



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EXPRESIÓN DE UNA HEMOGLOBINA HETERÓLOGA EN *Escherichia coli* PTS⁻
GalP⁺ PARA MEJORAR SU DESEMPEÑO BAJO CONDICIONES LIMITANTES DE
OXÍGENO DISUELTO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIOL. TANIA ELENA PABLOS ROJO

DIRECTOR: Dr. Alvaro Raúl Lara Rodríguez

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Asesor: Dr. Francisco Fierro Fierro

México, D.F.

Diciembre 2011

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biosistemas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa bajo la asesoría del Dr. Alvaro R. Lara.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de los siguientes proyectos: Financiamiento proporcionado por CONACyT (84447-Z) y PROMEP (47410089). Así como la Beca de Maestría No.267781.

RESUMEN.

Los cultivos de alta densidad celular (CADC) son una de las estrategias más utilizadas para la producción de biomoléculas por *Escherichia coli*. Anteriormente, ha sido demostrado que una cepa de *E. coli* modificada en su sistema de transporte de sustrato es capaz de lograr alta densidad celular cuando es cultivada en modo lote, presentando una disminución importante en el sobreflujo metabólico. Utilizar concentraciones elevadas de glucosa elimina el problema de gradientes de sustrato y de heterogeneidad en el medio. Sin embargo se requieren grandes cantidades de oxígeno para metabolizar dicho sustrato, ocasionando condiciones microaerobias después de algunas horas de cultivo.

En este trabajo se analizó el efecto que la expresión del gene *vgb* que codifica para la hemoglobina VHb (proveniente de la bacteria *Vitreoscilla stercoraria*) produce en una cepa de *E. coli* con el sistema PTS (sistema natural encargado de transportar la glucosa al interior de la célula) inactivado y con el sistema GalP sobreexpresado en cultivos en modo lote con elevadas concentraciones de glucosa.

En condiciones de cultivo completamente aerobias (con 10 g/L de glucosa) la presencia de la hemoglobina VHb presentó mayores ventajas para la cepa nativa, la cual presenta cantidades similares de biomasa, rendimiento y velocidad específica de crecimiento a las registradas para la cepa con el sistema de transporte modificado y con expresión de *vgb*, pero presenta una disminución importante en el sobreflujo metabólico.

En cultivos en modo lote con 25 g/L de glucosa, la combinación de la expresión de *vgb* y la modificación en el sistema de transporte de sustrato dio como resultado un aumento del 33% en la producción de biomasa en comparación con la cepa nativa (W3110) sin hemoglobina. Cuando se utilizaron 50 g/L de glucosa, la expresión de la hemoglobina en la cepa modificada permitió un aumento en la producción de biomasa del 11% en comparación con la cepa W3110. La expresión de *vgb* en cultivos en modo lote también produjo un incremento en las velocidades específicas de crecimiento en fases aerobias (30%) y en fases microaerobias (200%).

1. INTRODUCCIÓN.

Esta tesis se encuentra organizada de la siguiente manera: el capítulo 1 presenta las generalidades del tema de manera resumida; la importancia de los cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli* así como la problemática general de esta estrategia. Así mismo se aborda más a fondo los problemas de sobreflujo metabólico y de transferencia deficiente de oxígeno y las soluciones que se les han dado hasta el momento. También en este capítulo se presentan los objetivos hipótesis y justificación de este trabajo. El capítulo 2 detalla los arreglos experimentales y las metodologías analíticas empleados en el desarrollo del proyecto.

El capítulo 3 presenta en cuatro sesiones los estudios que se realizaron. En la primera se describen los resultados y la discusión de experimentos dirigidos a comprobar la presencia del gene *vgb* en el plásmido pNKD1, la construcción de las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y la expresión del gen *vgb* en las cepas W3110 *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁺. La segunda sección muestra los resultados obtenidos y las discusión correspondientes a las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ crecidas en condiciones de cultivo aerobias en modo lote usando un medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa. La tercera y cuarta sección presentan el comportamiento y análisis de éste de estas cepas en condiciones de cultivo con una fase aerobia y una fase microaerobia, cultivadas en modo lote crecidas con un medio complejo adicionado con 25 g/L y 50 g/L de glucosa respectivamente.

En el capítulo 4, se presentan las conclusiones generales sobre el trabajo. Finalmente, en el capítulo 5 se discuten algunas perspectivas sobre el área de investigación en general y sobre los resultados obtenidos en particular.

ÍNDICE GENERAL.

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Antecedentes	12
1.1.1 Cultivos de alta densidad celular de <i>Escherichia coli</i>	12
1.1.2 Sobreflujo metabólico en <i>Escherichia coli</i>	14
1.1.2.1 Estrategias típicas de cultivo para reducir el sobreflujo metabólico	16
1.1.2.2 Estrategias moleculares para reducir el sobreflujo metabólico	17
1.1.2.2.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i> modificadas en el sistema de transporte de glucosa	17
1.1.3 Efectos de una transferencia de oxígeno deficiente en cultivos de <i>Escherichia coli</i>	20
1.1.4 Soluciones para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno	25
1.1.4.1 Estrategias típicas de cultivo para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno	25
1.1.4.2 Estrategias moleculares para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno: la hemoglobina de <i>Vitreoscilla stercoraria</i>	25
1.1.5 Generalidades de la hemoglobina VHb	26
1.1.6 Efecto de la VHb en el metabolismo de cepas <i>E. coli</i> VHb ⁺	28
1.2 Objetivos	30
1.3 Hipótesis	31
1.4 Justificación	32
2. Material y Métodos	33
2.1 Cepas y Plásmidos empleados	33
2.1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	33
2.1.2 Plásmidos	34
2.1.2.1 Plásmido Bluescript	34

2.1.2.2 Plásmido pNKD1	35
2.2 Comprobación de la presencia del gen <i>vgb</i> en el plásmido pNKD1	36
2.2.1 Extracción del plásmido pNKD1	36
2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa	37
2.2.3 Amplificación del gene <i>vgb</i> en el plásmido pNKD1	37
2.2.4 Preparación de células W3110 y VH33 competentes	38
2.2.5 Transformación de células competentes por electroporación con los plásmidos Bluescript y pNKD1	40
2.2.6 Comprobación de la transformación de las cepas VH33 y W3110 con los plásmidos pBS y pNKD1	41
2.3 Preparación de crioviales de las cepas obtenidas	42
2.4 Preparación del inóculo para cultivos en biorreactor en modo lote	42
2.5 Medio de cultivo para modo lote	42
2.6 Cultivos en biorreactor instrumentado	43
2.7 Comprobación de la presencia de la hemoglobina VHb en las cepas transformadas	44
2.7.1 Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2})	44
2.7.2 Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	46
2.8 Métodos Analíticos	49
2.8.1 Determinación de concentración celular	49
2.8.2 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivo por lote	49
2.8.2.1 Cuantificación de glucosa	49
2.8.2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos	49
2.9 Métodos de cálculo	51
2.9.1 Cálculos cinéticos y estequiométricos	51
2.9.2 Cálculos respiratorios	52

3. Resultados y discusión	53
3.1 Comprobación de la presencia del gene <i>vgb</i> y su expresión	53
3.1.1 Comprobación de la presencia del gene <i>vgb</i> en el plásmido pNKD1	53
3.1.2 Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	53
3.1.3 Comprobación indirecta de la expresión del gene <i>vgb</i> en las cepas W3110 <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁺	55
3.2 Cultivo de las cepas W3110 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en modo lote con 10 g/L de glucosa	57
3.3 Cultivo de las cepas W3110 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en modo lote con 25 g/L de glucosa	65
3.4 Cultivo de las cepas W3110 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en modo lote con 50 g/L de glucosa	71
4. Conclusiones	78
5. Perspectivas	80
Producción científica	83
Referencias	84

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1	Principales rutas metabólicas involucradas en la producción y consumo de acetato en condiciones aerobias	16
Figura 1.2	Principales diferencias en el metabolismo de carbono entre la cepa silvestre W3110 (A) y la cepa VH32 GalP ⁺ (B)	18
Figura 1.3	Simulación de un cultivo de la cepa <i>E. coli</i>	22
Figura 1.4	Principales vías metabólicas fermentativas en la bacteria <i>Escherichia coli</i>	23
Figura 1.5	Mecanismo de acción propuesto para la hemoglobina VHb	27
Figura 2.1	Esquema del plásmido Bluescript (pBS)	34
Figura 2.2	Esquema del plásmido pNKD1	35
Figura 2.3	Cromatograma típico para la cuantificación de ácidos orgánicos	50
Figura 2.4	Curvas de calibración típicas para la cuantificación de metabolitos extracelulares mediante HPLC	50
Figura 3.1	Amplificación por PCR del gene <i>vgb</i> en el plásmido pNKD1	54
Figura 3.2	Gel de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de proteínas totales de las cepas VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺	54
Figura 3.3	Histogramas correspondientes al gel de electroforesis desnaturante de proteínas totales de las cepas VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺	55
Figura 3.4	Perfiles de concentración de oxígeno disuelto en experimentos para la determinación de <i>q</i> _{O₂}	56
Figura 3.5	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de acetato en cultivos con 10 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁻	58
Figura 3.6	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de acetato en cultivos con 10 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁺	59

Figura 3.7	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de acetato en cultivos con 10 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁻	60
Figura 3.8	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de acetato en cultivos con 10 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁺	61
Figura 3.9	Producción máxima de ácido acético de las cepas W3110 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en cultivos completamente aerobios	62
Figura 3.10	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 25 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁻	65
Figura 3.11	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 25 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁺	66
Figura 3.12	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 25 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁻	68
Figura 3.13	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 25 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁺	68
Figura 3.14	Concentraciones máximas de ácidos orgánicos de las cepas W3110 y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en cultivos con 25 g/L de glucosa	70
Figura 3.15	Velocidades específicas de crecimiento en fase aerobia y microaerobia de las cepas W3110 y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en cultivos con 25 g/L de glucosa	71
Figura 3.16	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 50 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁻	72

Figura 3.17	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 50 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> W3110 <i>vgb</i> ⁺	73
Figura 3.18	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 50 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁻	74
Figura 3.19	Perfiles cinéticos de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO así como producción de ácidos orgánicos en cultivos con 50 g/L de glucosa de la cepa <i>E. coli</i> VH33 <i>vgb</i> ⁺	75
Figura 3.20	Concentraciones máximas de ácidos orgánicos de las cepas W3110 y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en cultivos con 50 g/L de glucosa	75
Figura 3.21	Velocidades específicas de crecimiento en fase aerobia y microaerobia de las cepas W3110 y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ en cultivos con 50 g/L de glucosa	76

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1	Principales retos de los CADC de <i>E. coli</i> y algunas soluciones propuestas	13
Tabla 1.2	Datos fisiológicos, obtenidos en un cultivo en modo lote alimentado con glucosa, de una cepa <i>E. coli</i> con VHb	29
Tabla 2.1	Cepas bacterianas usadas en este trabajo	33
Tabla 2.2	Composición del medio de cultivo Luria-Bertani	36
Tabla 2.3	Componentes de la mezcla para amplificar el gen <i>vgb</i>	38
Tabla 2.4	Características de los ciclos utilizados en PCR para amplificar el gen <i>vgb</i>	38
Tabla 2.5	Composición del medio YENB	39
Tabla 2.6	Composición del medio SOB	41
Tabla 2.7	Composición del Medio de cultivo para modo lote	43
Tabla 2.8	Composición de la solución de metales traza empleada añadida al medio para cultivos en biorreactor	43
Tabla 2.9	Cantidad de extracto de levadura añadido en función de la concentración inicial de glucosa	43
Tabla 2.10	Condiciones de cultivo en matraz de 250 mL para realizar la obtención de células de VH33 <i>vgb</i> ⁺ y VH33 <i>vgb</i> ⁻ para la determinación de la <i>q</i> _{O₂}	45
Tabla 2.11	Preparación de un gel de separación de poliacrilamida para SDS-PAGE al 15%	47
Tabla 2.12	Preparación de un gel de concentración de poliacrilamida para SDS-PAGE	48
Tabla 3.1	Principales parámetros cinéticos obtenidos para las cepas W3110 y VH33 <i>vgb</i> ⁻ y <i>vgb</i> ⁺ cultivadas en modo lote con un medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa	61

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli*.

Debido a la relativa facilidad con la que puede producir proteínas heterólogas (Korz et al., 1995; Jana y Deb, 2005) y a sus características genéticas, moleculares y fisiológicas, la bacteria anaerobia facultativa *Escherichia coli* es el procarionte más utilizado a nivel industrial para la producción de biomoléculas con valor económico elevado. Entre estas moléculas se encuentran la insulina, interferones, hormona de crecimiento (Lee, 1996), ADN plasmídico (Riesenberg y Guthke, 1999; Lara y Ramírez, en prensa), enzimas, entre otras (Flores et al., 2004).

Para diseñar cultivos de *E. coli* altamente productivos se deben de tomar en cuenta algunos parámetros como: la concentración de biomasa alcanzable, la fuente de carbono usada para el cultivo, la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s), el rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) y la velocidad específica de crecimiento (μ). La concentración de biomasa se encuentra directamente ligada, en la mayoría de los casos, con la concentración de producto formado. Por ello, una de las estrategias más usadas para mejorar la productividad en cultivos de *E. coli* es el Cultivo de Alta Densidad Celular (CADC) donde se obtienen concentraciones de biomasa (medida como peso seco) de al menos 40 g/L, aunque se han reportado concentraciones de biomasa mayores a 150 g/L (Märkl et al., 1993). La concentración de biomasa alcanzable puede mejorarse de acuerdo a la estrategia de cultivo usada.

Aunque *E. coli* puede utilizar diferentes fuentes de carbono para su crecimiento, a nivel industrial el sustrato comúnmente usado es la glucosa (Flores et al., 1996; Van de Walle y Shiloach, 1997) por su bajo costo (Kayser et al., 2005) y por su impacto en las velocidades de crecimiento, productividad y rendimiento biomasa en sustrato (Gosset, 2005). El rendimiento celular o rendimiento biomasa en sustrato ($Y_{x/s}$) mide la cantidad de biomasa que puede producirse por unidad de masa de sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y

energía) y varía en función de las condiciones del cultivo, de la fisiología de la célula y su metabolismo.

El desarrollo y operación de CADC de *E. coli* a nivel industrial presenta una serie de retos (mostrados en la Tabla 1.1) que en algunos casos no han sido solucionados satisfactoriamente o cuya solución, eleva el costo de producción.

Tabla 1.1. Principales retos de los CADC de *E. coli* y algunas soluciones propuestas.

Retos	Solución
Sobreflujo metabólico (Lee, 1996; Riesenber g y Guthke, 1999)	- Cultivo en modo lote alimentado (Fed-Batch), de tres tipos: *Con alimentación constante: Se suministran los nutrientes a una velocidad predeterminada y constante. La μ disminuye constantemente (Lee, 1996). *Con alimentación creciente lineal: También disminuye μ a lo largo del cultivo, aunque en menor grado (Lee, 2006). *Con alimentación creciente exponencialmente: Permite controlar μ a un valor constante (Lee, 1996). - Ingeniería metabólica (De Anda et al., 2006; De Mey et al., 2007)
Elevación de calor por agitación y producción metabólica (Lee, 1996; Jana y Deb, 2005).	- Las células se crecen por debajo de su μ_{max} (Lee, 1996). - Se utilizan sistemas de enfriamiento.
Formación y acumulación de subproductos metabólicos inhibidores (Korz et al.,1995; Riesenber g y Guthke, 1999).	-Diálisis (Märkl et al., 1993). -Disminuir la temperatura dentro de un rango de 30 a 26°C (Lee, 1996). -Controlar la μ (Lee, 1996). -Ingeniería metabólica (De Anda et al., 2006; Lara et al., 2008). -Limitar el suministro de la fuente de carbono (Riesenber g y Guthke, 1999).
Alta demanda de oxígeno (Riesenber g y Guthke, 1999; Matsui et al., 1989).	-Aumentar la velocidad de agitación (Lee, 1996; Matsui et al., 2006). -Suministro de oxígeno puro (Lee, 1996). -Ingeniería metabólica (Lee, 1996). -Presurización (Knoll et al., 2007; Knabben et al., 2010; Lara et al., 2011). -Suministro de aire enriquecido con oxígeno (Knoll et al., 2007; Lara et al., 2008).

De entre los retos mostrados en la tabla 1.1, dos de ellos son particularmente importantes: el sobreflujo metabólico y la transferencia de oxígeno. Ambos se abordan con más detalle en las siguientes secciones.

1.1.2 Sobreflujo metabólico en *Escherichia coli*.

Uno de los requisitos para lograr CADC de *E. coli* es usar grandes cantidades de glucosa o de fuente de carbono que serán convertidas en células. 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 aun en condiciones completamente aerobias, dicha bacteria acumula acetato cuando es cultivada a una elevada q_S (Vemuri et al., 2006; Xu et al., 1999; Akesson et al., 2001) y/o con altas velocidades específicas de consumo de oxígeno (q_{O_2}) (Korz et al., 1995). Este fenómeno es conocido como sobreflujo metabólico.

Un porcentaje importante de la glucosa (del 15 al 30%) presente en un cultivo puede desperdiciarse en la formación de acetato por sobreflujo metabólico (Wolfe, 2005; Farmer y Liao, 1997). La producción de acetato es altamente indeseable porque induce en *E. coli* una serie de respuestas como reducción en la μ (incluso en concentraciones tan pequeñas como 30 mg/L) (Wolfe, 2005; Eitman y Altman, 2006), baja en la productividad, disminución de la biosíntesis (Kleman y Strohl, 1994; Luli y Strohl, 1990; Lara et al., 2008), alteraciones en la curvatura del ADN (Eitman y Altman, 2006), reducción de fosfoenolpiruvato (PEP, precursor de compuestos aromáticos de interés industrial) y pH (Flores et al., 2002; Kleman y Strohl, 1994) y por representar un desperdicio de sustrato (Wolfe, 2005; Lara, 2011).

Los efectos anteriores se presentan principalmente debido a que el acetato ocasiona un desacoplamiento en el metabolismo de *E. coli*. A pH neutro, el acetato se presenta en dos formas: ionizada (CH_3COO^-) y protonada (CH_3COOH) (Luli y Strohl, 1990). La segunda forma, debido a su baja naturaleza lipofílica, puede cruzar la membrana celular y actuar como un desacoplador de protones convirtiéndose en una sustancia tóxica (Luli y Strohl, 1990). Una vez que esta forma se encuentra en el interior de una célula con un pH mayor (ca. 7.5) respecto al entorno exterior, se disocia en CH_3COO^- y H^+ , ocasionando una disminución en el pH intracelular. Cuando esto sucede, en el exterior se produce más CH_3COOH causando en el medio de cultivo un flujo neto de iones hidrógeno. Sin embargo, el pH externo no presenta cambios drásticos debido a que en un biorreactor se mantiene controlado. En el interior de la célula con la reducción del pH se produce un efecto desacoplante. Las concentraciones de

ácido acético no disociado mayores a 30 mg/L inhiben el crecimiento de *E. coli* (Luli y Strohl, 1990), aunque pueden existir variaciones entre cepas.

La cantidad de acetato producida en un cultivo puede variar de acuerdo a la cepa cultivada (Kleman y Strohl, 1994; Van de Walle y Shiloach, 1998), a la composición del medio de cultivo, la cantidad de fuente de carbono presente y a la eficiencia y homogeneidad de propagación del mismo (Akesson et al., 2001; Shiloach et al., 1996). Luli y Strohl (1990) reportan diferencias importantes en el acetato producido por diversas cepas de *E. coli* cultivadas en matraces agitados con medio SD-7 adicionado con 5 g/L de glucosa (*E. coli* JM105 0.35 g/L y *E. coli* MC1060 0.92 g/L). Carlson y Srienc (2003) observaron una relación directamente proporcional entre la q_s de glucosa y la velocidad específica de formación de acetato ($q_{acetato}$) en un cultivo de *E. coli* en modo lote, empleando medio mínimo con glucosa. Se observó que cuando la q_s varió de 9.77 a 12.87 mmol/g h, la $q_{acetato}$ aumentó de 12.6 a 16.1 mmol/g h.

La concentración de glucosa en el medio de cultivo influye no solo en la formación de acetato sino también en su reutilización (Kleman y Strohl, 1994). Cuando ésta es baja, el acetato puede ser re-metabolizado o reutilizado en etapas avanzadas del cultivo cuando la glucosa ha sido casi o completamente consumida (Kleman y Strohl, 1994). Este fenómeno se presenta por acción de la enzima isocitrato liasa (ICL) (fig. 1.1) que se activan cuando el flujo de carbono de la glucólisis al Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos (CAT) es bajo (Farmer y Lio, 1997; Van de Walle y Shiloach, 1998).

El sobreflujo metabólico normalmente es atribuido a un desbalance entre la vía glicolítica y la del CAT. La velocidad de reacción de la glucólisis superaría a la del CAT, conduciendo a la acumulación de acetil-coenzima A (AcCoA), la cual es convertida a acetato por la piruvato cinasa y la transacetilasa (Eitman y Altman, 2006; Akesson et al., 2001) (fig. 1.1). Dicho de otra forma, el acetato se produce cuando la q_s es mayor que la de su conversión en biomasa y CO₂ (Kleman y Strohl, 1994).

El sobreflujo metabólico es controlado por diferentes vías metabólicas (fig 1.1): la vía PTA-ACK encargada de fosforilar el AcCoA y convertirlo a acetato por acción de las enzimas acetato cinasa (Ack) y acetil fosfotransferasa (PTA) (Shiloach et al., 1996; Van de Walle y Shiloach, 1998; Kirkpatrick et al., 2001); la ruta de glioxilato en la que las enzimas ICL (isocitrato liasa) y MAS (malato sintetasa) transforman el isocitrato y AcCoA a Malato y la vía Acs que controla el flujo del ácido acético al CAT, regulada por la acetil-CoA sintetasa (Acs) (Kirkpatrick et al., 2001; Van de Walle y Shiloach, 1998).

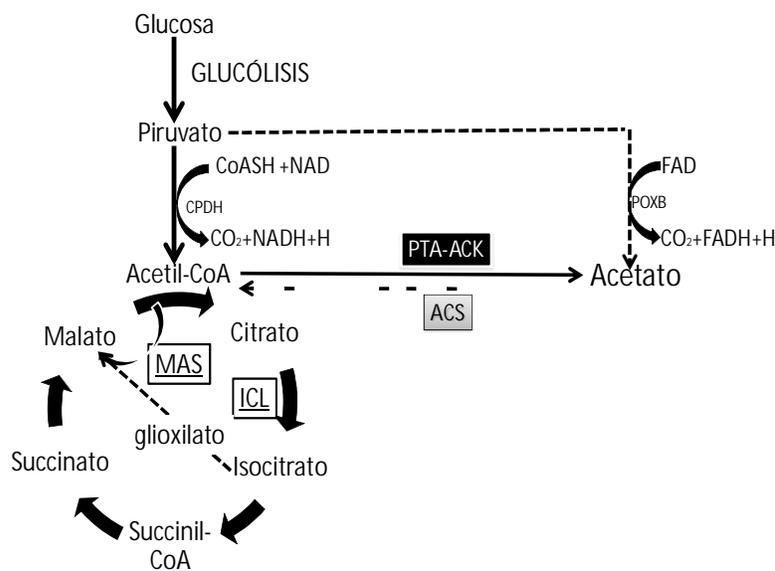


Figura 1.1 Principales rutas metabólicas involucradas en la producción y consumo de acetato en condiciones aerobias. Las reacciones de PTA y ACK del metabolismo de acetato (mostradas con un recuadro negro) transforman el exceso de AcCoA en acetato. La ruta del glioxilato se muestra en recuadros blancos. La enzima ACS se (recuadro gris) es la encargada de transformar al acetato en AcCoA para su reasimilación.

