

## **PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL MENCIÓN HONORIFICA MAESTRIA**

### **INGENIERÍA CELULAR COMO UNA ALTERNATIVA AL CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Daniela Velazquez<sup>1\*</sup>, Guillermo Gosset<sup>2</sup>, Alvaro R. Lara<sup>3</sup>,

*<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Av. Vasco de Quiroga 4871, Santa Fe Cuajimalpa, 05348 Ciudad de México, CDMX*

*<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos*

*<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología. Av. Vasco de Quiroga 4871, Santa Fe Cuajimalpa, 05348 Ciudad de México, CDMX*

*daniela369.velaz@hotmail.com*

#### **RESUMEN**

Los avances en la ingeniería metabólica y celular han resultado en un amplio desarrollo de fábricas celulares con la capacidad de producir diversas moléculas de interés comercial. *Escherichia coli* es una de las fábricas celulares más importantes de la industria. La producción industrial de metabolitos de interés se realiza en cultivos de alta densidad celular, pues éstos maximizan los rendimientos de biomasa y producto. Una limitación de estos cultivos es la alta concentración de sustrato requerida principalmente en los cultivos por lote, la cual lleva a una alta tasa de consumo, generando un sobreflujo metabólico, el cual se refiere a la conversión de carbono en metabolitos indeseables debido a una saturación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Para evitar este fenómeno se han seguido diversas estrategias que van desde la alimentación controlada (cultivo en lote alimentado) hasta la ingeniería metabólica y celular. Los cultivos por lote alimentado son utilizados ampliamente, sin embargo, estos presentan ciertas desventajas. El presente trabajo se enfocará en el uso de

ingeniería celular para alcanzar altas densidades celulares en cultivos por lote evitando el sobreflujo metabólico, como una alternativa a los cultivos por lote alimentado, con énfasis la modificación de genes relacionados con el transporte de glucosa en *E. coli*.

**Palabras clave:** cultivos de alta densidad celular, sobreflujo metabólico, *E. coli*, PTS

## ABSTRACT

Advances in metabolic and cellular engineering have resulted in extensive development of cellular factories with the ability to produce metabolites of commercial interest. *E. coli* is one of the most important bacterial cell factories in the industry. The industrial production of metabolites of interest is carried out in high cell density cultures, as these maximize the yields of biomass and product. A limitation of these cultures is the high concentration of substrate required, which carries a high consumption rate, generating a metabolic overflow (conversion of carbon into undesirable metabolites due to saturation in the tricarboxylic acid cycle). To avoid this phenomenon, various strategies have been followed, ranging from controlled feeding (fed batch culture) to genetic, metabolic and cellular engineering. Fed batch cultures are widely used; however, these have certain disadvantages. The present work will focus on the use of cellular engineering to achieve high cell densities in batch mode cultures avoiding metabolic overflow, as an alternative to fed batch cultures, with emphasis on the modification of genes related with the glucose transport in *E. coli*.

**Key words:** high density cell culture, overflow metabolism, *E. coli*, PTS

## INTRODUCCIÓN

### *Fábricas celulares*

Los avances en la ingeniería metabólica y celular han permitido el desarrollo de fábricas celulares capaces de transformar materias primas en biocombustibles, químicos, ingredientes alimenticios y productos farmacéuticos. Algunos de los organismos más utilizados como fábricas celulares incluyen a *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* (Keasling, 2010), así como las líneas celulares 3T3, HeLa, BHK, HepG2, HEK y CHO (Jayapal et al., 2007), siendo las

dos últimas las más utilizadas (Rue et al., 2019). Otros organismos utilizados para la producción de proteínas recombinantes incluyen a hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus awamori*; células de insectos como *Autographa californica* y *Spodoptera frugiperda*; así como animales y plantas transgénicas (Demain y Vaishnav, 2009).

A pesar que *E. coli* típicamente no es utilizada para la producción de proteínas complejas o proteínas que requieran modificaciones postraduccionales, sigue siendo la fábrica celular más empleada a nivel académico e

# Artículos

industrial, debido a que existe un gran conocimiento acumulado sobre su genoma, metabolismo y fisiología, aunado a su rápido crecimiento en medios simples y con altos niveles de producción de proteína recombinante (Demain y Vaishnav, 2009). En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de biomoléculas de interés industrial producidas

en *E. coli*. La insulina humana producida en *E. coli* por Genentech fue la primera proteína recombinante aprobada para su uso en humanos (Lara, 2011), aunque actualmente las células CHO constituyen el sistema preferencial para la producción de proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales (Demain y Vaishnav, 2009).

