

PREMIO ALFREDO SÁNCHEZ MARROQUÍN CATEGORÍA DOCTORADO

Oportunidades en la producción de ADN_p en *Escherichia coli* bajo limitación de oxígeno disuelto

Karim E. Jaén^{a*}, Juan C. Sigala^b, Alvaro R. Lara^b

^a*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico. CP 62210*

^b*Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871. Col. Santa Fe Cuajimalpa, Cuajimalpa, Ciudad de México, México. C.P. 05348*

Correo electrónico: jaenkarim@gmail.com

RESUMEN

El renovado auge de los biofármacos basados en ADN plasmídico ha venido acompañado de numerosos desarrollos tecnológicos para incrementar su producción masiva. Esto ha sido posible mediante la integración de diversas estrategias sobre la plataforma de manufactura actual, consistente en cultivos de alta densidad celular de *E. coli*. Estos esfuerzos pueden estar comprometidos por un problema inherente al cultivo microbiano aerobio que es la limitación de O₂. La implementación de los métodos disponibles para contender con esa problemática es complicada e impondrían costos elevados en la escala productiva. La microaerobiosis es una condición ventajosa que puede ser considerada para la producción de ADN_p, si se dispone de células con un mejor desempeño metabólico bajo limitación de O₂ y estrategias moleculares que maximizan los rendimientos de plásmido en esa condición. Esto ha sido aprovechado mediante células que expresan la hemoglobina de *Vitreoscilla* y replicones de plásmidos que contienen el promotor microaerobio P_{vgb} con resultados promisorios para su aplicación industrial.

Palabras clave: ADN plasmídico, microaerobio, *E. coli*, hemoglobina de *Vitreoscilla* VHb

ABSTRACT

The plasmid DNA based biopharmaceuticals renewed boom has come along with several technological developments to increase their largescale production. This has been achieved by the combination of many strategies to increase plasmid DNA yields in the current manufacturing platform, which consists in *E. coli* high cell density cultivation. Nonetheless, all these efforts could be compromised by an inherent problem of the aerobic microbial cultivation that is the O₂ limitation. The available methods to counteract this problematic have complexity and economical concerns for their application at productive scales. Microaerobiosis represents an advantageous condition that can be considered for pDNA production upon availability of cells possessing better metabolic performance under O₂, as well as molecular strategies that maximize pDNA yields under such condition. This has been exploited by cells expressing the *Vitreoscilla* hemoglobin and plasmid replicons containing the microaerobic promoter P_{vgb}, with promising results for harnessing their industrial use.

Key words: Plasmid DNA, microaerobic, *E. coli*, *Vitreoscilla* hemoglobin.

INTRODUCCIÓN

A más de dos décadas del surgimiento del ADNp como vector alternativo de vacunación y terapia génica, el ADNp no figura aún como principio activo de tratamientos de terapia génica para humanos. Sin embargo, es el vector no viral predominante para la introducción de transgenes en las células en los ensayos clínicos de terapia génica (de acuerdo a la base de datos “Gene Therapy Clinical Trials Worldwide” (<http://www.abedia.com/wiley/>) proporcionada por *Journal of Gene Medicine*) y es principio activo de tratamientos en salud animal (Kutzler & Weiner, 2008). Otra aplicación importante del ADNp es en la producción de bioterapéuticos mediante la expresión transitoria de genes (TGE por sus siglas en inglés), una alternativa a la expresión estable para la producción rápida de proteínas recombinantes terapéuticas y vectores virales en células CHO y HEK293, principalmente con

el objetivo de proveer material para las pruebas clínicas. Debido a la baja eficiencia de transfección (inferior al 70%), se necesitan cantidades considerables de plásmido (1-2 µg ADNp por mL de cultivo) y reunir atributos de calidad tales como fracción de plásmido superenrollado (FSE de 70-90%) y pureza (A_{260nm/280nm} de 1.8-2.0), lo que representa un costo importante del proceso (Baldi et al., 2007; Cheng et al., 2011, Gutiérrez-Granados et al., 2018). Todo esto impone un desafío a la capacidad de manufactura actual.

Actualmente el ADNp se produce en cultivos de alta densidad celular (CADC) de *E. coli*, principalmente de la cepa DH5α que, mediante la integración de una estrategia de termoinducción de 30-42°C, un perfil de alimentación exponencial de glicerol y un medio de cultivo propietario, se ha podido obtener una concentración y rendimiento específico de ADNp (Y_{P/X}) de 2.6 g/L y 56 mg/g (Carnes et al., 2011), los más altos reportados

hasta ahora. Sin embargo, están por debajo del máximo teórico que es de 592 mg/g (Cunningham et al., 2009). Más aún, existen reportes de que la presencia de secuencias de inserción en el cromosoma de *E. coli* DH5 α comprometen la integridad estructural del plásmido, sobre todo bajo las condiciones de cultivo en el biorreactor (Van der Heijden et al., 2013; Gonçalves et al., 2014). Otros hospederos celulares como *E. coli* W3110, *E. coli* MG1655 y *E. coli* BL21 crecen mejor que *E. coli* DH5 α durante su cultivo en biorreactor, e inclusive han llegado a equiparar sus rendimientos (Yau et al., 2008, Phue et al., 2005). Para incrementar la capacidad productiva de ADNp de *E. coli*, se han modificado algunos genes del metabolismo central (Flores et al., 2004, Borja et al., 2012) de la replicación del plásmido (Sprenger GA, 1995; Sorensen & Jensen, 1996), pero aún hay muchos blancos genéticos no probados con enorme potencial (Gonçalves et al., 2012) para el diseño de una cepa robusta para la producción de ADNp en biorreactores con capacidades de 5-20 m³ típicas de biofarmacéuticos y químicos finos (Takors, 2012), en particular, que puedan contender con un problema inminente y muchas veces inevitable como lo es la limitación por oxígeno.

Otras estrategias para la producción masiva de ADNp y de aplicación más versátil como esquemas de inducción de la replicación químicos (adición de cloranfenicol (Reinikainen et al., 1989), adenosina monofosfato y limitación por aminoácidos (Riethdorf et al., 1989; Neubauer et al., 1996;

Wang et al., 2007; Silva et al., 2011; Silva et al., 2012) aunque efectivos, su aplicación puede estar limitada por restricciones regulatorias o sus implicaciones económicas. En el caso particular de la limitación por aminoácidos, esta puede activar la respuesta estricta en cepas *relA* (Valdez-Cruz et al., 2010). La termoinducción es una estrategia que prescinde de la adición de aditivos químicos. Está basada en la desestabilización térmica del complejo inhibitorio de la replicación RNAI-RNAII al incrementar la temperatura de cultivo hasta 39-45 °C (Ongkudon et al., 2011; Carnes et al., 2011; Jaén et al., 2013). Sin embargo, esto desencadena la respuesta de choque térmico en el hospedero que despliega proteasas y chaperonas para contrarrestar la desnaturalización de las proteínas celulares (Arsène et al., 2000), con consecuencias catastróficas para la célula (Hoffmann & Rinas, 2001; Wittmann et al., 2007, Hasan & Shimizu, 2008).

Por otro lado, estrategias moleculares tales como la poliadenilación de RNAI (Jasiecki & Wegrzyn, 2006) y la expresión de Cas3 (una enzima que posee actividad nucleasa y helicasa) (Howard et al., 2011) aumentan la disponibilidad de RNAII. Esto se logra al impedir la formación del complejo inhibitorio RNAI-RNAII y acelerar la degradación de RNAI. Como resultado, han incrementado el número de copias y rendimientos de plásmido hasta 5 veces. La interferencia de RNAI por ARN antisentido no ha sido probada hasta el momento, pero un

acercamiento teórico indica que puede incrementar en un 25% el número de copias (Freudenau et al., 2015). La eliminación de RNAI compromete RNAII, descontrola la replicación y hace inestable al plásmido (Morita & Oka, 1979). La sobreexpresión de RNAII mediante la duplicación del origen de replicación (Wang et al., 2006) o a partir de promotores como P_{T5} (Bacharov et al., 1990), P_{trp} (Gayle III et al., 1986), P_{tac} (Togna et al 1993) y P_{trc} (Jaén et al., 2019^b) han incrementado el Y_{PIX} de plásmidos de alto y bajo números de copias hasta 10 y 25 veces, aunque otros autores encontraron que la elevada transcripción de RNAII a partir de P_{T7} disminuyó el número de copias de plásmido atribuida a un plegamiento no funcional de RNAII (Chao et al., 1995). En todos estos casos la inducción requirió IPTG, y el reemplazo o incorporación de promotores

alrededor del replicón fue probado principalmente en plásmidos de bajo número de copias.

Aunque existen esquemas de inducción para aumentar el rendimiento de ADNp, tanto químicos como físicos, su efectividad está limitada al desempeño del hospedero celular, y por tanto, son vulnerables a las deficiencias de oxígeno. Los esfuerzos aplicados hasta el momento son escasos, pero con resultados que confirman su enorme potencial. Sin embargo, sus beneficios pueden verse mermados al trasladar el bioproceso a gran escala por un problema inherente e inevitable que es la limitación de O_2 . En este trabajo se han revisado los métodos implementados para contender la limitación de O_2 y como estos han contribuido a mejorar la producción de ADNp.