El problema del sobreflujo metabólico ha sido atacado desde distintos enfoques, logrando diferentes grados de éxito. Existen dos grandes enfoques que se han desarrollado: el primero se orienta al modo de operación del cultivo, y el segundo se enfoca a efectuar modificaciones moleculares para reducir el sobreflujo metabólico (De Anda et al., 2006).

1.1.2.1 Estrategias típicas de cultivo para reducir el sobreflujo metabólico.

El sobreflujo metabólico puede evitarse manipulando variables ambientales para reducir la q_s . Se utilizan alternativas como: disminuir la temperatura del cultivo a un rango de 30-26°C (Lee, 1996); suministrar la fuente de carbono a una tasa que evite la formación de acetato

(Korz et al., 1995 y Lara, 2011); modificar la composición del medio de cultivo; sustituyendo la glucosa por otro sustrato que produzca menos acetato como glicerol, manosa o fructosa (Kleman y Strohl, 1994), o usar un medio definido en lugar de uno complejo (Kleman y Strohl, 1994). Todas las estrategias mencionadas, reducen el valor de μ y por lo tanto pueden reducir la productividad global del cultivo.

1.1.2.2. Estrategias moleculares para reducir el sobreflujo metabólico

Se han realizado modificaciones moleculares en el metabolismo central de carbono para disminuir la producción de acetato (Eiteman y Altman, 2006). Las tres estrategias más usadas son: modificaciones que reducen directamente la q_s de glucosa (que se abordaran con detalle más adelante), alteraciones que disminuyen el flujo de carbono a acetato y las transformaciones que redirigen los mecanismos metabólicos y de regulación de formación de acetato a vías alternas (De Anda et al., 2006; Eiteman y Altman, 2006). Esta última ha producido resultados satisfactorios, como en el caso de la sobreexpresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa donde se reporta una reducción hasta del 60% en la producción de acetato sin afectar significativamente el crecimiento de *E. coli* (Farmer y Liao, 1997).

En el presente trabajo se utilizará una cepa de *Escherichia coli* con el sistema de transporte de glucosa modificado para reducir el sobreflujo metabólico, por lo que a continuación, se profundizará un poco más en este tema.

1.1.2.2.1. Cepas de *Escherichia coli* modificadas en el sistema de transporte de glucosa

Una de las estrategias más eficientes para reducir la entrada de glucosa a la célula es desactivar el sistema de fosfotransferasa (PTS) que es el sistema natural de *E. coli* para realizar esta función (Flores et al., 2002; Hernández-Montalvo et al., 2003; Gosset, 2005). Sin embargo, la reducción de la tasa de internalización de glucosa también reduce la velocidad de crecimiento inclusive en porcentajes mayores al 40% (Flores et al., 2002). Esta desventaja puede contrarrestarse con el aumento en la expresión de un sistema alternativo de transporte de glucosa (Gosset, 2005). Tal es el caso de la cepa *E. coli* VH32 GalP⁺ que presenta el

fenotipo $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$, aun cuando es incapaz de introducir glucosa por el sistema PTS, es capaz de crecer en un medio con este carbohidrato (Hernández-Montalvo et al 2003).

La cepa *E. coli* VH32 GalP^+ fue construida a partir de la cepa silvestre W3110 (Hernández-Montalvo et al 2003), tiene el sistema PTS inactivado (mediante la inactivación del gene *ptsH*) y el promotor natural del gen de la enzima permeasa de galactosa (GalP) sustituido por el promotor *trc* que es más fuerte y permite una sobreexpresión de dicha enzima (Hernández-Montalvo et al., 2003; De Anda et al., 2006). Por lo tanto, la glucosa es introducida a través de la permeasa de galactosa en vez del sistema PTS (fig 1.2.) (Flores et al., 2002), lo que reduce el flujo glucolítico y con ello el sobreflujo metabólico. En el sistema de transporte PTS, el transporte de glucosa y la fosforilación ocurren simultáneamente, presentando una velocidad de reacción de $126 \mu\text{mol}/\text{min } g_{prot}$ (Gosset, 2005), mientras que el sistema GalP es más lento presentando una velocidad de reacción de $15.6 \mu\text{mol}/\text{min } g_{prot}$ (Gosset, 2005) lo que permite una formación de acetato menor con un bajo impacto en la velocidad de crecimiento, (Gosset, 2005).

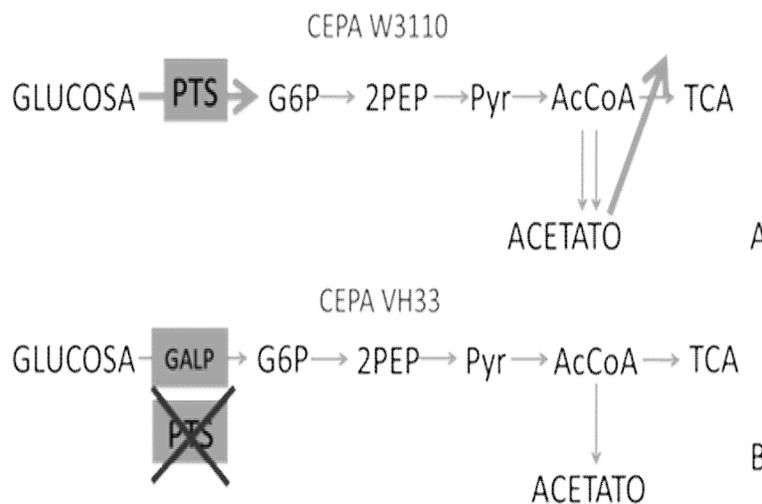


Figura 1.2. Principales diferencias en el metabolismo de carbono entre la cepa silvestre W3110 (A) y la cepa VH32 GalP^+ (B). Como se observa, la cepa VH32 GalP^+ tiene inactivado el sistema PTS y utiliza la GalP para introducir la glucosa. Esta estrategia permite que la velocidad de con la que la glucosa se introduce sea menor y se presente a su vez un menor desacoplamiento entre la glucólisis y CAT, produciendo una menor cantidad de acetato.

Otra ventaja del sistema GalP es el ahorro de fosfoenolpiruvato (PEP). Mientras que el sistema PTS gasta un mol de glucosa y un mol de PEP para formar 1 mol de glucosa-6 fosfato, el transporte a través de GalP gasta 1 mol de glucosa y un mol de ATP para formar este mismo compuesto (Gosset, 2005). El PEP funciona no solo como un precursor de compuestos aromáticos y aminoácidos de importancia industrial sino también como un regulador alostérico para otras rutas metabólicas (Flores et al., 1996; Flores et al., 2002; Gosset et al., 2005) por lo que la cepa VH32 GalP⁺ presenta un valor agregado para ciertos procesos industriales.

Se tienen reportes en los que la cepa VH32 GalP⁺ crecida a bajas concentraciones de glucosa (0.2 g/L) presenta un μ menor (en un 11%) que la de W3110 (Hernández-Montalvo et al., 2003). Esta velocidad de crecimiento puede incrementarse aumentando la expresión del promotor de GalP (Hernández-Montalvo et al., 2003). Aún mejor, si se combina la expresión de GalP con la sobreexpresión de glucocinasa (Glk), se produce un aumento de un 16% en la velocidad de crecimiento reportada para VH32 GalP⁺ (Hernández-Montalvo et al., 2003), sin embargo, el uso de las dos enzimas podría revertir el reducido sobreflujo metabólico presente solo con GalP.

Lara y col. (2008) reportaron el cultivo de alta densidad celular de la cepa VH32 GalP⁺ en modo lote empleando concentraciones de glucosa tan altas como 100 g/L. Según dicho reporte, VH32 GalP⁺ creció un 54% más (52 g/L) que la cepa nativa, produjo 2.10 veces más de proteína recombinante (8.29 g/L) y solo el 15% de ácido acético (2 g/L), mientras que mantuvo una velocidad de crecimiento similar a la de la cepa W3110 (0.6 h⁻¹)

La cepa VH33 es derivada de VH32 GalP⁺, a la que se extrajo el gene de resistencia a kanamicina. Esta cepa ha sido usada exitosamente en cultivos en medio mineral empleando hasta 130 g/L de glucosa, mientras que la producción de acetato fue menor a 0.4 g/L (Knabben et al., 2010). La cepa VH33 también ha sido empleada para la producción de ADN plasmídico en medio mineral con 100 g/L de glucosa inicial. En dichas condiciones, la producción de ADN plasmídico de VH33 fue del doble que la de su cepa silvestre (Soto et al., 2011).

La cepa VH33 representa una alternativa para mejorar la productividad de los cultivos tradicionales al presentar un muy bajo sobreflujo metabólico y crecer a velocidades máximas de crecimiento cercanas a la de su cepa progenitora. Sin embargo, al tener una elevada concentración de biomasa que crece a velocidades relativamente altas, se presenta un nuevo problema: la necesidad de una mayor velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) al medio de cultivo, pues la disponibilidad de oxígeno en un cultivo afecta directamente la velocidad de crecimiento de *E. coli*, (Mc Daniel et al., 1965; Belo et al., 1998), la producción de proteína recombinante (Belo et al., 1998), modifica directamente la velocidad y la ruta que sigue la fuente de carbono disuelta en el medio de cultivo (Smith et al., 1983) y como consecuencia, ocasiona la producción de subproductos que representan un desperdicio de sustrato (Xu et al., 1999; Bollinger et al., 2001; Sandoval-Basurto et al., 2004;). A continuación se abordará este tema así como algunas de las estrategias que se han utilizado para tratar de resolverlo.

1.1.3. Efectos de una transferencia de oxígeno deficiente en cultivos de *Escherichia coli*.

En cultivos de la bacteria aerobia facultativa *E. coli*, la disponibilidad de oxígeno es importante para evitar situaciones de estrés que activen la expresión de sus genes de enzimas fermentativas y la producción de subproductos tóxicos parcialmente oxidados (Becker et al., 1997). Bajo condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis, *E. coli* presenta un metabolismo fermentativo, produciendo una mezcla de ácidos orgánicos (lactato, succinato, formato, acetato) y etanol como subproductos de desecho que pueden reducir el rendimiento y productividad del proceso o inhibir el crecimiento del microorganismo (Knoll et al., 2007). Dado que dichos productos se encuentran parcialmente oxidados, su producción representa un desperdicio de la energía que podría producirse por la oxidación de la fuente de carbono a CO₂ bajo condiciones completamente aerobias. En un biorreactor pueden alcanzarse condiciones microaerobias cuando la demanda de oxígeno del cultivo supera la capacidad de transferencia en el biorreactor. En la escala industrial pueden encontrarse regiones con limitaciones de oxígeno (Lara et al., 2006). Exposiciones tan breves como 2 s a condiciones microaerobias son suficientes para activar el metabolismo fermentativo en *E. coli* (Lara et al., 2006).

Garantizar condiciones aerobias en cultivos de alta densidad celular es un reto a cualquier escala (ver tabla 1.1). Uno de los principales problemas para transferir oxígeno a un cultivo es la solubilidad de dicho gas en el agua (aproximadamente 7 mg/L a temperatura y presión ambiente) (Matsui et al., 2006). La solubilidad del oxígeno disminuye por la presencia de sales, incremento de temperatura y el uso de antiespumantes. Adicionalmente, mientras aumenta el número de células, también aumenta la demanda de oxígeno. Sin embargo, existen pocas alternativas para incrementar eficientemente la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en un biorreactor convencional, ya que variables como la velocidad de agitación y la velocidad de aireación pueden variar solo entre márgenes relativamente estrechos.

De acuerdo a Sandoval-Basurto y col. (2004), cuando se presentan valores de tensión de oxígeno disuelto (TOD) menores al 10% de saturación, se provocan desviaciones metabólicas (metabolismo fermentativo) y efectos fisiológicos indeseables, razón por la cual mantener la TOD por arriba de dicho valor crítico es crucial para el buen desempeño y desarrollo de cultivos de *E. coli*. La q_{O_2} en un cultivo puede variar de acuerdo al medio de cultivo utilizado y a la cepa de *E. coli* cultivada. Carlson y Srienc (2003) reportan valores de q_{O_2} máximos de entre 15 a 19 mmol/g h para cepas silvestres como W3110 y de hasta 21 mmol/g h para cepas modificadas genéticamente como es el caso de *E. coli* B cuando son cultivadas en medio mínimo adicionado con glucosa.

La velocidad de transferencia del oxígeno debe de ser igual a mayor que la q_{O_2} del cultivo (fig. 1.3), además de mantenerse la TOD por encima del valor crítico. En la figura 1.3 se observa que a concentraciones de biomasa mayores a los 40 g/L (concentraciones que se pueden obtener fácilmente con la cepa VH33), la q_{O_2} es por mucho, más elevada que la VTO que se puede llegar a suministrar en un biorreactor de tanque agitado convencional. En este caso, el cultivo de la cepa VH33 se encontraría en condiciones limitadas de oxígeno que ocasionaría un ambiente de microaerobiosis.

Aun cuando en un biorreactor industrial fuera posible tener la velocidad de transferencia de oxígeno adecuada, con frecuencia se presentan heterogeneidades en las concentraciones de oxígeno (Lara et al., 2006), lo cual provoca la existencia de zonas anaerobias en su interior.

Dichas heterogeneidades son atribuidas generalmente a un mezclado ineficiente en la escala industrial, lo que provoca largos tiempos de circulación del fluido en el biorreactor (Lara et al., 2006).

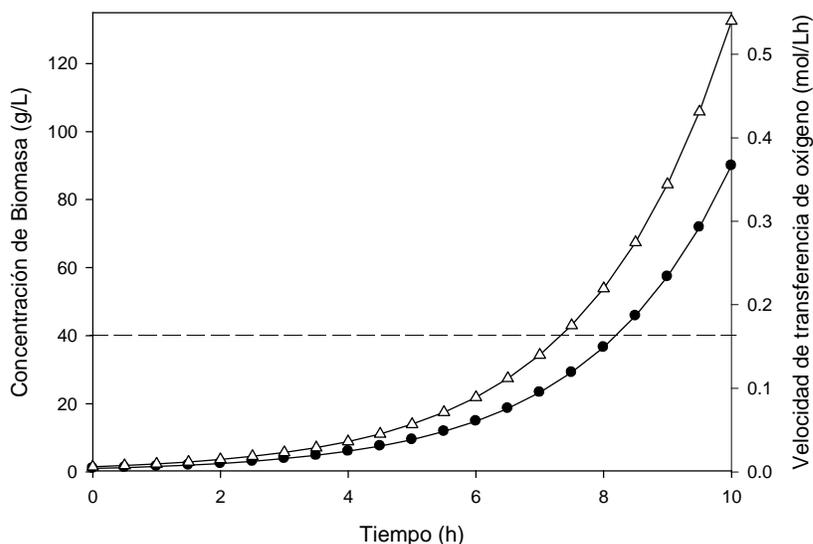


Figura 1.3. Simulación de un cultivo de la cepa *E. coli* **VH33** con una $\mu_{\max}=0.45 \text{ h}^{-1}$, una $q_{\text{glc}}=6.9 \text{ mmol/g h}$, $q_{\text{O}_2}=6 \text{ mmol/g h}$. la biomasa producida se representa por \bullet y la VTO por \triangle . La línea punteada representa la VTO típica alcanzable en biorreactores convencionales.

En la práctica es muy difícil evitar el incremento en el tiempo de circulación cuando se escala un cultivo debido a limitaciones económicas (p. ej., tamaño del motor empleado para la agitación), por lo que los gradientes de concentración son casi inevitables (Amanullah et al., 2004).

Cuando en un cultivo existe limitación de oxígeno, la fuente de carbono es oxidada solo parcialmente, generando varios subproductos (Varma et al., 1993). Bajo condiciones de anaerobiosis, *E. coli* presenta un metabolismo fermentativo, produciendo una mezcla de ácidos como subproductos de desecho (figura 1.4). El catabolismo aeróbico y anaeróbico en *E. coli* requiere rutas metabólicas diferentes (figura 1.4) (Alexeeva et al., 2003) que se encuentran reguladas principalmente por el sistema ArcAB y la proteína FNR (Fumarato Nitrato Reductora) (Becker et al., 1997; Shalel-Levanon et al., 2005). Cada ácido orgánico se produce en cantidades que permitan mantener un equilibrio redox y regenerar (al menos parcialmente) $\text{NADH} + \text{H}^+$.

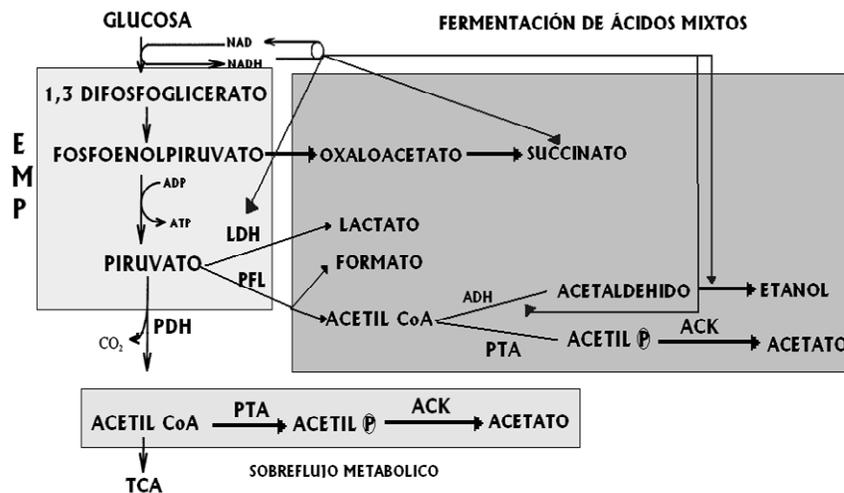


Figura 1.4. Vías metabólicas fermentativas en *E. coli*. Las principales enzimas involucradas son: enzima acetato cinasa (Ack), acetil fosfotransferasa (PTA), Piruvato deshidrogenasa (PDH), piruvato-formato liasa (PFL) y lactato deshidrogenasa (LDH).

El sistema Arc (siglas que significan control de la respiración aerobia) es un sistema regulador de dos componentes; ArcB, el cual es el sensor transmembranal y ArcA que es el regulador citoplasmático que reconoce las señales de ArcB (Tsai et al., 1995). ArcB se activa por autofosforilación en la transición de condiciones aerobias a microaerobias y anaerobias y se mantiene así durante crecimiento anaeróbico. ArcB fosforila a ArcA y ésta se encarga de inhibir la síntesis de varias enzimas del ciclo del ácido cítrico como la succinato deshidrogenasa, fumarasa, piruvato deshidrogenasa, baja la afinidad del citocromo *b* y activa la expresión del *d* y de enzimas del metabolismo fermentativo (Shalel-Levanon et al., 2005). La proteína FNR (siglas que significan Fumarato Nitrato Reductor) contiene el grupo Fe-S que funciona como sensor redox. La concentración de FNR es similar en condiciones anaerobias y aerobias; sin embargo, se encuentra activa solamente durante el crecimiento anaerobio reprimiendo entre otras oxidasas, al citocromo *o* y activando entre otras, a la formato hidrogenasa, fumarato reductasa y aspartasa (Shalel-Levanon et al., 2005).

En 1993, Varma y colaboradores analizaron estequiométricamente el catabolismo de la glucosa en *E. coli*. Para ello, utilizaron diferentes velocidades de oxigenación (desde condiciones completamente anaerobias a aerobias) y una $q_s = 10$ mmol/g h. Observaron que dicho microorganismo puede presentar diferentes subproductos de acuerdo a las condiciones

de oxígeno disuelto en el medio y establecieron que de acuerdo a la expresión genética y al gasto energético, su metabolismo presenta cinco fases:

FASE I. Bajo condiciones completamente anaerobias y con una velocidad de crecimiento de 0.26 h^{-1} , la bacteria utiliza una reacción de transhidrogenación de NADH a NADPH para producir la mayoría del potencial redox biosintético, en el medio se encuentran secretados tres subproductos: acetato, etanol y formato incapaces de ser utilizados para el crecimiento celular (Varma et al., 1993).

FASE II. El etanol deja de ser secretado, pero el acetato y formato continúan produciéndose. Los citocromos son utilizados como transportadores terminales de electrones provenientes del oxígeno, la ruta pentosa fosfato se enciende para favorecer la generación biosintética redox, aunque la transhidrogenación sigue siendo la ruta más utilizada (Varma et al., 1993).

FASE III. Aun cuando el acetato y formato siguen siendo secretados, esta fase se caracteriza por un balance de NADH/NAD⁺ lo que hace que la célula no esté forzada a eliminar más NADH. En esta etapa, tanto la piruvato deshidrogenasa (utilizada por primera vez en el cultivo) como la piruvato-formato liasa son empleadas para formar acetil coenzima A estableciendo una producción de NADH. La transhidrogenación ya no está activa y toda la generación de factores redox se produce por la vía pentosa fosfato (Varma et al., 1993).

FASE IV. Se presenta una fase aerobia, se muestra el completo uso de la ruta CAT para la generación de energía. La enzima anaeróbica piruvato-formato liasa no se utiliza y el acetato es el único subproducto presente. El Formato y el NADH son utilizados para el crecimiento celular (Varma et al., 1993).

FASE V. Se tiene una VTO totalmente satisfactoria para cubrir la q_{O_2} celular. Los subproductos antes mencionados no son producidos y toda la fuente de carbono es utilizada para crecimiento. El CAT es la mayor fuente de energía junto con la fosforilación oxidativa. Cantidades muy similares de moléculas redox son producidas por la isocitrato deshidrogenasa y la vía pentosa fosfato (Varma et al., 1993).

Para evitar la formación de estos subproductos se han desarrollado algunas estrategias tanto a nivel de bioprocesos como con ingeniería metabólica que se describen a continuación.

1.1.4. Soluciones para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno.

1.1.4.1 Estrategias típicas de cultivo para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno.

Dentro de las estrategias para mejorar la capacidad de transferencia de oxígeno se encuentran: reducir la temperatura del cultivo a un rango de 30 a 26°C para que la bacteria crezca más lentamente y consuma menos oxígeno (Lee, 1996), utilizar cultivos con una mayor presión parcial de oxígeno aumentando la presión total del biorreactor (Knoll et al, 2007); aumentar la tasa de aireación o la velocidad de agitación del cultivo (Matsui et al., 2006), utilizar aire enriquecido con oxígeno puro o éste último solo (Knoll et al; 2007). Aun cuando todas estas alternativas cumplen su objetivo, suelen ser imprácticas debido a que ocasionan estrés celular (Belo et al, 1998) o provocan incrementos en los costos de producción (Lee, 1996) y energéticos.

1.1.4.2. Estrategias moleculares para reducir las limitaciones en el suministro de oxígeno: la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria*

La aplicación de ingeniería metabólica ha sido una estrategia innovadora para disminuir el estrés ocasionado por las limitaciones de oxígeno y los costos. Esta herramienta ha permitido crear cepas modificadas que expresen proteínas heterólogas como la NADH-oxidasa de *Streptococcus pneumoniae* (Vemuri et al., 2007) o la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* (VHb) (Zhang et al., 2007) teniendo un incremento en la productividad de las mismas. Se abordarán a continuación algunas características principales de la hemoglobina VHb por ser de interés para la presente tesis.