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

Cepa de <i>E. coli</i>	Producto	Referencia/ compañía
<i>Interés alimenticio, cosmetológico y químico</i>		
BT03	Trealosa sintasa	Chen et al., 2012
XH001	L-treonina	Yang et al., 2011
BL21(DE3)	Ácido glutacónico	Djordjevic et al., 2010
NZN111; SBS110MG	Ácido succínico	Vemuri et al., 2002; Sánchez et al., 2005
FBR11 (B)	Ácido láctico	Dien et al., 2001
ALS848	ácido 3-hidroxipropanoico	Suthers y Cameron, 2005; Selifonova et al., 2002
<i>Biocombustibles, biopolímeros y productos de bajo valor agregado</i>		
JLX7	Ácido poliláctico (PLA) y P(3HB-co-LA)	Jung et al., 2010; Jung et al., 2011
BW25113	Butanol	Atsumi et al., 2008
DH10B	Isopentanol	Withers et al., 2007
KO11	Etanol	Underwood et al., 2002
<i>Biofármacos aprobados</i>		
	Admelog (inyección de insulina)	Sanofi (Bridgewater, NJ, USA), 2017
	Accretropin (somatropina)	Emergent Biosolutions (Rockville, MD, USA) Cangene (Winnipeg, MB, Canada), 2008
	Natpar (hormona paratiroidea)	Shire Pharmaceuticals Ireland (Dublin), 2017
	Infergen (interferon alfacon-1)	Kadmon Pharmaceuticals (Warrendale, PA, USA), 1997
	Trumenba (vacuna meningocócica del grupo B)	Pfizer (Philadelphia), 2014

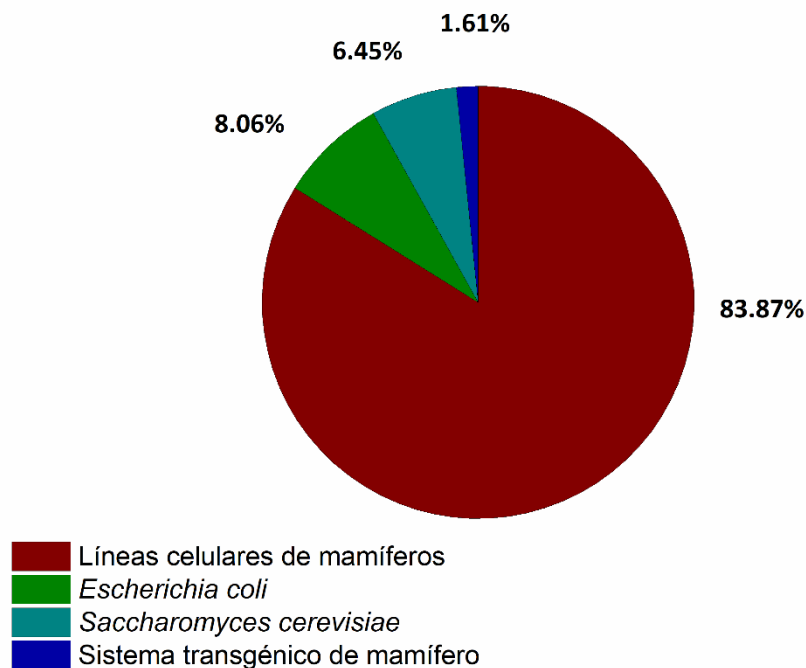
Dentro de la gran variedad de productos biotecnológicos, los biofármacos tienen una gran relevancia debido a su importancia en el

sector de salud humana, además de su impacto económico. En los últimos años se ha observado un incremento continuo en el valor

de mercado de los biofármacos. Reportes financieros de La Merie indican que las ventas acumuladas durante el 2014 y el 2017 alcanzaron los 651 billones de dólares (<http://www.lamerie.com>).

Durante el periodo de enero de 2014 y julio de 2018, se aprobaron 155 biofármacos en Estados Unidos y la Unión Europea. De estos, el 52% fueron nuevos ante el mercado, mientras que el resto se trata de biosimilares,

productos reformulados o con indicaciones diferentes y productos previamente aprobados en otros lugares. Dentro de los productos nuevos se cuenta con 71 ingredientes activos diferentes, de los cuales 62 son proteínas recombinantes. 52 de estas proteínas recombinantes son expresadas en líneas celulares de mamíferos, 1 se expresa en un sistema transgénico de mamífero, 5 se producen en *E. coli* y 4 en *S. cerevisiae* (Fig. 1) (Walsh, 2018).