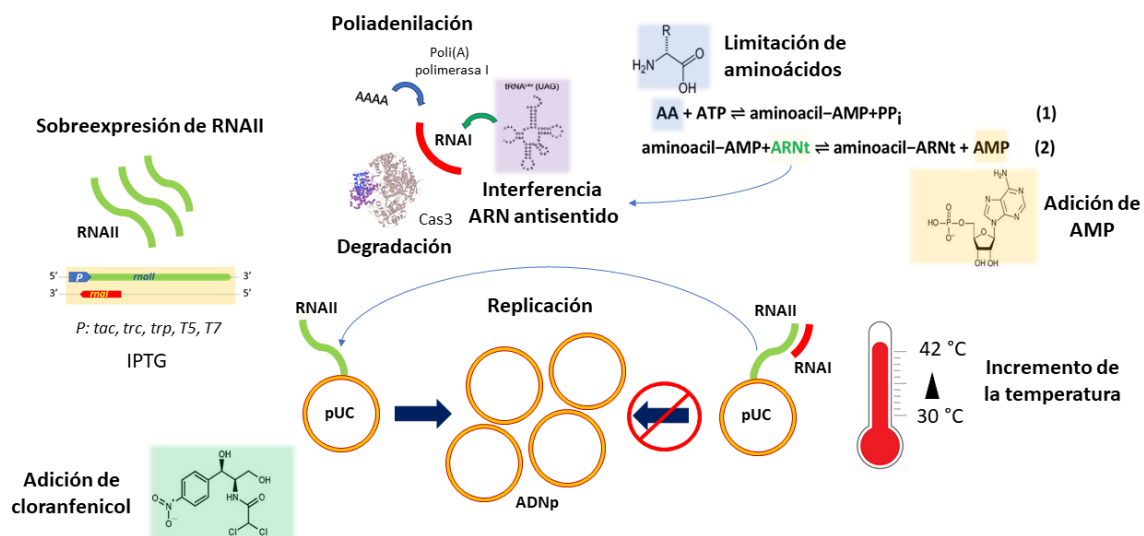


Figura 1. Estrategias moleculares y de proceso para incrementar la producción de ADNp. La replicación de los plásmidos tipo pUC es favorecida cuando se impide la formación del complejo

inhibitorio RNAI-RNAII. Esto se logra incrementando la temperatura de cultivo por arriba de 32 °C lo que provoca su desestabilización, así como con la degradación de RNAI mediada por su poliadenilación o por la nucleasa Cas3, o bien por su bloqueo con ARN antisentido, como los ARN de transferencia (ARNt) no cargados. Los niveles intracelulares de ARNt no cargados se incrementan con la adición del nucleótido AMP y la limitación de aminoácidos (reacciones 1 y 2). La replicación del ADNp también se incrementa cuando se propicia la formación del híbrido RNAII-ADN. Esto se logra al incrementar la abundancia de RNAII mediante su sobreexpresión a partir de promotores inducibles por IPTG. Una estrategia que redirige los recursos biosintéticos para la replicación del plásmido consiste en la adición de cloranfenicol. Cuando este antibiótico inhibe la actividad ribosomal bacteriana y la replicación del ADN genómico, deja disponible la maquinaria replicativa para el plásmido.

El problema de la limitación de O₂ disuelto en el biorreactor

El aumento en el número de células con el tiempo incrementa la velocidad de consumo de O₂ y provoca la disminución progresiva de la concentración de O₂ disuelto en el medio de cultivo (García-Ochoa & Gómez, 2009). Por debajo de cierto nivel de O₂ disuelto, la célula comienza a reconfigurar su metabolismo para mantener la generación de energía y de potencial reductor ante el inminente agotamiento del O₂ en el medio de cultivo, por lo que en esta situación se dice que el cultivo está limitado por O₂. En los reactores de escala industrial la limitación de O₂ no solo está en función del tiempo del cultivo, sino también del espacio como resultado del mezclado ineficiente. Esto conduce a una pobre dispersión y homogenización del O₂ por lo que surgen regiones con diferentes concentraciones de O₂ (gradientes), y por consecuencia de diferentes velocidades de transferencia de O₂ (VTO) (Lara et al., 2006^a). Estas

heterogeneidades a las que se exponen los hospederos celulares, que inclusive se magnifican con el aumento en la escala, son las responsables de la disminución en su desempeño. Esta adaptación fisiológica de la célula ocurre con gran rapidez (menos de 2 s), de manera que su exposición continua y prolongada a gradientes de O₂ como en un biorreactor de escala productiva, conlleva a una disminución considerable en su crecimiento y a un incremento importante en la acumulación de metabolitos parcialmente oxidados, en comparación a condiciones aerobias constantes. Esto se debe a que el metabolismo anaerobio predomina en la célula independientemente de su tránsito a condiciones aerobias. El CAT opera en modo reductor y oxidativo y el citocromo *bd* reemplaza al citocromo *bo*. Las vías fermentativas están activas tal como lo refleja el aumento en la producción de acetato, formiato, lactato, succinato y etanol, así como el elevado nivel de transcritos de *akcA*, *poxB*, *adhE*, *ldhA*, *pflD*, *fdhF*, *frdD*, aunque la expresión de los genes reguladores no cambia

de manera importante (Lara et al., 2006^b). En el caso extremo del tránsito de las células hacia regiones del biorreactor con alta concentración de sustrato y baja concentración de O₂, tal como ocurre en la zona de adición en un lote alimentado, se intensifica la producción de ácidos orgánicos y etanol, en gran parte debido a un incremento

en la tasa de consumo específico de sustrato (Y_{X/S}), para maximizar la producción de ATP a nivel de glicólisis. Esto representa un desperdicio considerable de carbono que impacta negativamente en el crecimiento celular y su productividad (Lara et al., 2006^{b, c} y 2009).

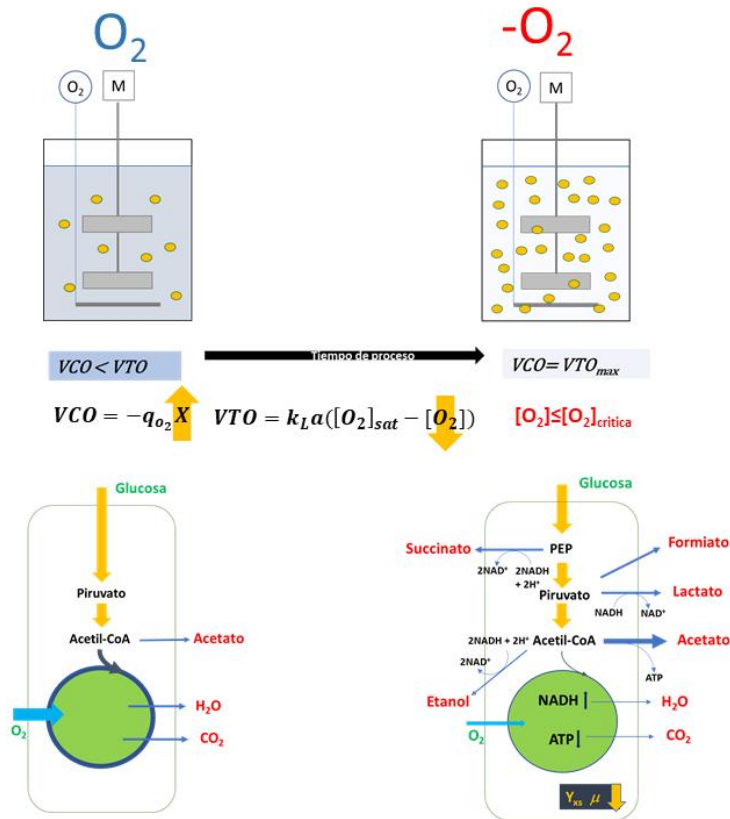


Figura 2. Limitación de O₂ disuelto en el biorreactor - origen y consecuencias sobre el metabolismo central de *E. coli*. La velocidad de consumo de O₂ (VCO) se incrementa con el aumento de la concentración celular. Cuando se equiparan las VCO y VTO_{max}, la concentración de O₂ disuelto disminuye hasta un nivel crítico. Bajo la limitación de O₂, se inhibe la actividad respiratoria del hospedero celular, el cual reconfigura su metabolismo para mantener la generación de energía y el poder oxidativo. Como consecuencia, gran parte de la fuente de carbono es oxidada parcialmente a metabolitos que son excretados al caldo de cultivo e impactan negativamente el crecimiento celular. *Impacto de la disponibilidad de O₂ sobre la producción de ADNp.*

Pese al crecimiento potencial del ADNp como agente terapéutico, es poco lo que se ha investigado sobre el impacto de las condiciones a gran escala sobre la producción de ADNp. Se ha reportado que la exposición transitoria (1.6 h) a limitación de O_2 disminuye la fracción de células portadoras de plásmido en cultivo (Hopkins et al., 1987). Namdev et al. (1993) reportaron que las fluctuaciones de oxígeno creadas por la aireación intermitente no condujeron a la segregación de plásmido, pero ocasionaron una disminución en el número de copias de plásmido. Por el contrario, el número de copias de plásmido en un cultivo continuo operado a una TOD de 0-25% fue 75% mayor que a una TOD de 90-100% sat. de aire (Ryan & Parulekar, 1990). De acuerdo a otros reportes, las condiciones microaerobias (TOD = 5% sat. de aire) no provocaron la pérdida del plásmido e incluso incrementó el título de plásmido en comparación a condiciones aerobias (Passarinha et al., 2006). Esto ha sido observado en otros trabajos. En la producción de ADNp en un cultivo en biorreactor en modo lote, el $Y_{P/X}$ a TOD < 2% sat. de aire fue 38% superior a las condiciones aerobias; bajo TOD heterogenea (0-90% sat. de aire) creada por el cambio en la velocidad de agitación cada 10 min a lo largo del cultivo no fue significativamente diferente de la observada en aerobiosidad (Jaén et al., 2017). En la evaluación de cultivos bajo VTOs de 10, 14, 30, 45 y 110 mmol $L^{-1} h^{-1}$, el $Y_{P/X}$ se incrementó gradualmente con la disminución en la VTO y

fue hasta 2.5 veces superior con la VTO más baja con respecto a la de los cultivos con la VTO más alta (Lara et al., 2019^a). El $Y_{P/X}$ en la producción de un plásmido sintético que contiene una versión mínima del replicón R1 en dos cepas de *E. coli*, fue 1.8-3.6 veces más alto en microaerobiosidad que aerobiosidad (Lara et al., 2019^b). El aumento de $Y_{P/X}$ cuando se limita el O_2 se atribuye principalmente a la consecuente disminución en la velocidad de crecimiento específico (μ).