1.1.5 Generalidades de la hemoglobina VHb.

Una alternativa para mejorar el metabolismo del oxígeno bajo condiciones microaerobias es la introducción de una hemoglobina heteróloga en *E. coli*. La hemoglobina soluble VHb (proveniente de la bacteria estrictamente aerobia, filamentosa, gram negativa *Vitreoscilla stercoraria*) (Khleifat et al, 2006; Bollinger et al., 2001) es un homodímero proteico (Zhang et al., 2007). Cada subunidad posee una masa molecular relativa a 15,775 Da y un dominio hemo. Su síntesis está codificada por el gen *vgb* cuyo promotor (P_{vgb}) es inducido al máximo cuando los niveles de oxígeno son menores al 2% de saturación (Khosla y Bailey, 1989; Frey et al., 2003) y modulado parcialmente por la proteína FNR que reconoce un sitio 48 pb corriente arriba de éste (Tsai et al, 1995). VHb es una proteína soluble localizada en ambos lados de la membrana citoplasmática de *Vitreoscilla* (Hart et al., 1990; Ramandeep et al., 2001).

La VHb tiene una constante de asociación con el oxígeno promedio pero una constante de disociación enorme en comparación con otras oxidasas ($k_D= 0.25 \mu\text{m}$) lo que sugiere que está diseñada para liberar el oxígeno rápidamente a bajas concentraciones de éste en el entorno (Wei y Chen, 2008). VHb es inducida bajo condiciones hipóxicas (Khleifat et al., 2006) o microaerobias, sugiriendo que su función primaria es atrapar al oxígeno y facilitar su transferencia a las vías respiratorias y así permitir a *Vitreoscilla* sobrevivir bajo estas condiciones (Chi et al., 2009; Zhang et al., 2006).

Se ha demostrado que la expresión de VHb, en condiciones microaerobias, en varias especies de microorganismos de importancia biotecnológica como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandii*, *Acremonium chrysogenum*, *Rhizobium etli*, *Streptomyces sp.*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia sp.*, *Cornebacterium glutamicum* y en plantas como el tabaco, da lugar a un incremento en la densidad celular (Zhang et al., 2007), en el metabolismo oxidativo y en la formación de productos comerciales (DeModena et al., 1993; Wei y Chen, 2008). Por ejemplo en células la presencia de la VHb en *E. coli* (Xiao y Chen, 2008) y *Pseudomonas sp.* incrementó la densidad celular; en *Amycolatopsis mediterranei*, la

producción de rifamicina B aumenta en un 29.5 % (Guerra et al., 2008) y en *Acremonium chrysogenum* la producción de cefalosporina C (Tsai et al., 1995).

Existen algunas evidencias que muestran que esta proteína mejora el transporte de cobre al interior de la célula (Khleifat et al., 2006), y durante el estrés oxidativo, esta proteína puede actuar como una oxidasa terminal o como una dioxigenasa encargada de transformar monóxido de nitrógeno (NO) en nitrato. Sin embargo, dicha función, solo se encuentra presente cuando esta hemoglobina se encuentra asociada a flavoproteínas nativas de *E. coli* (Bollinger et al., 2001 y Frey et al., 2002).

La hipótesis más aceptada sobre el mecanismo de acción de la VHb fue propuesta por Kallio et al en 1994 y establece que dicha hemoglobina actúa como una fuente adicional de oxígeno, aumentando la concentración intracelular de éste en condiciones microaerobias y como consecuencia, de las oxidasas terminales citocromo *o* y *d*; lo que a su vez incrementa la eficiencia en la bomba de protones en la cadena respiratoria generando mayores cantidades de ATP (fig. 1.5)

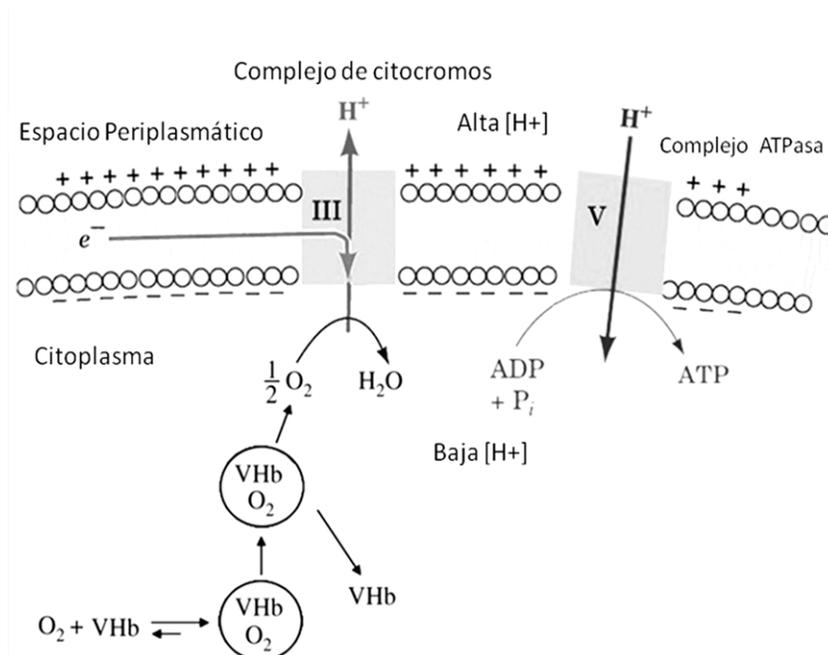


Figura 1.5. Mecanismo propuesto de la interacción de VHb con el complejo de citocromos para promover la producción de ATP (Tomado de Zhang et al., 2007).

Los experimentos reportados por Tsai y colaboradores (1995) apoyan la hipótesis de Kallio, ya que muestran que la presencia de VHB en células de *E. coli* influye positivamente en la expresión de los citocromos. En el caso del citocromo *d*, la hemoglobina permite elevar la DO hasta un nivel que desencadene los mecanismos regulatorios del sistema Arc, sintetizando ArcA que, en combinación con otras moléculas reguladoras, incrementan la actividad del promotor de dicho complejo (Tsai et al., 1995). Bajo condiciones microaerobias, la acumulación de VHB, aumenta la actividad específica del citocromo *o* pero no del *d*. Por lo tanto, VHB aumentará la velocidad de translocación de protones por esta oxidasa dando como resultado una mayor acumulación de ATP y un crecimiento más rápido. VHB no presenta un efecto notable o importante en una mutante sin citocromo *d*, ya que el incremento en el oxígeno disuelto no influye significativamente en la actividad del citocromo *d*.

Células que tienen inactivado el citocromo *d* y que solo presentan actividad del citocromo *o*, en presencia de VHB tienen un aumento de hasta 5 veces en su actividad en comparación a la cepa nativa, aquellas que expresan solamente citocromo *d* muestran un aumento de 1.5 veces más que la cepa nativa. Cuando se encuentran los dos citocromos y, bajo la expresión de VHB, el citocromo *o* presenta una concentración 7 veces mayor (0.14 nmol/mg) que la reportada para la cepa silvestre (0.02 nmol/mg), por su parte la oxidasa *d* solo registra el doble de su concentración (después de 7 h de condiciones microaerobias) (Tsai et al., 1995).

1.1.6 Efecto de la VHB en el metabolismo de cepas *E. coli* VHB⁺.

La expresión de VHB en *E. coli* está directamente ligada a un mejoramiento en la cadena respiratoria y en el metabolismo aerobio (Bollinger et al., 2001). La presencia de VHB en estas células, crecidas en medio mínimo con glucosa, ocasiona una reducción en la producción de los principales subproductos de origen fermentativo (Tabla 1.2) (Tsai et al., 1995 y Frey et al., 2001).

Tabla 1.2. Datos fisiológicos, obtenidos en un cultivo en modo lote alimentado con glucosa, de una cepa *E. coli* MG1655:pPPC1(VHb⁺) y MG1655 (Silvestre)(Frey et al.,2001).

PARÁMETRO	VHb ⁺	CONTROL
	mmol/g h	
<i>q_{etanol}</i>	0.53	0.32
<i>q_{acetato}</i>	2.27	3.05
<i>q_{formato}</i>	2.59	4.1
<i>q_{D-lactato}</i>	1.43	0.76
<i>q_{succinato}</i>	0.58	0.51

El efecto que produce VHb en la formación de acetato y etanol sugiere que estas células modificadas pueden regenerar en otras vías los equivalentes reducidos que de otra forma, se originarían por la síntesis de estos subproductos. Las células VHb⁺ dirigen una gran fracción de glucosa a la vía de las pentosas fosfato y una pequeña fracción a la vía CAT, solo para generar material para biosíntesis (Tsai et al., 1995) y una disminución del 30% en velocidad de formación de CO₂ (CER). La disminución en la excreción de acetato y el aumento en el crecimiento en células productoras de VHb, implica que estas células son más competentes en la producción de ATP, idea que también es apoyada por los resultados obtenidos por Frey y colaboradores (2001), quienes observaron que las células VHb⁺, generan un mayor flujo de protones por molécula de oxígeno reducido en comparación con la cepa silvestre y presentan un aumento del 30 % en la actividad de ATPasa.

Las ventajas reportadas en cultivos de *E. coli* expresando la hemoglobina VHb podrían ser aumentadas combinando esta estrategia con cepas de *E. coli* que tengan inactivado el sistema PTS y sobreexpresado el sistema GalP. En el presente proyecto, se proponen estrategias moleculares para reducir el sobreflujo metabólico y disminuir las desventajas de un cultivo en condiciones limitantes de oxígeno por medio de la expresión de una hemoglobina heteróloga en combinación con la inactivación del sistema PTS y la sobreexpresión del sistema GalP.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los efectos cinéticos y estequiométricos que la VHb produce en las cepas de *Escherichia coli* W3110 y W3310 PTS⁻ GalP⁺ (VH33) cultivadas en condiciones aerobias y microaerobias con altas concentraciones de glucosa en modo lote.

Objetivos específicos

- Evaluar los cambios que la presencia de la VHb origina en el comportamiento cinético y estequiométrico de las cepas de *Escherichia coli* W3110 y W3310 PTS⁻ GalP⁺ (VH33), cultivadas bajo condiciones completamente aerobias en modo lote en medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa.
- Evaluar los cambios que la presencia de la VHb origina en el comportamiento cinético y estequiométrico de las cepas de *Escherichia coli* W3110 y W3310 PTS⁻ GalP⁺ (VH33), en un cultivo con fases aerobia y microaerobia utilizando un medio complejo adicionado con 25 g/L de glucosa.
- Evaluar los cambios que la presencia de la VHb origina en el comportamiento cinético y estequiométrico de las cepas de *Escherichia coli* W3110 y W3310 PTS⁻ GalP⁺ (VH33), en un cultivo con fases aerobia y microaerobia utilizando un medio complejo adicionado con 50 g/L de glucosa.

1.3 HIPÓTESIS

- La presencia de la VHb en las cepas de *Escherichia coli* W3110 y VH33, permitirá producir una mayor cantidad de biomasa en cultivos en modo lote empleando concentraciones de glucosa de hasta 50 g/L, en los que se presenta una fase microaerobia debido a limitaciones en la transferencia de oxígeno.
- La presencia de la VHb en las cepas de *Escherichia coli* W3110 y VH33, contribuirá a reducir el sobreflujo metabólico en cultivos completamente aerobios en modo lote empleando bajas concentraciones de glucosa.

1.4 JUSTIFICACIÓN.

El sobreflujo metabólico es un problema general en cultivos aerobios de *E. coli*. La cepa VH33 es capaz de mantener altas velocidades de crecimiento y alcanzar altas densidades celulares en cultivos por lote con elevadas concentraciones de sustrato, manteniendo un muy reducido sobreflujo metabólico. Sin embargo, dicha estrategia de cultivo presenta altas demandas de oxígeno que difícilmente serían satisfechas en reactores de gran escala sin recurrir a esquemas de mezcla de gases o empleo de oxígeno puro. Condiciones limitantes de oxígeno en el medio, activan el metabolismo fermentativo de *E. coli*, lo cual resulta altamente indeseable. Además, bajas concentraciones de oxígeno generalmente reducen la velocidad de crecimiento, y la cantidad de biomasa alcanzable.

La hemoglobina VHb ha demostrado ser útil para reducir el impacto de las condiciones microaerobias en los cultivos. Expresar el gene *vgb* en *E. coli* VH33 puede resultar una opción ventajosa para el desarrollo de HCDC.

Una cepa con tales modificaciones en el sistema de transporte de sustrato y expresando una hemoglobina, potencialmente lograría una mínima producción de acetato y en consecuencia, alcanzaría una mayor cantidad de biomasa y de producto deseado, y un aumento en productividad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

En este apartado se describen los procedimientos para obtener las cepas de *E. coli* usadas en este trabajo, los plásmidos empleados, el biorreactor usado, las técnicas para comprobar la producción de la hemoglobina de interés en las cepas transformadas, los métodos de análisis para la determinación de densidad celular, concentración de metabolitos, los cálculos de parámetros cinéticos y estequiométricos así como la producción de geles de proteína y determinación de velocidad de consumo de oxígeno para comprobar la existencia de la hemoglobina de interés en las cepas modificadas.

2.1 Cepas y plásmidos empleados.

2.1.1 Cepas de *Escherichia coli*.

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se describen en la Tabla 2.1. La bacteria *Escherichia coli* W3110 se considera como cepa progenitora silvestre para el resto de las líneas bacterianas. Esta cepa fue obtenida de la colección del Dr. Francisco Bolívar, Instituto de Biotecnología de la UNAM. La cepa VH33 fue obtenida del laboratorio del Dr. Guillermo Gosset del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2.1 Cepas bacterianas usadas en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Fuente	Referencia
W3110	F ⁻ IN(rrnD-rrnE)λ ⁻	F. Bolívar, UNAM	ATCC 27325
VH33	W3110 Δ <i>ptsH</i> , <i>ptsI</i> :: <i>crr</i> , Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ</i> :: <i>loxP</i>	G. Gosset, UNAM	De Anda et al., 2006

La cepa VH33 es una cepa PTS⁻ derivada de W3110 en la cual se eliminó el gene *ptsH* lo que da como resultado la inactivación del sistema PTS (Hernández-Montalvo et al., 2003). En el cromosoma de dicha cepa, se intercambiò el promotor natural del gene *galP* por el promotor híbrido *trc* en para aumentar la capacidad de transporte de glucosa. Este promotor fue introducido empleando una técnica basada en la estrategia reportada por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), con algunas modificaciones. El método consistió en usar productos de PCR a partir del plásmido *ptrc_cat* (De Anda et al., 2006), que contiene el gene de resistencia a cloramfenicol (*cat2*) corriente arriba del promotor *trc*, para obtener la

inactivación de genes cromosomales. Dado que el gene *lacI* también se encuentra inactivado en la cepa VH33 (ver tabla 2.1), el promotor *trc* adquiere la característica de ser constitutivo. El gene *cat2* fue posteriormente extraído de la construcción.

Las cepas W3110 y VH33 fueron transformadas con los plásmidos Bluescript (Stratagene, California, EUA) y pNKD1 (Dikshit et al., 1998) (descritos abajo) y contenidas en crioviales (1.7 mL de volumen total) conteniendo glicerol al 80% y almacenadas a -78°C .

2.1.2 Plásmidos.

2.1.2.1 Plásmido Bluescript.

Dado que el plásmido pBS fue el esqueleto para la construcción del plásmido pNKD1 (Dikshit et al., 1998), el cual contiene el gene *vgb*, se usó como control para mantener la carga metabólica y la resistencia a antibiótico similares a las conferidas por pNKD1. Las cepas VH33 y W3110 fueron transformadas con el plásmido pBS (Stratagene, California, EUA) y denotadas con los nombres W3110 *vgb⁻* y VH33 *vgb⁻*. El plásmido Bluescript consta de 3204 pb, contiene resistencia a ampicilina, el origen de replicación EcoRI y un sitio de múltiple cortes para enzimas de restricción. La figura 2.1 muestra un esquema general del plásmido pBS.

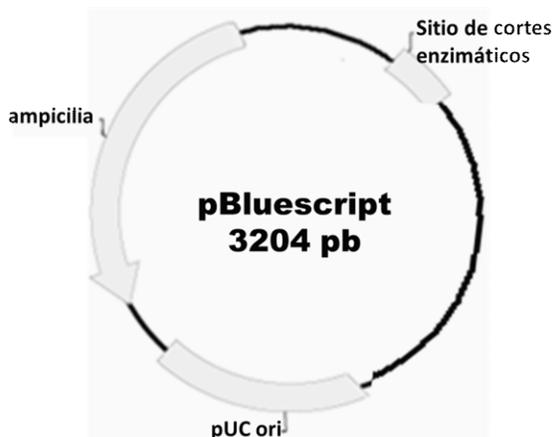


Figura 2.1 Esquema del plásmido Bluescript (pBS). El plásmido contiene el origen de replicación EcoRI, un gene de resistencia a ampicilina como marcador de selección y un sitio de corte de diferentes enzimas de restricción.

2.1.2.2 Plásmido pNKD1.

El plásmido pNKD1 está basado en el esqueleto del plásmido pBS (Stratagene, California, EUA). En éste fue insertado el gene *vgb* (que expresa la hemoglobina VHb) en el sitio de restricción *SmaI* bajo el control transcripcional del promotor de *Vitreoscilla stercoraria* con una modificación (Dikshit et al., 1998).

La modificación en el promotor nativo de *V. stercoraria* incluida en el plásmido pNKD1 consiste en un sitio CRP (que por sus siglas en ingles significa Proteína Represora de Catabolitos y que funciona como un regulador positivo incrementando la unión de la ARN polimerasa al promotor y aumentando la transcripción) insertado 100 pb corriente arriba del inicio del gene *vgb*. Esta modificación fue realizada por Dikshit y colaboradores (1998) con la finalidad de incrementar la expresión del gene *vgb* bajo condiciones aerobias. La figura 2.2 muestra un esquema general del plásmido pNKD1.

El plásmido pNKD1 fue donado por el Prof. Benjamin C. Stark del Instituto de Tecnología de Illinois, Chicago. Las cepas transformadas con este plásmido serán referidas como W3110 *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁺.

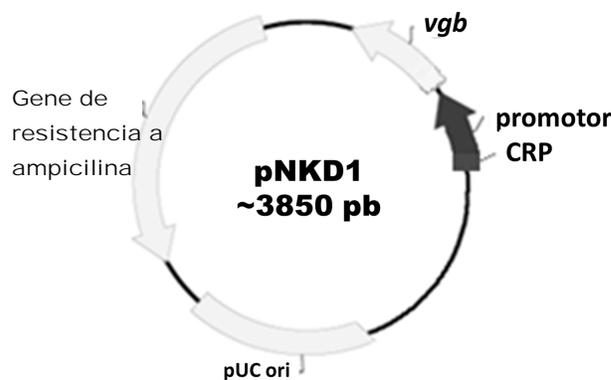


Figura 2.2 Esquema del plásmido pNKD1 que contiene el gen codificante de la hemoglobina VHb (*vgb*), el promotor nativo de este gen y una modificación (sitio CRP) para la sobreexpresión de este gen en condiciones aerobias.

2.2 Comprobación de la presencia del gen *vgb* en el plásmido pNKD1.

2.2.1 Extracción del plásmido pNKD1.

Las células donadas por el Dr. Benjamin Stark conteniendo el plásmido pNKD1 se cultivaron en 10 mL de medio líquido Luria-Bertani (tabla 2.2) suplementado con ampicilina disódica a una concentración final de 0.1 g/L como presión de selección, a una temperatura controlada de 37 °C y una agitación de 300 rpm, durante 12 h. Se tomaron 50 mL de este cultivo y se sembraron en una caja petri conteniendo 20 mL de medio Luria-Bertani sólido (adicionado con 15 g/L de agar microbiológico) y ampicilina disódica (concentración final de 0.1 g/L).

Para agregar ampicilina disódica a los medios de cultivo, se empleó una solución de ampicilina la cual se preparó se preparó disolviendo 5 g de ampicilina disódica en 50 mL de agua destilada (esto da como resultado una solución con una concentración final de 100 g/L). Esta solución concentrada se utilizó a lo largo de todo este trabajo. Dicha solución fue esterilizada por filtración a través de una membrana con un poro de 0.20 µm (Sartorius, Alemania). Todas las esterilizaciones por filtración realizadas en este trabajo se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones.

Tabla 2.2 Composición del medio de cultivo Luria-Bertani*.

Componente	Concentración (g/L)
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro de sodio	30

* El pH del medio se ajustó a 7.4 con NaOH 2M y se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 18 min.

Con una colonia aislada se realizó un cultivo líquido en medio LB (12.5 mL) con 12 µL de solución de ampicilina. Después de 8 h de crecimiento, se llevó a cabo la extracción de plásmido con el kit QIAprep Spin (Qiagen, Valencia USA) siguiendo las condiciones del

fabricante y recuperando el plásmido en buffer TE. Para comprobar la adecuada extracción de los plásmido se realizó una electroforesis cuyas especificaciones se mencionan a continuación.

2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis se realizó en una matriz de agarosa al 1% (p/v) disuelta por calentamiento en tampón TBE 1X. Este amortiguador tiene la siguiente composición: 4.84 g de 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS), 5.5 g de ácido bórico, 10 mL EDTA al 0.2 M. Estos componentes se disolvieron en 500 mL de agua destilada. El pH de la solución se ajustó a 8 utilizando una solución de NaOH 10M y se aforó con agua hasta completar 1 L.

Cada pozo del gel de agarosa se cargó con 2 µL de muestra combinados con 1 µL del amortiguador de carga azul de bromofenol 6X. La electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TBE 1X, con la aplicación de una corriente de 100 V durante 1.5 h. La tinción del ADN se realizó con una solución de bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 µg/mL. Para identificar los pesos moleculares aproximados de las bandas de ADN obtenidos se utilizaron 2 µL del marcador de 1 kb O'GeneRuler DNA Ladder (Fermentas, Canadá). Los geles se fotografiaron a través de un fotodocumentador Eagle Eye II (Stratagene, California).

2.2.3 Amplificación del gene *vgb* en el plásmido pNKD1.

Una vez comprobado el peso del plásmido extraído de las células donadas, se comprobó la presencia del gene de interés en el plásmido pNKD1 mediante un ensayo de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) con oligómeros diseñados para amplificar directamente el gene *vgb*. Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de PCR se muestran en las tablas 2.3 y 2.4.

La secuencia de los oligómeros utilizados para la PCR fueron los siguientes:

FW: 5'ATGTTAGACCAGCAAACCATT3'

RV: 5'TAGGATCCATGCCAAGGCACACCTGAAGA3'

La secuencia de cada uno de estos oligómeros fue tomada del artículo de Guerra y cols. (2008) y permiten la amplificación completa del gen *vgb* en un fragmento de aproximadamente 600

pb. Así mismo, se verificó que dichos oligómeros no amplificaran otro fragmento de tamaño similar analizando la secuencia de NCBI con número de acceso: M27061. La fabricación de dichos oligómeros se realizó en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2.3. Componentes de la mezcla para amplificar el gen *vgb*.