**Figura 1.** Número de proteínas recombinantes aprobadas en diferentes organismos (con datos de Walsh, 2018).

### *Cultivos de alta densidad celular*

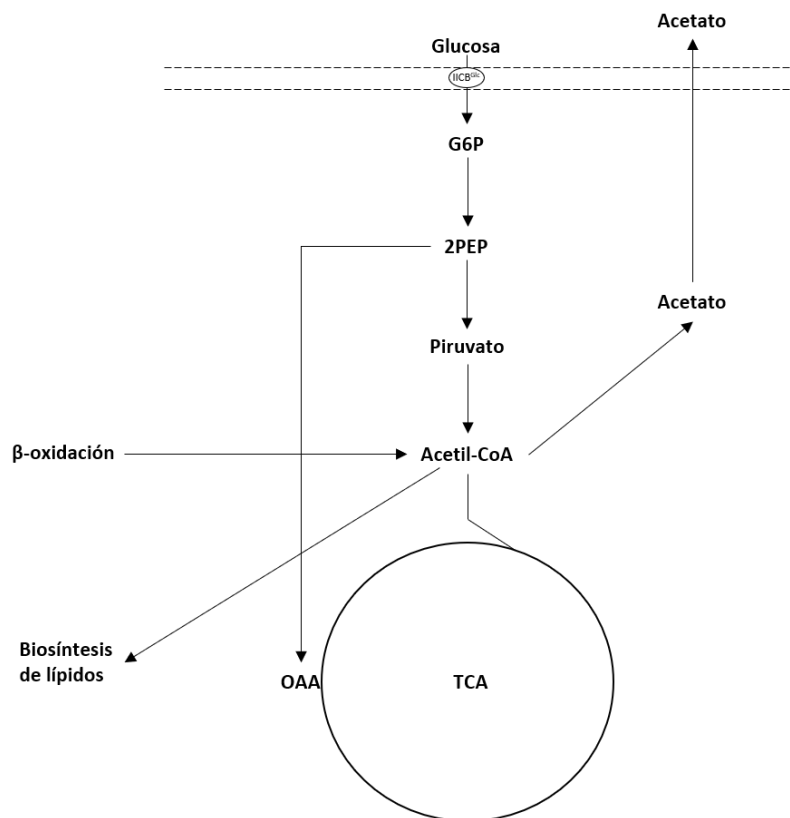
Los cultivos de alta densidad celular se utilizan a nivel industrial ya se consideran de las mejores estrategias de cultivo para reducir costos al maximizar los rendimientos de

biomasa y las productividades de metabolitos o de proteína recombinante (Blunt et al., 2019), además de ser económicamente viables para su introducción en el mercado (Lara y Ramírez, 2012) y reducir el volumen de cultivo, facilitar la purificación y reducir el

consumo de agua (Lee, 1996). Se consideran cultivos de alta densidad celular cuando se alcanzan concentraciones de biomasa de 40 g L<sup>-1</sup> o más (Borja et al., 2014). Sin embargo, este tipo de cultivos tiene desventajas tales como la inhibición por sustrato, transferencia de oxígeno limitada, formación de productos inhibitorios del crecimiento y disipación de calor limitada (Lee, 1996).

Para lograr una alta densidad celular se requieren grandes concentraciones de sustrato (generalmente glucosa). Sin embargo, para *E. coli* no suele utilizarse una

concentración que exceda los 20 g L<sup>-1</sup> pues al utilizar más que esto, el consumo de sustrato se da a una alta velocidad, generando un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarbónicos, lo cual lleva a la producción de acetato; a este fenómeno se le conoce como sobreflujo metabólico (Eiteman y Altman, 2006). Se estima que la acumulación de acetato puede llegar a ser hasta el 15% (en masa) de la glucosa suministrada (Wolfe, 2005). En la figura 2 se muestran las rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato de *E. coli*.

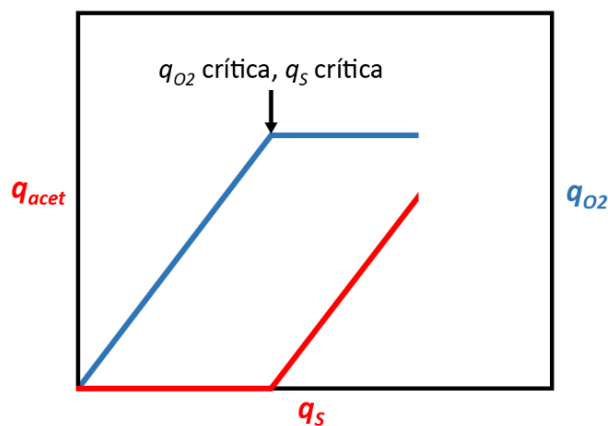


**Figura 2.** Rutas metabólicas involucradas en la producción de acetato en *E. coli* y su relevancia con el resto del metabolismo. En la glicólisis, por cada mol de glucosa se generan dos de fosfoenolpiruvato (PEP). Uno de estos es utilizado por el PTS para la fosforilación y el transporte de

la glucosa mediante la permeasa IICB<sup>Glc</sup>. A partir del catabolismo de ácidos grasos se produce acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para la producción de acetato.