Impacto de la disponibilidad de O_2 sobre la calidad de ADNp

Los efectos de la disponibilidad de O_2 sobre la calidad del plásmido producido no han sido apropiadamente caracterizados. Por ejemplo, la fidelidad de la secuencia debe verificarse durante los procesos de producción, mientras que la topología del plásmido es un factor de calidad requerido para su uso terapéutico y la transfección a células en cultivo (Cherng et al., 1999). Cortassa & Aon (1993) demostraron que el superenrollamiento se incrementó 6 min después del tránsito de *E. coli* de aerobiosidad a anaerobiosidad, y que el superenrollamiento fue máximo 20 min después de ese cambio. Esto fue atribuido a una disminución en la actividad de relajación del ADN de la topoisomerasa I y a la actividad constante de la girasa después del cambio a anaerobiosidad. Jaén et al. (2017) no observaron diferencias en la topología del plásmido pVAX1 producido en cultivos aerobios y microaerobios de *E. coli* W3110

recA⁻ a TOD constante, pero si una disminución del 20% en la fracción de plásmido superenrollado (FSE) y un aumento en la heterogeneidad del plásmido reflejada en la mayor variabilidad de la FSE y las diferencias en la movilidad electroforética de las poblaciones de plásmido producido en cultivos con oscilaciones en la TOD. En este mismo reporte se demostró que la secuencia de los plásmidos no fue afectada por la limitación de O₂. Ramírez et al. (2016) tampoco encontraron diferencias en las secuencias de un plásmido terapéutico producido por *E. coli* DH5 α y *E. coli* VH33 en cultivos que experimentaron limitación de O₂. En la producción del plásmido pUC18 por *E. coli* W3110 *recA*⁻ en cultivos alimentados exponencialmente con glucosa, se observó un incremento en la variabilidad de la FSE cuando se cambió la TOD de 30% a < 2% (sat. aire) (Jaén et al., 2019^b). Esto mismo también se observó, aunque en menor intensidad en la producción del plásmido pVAX1 por las cepas *E. coli* W3110 *recA*⁻ y *E. coli* BL21(DE3) en cultivos en modo lote cuando la TOD cayó de >40% a 0% cuando se disminuyó la velocidad de agitación de 1250 rpm a 750 rpm. Se ha observado que a VTOs inferiores a 30 mmol L⁻¹ h⁻¹, la FSE disminuye mientras que la fracción de las isoformas lineal y circular relajada se incrementan (Lara et al., 2019^a). Al poner en balance los rendimientos y la calidad, los autores determinaron una VTO óptima de 30 mmol L⁻¹ h⁻¹ y escalaron la producción del cultivo en microplaca de 0.9 mL a biorreactor de tanque agitado de 1000

mL en el que prácticamente reprodujeron el Y_{P/X} y FSE obtenidos en el sistema de cultivo de microplaca. El hecho de que la microaerobicidad no compromete la producción y calidad (fidelidad de la secuencia y FSE) de ADNp, representa una condición ventajosa para la manufactura de esta biomolécula. Sin embargo, es necesario robustecer los hospederos celulares para tolerar mejor los ambientes con TOD heterogénea, los cuales si repercuten considerablemente en el crecimiento celular y la FSE.

Estrategias para incrementar la producción de ADNp bajo limitación de O₂

Estrategias de proceso

Maximizar la VTO en el diseño y operación de los biorreactores permite prolongar el tiempo productivo de la fábrica celular, desde los sistemas de cribado masivo de apenas unos cuantos mililitros (Latterman & Büchs, 2015), preparación de precultivos, hasta los de producción de decenas de metros cúbicos. Las directrices fundamentales en las estrategias para incrementar la VTO en los biorreactores radican en mejorar el mezclado y la dispersión del gas, así como incrementar la solubilidad del O₂.

Incremento en el k_La

El coeficiente volumétrico de transferencia de O₂ (k_La) es determinante de la VTO. A partir de su definición fundamental, el k_La engloba el coeficiente de transferencia

de masa en la fase líquida que comprende los términos difusivos y convectivos, y el área superficial de contacto entre la fase líquida y la gaseosa. El k_{La} está fuertemente influenciado por las propiedades hidrodinámicas del medio, el mezclado y el burbujeo. A continuación, se describen algunas de las estrategias implementadas en el diseño y operación de biorreactores de tanque agitado.

Dispersión de la fase gaseosa

Los difusores son piezas tubulares, por lo general en forma de anillo provistas de orificios a través de los cuales se distribuye la corriente de aireación al medio de cultivo. Mientras más numerosos y de menor diámetro sean los orificios, se obtienen burbujas de menor tamaño y por consiguiente mayor área superficial de contacto gas-líquido, como en el caso de los microdifusores de acero sinterizado con poros de tamaño micrométrico que incrementan considerablemente el k_{La} (Fenge et al., 1993). Esto además contribuye a un aumento en la retención del gas y en el tiempo de residencia de las burbujas (Merchuk et al., 1998) lo cual es deseable para el cultivo microbiano, pero no para el de células sensibles al estrés hidrodinámico (Oh et al., 1992; Xie et al., 2003). La posición y el tamaño del difusor en relación al tipo de impulsor, así como el flujo volumétrico específico, influyen de manera importante en la dispersión del gas en términos de su retención (Birch & Ahmed, 1997).

Mezclado

Esta operación tiene como objetivos lograr las mayores VTOs y los menores tiempos de mezclado posibles para el cultivo microbiano a gran escala. Sin embargo, dada la limitada capacidad de los motores, el margen de maniobra para incrementar el k_{La} con el aumento en la velocidad de agitación a gran escala se estrecha, prolongando los tiempos de mezclado (Lara et al., 2006^a). Es por ello que las mejoras en este proceso tales como incrementar la turbulencia y minimizar las zonas de estancamiento se consiguen desde el diseño del tanque y los impulsores (Kumaresan & Joshi, 2006). En general, los impulsores de flujo radial como el Rushton dispersan mejor la fase gaseosa en el medio de cultivo al prolongar el tiempo de retención de las burbujas que los de flujo axial, a expensas de un mayor consumo de potencia y menor tiempo de mezclado (Vrábel et al., 2000). El empleo de dos o más impulsores en serie incrementa la eficiencia de mezclado dependiendo de su espaciamiento en la flecha (Nienow & Lilly, 1979; Armenante & Chang, 1998). Cuando se combinan impulsores radiales y axiales se obtienen menores consumos de potencia y tiempos de mezclado. Sin embargo, el empleo de 3 turbinas Rushton de 6 paletas espaciadas entre sí a una distancia equivalente al diámetro del impulsor, es la configuración que permite obtener los k_{La} por unidad de potencia suministrada más altos (Moucha et al, 2009). Gracias a la sofisticación de herramientas

como la dinámica computacional de fluidos (CFD), es posible contar con una evaluación *a priori* de los sistemas de agitación. Por ejemplo, Gelves et al. (2014) compararon el desempeño del sistema típico de impulsores Rushton contra un sistema novedoso de impulsores de paletas inclinadas con microdifusores rotatorios mediante el modelado de la hidrodinámica y la transferencia de masa con CFD. Las mediciones de los k_La validaron los resultados de las simulaciones y confirmaron que el sistema novedoso incrementó el k_La hasta 34 veces con un ahorro de potencia del 50% en comparación al sistema convencional.

Incremento en la solubilidad del O₂

El gradiente de concentración de O₂ es la fuerza motriz bajo la cual tiene lugar la transferencia de masa y alcanza su valor más alto cuando la concentración de O₂ disuelto en el medio de cultivo es cero. Sin embargo, tal condición es prohibitiva dada la limitación por O₂ por lo que el valor más alto posible del gradiente estará en función de la concentración de O₂ disuelto crítica. Además, existe la posibilidad de incrementar la concentración de saturación de O₂, por lo que puede aumentarse aún más dicho gradiente bajo las estrategias que se describen a continuación:

Enriquecimiento de la fase gaseosa con O₂ puro

De acuerdo con la ley de Henry, la concentración de O₂ en la fase líquida es

directamente proporcional a la presión parcial del O₂ en la fase gaseosa. Por tanto, incrementar el contenido de O₂ en la corriente de aireación aumenta la solubilidad de O₂ en el medio de cultivo. El suministro de mezclas enriquecidas con O₂ ha permitido incrementar la densidad celular y los títulos de los productos de interés con la calidad requerida en procesos de producción de proteína recombinante y ADN plasmídico (Castan et al., 2002; Shang et al., 2009, Lara et al., 2011). Sin embargo, algunos autores señalan que las concentraciones elevadas de O₂ desencadenan respuestas de estrés oxidativo, pero sus efectos no son tan evidentes en el crecimiento de la célula (Baez & Shiloach, 2013). El desarrollo de tecnologías de absorción y de membrana han conseguido abatir los costos de generación de O₂. Sin embargo, es necesario evaluar la factibilidad de su implementación en la escala que se pretende operar el bioproceso (Hendershot et al., 2010; Hashim et al., 2011).

