiento (mol _{SHK} /mol _{Glc}) | Productividad (gSHK/L*h) | Condiciones de cultivo (Biorreactor) | Referencia |
|---|---|--------------|---|--------------------------|--|--------------|
| SP1.1 _{pts} /pSC6.090B (derivada de RB791) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ <i>serA::aroB</i> (plásmido) <i>aroF^{fbr} tktA</i> , P _{tac} <i>aroE serA</i> , P _{tac} <i>glf^a glk^a</i> | 71 | 0.27 | 1.18 | 1 L modo lote alimentado con Glc y AAA. | (15) |
| SP1.1 _{pts} /pSC6.090B (derivada de RB791) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ <i>serA::aroB</i> (plásmido) <i>aroF^{fbr} tktA</i> , P _{tac} <i>aroE serA</i> , P _{tac} <i>glf^a glk^a</i> | 84 | 0.33 | 2.05 | 10 L modo lote alimentado con Glc, AAA y 15 g/L de YE. | (15) |
| KPM1 SA1 (derivada de K-12) | $\Delta aroK$ $\Delta aroL$ (plásmido) <i>aroF^{fbr}</i> , P _{R-PL} <i>aroE</i> | 7 | 0.11 | 0.20 | 5 L modo lote alimentado con 60 g/L de Glc, AAA y 5 g/L de YE. | (19) |
| SA5 (derivada de B0013) | $\Delta ptsG \Delta aroK \Delta aroL$ $\Delta ydiB \Delta ackA$ - <i>pta</i> (plásmido) P _{tac} <i>aroG^{fbr} ppsA tktA</i> | 15 | 0.29 | 0.26 | 7 L modo lote alimentado con Glc y AAA. | (18) |
| PB12.SA22 (derivada de JM101) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK$ $\Delta aroL$ (plásmido) P _{tacUV5} <i>aroG^{fbr} tktA</i> , (plásmido) <i>aroE aroB</i> | 7 | 0.29 | 0.16 | 1 L modo lote con 25 g/L de Glc y 15 g/L de YE. | (17) |
| AR36 (derivada de JM101) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ $\Delta lacI \Delta pykF$ (plásmido) P _{trc} <i>aroB tktA aroG^{fbr}</i> <i>aroE aroD zwf</i> | 43 | 0.42 | 1.44 | 1 L modo lote con 100 g/L de Glc y 30 g/L de YE. | (16) |
| AR36 (derivada de JM101) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ $\Delta lacI \Delta pykF$ (plásmido) P _{trc} <i>aroB tktA aroG^{fbr}</i> <i>aroE aroD zwf</i> | 59 | 0.42 | 2.46 | 2 L modo lote alimentado con Glc y 40 g/L de YE. | (91) |
| AR36 (derivada de JM101) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ $\Delta lacI \Delta pykF$ (plásmido) P _{trc} <i>aroB tktA aroG^{fbr}</i> <i>aroE aroD zwf</i> | 29 | 0.24 | 0.81 | 1 L modo lote con 120 g/L de Glc y 45 g/L de YE. | Este trabajo |
| AR36/pACYC _w vgb (derivada de JM101) | $\Delta ptsHIcrr \Delta aroK \Delta aroL$ $\Delta lacI \Delta pykF$ (plásmido) P _{trc} <i>aroB tktA aroG^{fbr}</i> <i>aroE aroD zwf</i> , (plásmido) P _w <i>vgb</i> | 35 | 0.29 | 0.98 | 1 L modo lote con 120 g/L de Glc y 45 g/L de YE. | Este trabajo |

SHK = shikimato; Glc = glucosa; YE = extracto de levadura; AAA = aminoácidos aromáticos. ^aGenes de *Zymomonas mobilis*. Tabla adaptada de Martínez *et al.*, 2015,⁽²⁰⁾ y de Rodríguez A., 2015.⁽⁹¹⁾