Bajo condiciones aerobias y sin limitación de oxígeno, *E. coli* presenta una alta tasa de consumo específico de sustrato ( $q_s$ ) así como una alta tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) y, sin importar la disponibilidad de oxígeno, la bacteria tiene una tasa de consumo de oxígeno límite (Varma y Palsson, 1994), la

cual corresponde a la tasa de crecimiento específico y tasa de consumo específico de sustrato críticas en donde comienza la acumulación de acetato ( $\mu_{crit}$  y  $q_{scrit}$ , respectivamente) debido al sobreflujo metabólico (Fig. 3).



**Figura 3.** La tasa de producción específica de acetato ( $q_{acet}$ ) en *E. coli* incrementa cuando la bacteria presenta una tasa de consumo específico de sustrato por arriba de un valor determinado ( $q_{Scrit}$ ). La  $q_{Scrit}$  también corresponde a la tasa de consumo de oxígeno límite  $q_{O_2crit}$ . Adaptado de Eiteman y Altman, 2006.

El sobreflujo metabólico ocurre debido a que la tasa de síntesis de acetil coenzima A (AcCoA) sobrepasa la capacidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) para consumir el metabolito. Debido a esto, la cantidad de AcCoA no consumida por el TCA es llevada a la ruta de fosfotranscetilasa (Pta)-acetato cinasa (Ack) en donde se sintetiza acetato (Delgado y Liao, 1997). Se ha propuesto que la acumulación de acetato ocurre por la represión catabólica de la expresión AcCoA

sintetasa bajo condiciones de altas tasas de importe de glucosa (Valgepea et al., 2010).

El sobreflujo metabólico se presenta en una variedad de bacterias, levaduras y células mamíferas (Paczia et al., 2012). En levaduras, al sobreflujo metabólico se le denomina efecto Crabtree y este se define como la represión de la respiración, bajo condiciones aerobias, inducida por la presencia de azúcares como fuente de carbono (Samper, 2019). Similar al sobreflujo metabólico en *E. coli*, el efecto

Crabtree representa una desviación de carbono a la producción de etanol al utilizar concentraciones altas de sustrato (Childers et al., 2016). Se ha discutido que este fenómeno es parte de una estrategia de supervivencia de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* para competir con otros microorganismos en el consumo rápido de sustrato (Rozpędowska et al., 2011).

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

A pesar de que el sobreflujo metabólico se encuentra descrito, no se cuenta con una explicación clara de su regulación. Enjalbert y colaboradores (2017) realizaron un análisis dinámico del flujo metabólico- $^{13}\text{C}$ , el cual reveló un intercambio bidireccional de acetato entre *E. coli* y su ambiente, donde la ruta Pta-AckA es central para ambas direcciones de flujo. La modelación cinética de esta ruta predijo que su flujo se encuentra controlado de manera termodinámica por la concentración

de acetato extracelular *in vivo*. A partir de una validación experimental se confirmó que es posible reducir, e incluso revertir, la producción de acetato dependiendo de su concentración extracelular.

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

Zhuang y colaboradores (2011) modificaron el modelo metabólico a escala genómica de *E. coli* ya existente (Feist et al, 2007) para incluir una restricción de la membrana citoplasmática, basada en la hipótesis de que existe una competencia en el espacio membranal entre transportadores de glucosa y proteínas relacionadas con la cadena respiratoria. En este estudio reveló una

utilización diferencial de los citocromos y un consumo de glucosa mayor bajo condiciones anaerobias comparado con condiciones aerobias. A partir de las simulaciones realizadas, propusieron que las bacterias modifican la composición de su membrana citoplasmática de tal forma que se mantenga una producción de ATP óptima mediante el cambio entre la fosforilación oxidativa y el nivel de sustrato.

Szenk y colaboradores (2017) propusieron la hipótesis del estado real de la membrana, la cual sugiere que el sobreflujo metabólico en *E. coli* se debe a que el crecimiento rápido hace que las células sean más grandes, reduciendo la relación de superficie/volumen. Esto provoca una disminución del área de membrana disponible para las proteínas respiratorias a pesar de la demanda de oxígeno. Esta limitación requiere que se produzca ATP mediante la producción de acetato, ya que de esta forma se produce más ATP por unidad de área de membrana. Este estudio demuestra que el comportamiento celular se encuentra limitado por los tamaños y formas de las proteínas de la célula.