Presurización

Incrementar la presión en el espacio de cabeza del biorreactor aumenta la presión parcial de O₂ y su solubilidad en el medio de cultivo. Esto permite un aprovechamiento más eficiente de la potencia volumétrica que se refleja en altas VTO (Knoll et al., 2005). Con respecto a cultivos de alta densidad celular no presurizados de *E. coli*, la aplicación de una sobrepresión de 11 bar incrementó la VTO en un 74% y la concentración de biomasa en 268%. Resultados similares fueron

observados con otros microorganismos (Knoll et al., 2007). En la producción de una vacuna de ADN plasmídico en un cultivo de alta densidad celular de *E. coli* presurizado a 8 bar, se alcanzaron concentraciones de biomasa, títulos y calidad del plásmido similares a los obtenidos en el proceso enriquecido con O₂. Sin embargo, el cultivo presurizado requirió menor potencia volumétrica y la VTO fue 20% superior a la del cultivo enriquecido con O₂. (Lara et al., 2011). Sin embargo, algunas limitaciones de esta estrategia son el CO₂ y la generación de calor. El CO₂ es 5 veces más soluble que el O₂ (Rischbieter et al., 1996) y con la presurización puede alcanzar concentraciones inhibitorias. La exposición de *E. coli* a niveles de CO₂ 15 veces superiores a los convencionales por periodos prolongados, exagera la excreción de acetato, disminuye el crecimiento celular y la producción de proteína recombinante (Baez et al., 2009 y 2011). Por otro lado, la operación a VTOs superiores a 0.7 kmol/m³ h en un biorreactor de 5 m³, está limitada por la capacidad de disipación de calor, que representa el concepto más costoso en la adquisición y operación del mismo (Knoll et al., 2005).

Disminución de la temperatura de cultivo

Considerando que típicamente *E. coli* se cultiva a 37 °C, disminuir la temperatura a 30 o inclusive a 25 °C aumenta la disponibilidad de O₂ en el medio de cultivo entre 10 y 20%. Sin embargo, el *k_La* disminuye con el aumento en la viscosidad y la tensión superficial del medio por lo que la VTO se

mantiene sin cambios importantes con la temperatura (Vogeelar et al, 1999, Lee et al., 2017). No obstante, los beneficios de esta estrategia estriban en gran medida en la fisiología de *E. coli* al minimizar la carga metabólica de la fábrica celular e incrementar la μ y el rendimiento de biomasa en sustrato ($Y_{X/S}$) (Jaén et al., 2013) así como la calidad (plegamiento, fracción soluble) en el caso de la producción de proteína recombinante (Baneyx & Mujacic, 2004).

Empleo de acarreadores de O₂

Los perfluorocarbonos (PFC) e hidrocarburos alifáticos de 12 y 13 carbonos son algunos de los acarreadores más utilizados debido a que no son tóxicos y pueden solubilizar el O₂ hasta 20 veces más que el agua. Debido a que ambas sustancias incrementan sustancialmente la viscosidad de la fase líquida, solo pueden utilizarse hasta en un 15% en volumen (Ju et al., 1991; Galaction et al., 2004). Con ese contenido de acarreador, se ha incrementado el *k_La* (Galaction et al., 2004 y 2005), las concentraciones celulares y las productividades de *E. coli* (Ju et al., 1991; Pilarek et al., 2011 y 2013). Esta estrategia se ha planteado como alternativa al incremento en la potencia volumétrica, pero es incongruente con el hecho de que el acarreador requiere ser dispersado adecuadamente para aumentar la superficie de contacto y el consecuente aumento en la viscosidad del medio (Ju et al., 1991; Clarke et al., 2006), aunque algunos autores han

observado lo contrario con los hidrocarburos (Galaction et al., 2004 y 2005). Los PFC son difíciles de dispersar debido a que son 2 veces más densos que el agua y requieren de la adición de surfactantes, mientras que los hidrocarburos, al ser menos densos que el agua, tienden a agregarse en la superficie de la fase líquida y dificultan la transferencia de O_2 en esa zona (Galaction et al., 2004). Otro inconveniente que no debe ser pasado por alto es que los acarreadores solubilizan 6 veces más el CO_2 que el agua. Los beneficios de su empleo difícilmente compensan los desafíos técnicos que implica su implementación a gran escala. Es por esta razón que solo han sido aplicados a nivel laboratorio.

Generación de O_2 in situ

La descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y O_2 catalizada por enzimas o cationes metálicos divalentes surge como una alternativa de oxigenación en fase líquida adicional, o para microorganismos en los que la aireación es contraproducente para la utilización de sustratos altamente volátiles, o que generan bastante espuma. Mediante un esquema de alimentación se adiciona el H_2O_2 al medio de cultivo bajo demanda para mantener su crecimiento aerobio y evitar concentraciones inhibitorias de H_2O_2 (Sonnleitner & Hahnemann, 1997). Sin embargo, la elevada concentración de H_2O_2 en la zona de adición, aunado a su toxicidad, resultan en una disminución de la densidad celular en comparación a cultivos aireados (Sarkar et al., 2008).

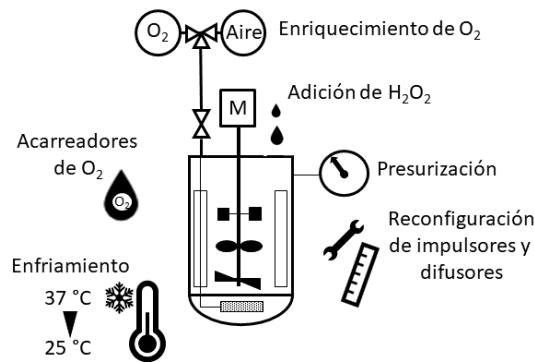


Figura 3. Estrategias de proceso para contener con la limitación de O_2 disuelto en el biorreactor.

Aunque existen estrategias para contener con la limitación de O_2 , su implementación es complicada e impondría costos elevados en la escala productiva. Otra

forma de abordar esta problemática consiste en robustecer la célula ante la limitación de O_2 mediante la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb).

Hemoglobina de Vitreoscilla (VHb)-alternativa biológica para contender con la limitación de O₂.

La hemoglobina de *Vitreoscilla* es una proteína homodimérica de 32.8 kDa cuyas cadenas de 146 residuos de aminoácidos estructuradas en 10 hélices alfa conforman el dominio globina sobre el cual se asienta el grupo hemo (número de acceso PDB: 1VHB). La capacidad de la VHb para mantener a *Vitreoscilla stercoraria* en ambientes deficientes en O₂ al tratarse de una bacteria Gram negativa aerobia estricta, planteó la posibilidad de su uso en otros microorganismos mediante la tecnología de ADN recombinante como una alternativa para contender con la limitación de O₂ en cultivos aerobios de alta densidad celular (Khosla &

Bailey, 1988^a). Esto llevó a la clonación del gen *vgb* de 441 pb (que codifica la VHb) junto con su promotor nativo (P_{*vgb*}) y a su expresión en *E. coli* (Khosla & Bailey, 1988^{a,b}; Dikshit & Webster, 1988). Rápidamente se elucidó que la expresión de la VHb a partir de su promotor nativo se activa en respuesta a bajos niveles de O₂ y que la VHb incrementó la velocidad de crecimiento y la densidad celular de *E. coli* (Khosla & Bailey, 1988^a). Su elevada constante disociación de O₂ (Tabla 1), su localización en el periplasma (Ramandeep et al., 2001), y la interacción significativa con el citocromo *bo* (Park et al., 2002), sugieren que la VHb funge como reservorio y transportador de O₂ hacia las oxidasas terminales.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la unión de O₂ con hemoglobinas. Datos tomados de (a) Trent et al., 2001, (b) Orii y Webster, 1986, (c) Dikshit et al., 1998 y (d) Hill et al., 1994. “****” : No disponible.

VHb + O ₂ ⇌ VHb·O ₂			
Hemoglobina	<i>k_{on}</i> (μM ⁻¹ s ⁻¹)	<i>k_{off}</i> (s ⁻¹)	<i>K_D</i> (μM)
Neurohemoglobina humana ^a	130	0.3	0.005
Hemoglobina humana α (R) ^a	19	15	0.77
Hemoglobina humana β(R) ^a	74	47	0.63
Mioglobina de esperma de ballena ^a	17	15	0.90
Leghemoglobina de soya ^a	130	5.6	0.04
Hemoglobina de <i>Synechocystis</i> ^a	240	0.038	0.000323
Hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i>^{bc}	78	5600	7.1 ± 0.8
Citocromo <i>bd</i> ^d	2000	50	0.025
Citocromo <i>bo</i> ^d	160	***	***

k_{on}, constante cinética de asociación; *k_{off}*, constante cinética de disociación; *K_D*: constante de equilibrio de disociación.

La capacidad de la VHb de mantener la respiración en células de *E. coli* carentes de los citocromos *bd* y *bo* plantea dos posibilidades: un papel de citocromo alternativo (Tsai et al., 2002) o una interacción con otros componentes de la cadena respiratoria (Dikshit et al., 1992). En condiciones microaerobias, la VHb incrementa el contenido y la actividad de los citocromos, particularmente *bo*, aumentando sustancialmente la actividad respiratoria e incrementando la afinidad aparente por el O₂ (Tsai et al., 2002); esto se traduce en una mayor translocación de protones y producción de ATP por mol de oxígeno consumido (Kallio et al., 1994). A nivel metabólico, la VHb redirige un mayor flujo de carbono hacia la vía de las pentosas-5-fosfato (P5F) y disminuye la excreción de acetato y formiato, subproductos predominantes de la fermentación ácido-mixta (Frey et al., 2001). Este aumento en la eficiencia energética y de aprovechamiento de la fuente de carbono bajo limitación de O₂ se refleja en un mejor crecimiento y capacidad de producción de proteína recombinante (Khosla et al., 1990; Khosravi et al., 1990) y etanol (Arnaldos et al., 2012) en *E. coli*. Estas ventajas de la VHb no se presentan en otras hemoglobinas (Kallio et al., 1996^b; Bollinger et al., 2001) y se han extrapolado a otros hospederos bacterianos en la producción de proteína recombinante (Kallio & Bailey, 1996^a), antibióticos (Wang et al., 2014), carotenoides (Ma & Lin, 2014), biopolímeros (Ye et al., 2012; Zhang et al., 2013), entre muchos otros (Wei & Chen, 2008; Stark et al.,