X. Conclusiones

- La cepa AR36/pACYC_{CRP}*vgb* adquirió el efecto de carga metabólica por causa de la elevada expresión del gen *vgb*, afectando negativamente a su capacidad de crecimiento y producción de SHK en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento.
- En general, la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* adquirió un eficiente metabolismo aeróbico como consecuencia de la débil expresión del gen *vgb*, esto se reflejó en la mejora del crecimiento, la mejora de la síntesis de SHK y la disminución de la producción de acetato, principal metabolito representativo de un metabolismo anaeróbico, en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento.
- La cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* mostró un aumento en los valores de título y rendimiento de SHK, así como en la productividad volumétrica final del proceso en condiciones aeróbicas, todos superiores al 21% con respecto a la cepa AR36.
- El rendimiento de SHK obtenido en el cultivo microaeróbico de la cepa AR36/pACYC_{wt}*vgb* representa el triple del rendimiento obtenido por la cepa AR36 en las mismas condiciones de cultivo. Se propone que la VHb puede regular directa o indirectamente la transcripción de los genes relacionados con el transporte y catabolismo de la glucosa en condiciones limitadas de oxígeno.
- Se propone que la expresión del gen *vgb* cambió significativamente los flujos de carbono dentro de la compleja red metabólica de la cepa AR36, por lo que es indispensable realizar estudios complementarios que ayuden a una mejor comprensión del efecto causado por la simple producción de la hemoproteína en esta cepa e identificar posibles blancos de modificación genética para poder optimizar la producción de SHK en las cepas generadas a partir de la cepa AR36.
- Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación sugieren que la construcción de una cepa derivada de la cepa AR36 que sintetice la VHb en niveles óptimos, puede ser más robusta ante los ambientes limitados de oxígeno disuelto característicos de los cultivos de alta densidad celular en cualquier modo de operación, aumentando notablemente los parámetros de producción de SHK. Esta característica tiene una importante repercusión sobre el escalamiento ascendente de una cepa derivada de AR36 que sintetice la VHb.

XI. Perspectivas

- Con el objetivo de minimizar el efecto de carga metabólica impuesta por la replicación y expresión de los genes contenidos en el plásmido, la integración cromosomal del gen *vgb* bajo el control transcripcional y su evaluación con diferentes promotores con diferentes fuerzas de expresión en la cepa AR36, puede ser una estrategia para encontrar el nivel de expresión óptimo de la VHb, donde se pueda maximizar los valores de los parámetros de crecimiento y producción de SHK y minimizar la producción de acetato.
- Para obtener resultados aún más finos sobre el comportamiento metabólico de las cepas derivadas de AR36 que expresan la VHb, se propone su caracterización en sistemas descendentes de dos compartimientos diseñados para estudiar y simular la respuesta metabólica ante los gradientes de oxígeno disuelto característicos en bioprocesos a gran escala.
- Cuantificar por medio de RT-qPCR, el nivel de expresión de los genes pertenecientes a las vías de glucólisis, pentosas fosfato, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, vías anapleróticas, metabolismo del acetato y reguladores globales, con el propósito de obtener una mejor comprensión sobre los cambios metabólicos ocasionados por la expresión de la VHb en las cepas derivadas de AR36 evaluadas en condiciones aeróbicas y microaeróbicas de crecimiento.

XII. Anexos

Anexo 1. Secuencia nucleotídica del gen *vgb* que codifica para la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria*

A continuación se muestran los resultados de secuenciación de los fragmentos de ADN clonados de forma independiente en pACYC184 para la creación de pACYC_{wt}*vgb* y pACYC_{CRP}*vgb* y que están conformados por las secuencias del gen *vgb* y de sus respectivas regiones promotoras.

| a) pACYC _{wt} <i>vgb</i> | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------|------------|------------|-----------------------------|
| 1 | <u>GTCGACGTGG</u> | ATTAAGTTTT | AAGAGGCAAT | AAAGATTATA | <u>ATAAGTGCTG</u> |
| 51 | CTACACCATA | CTGATGTATG | GCAAAACCAT | AATAATGAAC | TTA <u>AGGA</u> AAGA |
| 101 | CCCT <u>CATG</u> T | AGACCAGCAA | ACCATTAACA | TCATCAAAGC | CACTGTTCTT |
| 151 | GTATTGAAGG | AGCATGGCGT | TACCATTACC | ACGACTTTTT | ATAAAAACTT |
| 201 | GTTTGCCAAA | CACCCTGAAG | TACGTCCTTT | GTTTGATATG | GGTCGCCAAG |
| 251 | AATCTTTGGA | GCAGCCTAAG | GCTTTGGCGA | TGACGGTATT | GGCGGCAGCG |
| 301 | CAAACATTG | AAAATTTGCC | AGCTATTTTG | CCTGCGGTCA | AAAAAATTGC |
| 351 | AGTCAAACAT | TGTC AAGCAG | GCGTGGCAGC | AGCGCATTAT | CCGATTGTCTG |
| 401 | GTCAAGAATT | GTTGGGTGCG | ATTAAGAAG | TATTGGGCGA | TGCCGCAACC |
| 451 | GATGACATTT | TGGACGCGTG | GGGCAAGGCT | TATGGCGTGA | TTGCAGATGT |
| 501 | GTTTATTCAA | GTGGAAGCAG | ATTTGTACGC | TCAAGCGGTT | GAATA <u>AGGAT</u> |
| 551 | <u>CC</u> | | | | |