Un estudio realizado por Molenaar y colaboradores (2009) sugirió que el sobreflujo metabólico es el resultado de una asignación global de recursos celulares, en donde se consideran tanto las eficiencias enzimáticas, como el rendimiento global de las rutas metabólicas para obtener un crecimiento óptimo sujeto a diferentes condiciones. Esto

da noción a que el proceso fermentativo puede ser más eficiente en términos del proteoma, que la respiración. Basan y colaboradores (2015) propusieron y validaron que el costo proteómico de la generación de energía por respiración supera el de la fermentación, lo cual lleva a la producción de acetato bajo condiciones de alto crecimiento. Esta teoría fue incorporada al análisis de balances de flujo, obteniendo un modelo capaz de predecir de manera cuantitativa el inicio y el alcance del sobreflujo metabólico en varias cepas de *E. coli* (Zeng y Yang, 2019).

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

Como ya se mencionó, la transferencia de oxígeno suele ser una limitante en los cultivos



de alta densidad celular debido a la baja solubilidad de este, así como las restricciones operacionales del sistema. La concentración de saturación del oxígeno disuelto en agua bajo condiciones estándar (25°C, 1 atm) es de aproximadamente 7.54 mg L<sup>-1</sup> (Carpenter, 1966), sin embargo, el suministro de oxígeno se puede aumentar mediante el incremento en la velocidad de agitación y/o la tasa de aireación, el enriquecimiento del aire con oxígeno, o bien, el suministro de oxígeno puro (Lee, 1996). Otra estrategia que se ha implementado de manera exitosa es el uso de reactores presurizados, pues estos permiten incrementar la tasa de transferencia de oxígeno máxima (Knoll et al., 2005; Matsui et al., 2006; Knoll et al., 2007).

La alta densidad celular es difícil de alcanzar en cultivos por lote, pues la alta concentración de glucosa requerida resultaría en una  $q_{crit}$ , lo que llevaría a la acumulación de acetato (Lara et al., 2008). Una estrategia para realizar cultivos de alta densidad celular y evitar el sobreflujo metabólico es la operación en por lote alimentado. En este modo de operación el sobreflujo metabólico se puede prevenir mediante el control de la  $\mu$ , ya que esta se puede disminuir al limitar nutrientes esenciales tales como la fuente de carbono o de nitrógeno (Riesenberg et al., 1991).

Los cultivos por lote alimentado consisten en una fase lote de corta duración y posteriormente una fase de alimentación de sustrato o medio completo. En estos cultivos,

la tasa de alimentación determina tanto la  $\mu$  como la  $q_s$ ; esta tasa puede ser constante o con un incremento ya sea lineal o exponencial de tal forma que se evite el sobreflujo metabólico. En la alimentación exponencial, la tasa de alimentación incrementa en proporción al crecimiento celular, de tal forma que se mantenga a una  $\mu$  determinada y que la concentración de sustrato en el medio sea igual a cero (Korz et al., 1995). Esta tasa de alimentación se puede determinar mediante la siguiente ecuación (Ec. 1) (Jaén et al., 2013):

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

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

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

Generalmente los cultivos por lote alimentado se realizan en reactores instrumentados, sin embargo, se han desarrollado estrategias que permiten simular un lote alimentado en matraces agitados y en placas multipozo. La empresa BioSilta (Universidad de Oulu, Oulu) desarrolló un medio en el cual la glucosa se libera de manera controlada mediante la adición de la enzima glucoamilasa (Panula-Perälä et al., 2008). Con este medio se han alcanzado concentraciones celulares de hasta 15 g L<sup>-1</sup>, y se han obtenido mayores rendimientos de proteínas recombinantes y ADN plasmídico (ADNp) comparado con otros medios comúnmente utilizados (Krause et al., 2010; Ramírez et al., 2016; Galindo et al., 2016; Chrast et al., 2018).

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

sustrato entre 1.5 y 2.1 veces comparados con los cultivos por lote.

## *Ingeniería metabólica para reducir el sobreflujo metabólico en E. coli*

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

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

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

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

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

mayor flujo de carbono a la formación de CO<sub>2</sub>, comparada con la cepa parental MG1655.

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

La acetilación de proteínas en residuos de lisina es un fenómeno ampliamente observado, sin embargo, su entendimiento es escaso. Esta modificación proteica se ha

relacionado principalmente a la regulación transcriptómica. Las enzimas involucradas en la acetilación y desacetilación de proteínas ya se han descrito en una amplia variedad de bacterias (Castaño-Cerezo et al., 2014). Varios estudios de proteómica han revelado que la acetilación es abundante en *E. coli* (Zhang, et al., 2009). CobB fue la primera desacetilasa bacteriana descrita y es la única conocida en *E. coli* (Castaño-Cerezo, et al., 2014), esta es capaz de desacetilar residuos de acetil-lisina utilizando NAD<sup>+</sup> como sustrato (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

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

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

El PTS se compone de una proteína soluble y no azúcar-específica enzima I (EI) y de la proteína acarreadora de fosfohistidina (Hpr). Esta última mueve el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) a las enzimas IIA y IIB. También se encuentran otros componentes como el IIC y IID que constituyen permeasas que transportan moléculas de azúcar, las cuales son fosforiladas por el componente IIB (Fuentes et al., 2013).