2015). Los efectos benéficos de la VHb no se acotan únicamente a condiciones limitantes de O₂, ya que en condiciones aerobias ha demostrado incrementar la μ , densidad celular, así como disminuir el sobreflujo metabólico de cepas nativas y modificadas genéticamente de *E. coli* (Pablos et al., 2011 y 2014), y el efecto Warburgh en células CHO (Pendse & Bailey, 1994; Juárez et al., 2017)

En la mayoría de los trabajos, la VHb se ha expresado en microaerobiosis a partir de vectores de bajo y alto número de copias bajo el control de su promotor nativo, aunque modificaciones a este o el empleo de promotores inducibles por IPTG como P_{lac} o P_{tac} han hecho posible su expresión en condiciones aerobias. Como cualquier otra proteína recombinante, su expresión en *E. coli* no está exenta de su agregación en cuerpos de inclusión, la cual es además propiciada por la limitación en la disponibilidad del grupo hemo, su oxidación en el periplasma y la expresión simultánea de otras proteínas recombinantes como los marcadores de presión de selección de plásmido (Hart et al., 1990 y 1994; Rinas & Bailey, 1993). En este sentido, la integración de una sola copia de *vgb* bajo promotores fuertes en el cromosoma de *E. coli* es una alternativa genéticamente más estable y efectiva de expresión de VHb, que aminora sustancialmente la carga metabólica de los hospederos. Aunque el nivel de expresión cromosomal es inferior al de plásmido, sus efectos benéficos en el desempeño biosintético de *E. coli* (Khosla et al., 1990; Jaén et al., 2019^a), *B.*

amyloquefaciens (Zhang et al., 2013), *S. gilvosporeous* (Wang et al., 2014) y células CHO (Pendse & Bailey, 1994) demuestran que es suficiente.

Aplicación de VHb en la producción de ADNp

La expresión aerobia de la VHb a partir de un vector de alto número de copias duplicó $Y_{P/X}$ en *E. coli* W3110 (Pablos et al., 2014). No obstante, expresar la VHb a partir del plásmido no es apropiado, dado que es el producto en cuestión y no es deseable incluir más secuencias bacterianas en plásmidos destinados como biofármacos. Por estas razones cepas *recA*⁺ y *recA*⁻ de *E. coli* W3110 y BL21(DE3) fueron modificadas para expresar la VHb constitutivamente desde el cromosoma de los hospederos. En cultivos en modo lote aerobios en matraz, con respecto a las cepas parentales, la presencia de VHb prácticamente no tuvo efecto sobre μ y $Y_{X/S}$ de estas cepas. En cuanto a la producción, tuvo efectos opuestos; incrementó el $Y_{P/X}$ de *E. coli* W3110 *recA*⁻*vgb*⁺ y de *E. coli* BL21(DE3)*recA*⁺*vgb*⁺, pero disminuyó el de *E. coli* W3110*recA*⁺*vgb*⁺ y *E. coli* BL21(DE3)*recA*⁻*vgb*⁺. VHb no tuvo un efecto significativo sobre la calidad de los plásmidos en *E. coli* W3110(*recA*⁺ y *recA*⁻)*vgb*⁺ ni en *E. coli* BL21(DE3) *recA*⁺*vgb*⁺, pero disminuyó la FSE prácticamente a la mitad en *E. coli* BL21(DE3) *recA*⁻ *vgb*⁺. Esto se revirtió con la integración de una versión optimizada del gen que codifica VHb con el uso preferente de codones. En *E. coli* W3110 *recA*⁻ cultivada en biorreactor en modo lote, VHb no tuvo efecto

en la μ en aerobiosidad, pero duplicó la μ e incrementó en un 25% la concentración celular cuando se limitó el O₂ por la disminución en la velocidad de agitación. VHb abatió parcialmente el sobreflujo metabólico al disminuir en un 30% la excreción de acetato, pero acompañado de un incremento de 3 veces en la excreción de lactato. Mediante la evaluación de oxido-reductasas con Redox Sensor Green (RSG) (Baert et al., 2016) se demostró que VHb triplicó la actividad de la cadena transportadora de electrones en este fondo genético (Jaén et al., 2019^a). VHb no influyó en la viabilidad celular, pero el ensayo con yoduro de propidio (PI) reveló que VHb vuelve más susceptible a la célula a daño en aerobiosidad, posiblemente por estrés oxidativo. No obstante, bajo las condiciones evaluadas, VHb no influyó en el $Y_{P/X}$ ni en la FSE del plásmido producido en aerobiosidad y microaerobiosidad. Por el contrario, con *E. coli* BL21(DE3) *recA*⁻, la presencia de VHb disminuyó la μ en un 18% en aerobiosidad y hasta un 50% en microaerobiosidad. A diferencia de *E. coli* W3110*recA*⁻, este fondo genético acumuló una menor cantidad de subproductos, pero VHb no influyó sustancialmente, tan solo una sutil disminución del 10% en la excreción de lactato. No obstante, VHb incrementó hasta 10 veces la actividad de la cadena transportadora de electrones y mantuvo la viabilidad celular por encima de la cepa parental en microaerobiosidad. Sin embargo, esta fortalecida condición metabólica no se reflejó en una mayor producción de ADNp, aunque mostró

un ligero incremento en la FSE del plásmido producido en microaerobiosis. La producción aerobia y microaerobia de *E. coli* W3110recA⁻vgb⁺ de un plásmido con una versión mínima del replicón R1 resultó en $Y_{P/X}$ 14 y 7 veces mayores más altos que los obtenidos en *E. coli* W3110recA⁻vgb⁺ (Lara et al., 2019^b).

Pese al impacto negativo de la limitación de O₂ sobre el metabolismo del hospedero, que es más severo bajo condiciones de TOD heterogénea, la producción microaerobia de ADNp es una alternativa viable con células que contengan mejor con la limitación de O₂. Los efectos indeseables originados bajo esta condición han demostrado ser atenuados en cepas que expresan intracelularmente y de manera constitutiva VHB, siendo la cepa *E. coli* W3110recA⁻vgb⁺ propuesta como mejor candidata para la producción microaerobia de ADNp.

¿Cómo obtener ventajas de la adversidad?

La limitación de O₂ puede estropear estrategias que incrementan aún más los rendimientos de ADNp, como la sobreexpresión de RNAII. Lara et al. (2017^{a,b}) observaron una disminución del 63% en la expresión de una proteína reportera a partir de un promotor constitutivo P_{kat} en los cultivos microaerobios con respecto a los aerobios. El empleo de promotores inducibles por limitación de O₂ es una alternativa que puede sacar ventaja de esa condición adversa para maximizar la producción de ADNp, como pueden ser algunos promotores endógenos

de *E. coli* y de globinas heterólogas, cuya capacidad de expresión bajo condiciones aerobias y de limitación de oxígeno ha sido evaluada (Lara et al., 2017^{a,b}). Es deseable que la expresión de estos promotores no sea activada en aerobiosis, ya que esto aminora la carga metabólica del hospedero en las etapas tempranas del cultivo cuya finalidad es acumular biomasa rápida y eficientemente, pero en microaerobiosis, debe ser lo más fuerte y estable posible para aprovechar la capacidad biosintética de la célula por el poco tiempo productivo disponible. Entre los que reúnen algunas de estas características se encuentran el promotor de globina derivado de *Streptomyces coelicolor* (P_{sc}), cuyo nivel de expresión en aerobiosis es el más bajo, mientras que el derivado de *Salmonella typhi* (P_{sc}) posee el nivel de expresión más alto en microaerobiosis. Sin embargo, ambos promotores no mostraron diferencias en la relación de inducción (nivel de expresión microaerobio/nivel de expresión aerobio cuando la VTO disminuyó de 11 a 7 mmol L⁻¹ h⁻¹, mientras que el del promotor *vgb* de *V. stercoraria* (P_{vgb}) tuvo el incremento más alto que fue de 2 veces, seguido del promotor derivado de *Deinococcus radiodurans* (P_{Dr}) de 1.7 veces. Esto indica que estos promotores responden de manera gradual a la limitación de O₂, lo cual permite balancear mejor los recursos del hospedero durante el cultivo que una respuesta rápida y súbita. P_{vgb} además presenta uno de los rendimientos más altos en la expresión con la limitación de O₂. P_{vgb} es una secuencia de alrededor de 100 pb bajo la

cual se controla la expresión de VHB en *Vitreoscilla stercoraria* en condiciones limitantes de O_2 (Khosla & Bailey, 1989). El P_{vgb} es completamente funcional en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas (Dikshit et al., 1990) ya que posee sitios sobre los que actúan positivamente los reguladores transcripcionales ArcA y FnrR, los cuales se activan en respuesta a bajos niveles de O_2 . Este promotor ha sido empleado para expresar proteínas recombinantes (Jiang et al., 1999) y enzimas de rutas clave para la síntesis de biopolímeros en condiciones limitantes de O_2 (Wu et al., 2014) y recientemente en la producción de ADNp que se describe enseguida.