| b) pACYC _{CRP} <i>vgb</i> | | | | | |
|------------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|------------|----------------------|
| 1 | <u>GTCGACAGAA</u> | TTCGGGGTTA | AAAGTATTTG | TGATTTGATG | TGGATTAAGT |
| 51 | TTTAAGAGGC | AATAAGAT <u>I</u> | <u>ATAATA</u> AGTG | CTGCTACACC | ATACTGATGT |
| 101 | ATGGCAAAAC | CATAATAATG | AACTTA <u>AGGA</u> | AGACCCTC | <u>ATG...</u> |

Figura 15. Secuencia del gen *vgb* y de su región promotora. a) pACYC_{wt}*vgb*: se indica en negritas el codón de inicio (ATG) y el codón de término (TAA) correspondientes al gen *vgb*; la secuencia de su región promotora se ubica corriente arriba del codón de inicio. b) pACYC_{CRP}*vgb*: la secuencia posterior al codón de inicio del gen *vgb* es la misma que se muestra en a); la secuencia de su región promotora se ubica corriente arriba del codón de inicio. Letras en negritas y subrayadas: caja Pribnow; letras en negritas y en itálicas: sitio de unión al ribosoma. Los demás elementos de ambas secuencias promotoras se muestran en la Figura 9. Las regiones subrayadas y la región doblemente subrayada, indican los sitios de restricción para *Sal* I y *Bam*HI, respectivamente, compartidos con pACYC184. A = Adenina, G = Guanina, C = Citosina, T = Timina.

Anexo 2. Cuantificación de metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para la preparación de los estándares utilizados, cada metabolito se disolvió en agua milli-Q. Las concentraciones finales en g/L de cada uno de los estándares que fueron preparados, son las siguientes:

Glucosa: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20.

Shikimato: 0.01563, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5.

Ácido acético: 0.1563, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 y 5.

A través del software Empower 2 que controla al sistema Waters, se generaron curvas de calibración correspondientes a cada grupo de estándares. Mediante el método de interpolación del mismo software, se calcularon las concentraciones de metabolitos extracelulares de cada muestra tratada y proveniente de cultivos en biorreactores.

La figura 17 muestra las curvas de calibración que se obtuvieron para la determinación de la concentración de glucosa, shikimato y ácido acético.

En la siguiente tabla se muestran algunos datos obtenidos del software, sobre las curvas de calibración de cada metabolito cuantificado en este trabajo:

| Metabolito | Ecuación | Coefficiente de correlación (R²) |
|----------------------|---------------------|--|
| Glucosa | $y = 8.034376E+06x$ | 0.999995 |
| Shikimato | $y = 1.210672E+08x$ | 0.995349 |
| Ácido acético | $y = 1.159515E+06x$ | 0.999699 |