Componente	Volumen (µL)
MgSO ₄ 100 mM	1.5
Tampón 10X	10
Nucleótidos 10 mM	2
Primers 10 mM	10 de cada uno
Vent polimerasa 5 u/µl	0.5
DNA molde 1:100	10
Agua	66
Volumen total	100

Los productos obtenidos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelta en buffer TBE (Tris Borato EDTA) 1 M. Para identificar las bandas de ADN se le agregaron a los 40 mL de gel de agarosa 7 µL de solución de bromuro de etidio (a una concentración de 0.5 µg/mL). La electroforesis se realizó a un voltaje de 110 V, durante 75 min. Cada pozo se cargó con 2 µL de muestra y 1 µL de amortiguador de carga.

Tabla 2.4. Características de los ciclos utilizados en PCR para amplificar el gen *vgb*.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Inicial	95 °C	3 min.
Desnaturalización	95 °C	30 s
Hibridación	50 °C	30 s
Elongación	72 °C	30 s
Elongación final	72 °C	10 min
Número total de ciclos:35		

2.2.4 Preparación de células W3110 y VH33 competentes.

Para la preparación células competentes de las cepas W3110 y VH33 se siguió el método descrito por Hanahan (1983). Se utilizó agua destilada y demonizada para preparar todas las soluciones y medios de cultivo, así como para el lavado del material utilizado en la

preparación y almacenamiento de soluciones y medios y en el procesamiento de las células (Fernández, 1997). Los pasos realizados fueron los siguientes:

1. Se sembró una placa de medio YENB sólido (tabla 2.5) con la cepa de interés, de tal forma que se obtuvieron colonias aisladas y se incubaron a 37 °C durante un periodo de 12-14 h.

Tabla 2.5 Composición del medio YENB.

Componente	Concentración
Bacto triptona	2.0%
Extracto de Levadura	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM
Agar (solo para medio sólido)	15%

2. Se inoculó una colonia aislada del cultivo sólido en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio YENB previamente ajustado a un pH de 7.0. El cultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 250 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica (medida a 600 nm) de entre 0.45 y 0.5 unidades. Enseguida, el matraz se almacenó a 4 °C durante 20 min. La composición del medio YENB se describe en la Tabla 2.5. Este medio se esterilizó por autoclave.

3. Las células se colectaron mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min, manteniendo una temperatura de 4 °C.

4. A continuación se resuspendieron las células (con suavidad y manteniendo su temperatura alrededor de 4 °C) en solución RF1 (un tercio del volumen inicial), la suspensión se mantuvo en hielo durante 20 min. La solución RF1 se preparó de la siguiente manera: KCOOH 30 mL,

CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15% (p/v), MnCl₂ 50 mM y RbCl 100 mM. Se ajustó el pH a un valor de 5.8 con ácido acético 0.2 M. Esta solución se esterilizó por filtración.

5. Las células resuspendidas en el paso anterior, fueron centrifugadas bajo las condiciones descritas en el paso 3, se resuspendieron las células en solución RF2 (1/12.5 del volumen inicial). La suspensión se mantuvo en hielo durante 20 min. La solución RF2 tuvo la siguiente composición: CaCl₂ 75 mM, glicerol al 15% (p/v), MOPS 10 mM pH7 y RbCl 10 mM. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH y se esterilizó por filtración. Finalmente se repartió la suspensión en alícuotas de 200 µL.

Las células competentes así preparadas se conservaron a -80 °C (previa congelación en hielo seco) hasta su uso.

2.2.5 Transformación de células competentes por electroporación con los plásmidos Bluescript y pNKD1.

Para realizar la transformación por electroporación se utilizó un electroporador Eppendor AG multiporador. El procedimiento experimental elaborado se describe a continuación:

1. Se mezcló en una cubeta para electroporación fría con una distancia de 0.1 cm entre electrodos, de 1 a 5 µL de vector (el plásmido pNKD1 presentó una concentración aproximada de 68.1 ng/µl y el plásmido pBS 97.3 ng/ µl) y 50 µL de células competentes frías de *E. coli* W3110 o VH33.
2. Esta mezcla se dejó enfriar en hielo aproximadamente durante 30 min.
3. Se introdujo la cubeta en la rejilla del electroporador y se aplicó una descarga eléctrica de aproximadamente 2500 V con un tiempo promedio de 5 ms. (Si en el electroporador se registró una lectura de 5.6 ms o mayor, la transformación se consideró exitosa).
4. A continuación, se añadió rápidamente a la cubeta 1 mL de medio SOB, se mezcló perfectamente con ayuda de una micropipeta y se recuperó el volumen total en un tubo de ensaye estéril con tapa. La composición del medio SOB se reporta en la tabla 2.6. Este medio se ajustó a un pH 7, se aforo hasta un volumen final de 1 L con agua destilada y fue

esterilizado por calor. Una vez frío y antes de usar, se le agregaron 10 mL de una solución $MgCl_2$ 1 M.

Tabla 2.6 Composición del medio SOB.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Bacto- triptona	20 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	0.5 g/L
1M KCl	2.5 mL

5. El tubo de ensayo con el medio SOB y las células transformadas se incubó a 37 °C y 250 rpm durante 1 h para permitir que se expresara la resistencia al antibiótico.

6. Posteriormente se sembró por extensión 10 μ L del inóculo en medio LB adicionado con el antibiótico de selección (ampicilina) y se incubó a 37 °C durante 12 h.

7. Las transformantes se analizaron mediante minipreparaciones, y al mismo tiempo se resembraron en una placa réplica.

Consecutivamente se realizó la extracción de los plásmidos y su comprobación por medio de gel de electroforesis y en el caso de pNKD1 por medio de PCR.

2.2.6 Comprobación de la transformación de las cepas VH33 y W3110 con los plásmidos pBS y pNKD1.

Para la comprobación se creció una colonia aislada de cada una de las cepas transformadas con el plásmido correspondiente en un cultivo líquido en medio LB (12.5 mL) con 12 μ L de solución de ampicilina. Después de 8 h se elaboró la extracción de plásmido con el kit QIAprep Spin de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se efectuó una PCR, una digestión y electroforesis con las mismas características descritas en el apartado 2.2.2 para comprobar su adecuada extracción y presencia o ausencia del gene *vgb* en cada cepa y el tamaño del plásmido presente.

2.3. Preparación de crioviales de las cepas obtenidas.

Después de haber comprobado la existencia de los plásmidos pBS y pNKD1 en las cepas W3110 y VH33 se realizó la preparación de diez crioviales de cada una de cepas obtenidas. Se elaboró con cada una de las cepas por separado, un cultivo de 8 h, a 300 rpm y 37 °C con 20 mL de medio LB y 20 µL de solución de ampicilina disódica inoculado con una colonia aislada. Cada criovial contuvo 850 µL de una solución de glicerol al 80 % y 850 µL del cultivo de cada cepa específica. Los crioviales así elaborados se enfriaron primero en hielo durante 5 min y después fueron preservados a una temperatura de -80 °C.

2.4 Preparación del inóculo para cultivos en biorreactor en modo lote.

Los inóculos para el cultivo en biorreactor se desarrollaron en matraces bafleados (4 baffles en el fondo del matraz) de 250 mL, adicionando 850 µL de un criovial conteniendo la cepa correspondiente en 50 mL de medio Luria-Bertani 2X, esterilizado por autoclave y utilizando como presión de selección 50 µL de la solución de ampicilina. El inóculo se creció a una velocidad de agitación de 300 rpm, con una temperatura de 37 °C durante 17 h. El medio LB 2X se elaboró con el doble de las concentraciones descritas en la Tabla 2.2 y se ajustó el pH a 7.6 usando una solución de NaOH 10M.

2.5 Medio de cultivo para modo lote.

Para el cultivo de las diferentes cepas de *E. coli*, se empleó un medio complejo suplementado con glucosa. La composición del medio se describe en la tabla 2.7, se ajustó su pH a 7.6 por adición de una solución de NaOH 10 M y fue esterilizado por autoclave. La concentración de sales minerales, tiamina, metales traza y MgSO₄ ·7H₂O se mantuvo constante,

independientemente de la concentración inicial de glucosa. La solución de metales traza, glucosa, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (esterilizados en autoclave), tiamina y ampicilina (esterilizados por filtración) se prepararon por separado y fueron adicionadas una vez que el medio fue esterilizado por calor. Las soluciones de glucosa, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tiamina y ampicilina disódica se prepararon a una concentración de 650, 500, 10 y 100 g/L respectivamente.

Tabla 2.7 Composición del Medio de cultivo para modo lote.

Componente	Concentración (g/L)
K_2HPO_4	17
KH_2PO_4	5.3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$	1
Citrato de sodio tribásico	1
Hidrocloruro de Tiamina	0.01
Ampicilina sal disódica	0.1

La composición de la solución de metales traza se reporta en la tabla 2.8. La concentración de extracto de levadura se varió para mantener una proporción constante en relación con la cantidad de glucosa añadida, de acuerdo a la tabla 2.9.

Tabla 2.8 Composición de la solución de metales traza empleada añadida al medio para cultivos en biorreactor.

Componente	Concentración (g/L)
Na·EDTA	14.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5
H_3BO_3	3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.1
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33.8
Citrato de Fe(III)	100.8

Tabla 2.9 Cantidad de extracto de levadura añadido en función de la concentración inicial de glucosa.

Concentración de Glucosa (g/L)	Concentración de Extracto de levadura (g/L)
10	4
25	10
50	20

2.6 Cultivos en biorreactor instrumentado.

Los cultivos por lote se efectuaron en un biorreactor de tanque agitado de 1 L (BioStat A Plus, Sartorius BBI, Melsungen, Alemania) con un volumen de trabajo de 500 mL. El pH del cultivo se mantuvo a 7.0 ± 0.05 mediante la adición automática de una solución de NaOH 2M, la velocidad de agitación se controló a 1200 rpm y la temperatura a 37°C. El flujo de aire se mantuvo en 1vvm. El oxígeno disuelto fue medido, aunque no controlado, mediante un sensor polarográfico (Hamilton, Reno, NV, EUA). Cada cultivo se inoculó con 50 mL del inóculo desarrollado como se indica en la sección 2.4.

La concentración de oxígeno en el gas de salida fue determinada mediante en un analizador paramagnético (California Analytical Instruments, Orange, CA, EUA). Las condiciones microaerobias (menos del 5 % de TOD) en cada uno de los cultivos realizados se alcanzaron por el aumento progresivo de la concentración de biomasa y por las limitaciones propias del sistema utilizado, observando así una deficiencia en la transferencia de masa en el sistema usado que a su vez ocasionó microaerobiosis en el cultivo, tal como ocurriría en biorreactores industriales.

2.7 Comprobación de la presencia de la hemoglobina VHb en las cepas transformadas.

2.7.1 Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}).

Para medir el aumento de la velocidad de consumo de oxígeno de las cepas como efecto de la presencia de la VHb, se tomaron células frescas cultivadas bajo diferentes condiciones dependiendo de la cepa. Se realizaron cultivos de cada cepa usada (VH33 vgb^- y VH33 vgb^+) desarrollados bajo las condiciones reportadas en la tabla 2.10. Mientras que la cepa VH33 vgb^+ fue cultivada bajo condiciones que garantizaron aerobiosis (volumen de cultivo 30 mL), las condiciones de cultivo de la cepa VH33 vgb^+ fueron seleccionadas para inducir microaerobiosis (volumen de cultivo de 125 mL) y con ello maximizar la expresión del gene *vgb*.

Tabla 2.10 Condiciones de cultivo en matraz de 250 mL para realizar la obtención de células de VH33 *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ para la determinación de la q_{O_2} .

Parámetro	Condiciones aerobias	Condiciones microaerobias
Volumen de medio LB 2X	30 mL	125 mL
Volumen de ampicilina	30 μ L	125 μ L
Volumen de inóculo de células criopreservadas (cepa VH33 <i>vgb</i> ⁻)	30 μ L	–
Volumen de inóculo de células criopreservadas (cepa VH33 <i>vgb</i> ⁺)	–	125 μ L
Tiempo de cultivo	12 h	17 h

De cada uno de estos cultivos se tomaron 25 mL (para los sometidos a condiciones aerobias) o 50 mL (para los desarrollados en microaerobiosis, ya que para estas condiciones se espera un menor número de células) y se centrifugaron a 8,400 rpm, durante 10 min a temperatura controlada de 4 °C. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de medio mineral, cuya composición correspondió al de la tabla 2.7, excepto que para este paso no se usó ampicilina. Se repitió la centrifugación y se resuspendió nuevamente en 5 mL de medio mineral. Con estos lavados se eliminan los restos de fuente de carbono que podrían permanecer en el medio de cultivo, así como los posibles subproductos metabólicos (ácidos orgánicos) acumulados, manteniendo la osmolalidad adecuada.

Para medir la q_{O_2} , se empleó un vaso de precipitados con un volumen de 100 mL, llenado con 30 mL de medio mineral sin ampicilina. La temperatura (37 °C) y la agitación se regularon por medio de una parrilla de calentamiento magnética. El medio fue saturado con oxígeno mediante la inyección continua de aire a un flujo de 2 vvm durante 30 min, lo cual se comprobó con un electrodo polarográfico previamente calibrado (Hamilton, California). Al medio saturado se adicionó un volumen de las células tratadas calculado para obtener una concentración de biomasa de 0.42 g/L (lo cual se comprobó mediante espectrofotometría y

empleando un factor de conversión de 0.42 g biomasa/Unidad de absorbancia_{600 nm} determinado para esta cepa previamente) y se esperó el tiempo necesario para que la TOD se estabilizara. Debido a que el medio de cultivo no contenía fuente de carbono, sólo se observó un pequeño descenso en la TOD, debido probablemente al metabolismo endógeno. Bajo estas condiciones, se suspendió la aireación en el sistema y se suministró un pulso de 300 µL de una solución concentrada de glucosa (300 g/L) de manera que la concentración inicial de glucosa en el sistema fue de 3 g/L. Se redujo la velocidad de agitación y se selló el vaso de precipitados con parafilm para eliminar la posible transferencia de oxígeno superficial. Se monitoreó el descenso de la TOD como efecto del metabolismo celular. La velocidad específica de consumo de oxígeno se calculó como (ecuación 2.6, sección 2.9.1):

$$q_{O_2} = \frac{dC_L}{dt} \cdot \frac{1}{x}$$

Donde $\frac{dC_L}{dt}$ representa la caída de la concentración de oxígeno en el líquido (considerando una concentración de 7 mg_{O₂}/L para la saturación al 100%) y x la concentración de biomasa. Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

2.7.2. Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La presencia de la VHb también fue verificada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, la cual se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Para ello se obtuvieron muestras de cultivos VH33 *vgb⁻* y VH33 *vgb⁺* bajo las condiciones de crecimiento descritas para 50 g/L de glucosa en condiciones aerobias y microaerobias. Las muestras adquiridas durante los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm a una temperatura de 4 °C durante 8 min, se lavaron en 1 mL de medio mínimo mineral para volver a ser centrifugadas bajo los mismos parámetros y resuspendidas en 1 mL del mismo medio. Cada muestra se diluyó en el mismo medio de cultivo para obtener una densidad óptica de aproximadamente 1 unidad. La muestra diluida se sometió a ruptura en un sonicador aplicando una serie de 5 pulsos de 30 s con una potencia de 40 W. A continuación se tomaron 10 µL de

las células lisadas y se añadieron 10 μ L de buffer Laemmli 2X. Esta solución tiene la siguiente composición: 0.125 M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % v/v glicerol, 0.2 M DTT, 0.02 % de azul de bromofenol, aforada a 10 mL y con un pH ajustado a un valor de 6.8.

Cada una de estas muestras se cargó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% para separar las proteínas, empleando una corriente constante de 15 mA, durante un tiempo aproximado de 2.5 h.

El gel de poliacrilamida se preparó utilizando los volúmenes de cada solución mostrados en la tabla 2.11. El compuesto TEMED, fue adquirido de manera comercial, el resto de las soluciones se prepararon como se describe a continuación, filtrándose todas ellas con un poro de 0.45 μ m una vez que tenían su volumen final.

Tabla 2.11. Preparación de un gel de separación de poliacrilamida para SDS-PAGE al 15% (15 mL).

Sustancia	Concentración
Solución de Acrilamida	7.625 mL
Buffer del gel de separación 4x	3.8 mL
Solución de SDS	150 μ L
Agua Milli-Q	3.318 mL
Solución APS	100 μ L
TEMED	7 μ L

La solución de acrilamida se preparó con una concentración de 30 % acrilamida y 0.8 % bisacrilamida. Para preparar 200 mL de esta solución se disolvieron 60 g de acrilamida y 1.6 g de bisacrilamida en 100 mL de agua Mili-Q estéril para ser posteriormente aforada hasta un volumen final de 200 mL.

El buffer de gel de separación 4X fue preparado con 36.3 g de Tris-base (para tener una concentración de 1.5 M) disueltos en 150 mL de agua Milli-Q estéril, posteriormente el pH fue calibrado a 8.8 con una solución de HCl 4N y se aforó a 200 mL.

La solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% fue preparada disolviendo 10 g de este compuesto en agua Milli-Q estéril y aforando después esta disolución a 100 mL.

La solución de persulfato de amonio (APS) al 10% se preparó disolviendo 0.1 g de dicha sustancia en 500 μm , para ser aforado posteriormente a 1 mL. Esta solución no fue filtrada.

La solución de APS y el TEMED fueron agregados al final de la preparación del gel de separación por ser los agentes encargados de la polimerización de poliacrilamida.

El gel de concentración se preparó con los volúmenes reportados en la Tabla 2.12. El buffer de gel de concentración 4X se realizó disolviendo 3 g de Tris-base (para tener una concentración final de 0.5 M Tris-Cl) en 40 mL de agua estéril Milli-Q, el pH se ajustó hasta 6.8 utilizando una solución de HCl 4N y posteriormente, la solución se aforó a 50 mL.

Tabla 2.12. Preparación de un gel de concentración de poliacrilamida para SDS-PAGE (4 mL).

Sustancia	Concentración
Solución de Acrilamida	0.67 mL
Buffer del gel de concentración 4x	1 mL
Solución de SDS	40 μL
Agua Milli-Q	2.25 mL
Solución APS	40 μL
TEMED	4 μL

Una vez terminado el corrimiento electroforético, el gel de poliacrilamida al 15 % se tiñó con una solución de azul de Coomassie (Biolabs, Boston, EUA) durante 1 h y se continuo con el enjuague de los geles en agua Milli-Q durante un periodo de tiempo igual. Finalmente, el gel fue fotografiado y la imagen digitalizada empleando una fotodocumentador Gel Logic 200, Kodak.

2.8 Métodos analíticos.

2.8.1 Determinación de concentración celular.

La concentración de biomasa se determinó centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min de 1.5 a 4.5 mL de muestra en tubos para centrifuga de 1.5 mL, previamente puestos a peso constante. La pastilla obtenida se secó en un horno a 65 °C por al menos 18 h. Con la diferencia de pesos se determinó la concentración de biomasa en g/L.

2.8.2 Cuantificación de metabolitos extracelulares en muestras de cultivos por lote.

2.8.2.1 Cuantificación de glucosa.

Para determinar la concentración de glucosa, las muestras de fermentación fueron centrifugadas por 10 min a 12,000 rpm en una microcentrífuga. El sobrenadante fue filtrado por una membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm . Posteriormente, cada muestra fue analizada por duplicado con un analizador Bioquímico YSI (YSI, Inc., Ohio EUA).

2.8.2.2 Cuantificación de ácidos orgánicos.

Para la cuantificación de succinato, lactato, formato y acetato las muestras se centrifugaron y filtraron igual que en el caso anterior. Los ácidos orgánicos en el medio de cultivo fueron cuantificados en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, Waters) equipado con foto arreglo de diodos en serie. Se empleó una columna Aminex HPX-87H. La fase móvil empleada fue H_2SO_4 5 mM, a un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50 °C. El tiempo de corrida utilizado fue de 35 min. Para cada compuesto se determinó su tiempo de retención en muestras puras y en mezclas de ellos obteniéndose un cromatograma similar al observado en la figura 2.3.

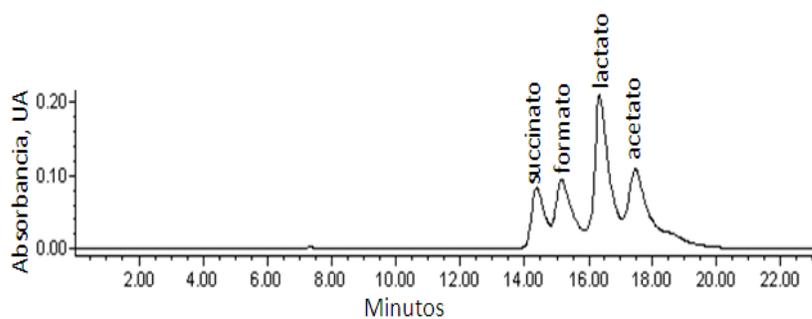


Figura 2.3. Cromatograma típico para la cuantificación de ácidos orgánicos.

Con los datos registrados se construyeron curvas de calibración como la mostrada en la Figura 2.4 donde se correlaciono la concentración de la muestra inyectada con el área bajo la curva integrada bajo el software Millenium de Waters. Las concentraciones máximas de acetato fueron verificadas empleando kits enzimáticos de Roche (R-Biopharm, de Boehringer Mannheim, Darmstadt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante excepto que el volumen de las reacciones fue escalado a la mitad. Este segundo análisis se consideró necesario, ya que en cultivos empleando medios muy concentrados, los picos de acetato no estaban completamente definidos, lo que podría llevar a un error en la cuantificación.

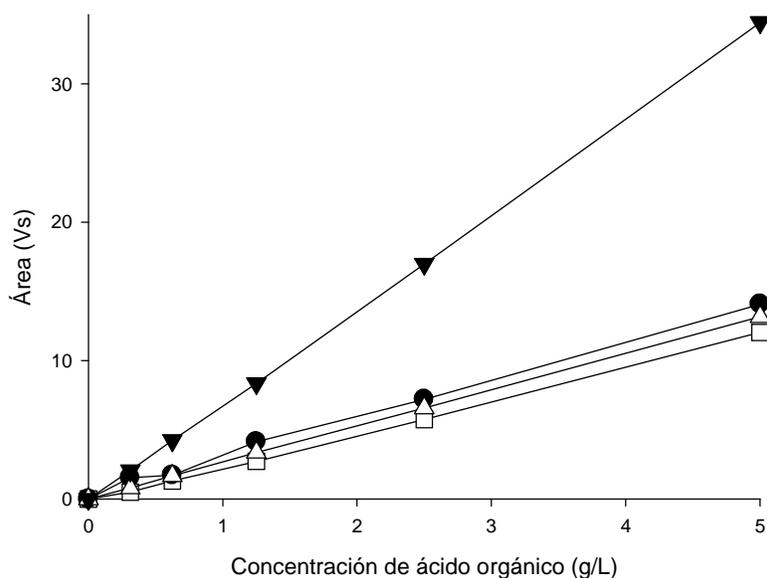


Figura 2.4. Curvas de calibración típicas para la cuantificación de metabolitos extracelulares mediante HPLC. \square Acetato, \bullet succinato, \triangle lactato y \blacktriangledown formato.