Aplicación de P_{vgb} en la producción de ADNp

El plásmido pUC18 $P_{vgb}rnalI$, el cual contiene una copia extra de *rnalI* bajo el promotor P_{vgb} en el plásmido de alto número de copias pUC18, incrementó en 42% el $Y_{P/X}$ de ADNp de *E. coli* W3110 *recA*⁻ en cultivos microaerobios en matraz en comparación a la del plásmido pUC18. Además, la FSE fue similar para ambos plásmidos y cercana al 100%, lo cual significa que la sobreexpresión no repercutió en la calidad, a diferencia del promotor *trc* (Jaén et al., 2019^b). En cultivos

de alta densidad celular de *E. coli* W3110 *recA*⁻ en biorreactor alimentado exponencialmente con glucosa, para mantener una μ de 0.15 h^{-1} , el $Y_{P/X}$ de pUC18 $P_{vgb}rnalI$ no fue diferente al del plásmido original en la etapa aerobia del cultivo, pero con la limitación de O_2 , el $Y_{P/X}$ de pUC18 $P_{vgb}rnalI$ se incrementó gradualmente hasta duplicarse al final del cultivo. En contraste, el $Y_{P/X}$ de pUC18 solo se incrementó un 26% en un periodo corto de tiempo, y se mantuvo sin cambios hasta el final del cultivo. A nivel molecular, tanto el número de copias de plásmido (NCP) como los niveles de RNAlI con respecto a RNAl de pUC18 $P_{vgb}rnalI$ aumentaron 3.5 veces a partir de la microaerobiosis, mientras que los pUC18 solo aumentaron 1.7 veces. En cuanto a la calidad, la FSE de pUC18 $P_{vgb}rnalI$ presentó menos variabilidad que la de pUC18 durante la etapa microaerobia del cultivo, pero ambas estuvieron por arriba del 80% que se recomienda para su aplicación clínica (Jaén et al., 2019^b). Esto representa una alternativa tecnológica valiosa para la producción de ADNp tanto en pequeña escala (reactores de laboratorio, matraz agitado) como en escala industrial.

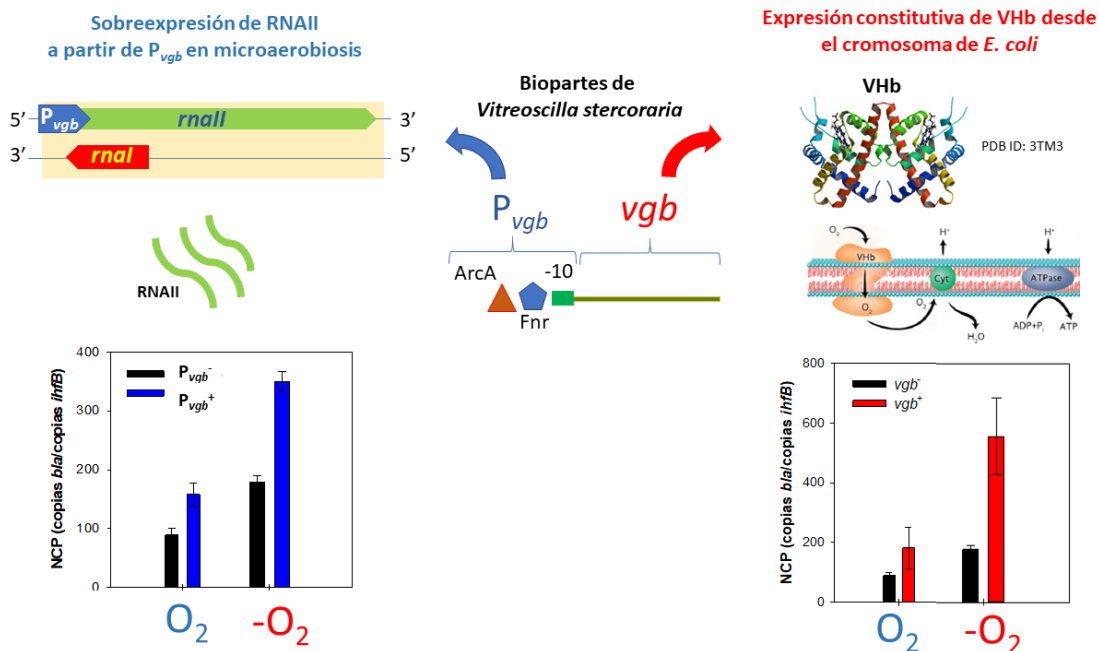


Figura 4. Estrategias biológicas para incrementar la producción de ADNp bajo limitación de O_2 . La utilización de *vgb* para expresar VHb en *E. coli*, produce efectos positivos en el metabolismo energético del hospedero celular. VHb canaliza eficientemente el O_2 disponible hacia los citocromos, estimulando de manera indirecta la actividad del CAT. Esto acrecienta la translocación de protones y la síntesis de ATP. Bajo limitación de O_2 , el NCP de las células con *vgb* fue 2.5 veces mayor al de las células sin *vgb*. Por otro lado, la utilización del promotor inducible por microaerobiosis, P_{vgb} , sobreexpresa RNAII bajo limitación de O_2 . Como resultado, el NCP de las células con P_{vgb} duplicó el NCP de las células sin P_{vgb} .

Conclusiones y Perspectivas

La robustez de la producción de ADNp bajo limitación de O_2 ha llevado al diseño y evaluación de estrategias de ingeniería celular y del vector que han mejorado la producción microaerobia de ADNp en términos cuantitativos y cualitativos, concretamente mediante el empleo de la hemoglobina heteróloga VHb y su promotor microaerobio P_{vgb} . Un análisis exhaustivo del metabolismo de los hospederos celulares que expresan

VHb es necesario para comprender los efectos observados en distintas cepas de *E. coli*. Dotar con VHb a cepas modificadas en su transporte de glucosa es una alternativa atractiva que puede simplificar la operación en los biorreactores para alcanzar altas concentraciones celulares. Evaluaciones del desempeño de las cepas más tolerantes a la limitación de O_2 en sistemas de escalamiento descendente o en biorreactores de mayor escala, podrán apuntalar su aplicación industrial. Por otro lado, la caracterización de promotores inducibles por limitación de O_2

constituye un elemento valioso para la ingeniería de bioprocesos. La información disponible puede dar pie a la creación de promotores híbridos que reúnan las características de expresión deseadas. Asimismo, la sinergia de la replicación de los plásmidos autoinducida por microaerobiosis y la capacidad biosintética de las cepas que expresan VHb representan una oportunidad para llevar la producción de ADNp al nivel que allanará la viabilidad de biofarmacéuticos que lo emplean como principio activo o en la etapa productiva de su bioproceso.

Referencias

- Armenante PM & Chang GM (1998) Power Consumption in Agitated Vessels Provided with Multiple- Disk Turbines. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37:284-291.
- Arnaldos M, Kunkel S, Wang J, Pagilla KR & Stark BC (2012) *Vitreoscilla* hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth media. *Biomass Bioenergy.* 37:1-8.
- Arsène F, Tomoyasu T & Bukau B (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 55(1-3):3-9.
- Baldi L, Hacker DL, Adam M & Wurm FM (2007) Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* 29:677-684.
- Bacharov D, Jay E & Ivanov I (1990) Construction of a ColE1 Plasmid Bearing Inducible High-Copy- Number Phenotype. *Folia Microbiol.* 35:177-182.
- Baert J, Delepierre A, Telek S, Fickers P, Toye D, Delamotte A, Lara AR, Jaén KE, Gosset G, Jensen PR & Delvigne F (2016) Microbial population heterogeneity versus bioreactor heterogeneity: evaluation of Redox Sensor Green as an exogenous metabolic biosensor. *Eng. Life Sci.* 16(7):643-651.
- Baez A, Flores N, Bolívar F & Ramírez OT (2009) Metabolic and Transcriptional Response of Recombinant *Escherichia coli* to Elevated Dissolved Carbon Dioxide Concentrations. *Biotechnol Bioeng.* 104(1):102-110.
- Baez A, Flores N, Bolívar F & Ramírez OT (2011) Simulation of dissolved CO₂ gradients in a scale-down system: A metabolic and transcriptional study of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol J.* 6:959-967.
- Baez A & Shiloach J (2013) *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese superoxide dismutase. *Microbial cell fact.* 12:23.
- Baneyx F & Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotech.* 22(11):1399-1408.
- Birch D & Ahmed N (1997) The influence of sparger design and location on gas dispersion in stirred vessels. *Trans IChemE A.* 75:487-496.

- Bollinger CJT, Bailey JE & Kallio PT (2001) Novel Hemoglobins to Enhance Microaerobic Growth Utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 17(5):798-808.
- Borja GM, Mora EM, Barron B, Gosset G, Ramirez OT & Lara AR (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb Cell Fact.* 11:132.
- Carnes AE, Luke JM, Vincent JM, Schukar A, Anderson S, Hodgson CP & Williams JA (2011) Plasmid DNA Fermentation Strain and Process-Specific Effects on Vector Yield, Quality and Transgene Expression. *Biotechnol Bioeng.* 108(2):354-363.
- Castan A, Näsman A & Enfors SO (2002) Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme Microbiol Tech.* 30:847-854.
- Chao MY, Kan M & Lin-Chao S (1995) RNAII transcribed by IPTG-induced T7 RNA polymerase is non-functional as a replication primer for ColE1-type plasmids in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 23(10):1691-1695.
- Cheng L, Sun X, Yi X & Zhang Y (2011) Large-scale plasmid preparation for transient gene expression. *Biotechnol. Lett.* 33:1559:1564.
- Cherng JY, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, Jiskoot W, Talsma H, Zuidam NJ, Hennink-Clarke KG, Williams PC, Smit MS & Harrison STL (2006) Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 28:237-242.
- Cortassa S & Aon MA (1993) Altered topoisomerase activities may be involved in the regulation of DNA supercoiling in aerobic transitions in *Escherichia coli*. *Mol. Cell Biochem.* 126:115-124.
- Cunningham DS, Koepsel RR, Ataa MM & Domach MM (2009) Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint. *Microb Cell Fact.* 8:27.
- Dikshit KL & Webster DA (1988) Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. 1988. *Gene.* 70:377-386.
- Dikshit KL, Dikshit RP & Webster DA (1990) Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* 18(14):4149-4155.
- Dikshit RP, Dikshit KL, Liu Y & Webster DA (1992) The Bacterial Hemoglobin from *Vitreoscilla* Can Support the Aerobic Growth of *Escherichia coli* Lacking Terminal Oxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 293(2):241-245.
- Dikshit K, Orii Y, Navani N, Patel S, Huang HY, Stark BC & Webster DA (1998) Site-Directed Mutagenesis of Bacterial Hemoglobin: The Role of Glutamine (E7) in Oxygen-Binding in the Distal Heme Pocket. *Arch. Biochem. Biophys.* 349(1):161-166.