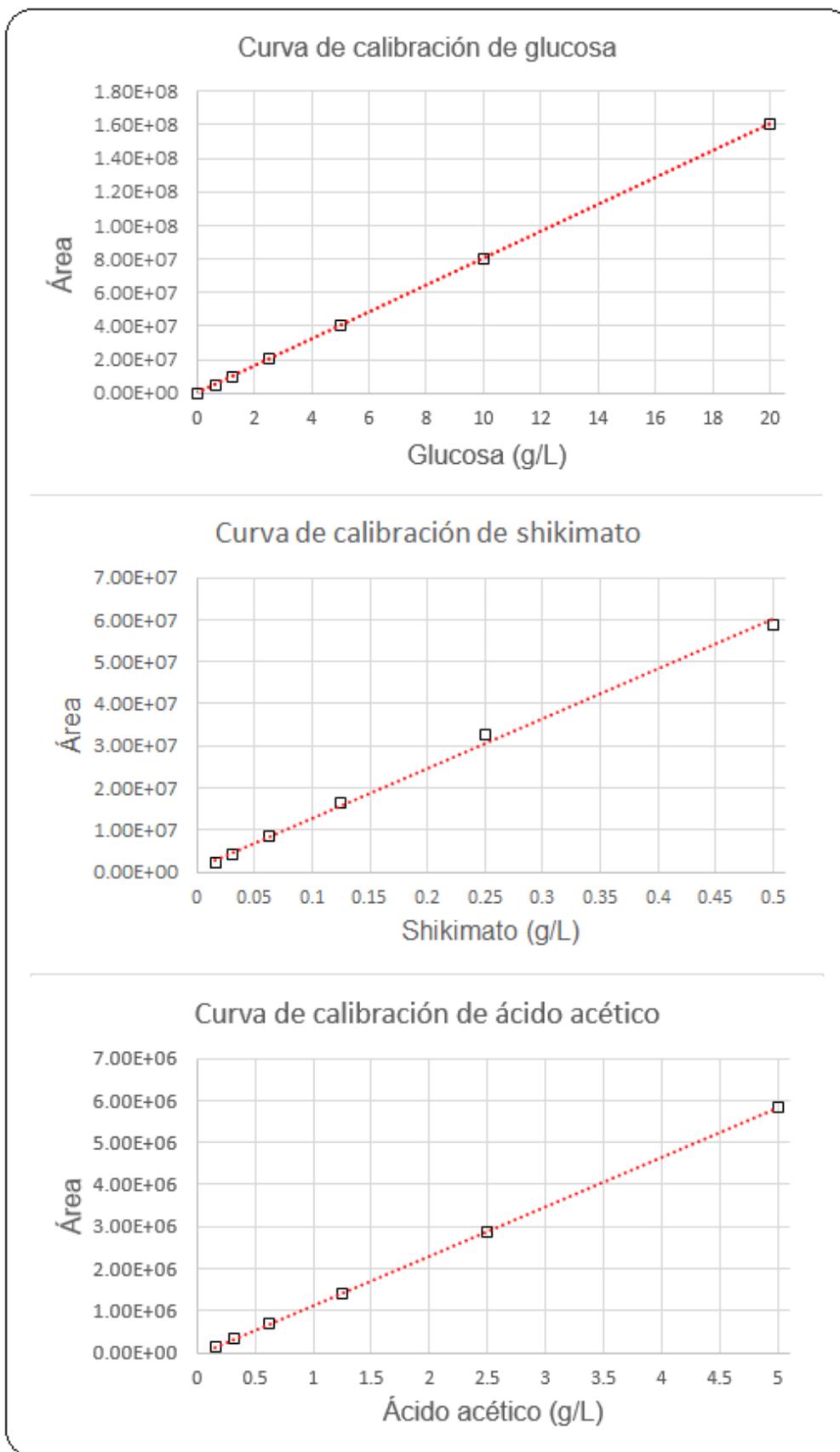


Figura 17. Curvas de calibración correspondientes a cada metabolito cuantificado en este trabajo.

XIII. Referencias

1. Frost JW, Lievens J. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *New J Chem.* 1994;18:341-348.
2. Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20:651-658.
3. Dundar B, Gahan P, Gartland K, Szente M, Viola-Magni M, Akbarova Y. Biotechnology worldwide and the “European Biotechnology Thematic Network” Association (EBTNA). *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22:7-14.
4. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999;50:473–503.
5. Patnaik R, Liao JC. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:3903-3908.
6. Estevez AM, Estevez RJ. A short overview on the medicinal chemistry of (-)-shikimic acid. *Mini Rev Med Chem.* 2012;12:1443–1454.
7. Díaz D, Carmona S, Bolívar F, Escalante A. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Res Rep Med Chem.* 2014;4:35-46.
8. Rawat G, Tripathi P, Saxena RK. Expanding horizons of shikimic acid: Recent progresses in production and its endless frontiers in application and market trends. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:4277–4287.
9. Jefferson T, Jones M, Doshi P, Del Mar C. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *Br Med J.* 2009;339:b5106.
10. Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? *Nat Rev.* 2005;4:945-946.
11. F. Hoffmann-La Roche Ltd. Roche Finance Report 2009. Scheiwiller T, Hirschi S. PricewaterhouseCoopers AG, 4070 Basel, Switzerland; Jan 2010. Report of serial 09.
12. Reddy D. Responding to pandemic (H1N1) 2009 influenza: the role of oseltamivir. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:35-40.
13. Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng.* 2003;5:277-283.
14. Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 1991;252:1668-75.
15. Chandran S, Yi J, Draths K, Von Daeniken R, Weber W, Frost J. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog.* 2003;19:808-814.
16. Rodríguez A, Martínez JA, Báez-Viveros JL, Flores N, Hernández-Chávez G, Ramírez OT, Gosset G, Bolívar F. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose

-
- batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and *pykF*. *Microb Cell Fact*. 2013;12:86.
17. Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De Anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F. Metabolic engineering for production of shikimic acid in a evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*. 2010;9:1-12.
 18. Chen X, Li M, Zhou L, Shen W, Algasan G, Fan Y, Wang Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving shikimate synthesis from glucose. *Bioresour Technol*. 2014;166:64-71.
 19. Ahn J, Chung B, Lee D, Park M, Karimi IA, Jung J, Lee H. NADPH-dependent *pgi*-gene knockout *Escherichia coli* metabolism producing shikimate on different carbon sources. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;324:10-16.
 20. Martínez JA, Bolívar F, Escalante A. Shikimic acid production in *Escherichia coli*: from classical metabolic engineering strategies to omics applied to improve its production. *Front Bioeng Biotechnol*. 2015;3:145.
 21. Neubauer P, Junne S. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Curr Opin Biotechnol*. 2010;21:114-121.
 22. Stark B, Pagilla K, Dikshit K. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99:1627-1636.
 23. Zhang L, Li Y, Wang Z, Xia Y, Chen W, Tang K. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering. *Biotechnol Adv*. 2007;25:123-136.
 24. Raghavendra TR, Vaidyanathan P, Swathi HK, Ramesha BT, Ravikanth G, Ganeshiah KN, Srikrishna A, Uma Shaanker R. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a bird-flu drug. *Curr Sci*. 2009;96:771-772.
 25. Avula B, Wang YH, Smillie TJ, Khan IA. Determination of shikimic acid in fruits of *Illicium* species and various other plant samples by LC-UV and LC-ESI-MS. *Chromatographia*. 2009;69:307-314.
 26. Stephen F. Austin State University, Inventors; Li S, Yuan W, Wang P, Zhang Z, Zhang W, Ownby S. Method for the extraction and purification of shikimic acid. United States Patent US 2007/0149805 A1. 2007 Jun 28.
 27. Abbott A. Avian flu special: What's in the medicine cabinet? *Nature*. 2005;435:407-9.
 28. Kao RY, Yang D, Lau LS, Tsui W, Hu L, Dai J, et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Nat Biotechnol*. 2010;28:600-607.
 29. Chen X, Zhou L, Tian K, Kumar A, Singh S, Prior BA, Wang Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol Adv*. 2013;31:1200-1223.

-
30. Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2008.
 31. Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact*. 2005;20:651-658.
 32. Board of Trustees Operating Michigan State University, Inventors; Frost J, Frost K, Knop D. Biocatalytic synthesis of shikimic acid. United States Patent US 6,472,169 B1. 2002 Oct 29.
 33. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 1996;14:620-623.
 34. Aguilar C, Escalante A, Flores N, De Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolivar F. 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*. 2012;13:385.
 35. Flores N, Flores S, Escalante A, De Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulón genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab Eng*. 2005;7:70-87.
 36. Bolívar F, Rodríguez R, Greene P, Betlach M, Heyneker H, Boyer H. Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 1977;2:95-113.
 37. Chang AC, Cohen SN. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol*. 1978;134:1141-1156.
 38. Lara A, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F, Ramirez O. Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99:893-901.
 39. Lara A, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F, Ramírez O. Transcriptional and metabolic responses of recombinant *Escherichia coli* to spatial dissolved oxygen tension gradients simulated in a scale-down system. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93:372-385.
 40. Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol*. 2005;69:12-50.
 41. Kleman G, Strohl W. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell density fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:3952-3958.
 42. Eitman M, Altman E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol*. 2006;24:530-535.