2.9 Métodos de cálculo.

2.9.1 Cálculos cinéticos y estequiométricos.

El crecimiento celular se siguió en forma de peso seco y fue calculado para cada fermentación utilizando la siguiente ecuación:

$$x = (T_{pc}X - T_{pc})/V * 1000 \quad (2.1)$$

Donde:

x : Concentración de Biomasa [g / L]

$T_{pc}X$: Peso constante del tubo conteniendo biomasa centrifugada y seca [g]

T_{pc} : Peso constante del tubo vacío [g]

V : Volumen centrifugado [mL]

La velocidad específica de crecimiento, de consumo de sustrato y el rendimiento (en fase aerobia, microaerobia y global) fueron calculadas a las siguientes ecuaciones:

$$\mu = (\Delta x / \Delta t) / x \quad (2.2)$$

$$q_s = -(\Delta S / \Delta t) / x \quad (2.3)$$

$$Y_{x/s} = (\Delta x / \Delta S) \quad (2.4)$$

Donde:

μ : Velocidad específica de crecimiento [h⁻¹]

x : Concentración de Biomasa [g / L]

t : Tiempo [h]

q_s : Velocidad específica de consumo de sustrato [g / g h]

S : Concentración de glucosa [g / L]

$Y_{x/s}$: Rendimiento de sustrato [g / g]

2.9.2 Cálculos respiratorios.

La velocidad de transferencia de oxígeno en el sistema fue obtenida de acuerdo a la siguiente expresión, incluyendo los datos obtenidos del análisis de gases, la velocidad específica de aireación (dada por las condiciones del sistema) y el volumen molar del oxígeno.

$$OTR = \frac{q}{V_{mo}} \cdot [O_{2IN} - O_{2OUT}] \quad (2.5)$$

Donde:

OTR : Velocidad de transferencia de oxígeno [mmol O₂ / L h]

q : Velocidad específica de aireación [L / L Min]

V_{mo} : Volumen molar en litros del O₂ [L/mol]

O_{2IN} : Concentración de oxígeno a la entrada del sistema [Moles]

O_{2OUT} : Concentración de oxígeno a la salida del sistema [Moles]

La velocidad específica de consumo de oxígeno se calculo a partir de la siguiente expresión:

$$q_{O_2} = \frac{dC_L}{dt} \cdot \frac{1}{x} \quad (2.6)$$

Donde:

q_{O₂} : Velocidad específica de consumo de oxígeno [mmol / g h]

C_L : Concentración de oxígeno disuelto en el líquido [mmol O₂ / L]

t : tiempo [h]

x : Concentración de biomasa [g / L]

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El presente capítulo se divide en cuatro secciones. En la primera se describen los resultados de experimentos dirigidos a comprobar la presencia del gene *vgb* en el plásmido pNKD1, la construcción de las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y la expresión del gen *vgb* en las cepas W3110 *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁺. La segunda sección muestra los resultados obtenidos con las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ crecidas en condiciones de cultivo aerobias en modo lote usando un medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa. La tercera y cuarta sección presentan el comportamiento de estas cepas en condiciones de cultivo con una fase aerobia y una fase microaerobia, cultivadas en modo lote crecidas con un medio complejo adicionado con 25 g/L y 50 g/L de glucosa respectivamente.

3.1 Comprobación de la presencia del gene *vgb* y su expresión.

3.1.1 Comprobación de la presencia del gene *vgb* en el plásmido pNKD1.

Para comprobar la presencia del gene de interés en el plásmido pNKD1, se extrajo dicho plásmido de las células donadas por el Prof. Stark (Illinois Institute of Technology) después de ser cultivadas en medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina como marcador de selección. Una vez que se obtuvo el plásmido se realizó una Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR), utilizando como molde al plásmido pNKD1 y las especificaciones y los oligómeros descritos en el capítulo 2. Posteriormente se realizó una electroforesis para verificar la amplificación del gen *vgb*. Como se observa en la figura 3.1, el producto de la amplificación corresponde a un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, lo que corresponde al valor esperado (Guerra et al., 2008). De acuerdo este resultado, se comprobó que el gene *vgb* se encuentra en el plásmido pNKD1.

3.1.2. Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

La presencia de la hemoglobina VHB en las células transformadas con el plásmido pNKD1 fue comprobada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), como se describió en el capítulo 2.

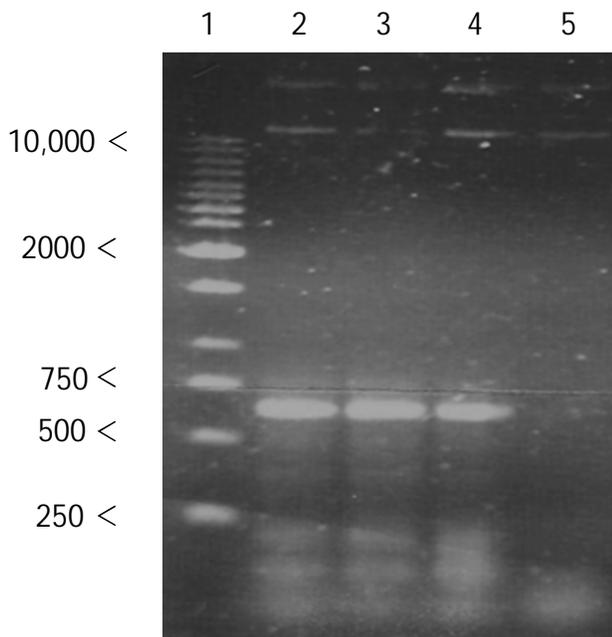


Figura 3.1. Amplificación por PCR del gene *vgb* en el plásmido pNKD1. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb de Fermentas. En los carriles 2, 3 y 4 se encuentran los fragmentos amplificados (600 pb aproximadamente) a partir del plásmido pNKD1. El carril 5 muestra el testigo negativo, en el que se colocó todo lo necesario para la reacción de amplificación excepto los oligómeros.

La figura 3.2 muestra que la cepa VH33 *vgb*⁺ muestra una mayor concentración de proteínas con un peso molecular cercano a los 16 kDa que la cepa VH33 *vgb*⁻ cuando son cultivadas bajo condiciones de microaerobiosis. El aumento en la población de proteínas de este peso molecular es atribuible a la VHb, la cual tiene un peso molecular de aproximadamente 15.8 kDa (Zhang et al., 2006; Bollinger et al., 2001).

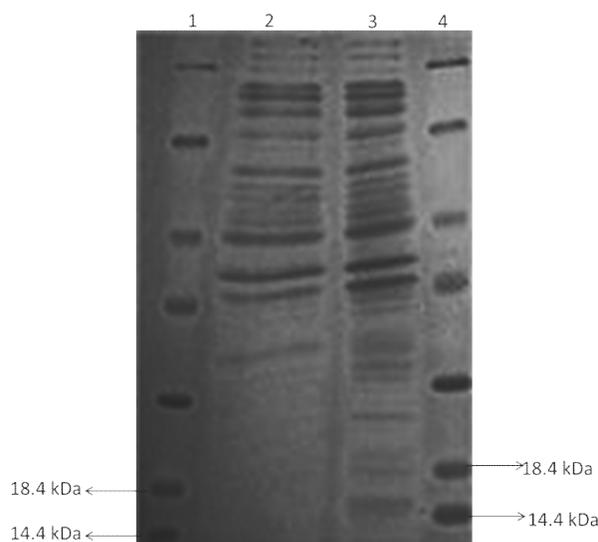


Figura 3.2. Gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de proteínas totales de las cepas VH33 *vgb*⁻ (carril 2) y *vgb*⁺ (carril 3). Los carriles 1 y 4 corresponden al marcador de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker de Fermentas. En la cepa VH33 *vgb*⁺ se presenta una banda correspondiente a aproximadamente 16 kDa, lo que coincide con el peso molecular reportado para la hemoglobina VHb.

En las figuras 3.3 A y B se muestran los

histogramas del gel de electroforesis de proteínas correspondiente a las cepas VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ respectivamente. Estos histogramas permiten ver las curvas o picos propios a cada una de las bandas de proteínas registradas en el gel de la figura 3.2. La banda correspondiente al peso de la hemoglobina VHb se encuentra alrededor de los 550 píxeles del histograma. En el panel A (cepa VH33 *vgb*⁻), alrededor de este valor se observa un área sin picos (aunque se tiene una elevación constante, debido probablemente a un lavado defectuoso del gel), mientras que en el panel B (correspondiente a la cepa VH33 *vgb*⁺) se observa un pico bien definido a la misma altura. Esto permite comprobar que en el caso de la cepa VH33 *vgb*⁺ existe una banda con una mayor concentración (ya que presenta una mayor cantidad de píxeles) correspondiente al tamaño de la hemoglobina de interés. Dicha banda no existe en la cepa *vgb*⁻, por lo que puede asumirse que la cepa VH33 *vgb*⁺ contiene la proteína VHb.

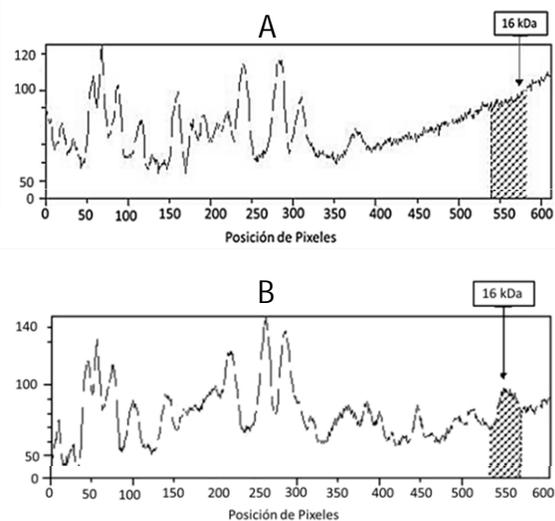


Figura 3.3 Histogramas correspondientes al gel de electroforesis desnaturalizante de proteínas de las cepas VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺. El panel A corresponde a la cepa VH33 *vgb*⁻ y el panel B a la cepa VH33 *vgb*⁺. En el panel B se observa un pico correspondiente a la banda de 16 kDa (tamaño aproximado de la VHb).

3.1.3. Comprobación indirecta de la expresión del gene *vgb* en las cepas W3110 *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁺.

Una de las hipótesis más aceptadas sobre el mecanismo de acción de la VHb es la hipótesis de difusión facilitada, que explica que la presencia de VHb aumenta la captura y el flujo de oxígeno hacia las oxidasas terminales (Ramandeep et al., 2001).

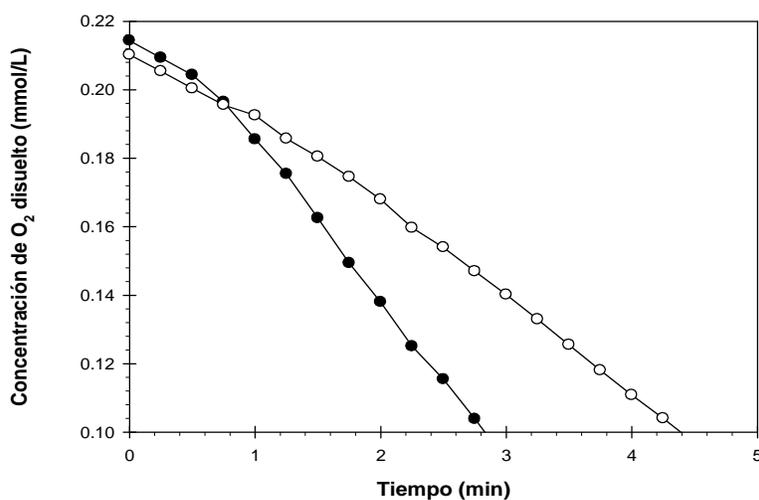
En consecuencia, una cepa que presente VHb consumirá el oxígeno con mayor velocidad que una cepa carente de dicha hemoglobina. Con la finalidad de comprobar el fenotipo resultado

de la expresión de la VHb, se determinó la velocidad específica de consumo de oxígeno disuelto (q_{O_2}) de la cepa VH33 con y sin la hemoglobina VHb (la expresión del gene vgb se indujo en cultivos microaerobios como se describió en el capítulo 2).

En la figura 3.4 se muestran los perfiles de consumo de oxígeno en un intervalo de entre el 97 y el 40 % de TOD para las dos cepas analizadas. Este intervalo de datos garantiza que se tomaron en cuenta condiciones completamente aerobias. Como puede observarse en la figura 3.4, la cepa expresando el gene vgb consumió el oxígeno con mayor rapidez que la cepa que no porta dicho gene.

El valor de q_{O_2} obtenido para la cepa VH33 vgb^+ (22.0 ± 0.2 mmol / g h), fue casi el doble del obtenido para la cepa vgb^- (11.3 ± 1.8 mmol / g h). Puesto que ambas cepas fueron cultivadas y analizadas bajo las mismas condiciones, esta diferencia en el consumo de oxígeno y el aumento en el mismo, debe ser causado por la expresión del gene vgb y acción de la hemoglobina VHb (Kallio et al., 1994). Carlson y Srienc (2004) reportaron un intervalo de valores de q_{O_2} para cepas silvestres de 15 a 19 mmol/g h. De acuerdo a estos valores, la q_{O_2} obtenido para la cepa VH33 vgb^- resultó menor que los valores compilados por Carlson y Srienc (2004) para las cepas silvestres.

Figura 3.4. Perfiles de concentración de oxígeno disuelto en experimentos para la determinación de q_{O_2} . Círculos



blancos: cepa VH33 vgb^- , círculos negros: cepa VH33 vgb^+ . Los experimentos por triplicado generaron resultados similares.

Esto puede ser porque la cepa VH33 transporta la glucosa al interior de la célula con menor

rapidez que una cepa no modificada (Gosset, 2005; Lara et al., 2008), por lo que el oxígeno necesario para oxidar la glucosa se consumiría también con menor rapidez en VH33 que en una cepa silvestre. Por su parte, la cepa VH33 *vgb*⁺ presenta una q_{O_2} que es incluso ligeramente superior a los valores compilados por Carlson y Srienc (2004). Este incremento en consumo de oxígeno, atribuible a la presencia de la VHb, puede tener una repercusión inmediata en los flujos de carbono, ya que podrían incidir en una mayor velocidad de consumo de glucosa, como se discutirá más adelante.

Los resultados mostrados en esta sección demuestran que el gene *vgb* está presente en el plásmido pNKD1, que la cepa expresando dicho gene mostró un aumento de la cantidad de proteínas del peso molecular correspondiente a la VHb, y que el fenotipo esperado como consecuencia de la presencia de la VHb (aumento en la q_{O_2}) fue comprobado, lo que indica la presencia de la proteína activa. Una vez comprobado lo anterior, las diferentes cepas fueron evaluadas en cultivos completamente aerobios y en cultivos de alta densidad celular en modo lote.

3.2 Cultivo de las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ en modo lote con 10 g/L de glucosa.

En *V. stercoraria* la hemoglobina VHb sólo se expresa en ambientes microaerobios (Khosla y Bailey, 1998; Zhang et al., 2006). Sin embargo, como se explicó en el capítulo 2, el gen *vgb* utilizado en este trabajo se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor modificado que permite su expresión en condiciones completamente aerobias (Dikshit et al., 1998). En esta sección se muestran los resultados del comportamiento de las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ bajo condiciones completamente aerobias. Para ello se realizaron cultivos en modo lote usando un medio de cultivo complejo adicionado con 10 g/L de glucosa y siguiendo las condiciones descritas en el capítulo 2. Cuando fue necesario, la aireación se elevó a 2 vvm para mantener la TOD en valores mayores al 10 % y así garantizar condiciones aerobias (Sandoval-Barsuto et al., 2004). En esta serie de

cultivos se reporta únicamente la producción de acetato debido a que la generación de los demás ácidos orgánicos fue nula o despreciable.

La figura 3.5 muestra el comportamiento típico de la cepa W3110 *vgb⁻* en el cultivo completamente aerobio. Se observó crecimiento exponencial aproximadamente durante las primeras 4 h de cultivo, el cual se acompañó de un incremento en la VTO. La acumulación de acetato se observó en cuanto inició el crecimiento. A las 5 h de crecimiento se agotó la glucosa, mientras que el acetato y la VTO llegaron a sus máximos valores. Tanto el acetato acumulado como la VTO presentaron sólo una pequeña variación entre las 3 y 5 h de cultivo. Posteriormente se observó un crecimiento adicional de la biomasa, debido probablemente a la re asimilación del acetato, acompañado por un descenso en la VTO, lo que indica que la demanda de oxígeno se redujo al agotarse la principal fuente de carbono. Este comportamiento es típico de cultivos de *E. coli* con baja concentración de glucosa (Lara et al., 2008).

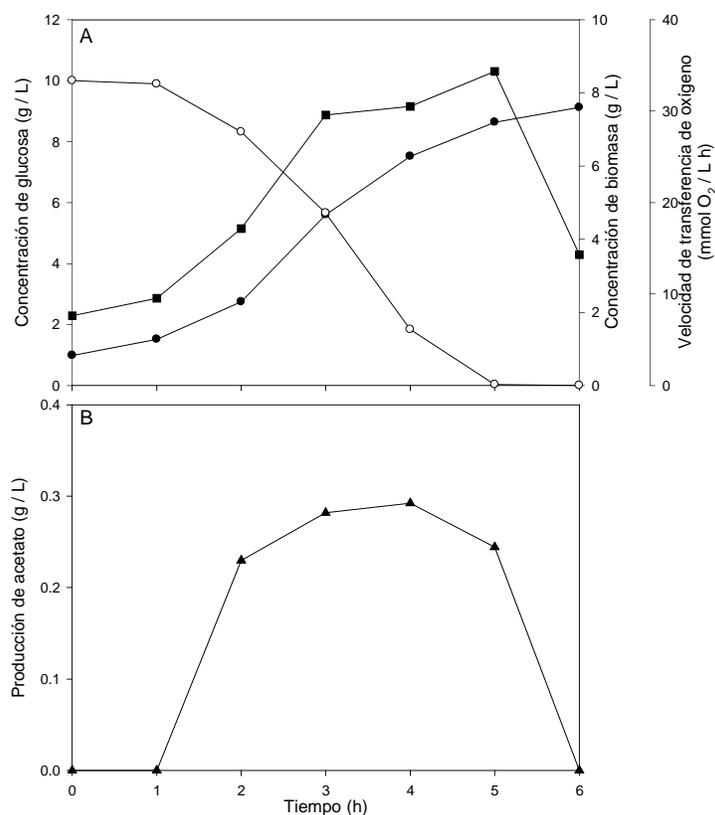


Figura 3.5 (A) Perfiles cinéticos de ● producción de biomasa, ○ concentración de glucosa y ■ VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 *vgb⁻*. (B) Perfil cinético de producción de ▲ acetato. Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

La figura 3.6 muestra el perfil de crecimiento de la cepa W3110 *vgb⁺*. Se observó un

crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo y hasta las 4 h. En este momento, la glucosa estaba cercana a agotarse, a diferencia del cultivo de W3110 *vgb*⁺, en el que el consumo de la glucosa tomó 5 h (figura 3.5). La VTO también aumentó a lo largo del periodo de crecimiento, para caer abruptamente cuando éste cesó.

La VTO máxima alcanzada en cultivos de W3110 *vgb*⁺ fue similar a la obtenida en cultivos de W3110 *vgb*⁻ (Tabla 3.1), sin embargo, en cultivos de W3110 expresando el gene *vgb*, dicha VTO se alcanzó con una concentración de biomasa casi 3 g/L menor que en la cepa sin Vhb. Ello concuerda con los resultados de medición de consumo de oxígeno de la sección 3.1.2, en los que se mostró que la presencia de Vhb en condiciones aerobias incrementa sustancialmente la *q*_{O₂}. El acetato fue completamente consumido al final del cultivo (figura 3.6 B).

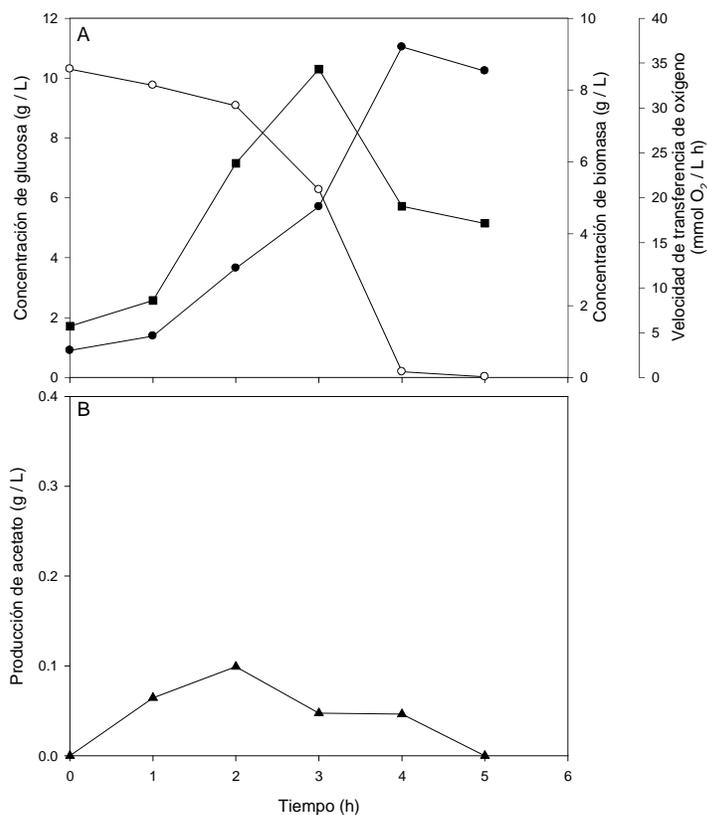


Figura 3.6 (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de producción de acetato. La cinética se suspendió en el punto en que la glucosa se consumió completamente. Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

La figura 3.7 muestra el perfil

cinético de la cepa VH33 *vgb*⁻ cultivada en modo lote con medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa. En los cultivos de esta cepa, también se observó crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo. La glucosa fue agotada a las 5 h, punto en el que se alcanzó la máxima concentración de biomasa. La VTO máxima fue detectada a las 3 h de cultivo (figura 3.7 A).

Durante las primeras 2 h de cultivo no se detectó acetato en el medio, y la concentración máxima alcanzada del mismo se encontró en el punto de agotamiento de glucosa (figura 3.7 B). El acetato fue consumido en su totalidad a las 5 h de cultivo, lo que permitió una ligera acumulación adicional de biomasa (figura 3.7 A).

El perfil cinético de la cepa VH33 *vgb*⁻ cultivada con 10 g/L de glucosa se muestra en la figura 3.8. El comportamiento cinético fue similar al de la cepa VH33 *vgb*⁺, agotando la glucosa a las 5 h de cultivo y alcanzando la máxima VTO a las 3 h de cultivo.