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

Otra forma de modificar el PTS es mediante la regulación del gen *ptsG*, el cual codifica para la enzima específica para glucosa IIA<sup>Glc</sup>. El regulador ArcA se une al promotor de *ptsG*, la delección de *arcA* incrementó alrededor de dos veces la expresión del gen *ptsG*. Por otro lado, la sobreexpresión de *arcA* disminuyó el consumo de glucosa, lo cual llevó a una disminución en la acumulación de acetato (Jeong et al., 2004).

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

Como ya se mencionó, el sobreflujo metabólico no está únicamente relacionado con la  $q_s$ , pues también interviene la capacidad de la célula para oxidar completamente la glucosa en CO<sub>2</sub> (Perrenoud y Sauer, 2005), lo cual se ve reflejado en la tasa de consumo específico de oxígeno ( $q_{O_2}$ ). La hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) expresada en *E. coli*, es una proteína transmembranal que captura el oxígeno y lo transfiere a oxidasas terminales (Hwang et al., 2001).

La característica principal de esta hemoglobina es que, a pesar de que su

constante de asociación de O<sub>2</sub> es similar a la de otras hemoglobinas, su constante de disociación es considerablemente más alta (Wei y Chen, 2008) lo que indica que VHb es capaz de entregar de manera eficiente el O<sub>2</sub> a los citocromos, mejorando la respiración aerobia, lo que provocará una regeneración de NAD<sup>+</sup> más rápida, activando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y disminuyendo la producción de acetato (Pablos et al., 2014).

### *Modificación del transporte de glucosa como estrategia para reducir el sobreflujo metabólico en E. coli*

La glucosa es el sustrato más utilizado en la industria para cultivos de *E. coli* ya que es la fuente de carbono preferida por esta bacteria. Una vez dentro del periplasma, la glucosa puede ser internalizada en el citoplasma mediante el PTS. La glucosa es importada mediante el complejo enzimático de glucosa II (II<sup>Glc</sup>), el cual incluye la enzima IIA<sup>Glc</sup> y la permeasa IICB<sup>Glc</sup> (Misset, et al., 1983). Se ha reportado que el complejo de manosa (II<sup>Man</sup>) también es capaz de transportar glucosa. Este complejo está compuesto por la enzima IIAB<sup>Man</sup> y por la permeasa IICD<sup>Man</sup> (Curtis y Epstein, 1975).

Chou y colaboradores (1994) demostraron que una cepa mutante de *E. coli* con el complejo PTS de glucosa (*ptsG*) inactivo es capaz de crecer en glucosa con una tasa correspondiente al 80% de lo observado en una cepa silvestre. Esta estrategia permitió

disminuir el flujo glicolítico, lo que llevó a una menor acumulación de acetil-CoA. Por otro lado, Han y colaboradores (2004) encontraron un incremento en la producción de biomasa y de proteína recombinante como resultado de la eliminación de *ptsG*, ya que al reducir el flujo glicolítico se redujo la acumulación de acetato, evitando el desperdicio de carbono.

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

SgrS es un ARN pequeño de *E. coli* que regula la expresión del transportador de glucosa IICB<sup>Glc</sup>, por lo que también regula el consumo de glucosa. Negrete y colaboradores (2010) estudiaron el efecto de altas concentraciones de glucosa (40 g L<sup>-1</sup>) en los niveles de transcripción del SgrS y del ARN mensajero *ptsG* en las cepas de *E. coli* MG1655, JM109

y BL21. En este estudio encontraron que la transcripción de *sgrS* se regula diferente en BL21 que en las cepas derivadas de K-12 (MG1655 y JM109). En las cepas derivadas de K-12, la transcripción de *sgrS* fue más baja, lo cual contribuye a una mayor concentración del transportador y a un mayor consumo de sustrato; mientras que en BL21 ocurrió lo contrario.

Una posible explicación al incremento en la transcripción de *sgrS* es la acumulación de intermediarios de la vía glicolítica, lo que podría indicar un sobreflujo de glucosa. Estos resultados sugieren que BL21 tolera altas concentraciones de glucosa no solo por su metabolismo eficiente, si no por su capacidad de controlar el transporte de glucosa regulada por SgrS. A partir de estos resultados, se sobreexpresó SgrS en ambas cepas derivadas de K-12, lo cual resultó en una reducción en la producción de acetato (Negrete et al., 2013).