-
43. Kang Y, Weber D, Qiu Y, Kiley P, Blattner F. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J Bacteriol.* 2005;187:1135-1160.
 44. Matsui T, Shinzato N, Yokota H, Takahashi J, Seigo S, High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. *Process Biochem.* 2006;41:920-924.
 45. Luli G, Strohl W. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Biotechnol.* 1990;56:1004-1011.
 46. Lara A, Taymaz-Nikerel H, Mashego M, Gulik W, Heijnen J, Ramírez O, Winden W. Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104:1153-1161.
 47. Flores S, De Anda R, Gosset G, Bolívar F. Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnol Bioeng.* 2002;87:486-494.
 48. Sandoval-Basurto EA, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng.* 2005;89:453-463.
 49. Salmon K, Hung S-p, Mekjian K, Baldi P, Hatfield W, Gunsalus R. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem.* 2003;278:29837-29855.
 50. Keseler I, Mackie A, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Gama-Castro S, Bonavides-Martínez C, et al. EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.* 2016.
 51. Levanon S, San K-Y, Bennett G. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. *Biotechnol Bioeng.* 2005;89:556-564.
 52. Georgellis D, Lynch A, Lin E. In vitro phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1997;179:5429-5435.
 53. Zhou J, Liu L, Shi Z, Du G, Chen J. ATP in current biotechnology: Regulation, applications and perspectives. *Biotechnol Adv.* 2009;27:94-101.
 54. Lee SY. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1996;14:98-105.
 55. Amanullah A, Buchland BC, Nienow AW. Handbook of industrial mixing: Science and practice. New York: John Wiley & Sons; 2004.
 56. Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stockmann C, Seletzky J, Buch J. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J Biotechnol.* 2007;132:167-179.

-
57. Li Y, Chen J, Mao YY, Lun SY, Koo YM. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Proc Biochem*. 1998;33:709-714.
 58. Zhang JG, Wang XD, Zhang JN, Wei DZ. Oxygen vectors used for S-adenosylmethionine production in recombinant *Pichia pastoris* with sorbitol as supplemental carbon source. *J Biosci Bioeng*. 2008;105:335-40.
 59. Carneiro S, Ferreira EC, Rocha I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2013;164:396-408.
 60. Vemuri GN, Eitman MA, Altman E. Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. *Biotechnol Bioeng*. 2006;94:538-42.
 61. Wakabayashi S, Matsubara H, Webster DA. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*. 1986;322:481-3.
 62. Yang J, Webster DA, Stark BC. ArcA works with Fnr as a positive regulator of *Vitreoscilla* (bacterial) hemoglobin gene expression in *Escherichia coli*. *Microbiol Res*. 2005;160:405-415.
 63. Orii Y, Webster DA. Photodissociation of oxygenated cytochrome *o*(s) (*Vitreoscilla*) and kinetic studies of reassociation. *J Biol Chem*. 1986;261:3544-7.
 64. Ramandeep HK-W, Raje M, Kim KJ, Stark BC, Dikshit KL, Webster DA. *Vitreoscilla* hemoglobin: intracellular localization and binding to membranes. *J Biol Chem*. 2001;276:24781-24789.
 65. Tarricone C, Galizzi A, Coda A, Ascenzi P, Bolognesi M. Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* sp. *Structure*. 1997;5:497-507.
 66. Ratakonda S, Anand A, Dikshit KL, Stark BC, Howard AJ. Crystallographic structure determination of B10 mutants of *Vitreoscilla* hemoglobin: role of Tyr29 (B10) in the structure of the ligand-binding site. *Acta Crystallograp Sect F: Struct Biol Crystalliz Comm*. 2013;69:215-222.
 67. Stark BC, Dikshit KL, Pagilla KR. The biochemistry of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012;3:4.
 68. Dikshit KL, Webster DA. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene*. 1988;70:377-386.
 69. Khosla C, Bailey JE. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1989;171:5995-6004.
 70. Liu C-S, Liu Y-X, Webster DA, Stark BC. Sequence of the region downstream of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene: *vgb* is not part of a multigene operon. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;42:304-308.