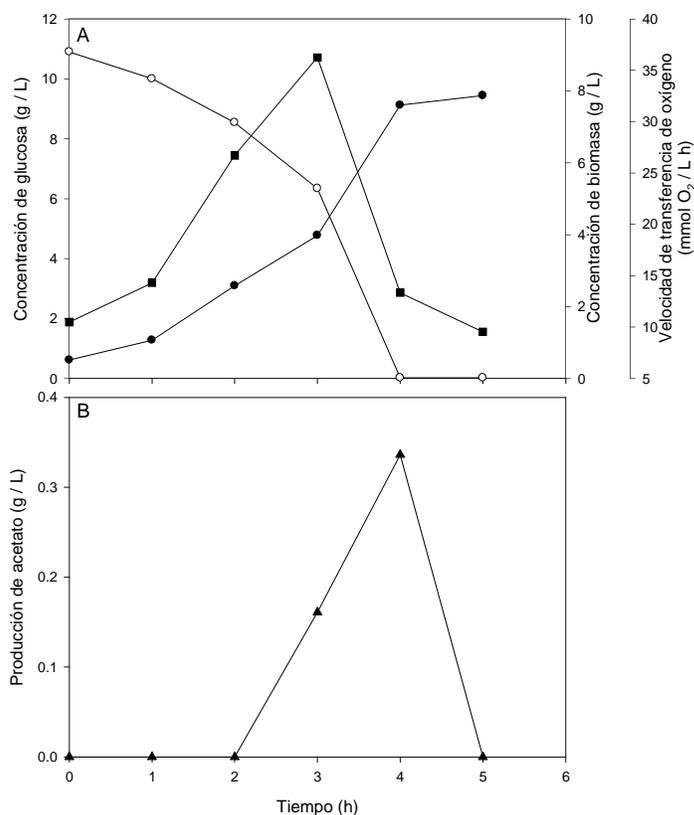


Figura 3.7 (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁻. (B) Perfil cinético de producción de acetato. La cinética se suspendió en el punto en que la glucosa se consumió completamente. Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

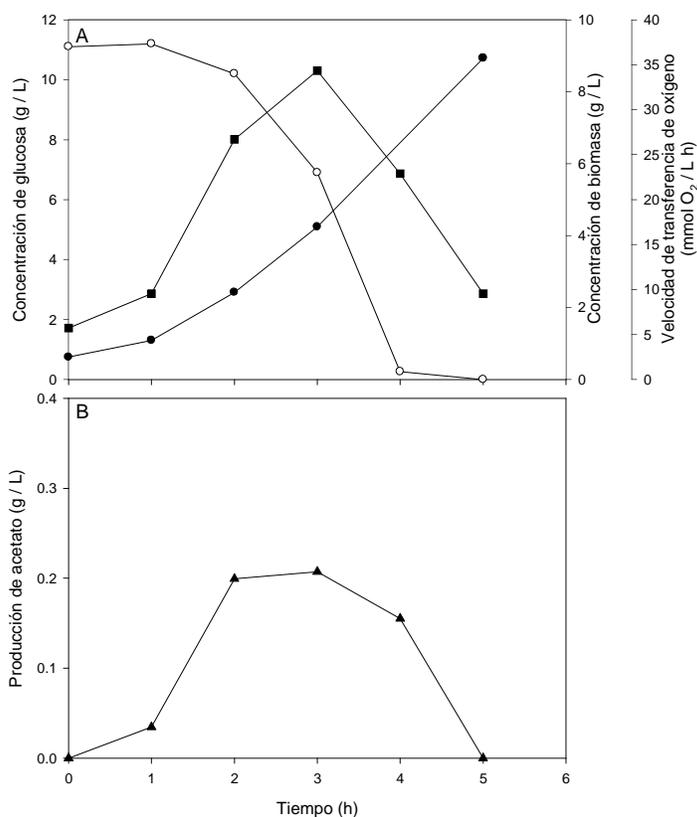


Figura 3.8 (A) Perfil cinético de \bullet producción de biomasa, \circ concentración de glucosa y \blacksquare VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de \blacktriangle producción de acetato. La cinética se suspendió en el punto en que la glucosa se consumió completamente. Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

La presencia de la hemoglobina VHb tuvo diferentes efectos en las cepas W3110 y VH33. La tabla 3.1 resume los parámetros cinéticos y estequiométricos más importantes de los cultivos de ambas cepas expresando y sin expresar el gene *vgb*. Como se puede observar, los efectos más importantes ocurrieron en la cepa W3110.

Tabla 3.1. Principales parámetros cinéticos obtenidos para las cepas W3110 y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ cultivadas en modo lote con un medio complejo adicionado con 10 g/L de glucosa.

Parámetro	Cepa			
	W3110 <i>vgb</i> ⁻	W3110 <i>vgb</i> ⁺	VH33 <i>vgb</i> ⁻	VH33 <i>vgb</i> ⁺
μ_{max} (h ⁻¹)	0.53 ± 0.02	0.67 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.02
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.69 ± 0.02	0.73 ± 0.03	0.75 ± 0.07	0.69 ± 0.05
x_{max} (g/L)	7.80 ± 0.20	8.20 ± 0.33	7.97 ± 0.10	7.50 ± 1.43
q_s (g/g h)	0.79 ± 0.07	0.94 ± 0.08	1.05 ± 0.02	0.96 ± 0.02
VTO _{max} (mmol/L h)	33.38 ± 2.86	34.33 ± 0.01	32.90 ± 3.34	32.43 ± 1.9

La velocidad específica de crecimiento en fase exponencial se vio incrementada alrededor del 26 % como consecuencia de la hemoglobina VHb en la cepa W3110. Otros autores han reportado un incremento del 44 % en la velocidad de crecimiento bajo condiciones aerobias cuando se expresa el gene *vgb* en *Schwanniomyces occidentalis* (Devesh et al., 2006) y del 10 % cuando dicho gene se expresa en *Pichia pastoris* (Xiaofeng et al., en prensa). El aumento en la velocidad de crecimiento se acompañó de un incremento de alrededor del 19 % en la q_S al expresar el gene *vgb* en *E. coli* W3110 (tabla 3.1). Este resultado es razonable, dado que la q_S está estrechamente relacionada con la velocidad de crecimiento.

En cuanto a la producción de acetato, se observó una disminución importante en cultivos de la cepa W3110 vgb^+ comparada con la cepa W3110 vgb^- . Mientras que la cepa sin la VHb produjo hasta 0.37 ± 0.13 g/L de acetato, la cepa conteniendo la VHb produjo tan solo 0.08 ± 0.02 g/L (figura 3.9), lo que representa reducción de aproximadamente 66 %. Este resultado es interesante y puede ser explicado desde el punto de vista del sobreflujo metabólico, el cual ha sido explicado en el capítulo 1. Como ya se ha mencionado, es generalmente aceptado que el acetato se produce debido a una tasa de transporte elevada de la glucosa al interior de la célula y un desbalance entre la glicólisis y el CAT.

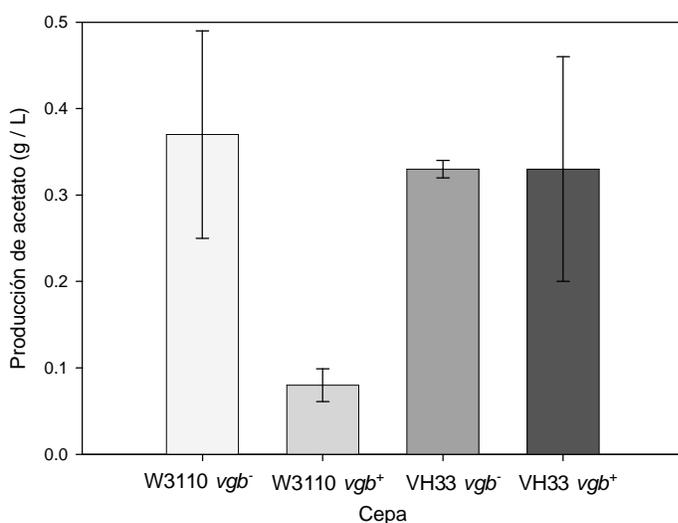


Figura 3.9. Producción máxima de ácido acético de las cepas W3110 vgb^- y vgb^+ y VH33 vgb^- y vgb^+ en cultivos completamente aerobios.

Un enfoque más amplio del fenómeno de sobreflujo metabólico toma en cuenta la capacidad de generación de NADH en el CAT y la capacidad de transferencia de electrones al oxígeno en la cadena respiratoria (reflejado en la velocidad de consumo de oxígeno). Se ha reportado (Kayser et al., 2005) que a medida que aumenta la velocidad de crecimiento (y con ello la velocidad de consumo de sustrato) en *E. coli*, aumenta la q_{O_2} (directamente relacionada con la generación de energía al final de la cadena respiratoria). Sin embargo, existe un punto en el que la q_{O_2} llega a su máxima capacidad y con ello comienza la producción de acetato. Por lo tanto, no sólo la tasa de consumo de glucosa es un factor determinante para disparar el sobreflujo metabólico, sino también la capacidad de la célula para oxidarla. De hecho, algunos autores han sugerido (basados en cálculos estequiométricos) que la velocidad de crecimiento en *E. coli* está limitada por la velocidad de respiración aerobia (Andersen y Meyenburg, 1980). Dado que la VHb podría jugar un papel similar a un citocromo en la cadena de transporte electrónico (Zhang et al., 2007; Wei y Chen, 2008), es posible que su presencia en condiciones aerobias acelere el transporte de electrones del NADH hasta el oxígeno, con el consecuente aumento en formación de ATP, lo que explicaría la mayor velocidad de crecimiento cuando la VHb está presente en condiciones aerobias (tabla 3.1). Al existir un mayor consumo de $NADH + H^+$, el CAT estaría más activado y ello podría explicar la reducción en la producción de acetato (figura 3.9). Sin embargo, no es posible comprobar dicha hipótesis con los datos de la presente tesis, por lo que habría que realizar estudios fisiológicos más profundos para explicar los efectos mencionados. No obstante, es razonable afirmar que la expresión de la hemoglobina VHb en *E. coli* bajo condiciones aerobias es una estrategia interesante para reducir el sobreflujo metabólico y aumentar la velocidad de crecimiento de dicha bacteria bajo condiciones aerobias.

A pesar de los cambios observados en W3110 por la presencia de la VHb, el valor de $Y_{X/S}$ no tuvo variación perceptible (tabla 3.1). Ello podría deberse a que el carbono que no se destina a la producción de acetato, podría estarse direccionando a la generación de energía y liberarse como CO_2 , es decir, no integrarse a la biomasa. Nuevamente, es necesario un análisis más detallado para comprobar lo anterior.

La presencia de la VHb no tuvo efectos importantes en la cepa VH33. La velocidad de crecimiento, rendimiento de biomasa y velocidad de consumo de glucosa no tuvieron variaciones apreciables (tabla 3.1). A diferencia del sistema PTS, el cual es inducible y altamente eficiente (Gosset, 2005), la permeasa de galactosa tiene una capacidad limitada para transportar glucosa. Ello podría explicar que en contraste con W3110, no se observó un aumento en la velocidad de crecimiento ni en el consumo de glucosa. Cabe mencionar que las velocidades de crecimiento de VH33 v_{gb^-} y v_{gb^+} es muy similar a la de la cepa W3110 v_{gb^+} . Sin embargo, el acetato producido por la cepa fue menor que el de las cepas VH33, lo que indica que la VHb permite un metabolismo más eficiente en la cepa W3110 que en las demás cepas.

Por otro lado, se ha demostrado que VH33 produce más del doble de ADN plasmídico que W3110 (Soto et al., 2011), esto probablemente debido al aumento en el flujo de carbono de la ruta de las pentosas fosfato. En consecuencia, la carga metabólica en VH33 puede ser mayor que en W3110, debido a la presencia de un mayor número de copias de plásmido y por lo tanto, más copias del gene de resistencia a antibiótico que deben de ser transcritas y traducidas. De acuerdo a Rozkov y colaboradores (2004), la carga metabólica presente cuando *E. coli* produce plásmidos trae como consecuencia un aumento en la acumulación de acetato debido a la expresión del gen de resistencia, lo que puede en parte explicar los resultados observados.

Los valores obtenidos para $Y_{x/s}$ y x_{max} en las cuatro cepas son similares (tabla 3.1). Para evaluar las posibles ventajas de la cepa W3110 v_{gb^+} sobre las otras cepas, sería deseable llevar a cabo cultivos de alta densidad celular en modo lote completamente aerobios empleando concentraciones de 100 g/L de glucosa o superiores. En experimentos similares, se ha observado la ventaja de evitar la producción de acetato (Lara et al., 2008; Knabben et al., 2010; Soto et al., 2011). Sin embargo, dichos experimentos están fuera de los objetivos de la presente tesis. Los valores máximos de VTO de los diferentes cultivos fueron similares, lo que está en concordancia con los valores de q_s obtenidos. La adquisición de datos con una frecuencia menor (p. ej., mediciones cada 10 min) permitiría un análisis más informativo de este parámetro.

3.3 Cultivos de las cepas W3110 vgb^- y vgb^+ y VH33 vgb^- y vgb^+ en modo lote con 25 g/L de glucosa.

Para evaluar el efecto que la hemoglobina Vhb tiene en las cepas W3110 y VH33 cuando se alcanzan condiciones microaerobias en cultivos por lote, éstas se cultivaron expresando y no expresando el gene vgb , empleando una concentración inicial de 25 y 50 g/L de glucosa. Las condiciones microaerobias en estos cultivos se alcanzaron por aumento de biomasa (y con ello del consumo de oxígeno) y por las limitaciones propias del sistema usado. En esta sección se describen los resultados de cultivos empleando 25 g/L de glucosa.

Las figuras 3.10 y 3.11 muestran el perfil cinético típico de cultivos de las cepas W3110 vgb^- y vgb^+ cuando se emplearon 25 g/L de glucosa inicial.

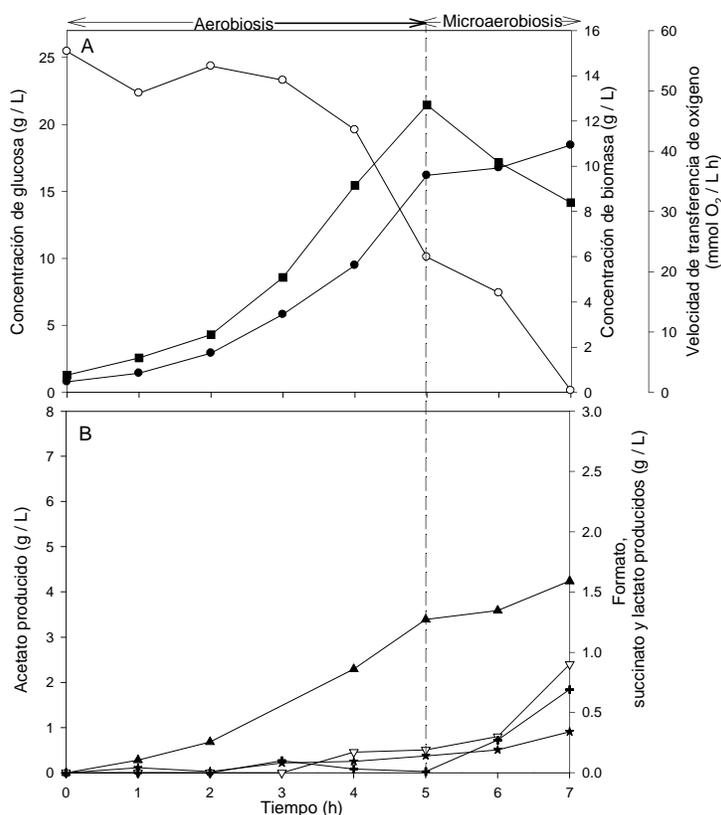


Figura 3.10. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, consumo de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 vgb^- . (B) Perfil cinético de la producción de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzó microaerobiosis ($TOD \leq 5\%$). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

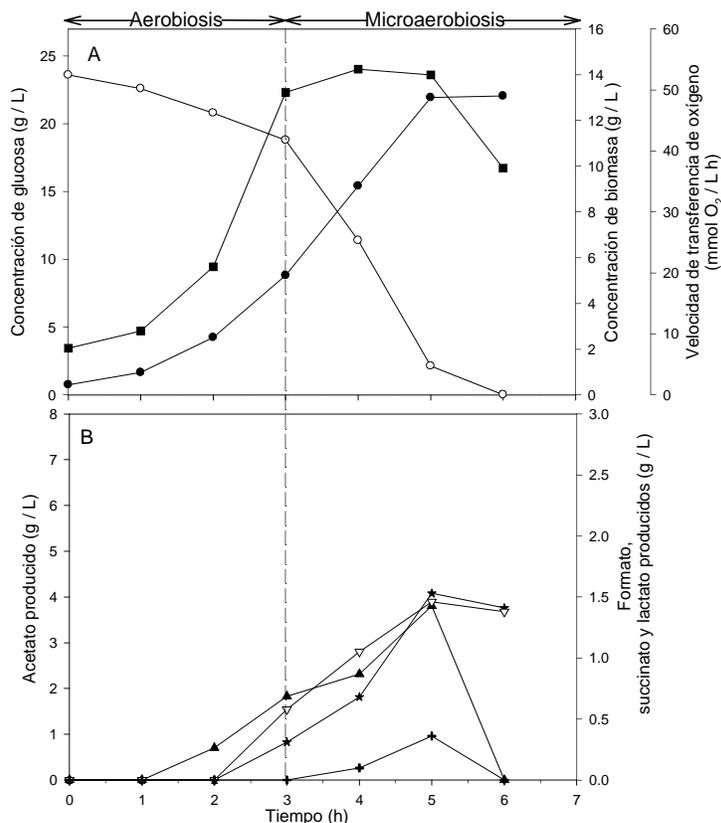


Figura 3.11. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de producción de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzó microaerobiosis (TOD ≤ 5%). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

En el caso de la cepa W3110 *vgb*⁻ se observó crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo y hasta las 5 h (figura 3.10A). En este punto se alcanzaron condiciones microaerobias (TOD ≤ 5 %) y las células continuaron creciendo a una menor velocidad por dos horas más, hasta que la glucosa fue agotada, alcanzando una concentración de biomasa cercana a los 11 g/L.

Se observó acumulación de acetato desde el inicio de los cultivos de ambas cepas (figuras 3.10 y 3.11 B) como es usual en cultivos de W3110, atribuible al sobreflujo metabólico (Lara et al., 2008). En cultivos de W3110 *vgb*⁻, el lactato, succinato y formato claramente comenzaron a acumularse después de la transición a condiciones microaerobias. El acetato y el lactato fueron consumidos parcialmente después del agotamiento de la glucosa, lo que concuerda con estudios previos de cultivos de W3110 bajo condiciones anaerobias intermitentes (Lara et al, 2006).

Se encontraron varias diferencias en el comportamiento de W3110 cuando se expresó el gene *vgb*. Las condiciones microaerobias se alcanzaron a las 3 h de cultivo, esto es, dos horas antes que en cultivos de W3110 *vgb*⁻. A diferencia del cultivo de W3110 *vgb*⁻, el crecimiento exponencial de W3110 *vgb*⁺ continuó durante la fase microaerobia hasta que se agotó la glucosa (figura 3.11A). Este comportamiento dio como resultado una menor duración del lote, ya que la glucosa fue agotada a las 6 h, es decir, una hora menos que en cultivos de W3110 *vgb*⁻. El lactato, succinato y acetato comenzaron a acumularse un poco antes de iniciar la fase microaerobia. Las concentraciones máximas de acetato alcanzada por la cepa W3110 *vgb*⁻ (3.5 ± 0.9 g/L) y W3110 *vgb*⁺ (3.8 ± 0.2 g/L) fueron similares (figura 3.14). Es interesante observar que la presencia de la VHb tuvo como consecuencia una menor acumulación de lactato (0.35 ± 0.10 g/L), comparado con la cepa W3110 *vgb*⁻ (0.66 ± 0.15 g/L). Por otro lado, la cepa conteniendo la VHb produjo más formato (1.64 ± 0.18 g/L) que la cepa careciendo de dicha hemoglobina (0.76 ± 0.29 g/L) (figura 3.14). Estas diferencias pueden atribuirse a la diferente demanda de cofactores que resulta del mayor flujo de oxígeno en la cadena respiratoria provocado por la presencia de la VHb (Zhang et al., 2007).

El objetivo particular de este trabajo fue mejorar el desempeño de la cepa VH33 para alcanzar altas densidades celulares en un modo lote. El desempeño de las cepas VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺ cultivadas en modo lote con un medio complejo adicionado con 25 g/L de glucosa se presenta en las figuras 3.12 y 3.13 respectivamente.

El crecimiento de VH33 *vgb*⁻ fue exponencial desde el principio del cultivo hasta las 5 h del mismo, momento en que las condiciones microaerobias fueron alcanzadas. De manera similar a los cultivos de W3110 *vgb*⁻, el crecimiento casi ceso bajo las condiciones microaerobias. Sin embargo, en este caso, todavía quedaban alrededor de 8 g/L de glucosa en el medio (figura 3.12 A).

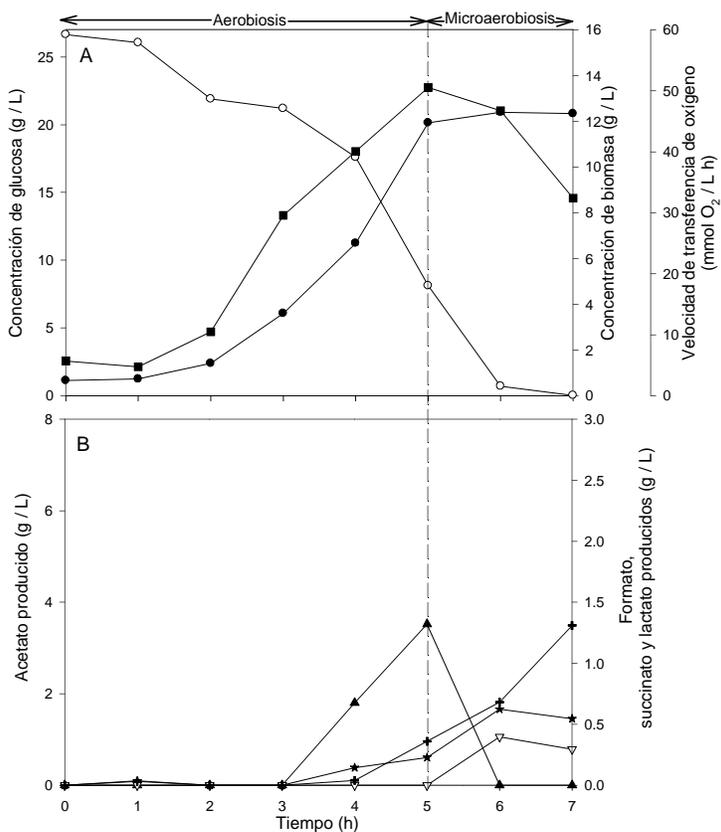


Figura 3.12. (A) Perfil cinético de \bullet producción de biomasa, \circ concentración de glucosa y \blacksquare VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁻. (B) Perfil cinético de producción de ácidos orgánicos: \blacktriangle acetato, \star formato, ∇ succinato y \blacklozenge lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzó microaerobiosis ($TOD \leq 5\%$). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

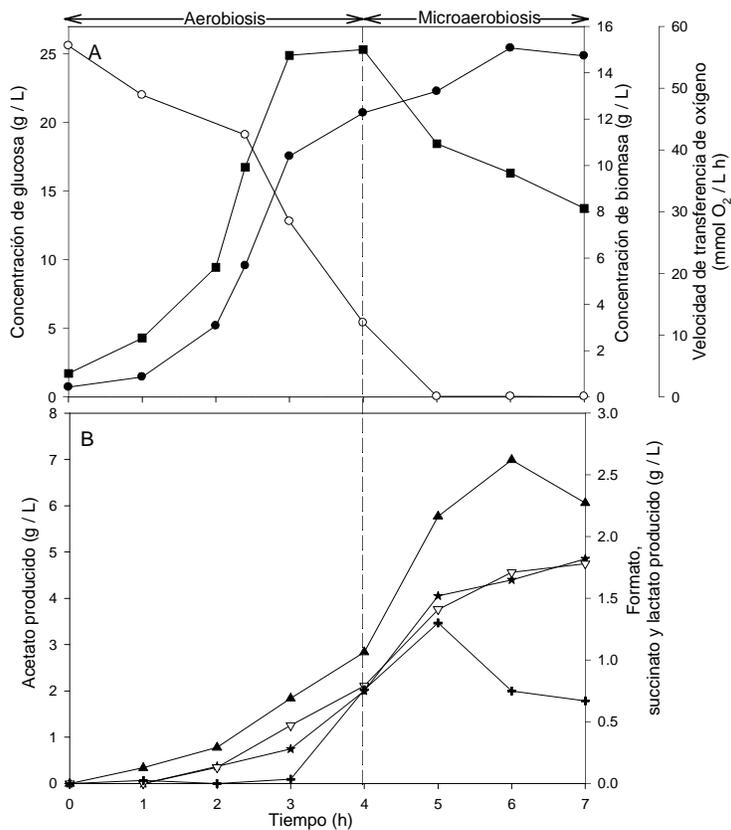


Figura 3.13. (A) Perfil cinético de \bullet producción de biomasa, \circ concentración de glucosa y \blacksquare VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de producción de ácidos orgánicos: \blacktriangle acetato, \star formato, ∇ succinato y \blacklozenge lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzó microaerobiosis ($TOD \leq 5\%$). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

Durante las primeras 3 h del cultivo de VH33 *vgb*⁻ no se observó acumulación de acetato (figura 3.12 B), lo cual contrasta con los cultivos de la cepa W3110 *vgb*⁻. Se observó una pequeña cantidad de acetato durante la cuarta y quinta hora, siendo consumido posteriormente. Estos resultados concuerdan con el modelo molecular de la cepa VH33 (De Anda et al., 2006). El formato, succinato y lactato se acumularon después de 4 h de cultivo. La máxima concentración de biomasa fue cercana a los 13 g/L (figura 3.12 B).