### *Cultivos por lote empleando cepas modificadas en el sistema de transporte para alcanzar altas densidades celulares*

La inactivación del sistema PTS, mediante la delección del operón *ptsHI-crr* (el cual codifica para los genes EI, HPr y IIA<sup>Glu</sup>), aunado a la sobreexpresión cromosomal del gen *galP* bajo el control del promotor *trc*, dio como resultado la cepa VH32GalP<sup>+</sup>. Esta cepa modificada presenta una menor tasa de producción de

acetato comparada con la cepa nativa W3110, así como una producción de GFP cuatro veces mayor que la obtenida con W3110 (De Anda et al., 2006). De igual forma, Lara y colaboradores (2008) evaluaron la producción de GFP cepa VH32GalP<sup>+</sup> en lote y la compararon con la producción en la cepa W3110 en lote alimentado. En este estudio demostraron que tanto la alta densidad celular, como altas concentraciones de proteína recombinante, se pueden obtener en cultivos por lote simple al lograr evitar la producción de acetato.

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

La cepa VH33 también fue evaluada por Soto y colaboradores (2011) para la producción de ADN plasmídico (ADNp), empleando el plásmido pHN, el cual es una vacuna

experimental contra las paperas, en cultivos por lote con 100 g L<sup>-1</sup> de glucosa. La cepa nativa W3110 produjo 17 mg L<sup>-1</sup> de plásmido y 5.3 g L<sup>-1</sup> de acetato, mientras que VH33 produjo 40 mg L<sup>-1</sup> de pHN y únicamente 2 g L<sup>-1</sup> de acetato. Borja y colaboradores (2012) compararon la producción de ADNp en la cepa productora DH5 $\alpha$  con VH33 y derivadas de esta con los genes *endA*, *recA*, *deoR* y *nupG* inactivados de manera independiente y en combinación. En altas concentraciones de glucosa (100 g L<sup>-1</sup>), la triple mutante VH33  $\Delta$  *recA deoR nupG* produjo 186 mg L<sup>-1</sup> de ADNp, 40 g L<sup>-1</sup> de biomasa y 2.2 g L<sup>-1</sup> de acetato, mientras que la cepa DH5 $\alpha$  produjo únicamente 70 mg L<sup>-1</sup> de ADNp y acumuló 9.5 g L<sup>-1</sup> de acetato.

Por otro lado, las cepas W3110 *vgb*<sup>+</sup> y MG1655 *vgb*<sup>+</sup>, las cuales expresan VHb, se evaluaron en cultivos aerobios y se compararon con las cepas nativas W3110 y MG1655 (*vgb*). La producción de acetato se redujo un 50% en MG1655 *vgb*<sup>+</sup> y más del 90% en W3110 *vgb*<sup>+</sup>. Los valores de  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$  y  $q_s$  se mantuvieron similares en las cepas *vgb*<sup>+</sup> y *vgb*<sup>-</sup>. En contraste, la presencia de esta hemoglobina incrementó al doble el rendimiento de ADNp ( $Y_{p/x}$ ) en la cepa W3110 *vgb*<sup>+</sup> en comparación con la nativa. La cepa MG1655 no presentó cambios en  $Y_{p/x}$  con la presencia de VHb. Estos resultados mostraron que mejorar la eficiencia del metabolismo aerobio es un enfoque interesante para evitar el sobreflujo

metabólico en cultivos de alta densidad celular por lote (Pablos et al., 2014).

Juárez y colaboradores (2017) estudiaron el impacto de la Vhb en el crecimiento y acumulación de lactato en cultivos de CHO-K1. La expresión de esta hemoglobina incrementó la  $\mu$  y los rendimientos de biomasa en glucosa y glutamina, además de reducir la producción de lactato por célula un 40% comparada con las células *vgb*. Aunado a esto, estudiaron la distribución de Vhb, demostrando que esta se encuentra en el citoplasma y organelos, lo cual indica que Vhb puede servir como transportador de oxígeno, mejorando así la respiración aerobia. Licon-Cassani y colaboradores (2014) evaluaron la producción de dos compuestos de valor industrial: ácido 3-dehidroshikímico y ácido shikímico, en cepas de *B. subtilis* PTS<sup>-</sup> y con la enzima piruvato cinasa inactiva (PYKA<sup>-</sup>). Comparada con la cepa nativa, los rendimientos de ácido shikímico ( $Y_{SHIK/S}$ ) y de ácido 3-dehidroshikímico ( $Y_{DHS/S}$ ) en glucosa con la cepa PTS<sup>-</sup> fueron 1.9 y 4.6 veces mayores, respectivamente. Mientras que en la cepa PYKA<sup>-</sup> los rendimientos  $Y_{SHIK/S}$  y  $Y_{DHS/S}$  fueron 2 y 4.2 veces mayores que en la nativa, respectivamente.