- Fenge C, Klein C, Heuer C, Siegel U & Fraune E (1993) Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnology*. 11(3):233-244.
- Flores S, de Anda-Herrera R, Gosset G & Bolívar FG (2004) Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid by engineering of the Pentose-Phosphate Pathway. *Biotech. Bioeng.* 87:485-494.
- Freudenau I, Lutter P, Baier R, Schleef M, Bednarz H, Lara AR & Niehaus K (2015) ColE1-plasmid production in *Escherichia coli*: mathematical simulation and experimental validation. *Front. Bioeng. Biotech.* 127(3):1-14.
- Frey AD, Fiaux J, Skyperski T, Wütrich K, Bailey JE & Kallio PT (2001) Dissection of Central Carbon Metabolism of Hemoglobin-Expressing *Escherichia coli* by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Flux Distribution Analysis in Microaerobic Bioprocesses. *App. Environ. Microbiol.* 67:680-697.
- Galaction AI, Cascaval D, Turnea M & Folescu E. (2004) Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors 1. Simulated fermentation broths. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:263-271.
- Galaction AI, Cascaval D, Turnea M & Folescu E (2005) Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors 2. *Propionibacterium shermanii* broths. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 27:263-271.
- García-Ochoa F & Gómez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27:153-176.
- Gayle III RB, Vermersch PS & Bennett GN (1986) Construction and characterization of pBR322-derived plasmids with deletions of the RNA I region. *Gene*. 41:281-288.
- Gelves R, Dietrich A & Takors R (2014) Modeling of gas-liquid mass transfer in a stirred tank bioreactor agitated by a Rushton turbine or a new pitched blade impeller. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37(3):365-375.
- Gonçalves G, Bower D, Prazeres D, Monteiro G & Prather K (2012) Rational engineering of *Escherichia coli* strains for plasmid biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol. J.* 7(2):251-261.
- Gonçalves GAL, Oliveira PH, Gomes AG, Prather KLJ, Lewis LA, Prazeres DMF & Monteiro GA. (2014) Evidence that the insertion events of IS2 transposition are biased towards abrupt compositional shifts in target DNA and modulated by a diverse set of culture parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:6609-6619.
- Gutiérrez-Granados S, Cervera L, Kamen AA & Gòdia F (2018) Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38(6):918-940.
- Hasan CMM & Shimizu K (2008) Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene

- expressions in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact* 7:35.
- Hashim SS, Mohamed AR & Bathia S (2011) Oxygen separation from air using ceramic-base membrane technology for sustainable fuel production and power generation. *Renew. Sust. Energy Rev.* 15:1284-1293.
- Hart RA, Rinas U & Bailey JE (1990) Protein Composition of *Vitreoscilla* Hemoglobin Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265(21):12728-12733.
- Hendershot R, Lebrecht TD & EasterBrook NC (2010) Use Oxygen to Improve Combustion and Oxidation. *CEP.* 7:57-61.
- Hill BC, Hill JJ & Gennis RB (1994) Room Temperature Reaction of Carbon Monoxide and Oxygen with the Cytochrome bd Quinol Oxidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 33:15110-15115.
- Hopkins DJ, Betenbaugh MJ & Dhurjati P (1987) Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *Escherichia coli* containing plasmid pKN401. *Biotechnol. Bioeng.* 29:85-91.
- Hoffmann F & Rinas U (2001) Plasmid amplification in *Escherichia coli* after temperature upshift is impaired by induction of recombinant protein synthesis. *Biotechnol. Lett.* 23(22):1819-1825.
- Howard JAL, Delmas S, Ivancic-Bace I & Bolt EL (2011) Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. *Biochem. J.* 439:85-95.
- Jasiecki J & Wegrzyn G (2006) Transcription start sites in the promoter region of the *Escherichia coli* *pcnB* (plasmid copy number) gene coding for poly(A) polymerase I. *Plasmid.* 55:166-172.
- Jaén KE, Lara AR & Ramírez OT (2013) Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem. Eng. J.* 79:230-238.
- Jaén KE, Sigala JC, Olivares-Hernández R, Niehaus K & Lara AR (2017) Heterogeneous oxygen availability affects the titer and topology but not the fidelity of plasmid DNA produced by *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 17(1):60.
- Jaén KE, Velázquez D, Delvigne F, Sigala JC & Lara AR (2019^a) Engineering *E. coli* for improved microaerobic pDNA production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 42:1457.
- Jaén KE, Velázquez D, Sigala JC & Lara AR (2019^b) Design of a microaerobically inducible replicon for high-yield plasmid DNA production. *Biotechnol. Bioeng.* 116(10): 2514-2525.
- Jiang L, Yang Y, Chatterjee S, Seidel B, Wolf G & Yang S (1999) The expression of proUK in *Escherichia coli*: the *vgb* promoter replaces IPTG and co-expression of argU compensates for rare codons in a hypoxic induction model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(12): 2097-2101.
- Ju LK, Lee JF & Armiger WB (1991) Enhancing Oxygen Transfer in Bioreactors by Perfluorocarbon Emulsions. *Biotechnol. Prog.* 7:323-329.
- Juárez M, González-De la Rosa CH, Memún E, Sigala JC & Lara AR (2017) Aerobic

- expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnol. J.* 12(3): 1600438.
- Kallio PT, Kim DJ, Tsai PS & Bailey JE (1994) Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.* 219:201-208.
- Kallio PT & Bailey JE (1996^a) Intracellular Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Enhances Total Protein Secretion and Improves the Production of α -Amylase and Neutral Protease in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 12:31-39.
- Kallio PT, Tsai PS & Bailey JE (1996^b) Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Is Superior to Horse Heart Myoglobin or Yeast Flavohemoglobin Expression for Enhancing *Escherichia coli* Growth in a Microaerobic Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 12:751-757.
- Khosla C & Bailey JE (1988^a) The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: Molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214:158-161.
- Khosla C & Bailey JE (1988^b) Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature.* 331:633-635.
- Khosla C & Bailey JE (1989) Characterization of the Oxygen-Dependent Promoter of the *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171(11):5995-6004.
- Khosla C, Curtis JE, DeModena J, Rinas U & Bailey JE (1990) Expression of Intracellular Hemoglobin Improves Protein Synthesis in Oxygen-Limited *Escherichia coli*. *Biotechnology.* 8.
- Knoll A, Maier B, Tscherrig H & Büchs J (2005) The Oxygen Mass Transfer, Carbon Dioxide Inhibition, Heat Removal, and the Energy and Cost Efficiencies of High-Pressure Fermentation. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 92:77-99.
- Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J & Büchs J. (2007) High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J. Biotechnol.* 132:167-179.
- Kumaresan T & Joshi JB (2006) Effect of impeller design on the flow pattern and mixing in stirred tanks. *Chem. Eng. J.* 115:173-193.
- Kutzler MA & Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 9(10):776-788.
- Lara AR, Galindo E, Ramírez OT & Palomares L (2006^a) Living with Heterogeneities in Bioreactors-Understanding the Effects of Environmental Gradients on Cells. *Mol. Biotechnol.* 34:355-379.
- Lara AR, Leal L, Flores N, Gosset G, Bolívar F & Ramírez OT (2006^b) Transcriptional and Metabolic Response of Recombinant *Escherichia coli* to Spatial Dissolved Oxygen Tension Gradients Simulated in a

- Scale-Down System. *Biotechnol. Bioeng.* 93(2):372-385.
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolivar F, López-Munguía A & Ramírez OT (2006^c) Engineering *Escherichia coli* to Improve Culture Performance and Reduce Formation of By Products During Recombinant Protein Production Under Transient Intermittent Anaerobic Conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 94(6): 1164-1175.
- Lara AR, Taymaz-Nikerel H, Mashego MR, Gulik WM, Heijnen JJ, Ramírez OT & Winden WA (2009) Fast Dynamic Response of the Fermentative Metabolism of *Escherichia coli* to Aerobic and Anaerobic Glucose Pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 104(6):1153-1161.
- Lara AR, Knabben I, Regestein L, Sassi J, Caspeta L, Ramírez OT & Büchs J (2011) Comparison of oxygen enriched air vs. pressure cultivation to increase oxygen transfer and to scale-up plasmid DNA production fermentations. *Eng. Life. Sci.* 11(4):382-386.
- Lara AR, Jaén KE, Sigala JC, Mühlmann M, Regestein L & Büchs J (2017^a) Characterization of Endogenous and Reduced Promoters for Oxygen-Limited Processes Using *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol.* 6:344-356.
- Lara AR, Jaén KE, Sigala JC, Regestein L & Büchs J (2017^b) Evaluation of microbial globin promoters for oxygen-limited processes using *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* 11:39.
- Lara AR, Jaén KE, Folarin O, Keshavarz-Moore E & Büchs J (2019^a) Effect of the oxygen transfer rate on oxygen-limited production of plasmid DNA by *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* 150:107303.
- Lara AR, Velázquez D, Penella I, Islas F, González-De la Rosa CH & Sigala JC (2019^b) Design of a synthetic miniR1 plasmid and its production by engineered *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 42(8):1391-1397.
- Latterman C & Büchs J (2015) Microscale and miniscale fermentation and screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 35:1-6.
- Morita M & Oka A (1979) The structure of a transcriptional unit of colicin E1 plasmid. *Eur. J. Biochem.* 97:435-443.
- Lee J. (2017) Development of a model to determine mass transfer coefficient and oxygen solubility in bioreactors. *Heliyon.* 3. E00248.
- Ma R & Lin X. (2014) *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) improves lutein production in *Chlorella vulgaris*. *J. Ocean. Limnol.* 32:390-396.
- Merchuk JC, Contreras A, García F & Molina E (1998) Studies of mixing in a concentric tube airlift bioreactor with different spargers. *Chem. Eng. Sci.* 53(4):709-719.
- Moucha T, Linek V, Erokhin K, Rejl JF & Fijasová M (2009) Improved power and mass transfer correlations for design and scale-up of multi-impeller gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* 64:598-604.
- Namdev PK, Irwin N, Thompson BG & Gray MR (1993) Effect of oxygen fluctuations on