Al igual que en el caso de W3110, la presencia de VHb en la cepa VH33 generó varias diferencias en el desempeño de ésta. La expresión del gen *vgb* aumentó el crecimiento de VH33 y la velocidad a la que se alcanzan las condiciones microaerobias (una hora antes que VH33 *vgb*⁻). Este comportamiento puede ser atribuido a una mayor actividad respiratoria de VH33 *vgb*⁺ comparada con VH33 *vgb*⁻, como se reportó en la figura 3.3. El crecimiento continuó tres horas más en condiciones microaerobias aunque con una baja velocidad de crecimiento (comparado con la fase aerobia) (figura 3.13A), a diferencia de la cepa VH33 *vgb*⁻, la cuál presentó sólo un crecimiento casi nulo cuando se presentaron condiciones microaerobias (figura 3.12A). En comparación con los cultivos de VH33 *vgb*⁻, el acetato se acumulo desde el principio del cultivo de VH33 *vgb*⁺ (figura 3.13 B).

La carga metabólica impuesta por la producción de plásmidos dentro de *E. coli* trae como consecuencia un aumento en la acumulación de acetato debido a la expresión del gen de resistencia (Rozkov et al., 2004). Se ha demostrado que VH33 produce más del doble de plásmido que W3110 (Soto et al., 2011), esto probablemente debido al aumento en el flujo de carbono de la ruta de las pentosas fosfato. En consecuencia, la carga metabólica en VH33 puede ser mayor que en W3110, debido a la presencia de un mayor número de copias de plásmidos y por lo tanto, más copias del gen de resistencia a antibióticos que deben de ser transcritas y traducidas. En VH33 *vgb*⁺ la expresión adicional del gen *vgb* aumenta la carga metabólica. Esta carga se ve reflejada en el aumento en la velocidad específica de consumo de glucosa (*qs*) de VH33 *vgb*⁺ (1.09 ± 0.04 g/g h), comparado con VH33 *vgb*⁻ (0.88 ± 0.02 g/g h).

Esto puede explicar la mayor acumulación de acetato en VH33 *vgb*⁺ (6.5 ± 0.3 g/L) comparado con VH33 *vgb*⁻ (3.8 ± 0.2 g/L), a pesar de la modificación en el sistema de transporte (figura 3.14).

La acumulación de lactato fue similar en ambas cepas, mientras que el succinato llegó hasta 0.63 ± 9.93 y 1.8 ± 0.4 g/L en VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺ respectivamente. Sin embargo, la concentración máxima de biomasa alcanzada 14.9 ± 0.2 g/L se presentó en VH33 *vgb*⁺ (figura 3.14).

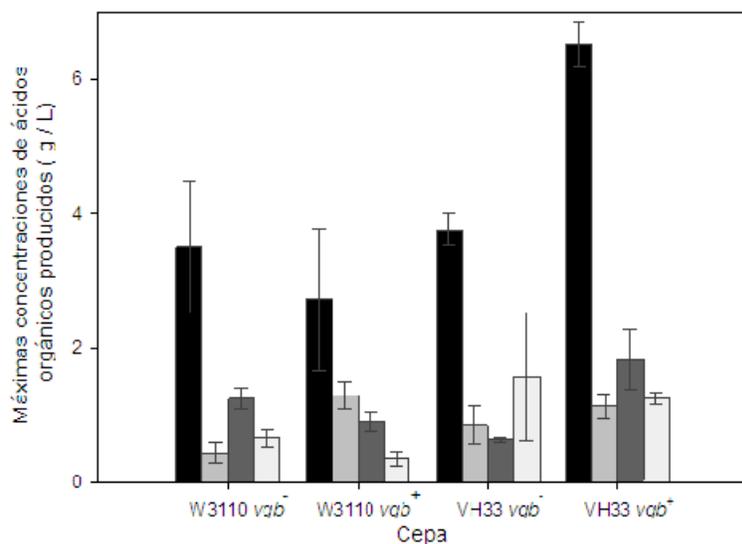


Figura 3.14. Concentraciones máximas de ácidos orgánicos de las cepas W3110 y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ en cultivos con 25 g/L de glucosa. ■ acetato, ■ formato, ■ succinato, □ lactato. Se muestran los promedios y el intervalo de los datos de experimentos por duplicado.

La presencia de VHb en las diferentes cepas de *E. coli* aumentó la velocidad específica de crecimiento en condiciones aerobias y microaerobias. La velocidad de crecimiento de W3110 y VH33 aumento cerca del 30% cuando VHb se expresó en la fase aerobia de los cultivos. Una posible explicación para esto es que el aumento en el flujo de electrones facilitado por la VHb (Zhang et al., 2006) puede resultar en una mayor producción de ATP. Como en condiciones completamente aerobias no hay producción de ácidos orgánicos, la fuente de carbono y energía pueden ser dirigidas más eficientemente a la síntesis de biomasa.

El efecto en la velocidad de crecimiento en condiciones de microaerobias fue más importante, ya que aumentó más del doble en ambas cepas cuando VHb estuvo presente (figura 3.15).

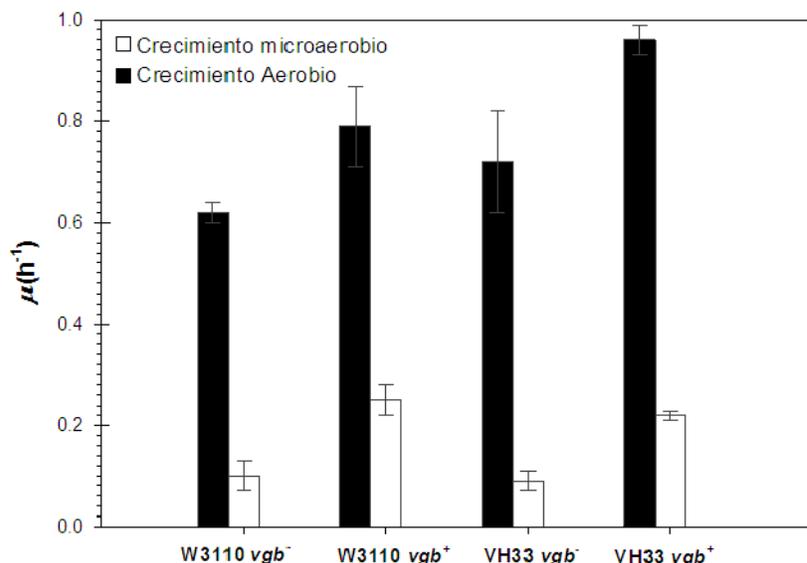


Figura 3.15. Velocidades específicas de crecimiento en fase aerobia ■ y microaerobia □ de las cepas W3110 y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ en cultivos con 25 g/L de glucosa. Se muestran los promedios y el intervalo de los datos de experimentos por duplicado.

La velocidad de crecimiento en microaerobiosis aumento de 0.10 ± 0.03 a $0.25 \pm 0.03 h^{-1}$ cuando la hemoglobina se produjo en W3110, al mismo tiempo, el aumento en la velocidad de crecimiento en microaerobiosis fue de 0.09 ± 0.02 a $0.22 \pm 0.01 h^{-1}$ en VH33.

También hubo un aumento general en el rendimiento de biomasa en glucosa cuando *vgb* se expresó en condiciones microaerobias. Como resultado de la presencia de VHb, los rendimientos de biomasa sobre glucosa aumentaron de 0.17 ± 0.08 a $0.40 \pm 0.05 g/g$ para W3110 y de 0.13 ± 0.06 a $0.41 \pm 0.03 g/g$ para VH33.

3.4 Cultivo de las cepas W3110 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺ en modo lote con 50 g/L de glucosa.

El efecto de la presencia de la VHb se estudió también en cultivos en modo lote con un con una elevada concentración de glucosa (50 g/L). Al igual que en los cultivos con 25 g/L de glucosa, se presentó una fase aerobia y una microaerobias.

El empleo de 50 g/L de glucosa ha permitido alcanzar concentraciones de biomasa de VH33 en modo lote superiores a los 20 g/L en modo lote. Para mantener condiciones aerobias se ha requerido enriquecer el aire con oxígeno (Lara et al. 2008) o incrementar la presión en el biorreactor (Knabben et al. 2010).

Las figuras 3.16 A y 3.17 A muestran las características de un cultivo típico de la cepa W3110 *vgb⁻* y la cepa W3110 *vgb⁺* respectivamente. La cepa W3110 *vgb⁺* alcanzó las condiciones microaerobias dos horas antes que la cepa W3110 *vgb⁻*. El crecimiento exponencial continuó durante una hora más en la cepa con hemoglobina. La cepa W3110 *vgb⁻* cultivada con 50 g/L de glucosa presenta condiciones de microaerobiosis al mismo tiempo que si se cultiva con 25 g/L, sin embargo, bajo la primera condición, continúa creciendo exponencialmente dos horas más. Aun cuando la concentración máxima de biomasa fue muy similar para las cepas W3110 *vgb⁻* (18.03 ± 1.43 g/L) y W3110 *vgb⁺* (18.63 ± 0.50 g/L) esta última tomó una hora menos para agotar la glucosa.

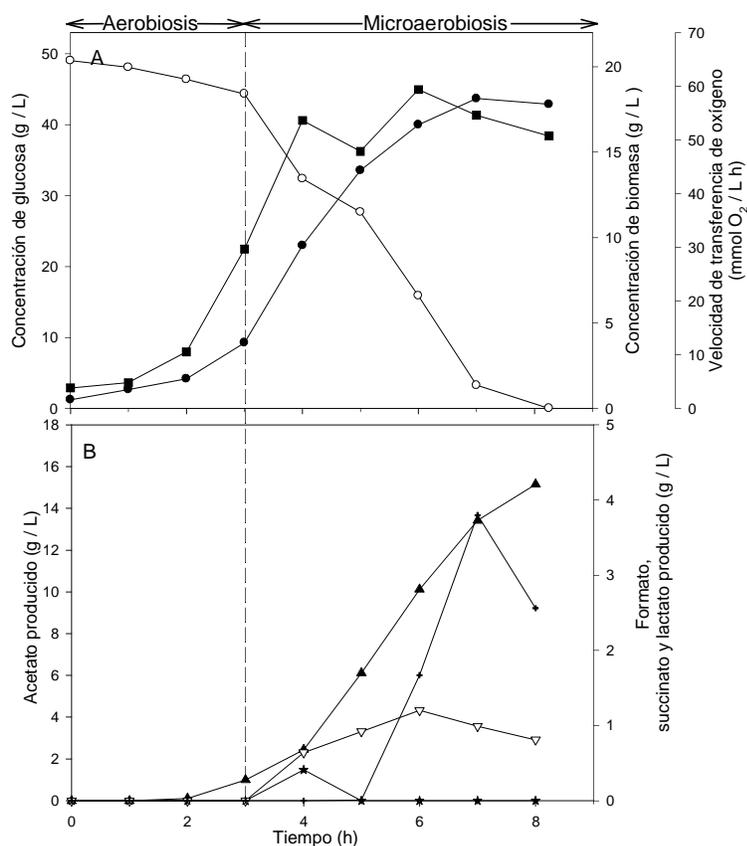


Figura 3.16. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 *vgb⁻*. (B) Perfil cinético de acumulación de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzó microaerobiosis (TOD \leq 5 %). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

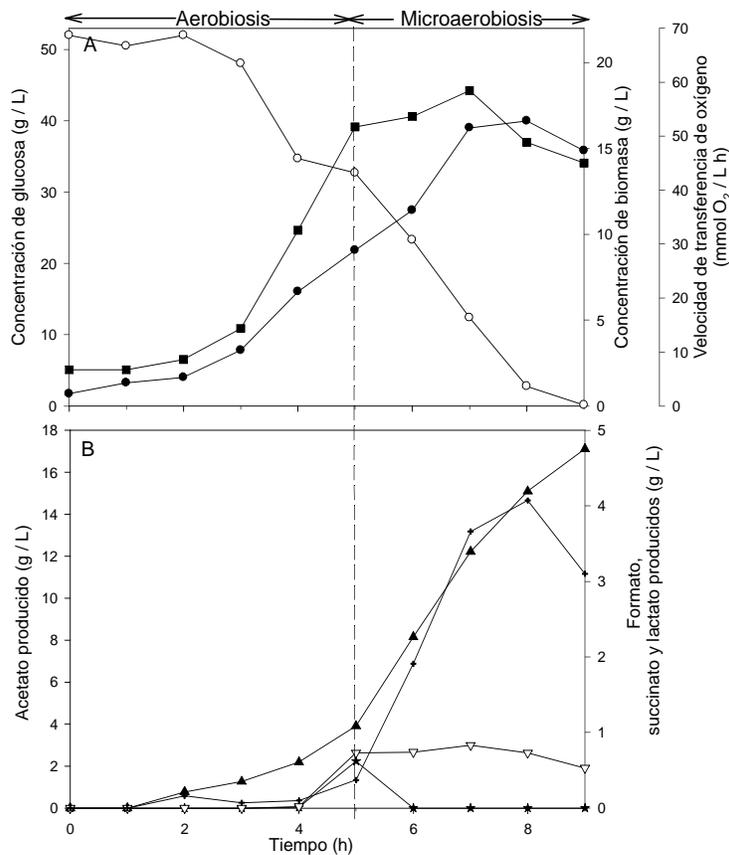


Figura 3.17. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* W3110 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de acumulación de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzaron condiciones microaerobias (TOD ≤ 5 %). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

La producción de ácidos orgánicos registrada para ambas cepas fue muy similar y aumentó considerablemente cuando el sistema se encontró en condiciones microaerobias (Figuras 3.16B y 3.17B). En ambas cepas se mostró el mismo patrón de producción de metabolitos fermentativos. El ácido orgánico producido en mayor cantidad fue el acetato (17.01 ± 1.27 g/L para W3110 *vgb*⁻ y 16.56 ± 0.1 g / L para W3110 *vgb*⁺), seguido de lactato (4.15 ± 0.09 g/L para W3110 *vgb*⁻ y 3.45 ± 0.35 g/L para W3110 *vgb*⁺) y succinato (0.61 ± 0.22 g/L para W3110 *vgb*⁻ y 1.47 ± 0.27 g/L para W3110 *vgb*⁺), siendo el formato el metabolito con menor producción (no se detectó en ningún caso).

Las figuras 3.18A y 3.19A muestran una cinética típica de las cepas VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺ respectivamente. El tiempo en que ambas cepas tardaron en llegar a microaerobiosis fue de 4 h. El crecimiento exponencial y el tiempo en que se consumió toda la glucosa fueron similares en ambas cepas.

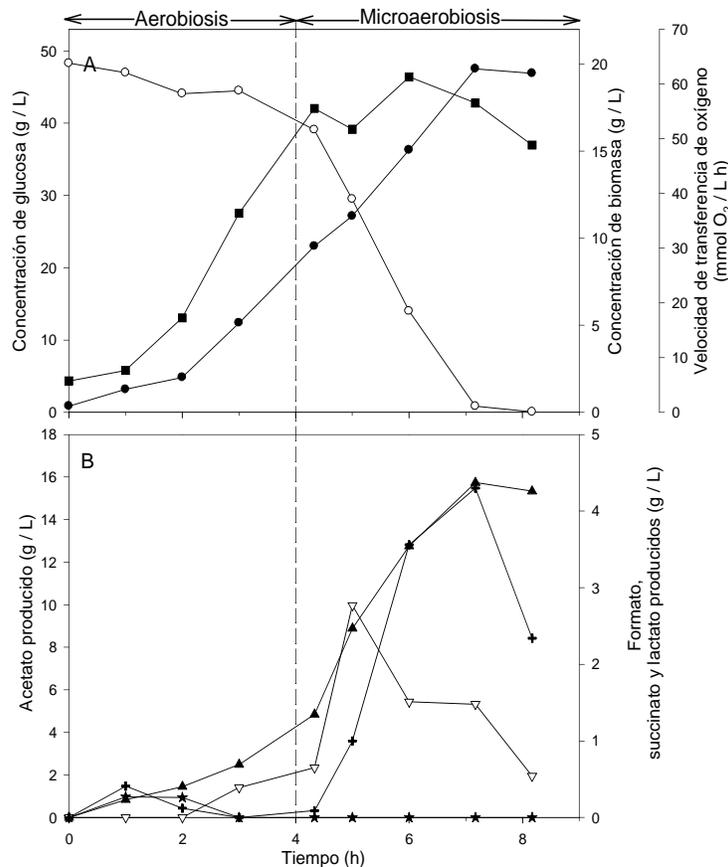


Figura 3.18. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁻. (B) Perfil cinético de acumulación de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzaron condiciones microaerobias (TOD ≤ 5 %). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

Las figuras 3.18 y 3.19 en su inciso B, muestran que la formación de productos de fermentación ácido-mixta en los cultivos de VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺ fue similar. El ácido orgánico de mayor producción fue el acetato con una concentración de 17.01 ± 1.27 y 16.56 ± 0.12 g/L para VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺, respectivamente, seguido por el succinato (3.33 ± 0.56 y 2.83 ± 1.57 g/L) y lactato (4.34 ± 0.04 y 3.36 ± 0.99 g/L) (figura 3.20). Aun cuando la producción de acetato, lactato y succinato fue muy similar para VH33 *vgb*⁻ y VH33 *vgb*⁺ (figuras 3.18B y 3.19 B), el formato fue producido antes por VH33 *vgb*⁺ y alcanzó una concentración mayor (2.02 ± 0.38 g/L) que en cultivos de VH33 *vgb*⁻ (0.49 ± 0.19 g/L).

Las concentraciones de los diferentes ácidos orgánicos producidos en las cuatro cepas cultivadas con 50 g/L de glucosa son muy similares, no se puede identificar una diferencia sustancial en las mismas (figura 3.20), lo que indica que el balance redox no fue alterado por la presencia de la VHB.

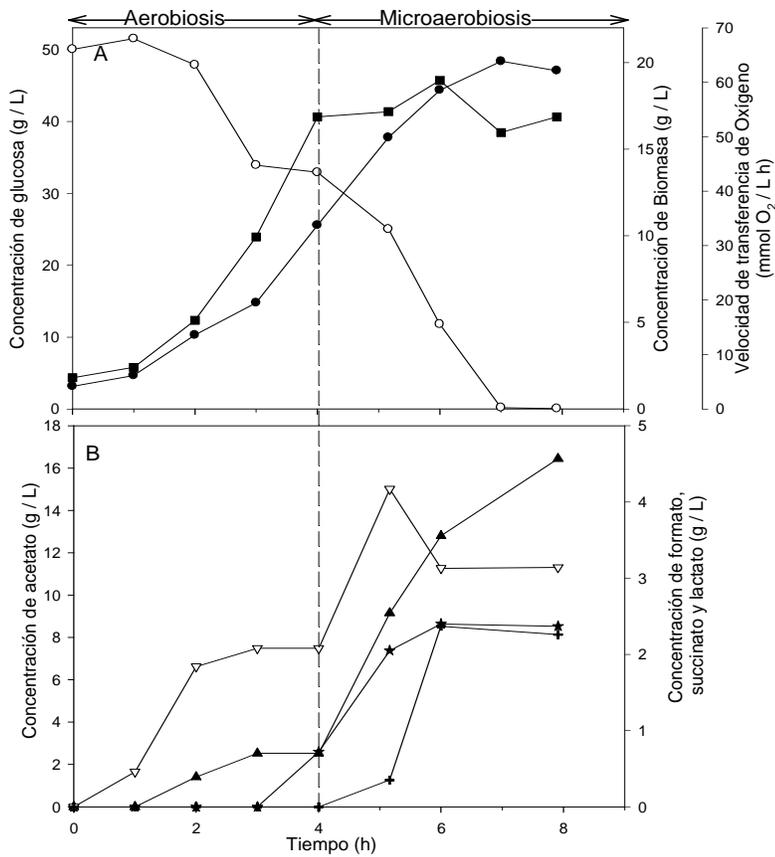


Figura 3.19. (A) Perfil cinético de producción de biomasa, concentración de glucosa y VTO en cultivos de la cepa *E. coli* VH33 *vgb*⁺. (B) Perfil cinético de acumulación de ácidos orgánicos: acetato, formato, succinato y lactato. La línea vertical punteada indica el momento en que se alcanzaron condiciones microaerobias (TOD ≤ 5 %). Se realizaron dos experimentos independientes en cada caso con resultados similares. Para facilitar la visualización se muestran resultados de un solo experimento.

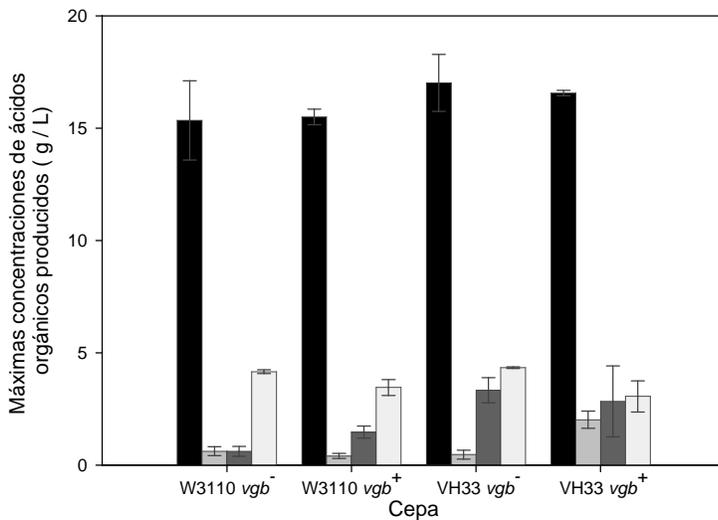


Figura 3.20. Concentraciones máximas de ácidos orgánicos de las cepas W3110 y VH33 *vgb*⁻ y *vgb*⁺: acetato, formato, succinato, lactato en cultivos con 50 g/L de glucosa. Se muestran los promedios y el intervalo de los datos de experimentos por duplicado.