-
71. Dikshit KL, Orii Y, Navani N, Patel S, Huang H-Y, Stark BC, Webster DA. Site-directed mutagenesis of bacterial hemoglobin: The role of glutamine (E7) in oxygen-binding in the distal heme pocket. *Arch Biochem and Biophys*. 1998;349:161-166.
 72. Tsai PS, Nageli M, Bailey JE. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*. *Biotechnol Bioeng*. 1996;49:151-160.
 73. Kallio PT, Kim DJ, Tsai PS, Bailey JE. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur J Biochem*. 1994;219:201-208.
 74. Chen W, Hughes DE, Bailey JE. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*. 1994;10:308-13.
 75. Puustinen A, Finel M, Haltia T, Gennis RB, Wikstrom. Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1991;30:3936-3942.
 76. Dikshit RP, Dikshit KL, Liu YX, Webster DA. The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases. *Arch Biochem Biophys*. 1992;293:241-5.
 77. Chen R, Bailey JE. Energetic effect of *Vitreoscilla* hemoglobin expression in *Escherichia coli*: an online ³¹P NMR and saturation transfer study. *Biotechnol Prog*. 1994;10:360-364.
 78. Tsai PS, Rao G, Bailey JE. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential. *Biotechnol Bioeng*. 1995;47:347-54.
 79. Frey AD, Fiaux Jocelyne, Szyperski T, Wuthrich K, Bailey JE, Kallio PT. Dissection of central carbon metabolism of hemoglobin-expressing *Escherichia coli* by ¹³C nuclear magnetic resonance flux distribution analysis in microaerobic bioprocesses. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:680-687.
 80. Tsai PS, Hatzimanikatis V, Bailey JE. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotechnol Bioeng*. 1996;49:139-150.
 81. Khosla C, Bailey JE. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature*. 1988;331:633-5.
 82. Khosla C, Curtis JE, DeMoneda J, Rinas U, Bailey JE. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)*. 1990;8:849-53.
 83. Khosravi M, Webster DA, Stark BC. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *E. coli* strain. *Plasmid*. 1990;24:190-194.

-
84. Priscila G, Fernández FJ, Absalón AE, Suarez MR, Sainoz M, Barrios-González J, Mejía A. Expression of the bacterial hemoglobin gene from *Vitreoscilla stercoraria* increases rifamycin B production in *Amycolatopsis mediterranei*. *J Biosci Bioeng*. 2008;106:493-497.
 85. Zhang W, Xie H, He Y, Feng J, Gao W, Gu Y, Wang S, Song C. Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances γ -PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;343:127-134.
 86. Xu M, Rao Z, Xu H, Lan C, Duo W, Zhang X, Xu H, Jin J, Xu Z. Enhanced production of L-arginine by expression of *Vitreoscilla* hemoglobin using a novel expression system in *Corynebacterium crenatum*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163:707-719.
 87. Wu XC, Chen YM, Li YD, Li O, Zhu L, Qian CD, Tao XL, Teng Y. Constitutive expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Sphingomonas elodea* to improve gellan gum production. *J Appl Microbiol*. 2011;110:422-430.
 88. Wang S, Liu F, Hou Z, Zong G, Zhu X, Ling P. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*). *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:1369-1376.
 89. Ma Z, Liu J, Bechthold A, Tao L, Shentu X, Bian Y, Yu X. Development of intergeneric conjugal gene transfer system in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 and its application for improvement of toyocamycin production. *Curr Microbiol*. 2014;68:180-185.
 90. Pablos TE, Mora EM, Le Borgne S, Ramírez OT, Gosset G, Lara AR. *Vitreoscilla* hemoglobin expression in engineered *Escherichia coli*: improved performance in high cell-density batch cultivations. *Biotechnol J*. 2011;6:993-1002.
 91. Rodríguez A. Generación y caracterización de una cepa de *Escherichia coli* sobreproductora de shikimato mediante la implementación de estrategias de ingeniería metabólica [Tesis de doctorado]. México: Instituto de Biotecnología, UNAM; 2015.
 92. Rodríguez DL. Efecto de la expresión del gen de hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* en el metabolismo y producción de shikimato de la cepa sobreproductora *Escherichia coli* PB12.AR36 [Tesis de licenciatura]. México: Instituto de Biotecnología, UNAM / Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2016.