- recombinant *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 41:666-670.
- Neubauer P, Wrobel B & Wegrzyn G. (1996) DNA degradation at elevated temperatures after plasmid amplification in amino acid-starved *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Lett.* 18(3):321-326.
- Nienow A & Lilly MD (1979) Power Drawn by Multiple Impellers in Sparged Agitated Vessels. *Biotech. Bioeng.* 21(12):2341-2345.
- Oh SKW, Nienow AW, Al-Rubeai M & Emery AN (1992) Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *Biotechnol. J.* 22(3):245-270.
- Ongkudon CM, Pickering R, Webster D & Danquah MK (2011) Cultivation of *E. coli* carrying a plasmid-based Measles vaccine construct (4.2 kbp pcDNA3F) employing medium optimization and pH-temperature induction techniques. *Microb. Cell Fact.* 10:16.
- Orii Y & Webster DA (1986) Photodissociation of Oxygenated Cytochrome o(s) (*Vitreoscilla*) and Kinetic Studies of Reassociation*. *J. Biol. Chem.* 261(8):3544-3547.
- Passarinha LA, Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA, Fonseca LP & Prazeres DMF (2006) Production of ColE1 type plasmid by *Escherichia coli* DH5 α cultured under nonselective conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:20-24.
- Pablos TE, Meza-Mora E, Le Borgne S, Ramírez OT, Gosset G & Lara AR (2011) *Vitreoscilla* hemoglobin expression in engineered *Escherichia coli*: Improved performance in high cell-density batch cultivations. *Biotechnol. J.* 6:993-1002.
- Pablos TE, Sigala JC, Le Borgne S & Lara AR (2014) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* 9:1-9.
- Park KW, Kim KJ, Howard AJ, Stark BC & Webster DA (2002) *Vitreoscilla* Hemoglobin Binds to Subunit I of Cytochrome bo Ubiquinol Oxidases. *J. Biol. Chem.* 277(36):33334-33337.
- Pendse GJ & Bailey JE (1994) Effect of *Vitreoscilla* Hemoglobin Expression on Growth and Specific Tissue Plasminogen Activator Productivity in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotech. Biotechnol.* 44:1367-1370.
- Phue JN & Shiloach J (2005) Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metab. Eng.* 7:353-363.
- Pilarek M, Brand E, Hillig F, Krause M & Neubauer P (2013) Enhanced plasmid production in miniaturized high-cell-density cultures of *Escherichia coli* supported with perfluorinated oxygen carrier. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:1079-1086.
- Pilarek M, Glazyrina J & Neubauer P (2011) Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in

- miniaturized fed-batch cultures. *Microb. Cell Fact.* 10:50.
- Ramandeep, Hwang KW, Raje M, Kim KJ, Stark BC, Dikshit KL & Webster DA (2001) *Vitreoscilla* Hemoglobin. Intracellular Localization and Binding to Membranes. *J. Biol. Chem.* 276(27):24781-24789.
- Ramírez EA, Velázquez D & Lara AR (2016) Enhanced plasmid DNA production by enzyme-controlled glucose release and an engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 38:651-657.
- Reinikainen P, Korpela K, Nissinen V, Olkku J, Söderlund H & Markkanen P (1989) *Escherichia coli* plasmid production in fermenter. *Biotechnol. Bioeng.* 33(4):386-393.
- Rischbieter E & Schumpe A (1996) Gas Solubilities in Aqueous Solutions of Organic Substances. *J. Chem Eng. Data.* 41(4):809-812.
- Riethdorf S, Schroeter A & Hecker M (1989). RelA mutation and pBR322 plasmid amplification in amino acid-starved cells of *Escherichia coli*. *Genet. Res.* 54(3):167-171.
- Rinas U & Bailey JE (1993) Overexpression of Bacterial Hemoglobin Causes Incorporation of Pre- β -Lactamase into Cytoplasmic Inclusion Bodies. *App. Environ. Microbiol.* 59(2):561-566.
- Ryan W & Parulekar SJ (1990) Effects of Culture Conditions on Plasmid Stability and Production of a Plasmid-encoded Protein in Batch and Continuous Cultures of *Escherichia coli* JM103[pUC18]. *Ann Ny Acad Sci.* 589(1):91-110.
- Sarkar P, Ghosh K & Suraishkumar GK (2008) High hydrogen peroxide concentration in the feed-zone affects bioreactor cell productivity with liquid phase oxygen supply strategy. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31:357-367.
- Shang L, Tian PY, Kim NJ, Chang HN & Hahm MS (2009) Effects of Oxygen Supply Modes on the Production of Human Growth Hormone in Different Scale Bioreactors. *Chem. Eng. Technol.* 32(4):600-605.
- Silva F, Lourenço O, Maia C, Queiroz JA & Domingues FC (2011) Impact of plasmid induction strategy on overall plasmid DNA yield and *E. coli* physiology using flow cytometry and real-time PCR. *Process Biochem.* 46(1):174-181.
- Silva F, Queiroz JA & Domingues FC (2012) Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* 30(3):691-708.
- Sonnleitner B & Hahnemann U (1997) Robust oxygen supply by controlled addition of hydrogen peroxide to microbial cultures. *Bioproc. Eng.* 17:215-219.
- Sorensen KI & Hove-Jensen B (1996) Ribose Catabolism of *Escherichia coli*: Characterization of the *rpIB* Gene Encoding Ribose Phosphate Isomerase B and of the *rpIR* Gene, which is involved in Regulation of *rpIB* Expression. *J. Bacteriol.* 178(4): 1003-1011.

- Sprenger GA (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* 164:324-330.
- Stark BC, Pagilla KR & Dikshit KL (2015) Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(4):1627-1636.
- Takors R. (2012) Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. *J. Biotechnol.* 160:3-9.
- Trent JT III, Watts RA & Hargrove MS (2001) Human Neuroglobin, a Hexacoordinate Hemoglobin That Reversibly Binds Oxygen. *J. Biol. Chem.* 276(32):30106-30110.
- Tsai PS, Nägeli M & Bailey JE (2002) Intracellular Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Modifies *Escherichia coli* Metabolism Through Elevated Concentration and Specific Activity of Cytochrome *o*. *Biotechnol. Bioeng.* 79(5):558-567.
- Togna AP, Shuler M & Wilson DB (1993) Effects of Plasmid Copy Number and Runaway Plasmid Replication Overproduction and Excretion of β -Lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 9: 31-39.
- Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT & Trujillo-Roldán MA (2010) Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb. Cell Fact.* 9:18.
- Van der Heijden I, Gomez-Eerland R, van den Berg JH, Oosterhuis K, Schumacher TN, Haanen JBAG, Beijnen JH & Nuijen B (2013) Transposon leads to contamination of clinical pDNA vaccine. *Vaccine.* 31, 3724-3280
- Vrábel P, Lans RGJM, Luyben KChAM, Boon L & Nienow AW (2000) Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modeling and measurements. *Chem. Eng. Sci.* 55: 5881-5896.
- Vogelaar JCT, Klapwijk A, Lier JB & Rulkens WH (1999) Temperature Effects on The Oxygen Transfer Rate Between 20 and 55 °C. *Wat. Res.* 34(3):1037-1041.
- Wang Z, Xiang Li, Shao J, Wegrzyn A & Wegrzyn G (2006) Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism. *Microb. Cell Fact.* 5:34.
- Wang Z, Xiang L, Shao J & Wegrzyn G (2007) Adenosine monophosphate-induced amplification of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli*. *Plasmid.* 57(3):265-274.
- Wang, S., Liu, F., Hou, Z., Zong G & Zhu X. (2014) Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla hemoglobin* gene (*vgb*). *World J Microbiol. Biotechnol.* 30: 1369.
- Xie L, Metallo C, Warren J, Pilbrough W, Peltier J, Zhong T, Pikus L, Yancy A, Leung J, Aunins JG & Zhou W (2003) Large-scale

- propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred tank bioreactor PER.C6TM cell culture under sparging conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 83(1):45-52.
- Ye W, Liu M, Ma Y, Yang J, Wang H, Wang X, Wang J & Wang J (2012) Improvement of *Vitreoscilla* hemoglobin function by *Bacillus licheformis* glutamate-specific endopeptidase treatment. *Protein Expr. Purif.* 86(1):21-26.
- Yau SY, Keshavarz-Moore E & Ward J (2008) Host Strain Influences on Supercoiled Plasmid DNA Production in *Escherichia coli*: Implications for Efficient Design of Large-Scale Processes. *Biotechnol. Bioeng.* 101(3):529-544.
- Wei XX & Chen GQ (2008) Applications of the VHb gene *vgb* for improved microbial fermentation processes. *Methods. Enzymol.* 436:273-287.
- Wittmann C, Weber J, Betiku E, Krömer J, Böhm D & Rinas U (2007) Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 132(4):375-384.
- Wu H, Wang H, Chen J & Chen GQ (2014) Effects of cascaded *vgb* promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(24):10013-10021.
- Zhang Q, Xie H, He Y, Feng J, Gao W, Gu Y, Wang S & Song C (2013) Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances g- PGA production in *Bacillus amyloquefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 343(2):127-134.