La VTO no mostró diferencia importante entre los cultivos de las diversas cepas estudiadas. Este resultado es razonable, ya que demuestra que se alcanzó la máxima capacidad de transferencia del biorreactor empleado (alrededor de los 60 mmol O₂ /L h) en todos los cultivos con fase microaerobia. Knabben y colaboradores (2010) reportaron un valor de VTO de 150 mmol O₂ /L h para mantener condiciones aerobias en cultivos de VH33 con 50 g/L de glucosa, lo que es difícilmente alcanzable en biorreactores convencionales.

La figura 3.21 muestra el efecto de la VHb en la velocidad de crecimiento durante la fase aerobia y microaerobia de los cultivos con 50 g/L de glucosa. Solamente la cepa W3110 presentó mejoría en la velocidad de crecimiento bajo condiciones microaerobias. Cabe notar que en estos cultivos la cantidad de ácidos orgánicos acumulada fue de alrededor de 20 g/L, lo que resulta inhibitorio para el crecimiento de *E. coli* (Lee et al., 1996). Es posible la inhibición por estos productos impidan observar los efectos de la VHb. La cantidad de carbono que fue convertida a ácidos orgánicos puede ser la causa de que la cantidad de biomasa producida por todas las cepas fuera casi la misma, a pesar de las distintas modificaciones moleculares.

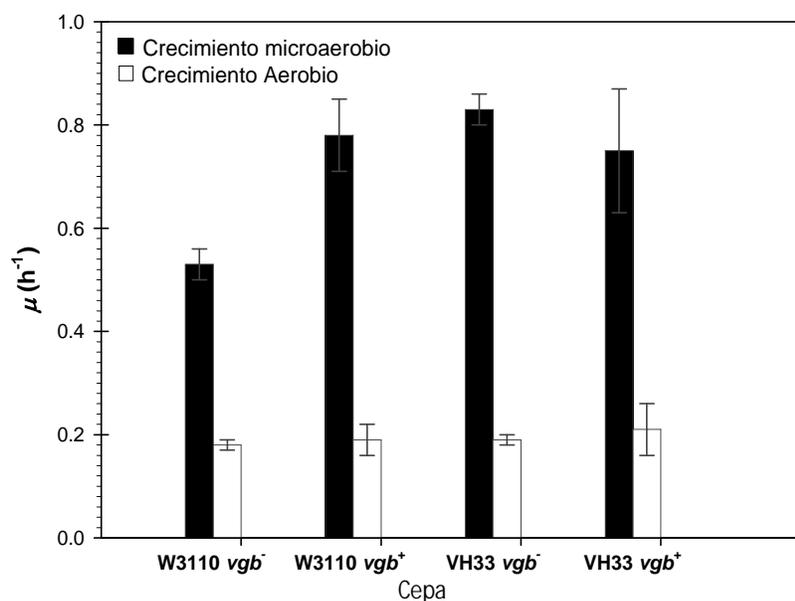


Figura 3.21. Velocidades específicas de crecimiento en fase aerobia ■ y microaerobia □ en cultivos con 50 g/L de glucosa. Se muestran los promedios y el intervalo de los datos de experimentos por duplicado.

Si se comparan estos datos con los obtenidos en las cinéticas con 10 y 25 g/L de glucosa, se observa que todas las cepas crecidas en condiciones completamente aerobias presentaron un aumento en el rendimiento y en la biomasa máxima con respecto a los valores registrados para

estos parámetros en los cultivos de 25 y 50 g/L. En general en todas las cepas se presenta un aumento en la μ_{max} y en la q_s en los cultivos realizados con 25 g/L con respecto a los de condiciones completamente aerobias y a las de alta concentraciones de glucosa. Cuando se empleó una concentración inicial de glucosa de 50 g/L, la acumulación de ácidos orgánicos fue muy alta. Por lo tanto, un nuevo reto para el uso de cepas expresando VHb en CADC en modo lote es establecer estrategias para reducir o incluso eliminar la producción de ácidos orgánicos bajo condiciones microaerobias.

4. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se presentaron estudios que integraron técnicas moleculares y herramientas de análisis fisiológico para investigar los efectos que la hemoglobina VHb proveniente de la bacteria gram negativa *Vitreoscilla stercoraria* ocasiona en cepas de *Escherichia coli* silvestres y con el metabolismo central de la glucosa modificado crecidas en modo lote utilizando un medio complejo.

Se usaron tres variaciones en la concentración de la fuente de carbono para analizar las respuestas celulares en condiciones completamente aerobias, aerobias y microaerobias con una cantidad considerable de fuente de carbono (25 g / L de glucosa) y con una cantidad elevada de la misma (50 g/L glucosa).

Los diferentes parámetros cinéticos analizados en este trabajo mostraron que en cada una de las condiciones elegidas para este estudio el comportamiento de las cepas estudiadas difería notablemente, teniendo resultados valiosos e interesantes sobre todo en los cultivos con 25 g/L de glucosa.

La cepa VH33 *vgb*⁺ cultivada en un medio complejo adicionado con 25 g/L de glucosa presenta valiosas ventajas con respecto a su progenitora (W3110) y a las demás cepas (VH33 *vgb*⁻ y W3110 *vgb*⁺). Se observó que la μ_{max} no cambió en la cepa VH33 cuando la VHb estuvo presente y aunque dicha velocidad de crecimiento fue igual a la registrada para la cepa W3110 *vgb*⁺, el rendimiento y la cantidad de biomasa se elevan notablemente en la cepa VH33 *vgb*⁺ mientras que el perfil de ácidos orgánicos obtenidos es sumamente similar al registrado en las otras cepas.

Estas ventajas se ven reducidas en los cultivos con 10 g/L debido a que la expresión de la hemoglobina VHb es menor, pudiendo concluir que la modificación realizada en el promotor del gen de esta proteína para su expresión en condiciones aerobias, no es tan eficiente como el someter a la cepa a condiciones de cultivo microaerobias. Sin embargo, la presencia de la VHb

redujo fuertemente el sobreflujo metabólico en la cepa W3110, lo que resulta atractivo para posteriores investigaciones.

Por otro lado en los cultivos con 50 g/L de glucosa, no se notó mejoría cuando se expresó la hemoglobina, probablemente debido a la fuerte acumulación de ácidos orgánicos y a que dicha concentración de glucosa resulta inhibitoria.

De esta forma se puede concluir que la cepa VH33 se vuelve un modelo más robusto de producción cuando expresa la hemoglobina VHb en condiciones moderadas de sustrato y siendo sometida a condiciones aerobias y microaerobias en el cultivo.

El presente trabajo representa un ejemplo de la integración de ingeniería metabólica y de fermentaciones para obtener cepas con un comportamiento mejorado ante la limitación de oxígeno presente muy comúnmente en la escala de producción.

5. PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra que la hemoglobina VHb ocasiona un impacto positivo en una cepa de *Escherichia coli* con un sobreflujo metabólico minimizado. En este sentido, las perspectivas directas surgidas del presente trabajo son amplias.

Una buena opción para analizar con más detenimiento el efecto que esta proteína produce en la cepa VH33 sería realizar cultivos con esta cepa en modo lote con un medio mínimo mineral adicionado con diferentes concentraciones de glucosa u otras fuentes de carbono. De esta manera la velocidad específica de crecimiento se encontraría disminuida y la formación de productos de fermentación mixta sería menor.

Otra opción llamativa sería realizar cultivos en quimiostato, controlando de esta manera, la velocidad de crecimiento por la entrada de sustrato al cultivo y tener la posibilidad de ejecutar cultivos de mayor duración.

Así mismo, las cepas con hemoglobina usadas en la presente investigación muestran, aun en condiciones de cultivo aerobias, una expresión del gen *vgb*. Lo anterior permite una nueva rama de investigación ya que la mayoría de los estudios con esta hemoglobina en cepas de *E. coli* hasta ahora se centran en su expresión bajo condiciones microaerobias. Realizar un estudio completo e integral de la influencia que esta proteína ocasiona a diferentes condiciones de oxígeno disuelto permitirá obtener un panorama completo de la función y beneficios que la VHb ocasiona en *E. coli*.

Para poder comprender el impacto que la hemoglobina bacteriana tiene en cepas de *E. coli* se propone realizar perfiles transcripcionales, evaluar cambios en el metaboloma, así como elaborar análisis proteómicos extracelulares y mediciones de viabilidad celular. Todo esto en conjunto permitirá establecer un estudio global y un entendimiento completo de como la VHb modifica la fisiología celular de diferentes cepas de *Escherichia coli* (silvestre o con

modificaciones en el metabolismo central) en condiciones tanto aerobias como microaerobias de cultivo.

También sería de gran utilidad evaluar el efecto que la hemoglobina VHb puede llegar a tener en cepas cuyo metabolismo fermentativo se encuentra modificado ya que con esto se resolvería uno de los principales problemas expuestos en este trabajo: la elevada producción de ácidos orgánicos cuando la cepa VH33 *vgb*⁺ se cultivó a elevadas concentraciones iniciales de glucosa.

De la misma manera, sería interesante estudiar el comportamiento de cepas que expresen el gen *vgb* junto con estrategias como diálisis, suministro de oxígeno puro o aire enriquecido y

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

Publicaciones derivadas de la presente tesis.

En el artículo 1 se presentan los resultados del análisis fisiológico de cepas de *E. coli* nativa (W3110) y con el sistema PTS modificado (VH33) con y sin expresión del gen *vgb* cultivadas en modo lote con medio complejo con 25 y 50 g/L de glucosa.

En el artículo 2 se muestra un estudio adicional con la cepa VH33. Se analizan las producciones de acetato y ADN plasmídico (un modelo de vacuna de ADN) para la cepa nativa (W3110) y las cepas VH33 y VH34 (proveniente de VH33 pero con el gen de la piruvato cinasa inactivado).

1. Pablos TE, Meza E, Le Borgne S, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR. 2011. *Vitreoscilla* hemoglobin expression in engineered *Escherichia coli*: Improved performance in high cell-density batch cultivations. 2011. *Biotechnol J.* 6(8) 993-1002.
2. Pablos TE, Soto R, Meza E, Le Borgne S, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR. 2011. Enhanced production plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J Biotechnol.* En prensa.

Presentaciones en Cartel.

Pablos TE, Ramirez OT, Lara AR. “Uso de una hemoglobina heteróloga para mejorar el desempeño de cepas de *Escherichia coli* PTS⁻ y GalP⁺”. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, Acapulco Gro.

Lara AR, Soto R, Meza E, **Pablos TE**, Ramirez OT, Gosset G. “Incremento de la producción de una vacuna de ADN empleando cepas de *Escherichia coli* modificadas en el metabolismo central de carbono”. VI Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y VIII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, Acapulco Gro.

REFERENCIAS.

1. Akesson M., Axelsson J. P.,2000. Avoiding Acetate Accumulation in *Escherichia coli* Cultures Using Feedback Control of Glucose Feeding. *Biotechnol Bioeng*: 73:3:224-229.
2. Alexeeva S., Hellingwerf K., Teixeira de Mattos M.2003.Requirement of ArcA for Redox Regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not Anaerobic or Aerobic Conditions. *J Bacteriol*.185:1:204-209.
3. Andersen K. B. y Meyenburg K. 1980. Are Growth Rates of *Escherichia coli* in Batch Cultures Limited by Respiration? *J. Bacteriol*:144:1:114-123.
4. Becker S., Vlad D. Schuster p. P., Uden G.1997.Regulatory O₂tensions for the synthesis of fermentation products in *Escherichia coli* and relation to aerobic respiration. *Arch Microbiol*:168:290-296.
5. Belo I., Mota M.,1998. Batch and fed-batch cultures of *E. coli* TB1 at different oxygen transfer rates. *Bioproc Engineer*:451-455.
6. Bollinger C. J. T., Bailey J. E., Kallio P. T., 2001. Novel hemoglobins to enhance microaerobic growth and substrate utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnol.*, 17:798-808
7. Carlson R. y Srienc F. 2003.Fundamental *Escherichia coli* Biochemical Pathways for Biomass and Energy Production: Creation of Overfall Flux States. *Biotechnol Bioeng*: 86:2:149-162.
8. Chi P., Webster D., Stark B. 2009.*Vitreoscilla* hemoglobin aids respiration under hypoxic conditions in its native host. *Microbiol research*.164:267-275.
9. Datsenko K. y Wanner B.2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.*PNAS*.97:12:6640-6645.
10. De Anda R., Lara A. R., Hernández V., Hernández-Montalvo V.,Gosset G., Bolívar F., Ramírez O. T.,2006.Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process

- performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Met Eng*:8:281-290.
11. De Mey M., Maertens J., Lequeux G., Soetaert W., Vandamme E. 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *7*:34:
 12. DeModena J. A., Gutiérrez S., Velasco J., Fernández J. F., Fachini R.A., Galazzo J. L., Hughes D. E., 1993. The Production of Cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* Improved by the intracellular Expression of a Bacterial Hemoglobin. *Biotechnol*:11:926-930.
 13. Dikshit K., Orii Y., Navani N., Patel S., Huang H., Stark B., Webster D. 1998. Site-Directed mutagenesis of bacterial hemoglobin: the role of glutamine (E7) in oxygen-binding in the distal Heme pocket. *Archives of Biochem and Biophysics*.349:1:161-166.
 14. Eitman M. A., Altman E., 2006. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnol* 24:11:530-535.
 15. Farmer W. R. y Liao J. C., 1997. Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*:63:8:3205-3210.
 16. Flores N., Xiao J., Berry A., Bolívar F., Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol*:14:620-623.
 17. Flores S., De Anda-Herrera R., Gosset G., Bolivar F.G., 2004. Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by Engineering of the Pentose-Phosphate Pathway. *Biotechnol Bioeng*: 87:4:486-494.
 18. Flores S., Gosset G., Flores N., Graaf A.A., Bolívar F., 2002. Analysis of Carbon Metabolism in *Escherichia coli* Strains with an Inactive Phosphotransferase System by ¹³C Labeling and NMR Spectroscopy. *Met Eng*:4:124-137.
 19. Frey A. D., Farrés J., Bollinger C. J. T., Kallio T. P., 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 68:10:4835-48040.
 20. Frey A. D., Farrés J., Bollinger C. J. T., Kallio T. P., 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 68:10:4835-48040.

21. Frey A. D., Fiaux J., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J. E., Kallio P. T., 2001. Dissection of central carbon metabolism of hemoglobin-expressing *Escherichia coli* by ¹³C nuclear magnetic resonance flux distribution analysis in microaerobic bioprocess. *Appl Environ Microbiol*:67:2:680-687.
22. Gosset G. 2005. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*. 4:1-14.
23. Guerra P., Fernandez J. F., Absalón A. E., Suarez M. R., Sainoz M., Battios J., Mejía A., 2008. Expression of the bacterial hemoglobin gene from *Vitreoscilla stercoraria* increases Rifamycin B production in *Amycolatopsis mediterranei*. *Journal of Bioscience and Bioeng*, 106:5:493-497.
24. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
25. Hart R. A., Rinas U., Bailey J. E., 1990. Protein composition of *Vitreoscilla* hemoglobin inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *J. Biol Chem.*:265:21:12728-12733.
26. Hernández-Montalvo V., Martínez A., Hernández-Chavez G., Bolívar F., Valle F., Gosset G., 2003. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng*: 83:6:687-694.
27. Jana S. y Deb J. K., 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Microbiol Biotechnol.* 67:289-298.
28. Kallio P. T., Kim D. J., Tsai P. S., Bailey J. E., 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.*:219:201-208.
29. Kayser A., Weber J., Hecht V., Rinas U. 2005. Metabolic Flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiol*:151:693-706.
30. K
hleifat K. M., 2006. Correlation between bacterial hemoglobin and carbon sources:

- Their Effect on Copper Uptake by transformed *E. coli* Strain aDH5. *Current Microbiol*, 52:64-68. 52.
31. Khosla C. y Bailey J.1989.The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol and General Genetics*. 214:1:158-161.
 32. Khosla C.y Bailey J.1989.Characterization of the Oxygen-Dependent promoter of the *Vitreoscilla* Hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*.171 (11): 5885-6004.
 33. Kirkpatrick C., Maurer L. M., Oyelakin N. E., Yoncheva Y. N., Maurer R., Slonczewski J. L.2001. Acetate and Formate Stress: Opposite Responses in the proteome of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*:183:21:6466-6477
 34. Kleman G. L., Strohl W. R., 1994. Acetate Metabolism by *Escherichia coli* in High-Cell Density Fermentation. *Appl Environ Microbiol*:60:11:3952-3958.
 35. Knabben I., Regestein L., Marquering F., Steinbusch S., Lara A., Büchs J. 2010.High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor.*J. of Biotechnol*:150:73-79.
 36. Knoll, A., Bartsch Stefan, Husemann B., Engel P.,Schroer K.,Ribeiro B.,Stöckmann C.,Seletzky J., Büch J.,2007.High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J. Biotechnol* 132:167-179.
 37. Korz D.J.,Rinas U., Hellmuth K., Sanders E.A., Deckwer W.D. 1995.Simple Fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol*. 39:59-65.
 38. Laemmli U. 1970.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature*. 227:680-685.
 39. Lara A.R., Caspeta L., Gosset G., Bolivar F.,Ramirez O. T.,2008.Utility of an *Escherichia coli* Strain Engineered in the Substrate Uptake System for Improved Culture Performance at High Glucose and Cell Concentrations: An Alternative to Fed-Batch Cultures. *Biotechnol Bioeng*: 99:4:893-901.
 40. Lara A.R., Galindo E., Ramírez O. T., Palomares L. A. ,2006. Living With Heterogeneities in Bioreactors. *Mol Biotechnol*:34:355-381.

41. Lee S.Y.1996.High cell density culture of *Escherichia coli*.Tibtech.14:3:98-105.
42. Luli G. W., Strohl R. W., 1990. Comparison of growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of *Escherichia coli* Strains in Batch and Fed-Batch fermentations. Appl Environ Biotechnol 56:1004-10011.
43. Märkl H., Zenneck C., Dubach A. Ch., Ogbonna C.J. 1993.Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. Appl Microbial Biotechnol.39:48-52.
44. Matsui T., Shinzato N., Yokota H., Takahashi J., Seigo S., 2006. High Cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture.Process Biochem:41:920-924.
45. Matsui T., Yokota H., Sato S., Mukataka S., Takahashi J.,1989.Pressurized culture of *Escherichia coli* for a High concentration. Agric. Biol. Chem:53:8:2115-2120.
46. McDaniel L.E., Bailey E. G., Zimmerli A.,1965.Effect of Oxygen Supply rates on Growth of *Escherichia coli*. Appl Microbiol:13:1:109-115.
47. McDaniel L.E., Bailey E. G., Zimmerli A.,1965.Effect of Oxygen Supply rates on Growth of *Escherichia coli*.Appl Microbiol:13:1:115-119.
48. Ramandeep, Hwang K., Raje M., Kim K-J., Stark B. C., Dikshit K. L., Webster D. A., 2001. *Vitreoscilla* Hemoglobin, intracellular localization and binding to membranes. The J. Biol Chem:276:27:24781-24789.
49. Riesenber D. y Guthke R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol.51:422-430.
50. Rozkov, A., Avignone-Rossa, C., Ertl, P., Jones, P. 2004.Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol. Bioeng.*88: 909–915.
51. Sandoval-Basurto E. A., Gosset G., Bolívar F., Ramirez O. T.,2004.Culture of *Escherichia coli* Under Dissolved Oxygen Gradients Simulated in a Two-compartment Scale-Down Systeem: Metabolic Response and Production of Recombinant protein. Biotechnol Bioeng: 89:4:453-463.
52. Shalel-Levanon S., San K., Bennet G.2005.Effect of ArcA and FNR on the Expression of genes related to the oxygen regulation and the Glycolysis Pathway in *Escherichia coli* Under Microaerobic growth conditions. Biotechnol Bioeng. 92 (2): 147-159.

53. Shiloach J., Kaufman J., Guillard A.S., Fass R.,1996. Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth, and Recombinant Protein production by *Escherichia coli* BL21 (□DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol Bioeng*: 49:421-428.
54. Smith M. W., Neidhardt F. C., 1983. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*:154:1:336-343.
55. Soto R., Caspeta L., Barrón B., Gosset G., Ramirez O., Lara A.2011.High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochemical Engineering Journal*. 56:3:165-171.
56. Tsai P. S., Hatzimanikatis V., Bailey J. E.,1995. Effect of *Vitreoscilla* Hemoglobin Dosage on Microaerobic *Escherichia coli* Carbon and Energy Metabolism. *Biotechnol Bioeng*:49:139-150.
57. Tsai P. S., Kallio P. T., Bailey J. E., 1995.Fnr, a Global Transcriptional Regulator of *Escherichia coli*, activates the *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Promoter and Intracellular VHb Expression Increases Cytocrome *d* Promoter Activity.*Biotechnol Prog*:11:288-293.
58. Tsai P. S., Nägeli M., Bailey J. E., 1995. Intracellular Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Modifies Microaerobic *Escherichia coli* Metabolism Through Elevated Concentration and Specific Activity of Cytocrome O. *Biotechnol Bioeng*: 49:151-160.
59. Van de Walle M. y Shiloach J., 1997. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol Bioeng*: 57:1:72-77.
60. Varma A., Boesch B. W., Palsson B. O.,1993.Stoichiometric Interpretation of *Escherichia coli* Glucose Catabolism under Various Oxygenation Rates. *Appl Environ Microbiol*:59:8:2465-2473.
61. Vemuri G. N., Eitman M. A., McEwen J. E., Olsson L., Nielsen J.,2007.Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*:104:7:2402-2407.

62. Vemuri G. N., Altman E., Sangurdekar D. P., Khodursky A. B., Eitman M. A. 2006. Overflow Metabolism in *Escherichia coli* during Steady-State Growth Transcriptional Regulation and Effect of the Redox Ratio. *Appl Environ Biotechnol*:72:5:3653-3661.
63. Wei X. X., Chen G.-Q. 2008. Applications of the Vhb gene *vgb* for Improved Microbial Fermentation Processes. *Methods in Enzymology*: 436: 273-283.
64. Wolfe A. 2005. The Acetate Switch. *Microbiol and Molecul Biology Reviews*.69:1:12-50.
65. Xiao X. y Chen G.2008. Application of the Vhb gen *vgb* for improved microbial fermentation processes. *Methods in enzymology*. 436:273-287.
66. Xu B., Jahic M., Blomsten G., Enfors S.-O., 1999. Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:564-571.
67. Zhang, L. Yingjun L., Wang Z., Xia Y., Chen W., Tang K.,2006. Recent developments and future prospects of *Vitroscilla* hemoglobin application in metabolic application in metabolic engineering. *Biotechnol Advances*, 25: 123-136.