### *Potencial biotecnológico de cepas con diferentes capacidades de transporte de glucosa*

Fuentes y colaboradores (2013) generaron una colección de *E. coli* W3110 con mutaciones en las proteínas relacionadas con

el transporte de glucosa (tabla 2). Incluyendo a la cepa progenitora, los valores de  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{acet}$  abarcan de 0.18 a 0.65 h<sup>-1</sup>; de 0.33 a 1.33 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y de 0 a 0.19 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Este amplio espectro de tasas específicas permite generar un panorama completo de cultivos en lote que asemejen la operación por lote alimentado. La producción de GFP inducida por IPTG fue evaluada por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019) en las cepas WHI, WHIC, WG, WGX y WGM, siendo el mayor rendimiento de GFP ( $Y_{GFP/x}$ ) de 91.3 mg/g en WGM, mientras que para la nativa fue de 10.5 mg/g. Existen evidencias que sugieren que las modificaciones en el sistema de transporte de glucosa afectaron también el transporte de IPTG, lo que puede sesgar los resultados observados. Por otro lado, la inducción con IPTG genera estados bi-estables, que pueden dificultar la interpretación fisiológica. Debido a esto, la acumulación de proteína recombinante está acompañada de una fuerte diversificación fenotípica de la población microbiana. Las cepas que presentaron los mayores rendimientos de proteína también presentaron la mayor heterogeneidad con respecto a la morfología y acumulación de GFP. Una de las principales consecuencias de la acumulación masiva de GFP observadas en este estudio es la elongación celular, aunado a un incremento en la permeabilidad de la membrana.

El resto de la colección no ha sido evaluada para la producción de proteína recombinante.



# Artículos

Sin embargo, Fuentes y colaboradores (2013) evaluaron la producción del plásmido pHN en las mutantes WG, WGMC, WGM, WGME WHIC, y la cepa nativa W3110. En este estudio encontraron que todas las cepas mutantes evaluadas presentaron mayores

rendimiento de ADNp 3.2 veces mayor al de la cepa nativa con el plásmido pHN, esto puede deberse a que la distribución de los flujos metabólicos asociados a la generación de biomasa y ácidos nucleicos en esta cepa favorece la síntesis de precursores de ADN,

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

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

$\mu$ : Tasa específica de crecimiento

$q_s$ : Tasa específica de consumo de sustrato

$q_{ac}$ : Tasa específica de producción de acetato

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

rendimientos producto-biomasa ( $Y_{p/x}$ ) que la cepa nativa, estos incrementos pueden deberse a la escasa o nula producción de acetato. La cepa que presentó los mejores resultados fue WGMC, la cual obtuvo un

generando una mayor producción de plásmido.

Actualmente se está evaluado la producción de GFP usando un promotor constitutivo en la colección de mutantes con diferentes concentraciones de glucosa inicial. Se encontró que las cepas WGMB y WHIC presentaron valores de fluorescencia específica mayores a la nativa en todas las concentraciones de glucosa inicial evaluadas. Los rendimientos obtenidos con 20 g/L de glucosa fueron 68 y 237% mayores al de W3110 en WGMB y WHIC, respectivamente. Estos resultados indican que las cepas WGMB y WHIC resultan interesantes para la producción de proteína recombinante en cultivos de alta densidad celular en lote, por lo que se evaluará su desempeño en concentraciones altas de glucosa inicial.

De acuerdo a lo obtenido por Fragoso-Jiménez y colaboradores (2019), se espera que la cepa WHIC portando el plásmido con expresión constitutiva de GFP presente heterogeneidades en su morfología, provocando una posible elongación celular. De igual forma, se espera encontrar heterogeneidad poblacional respecto a la acumulación de GFP, obteniendo poblaciones en un estado alto y en un estado bajo de producción. A pesar de los posibles efectos negativos de la acumulación masiva de GFP, la cepa mutante WHIC podría resultar en una fábrica celular capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa, sin producir acetato y obteniendo altos rendimientos producto-biomasa.

## Perspectivas

El desarrollo de estrategias que permitan realizar cultivos de alta densidad celular evitando el sobreflujo metabólico ha progresado notablemente en los últimos años. De acuerdo a lo reportado por diferentes autores y para el caso de *E. coli*, se puede concluir que la disminución en la acumulación de acetato requiere modificaciones en más de un gen. La inactivación total o parcial del PTS, así como la inactivación de otras proteínas relacionadas con el transporte de glucosa, resulta en fábricas celulares mejoradas para la producción de diferentes clases de compuestos. Sin embargo, varias de estas modificaciones son específicas para un solo producto, por lo que resultaría interesante desarrollar una cepa capaz de producir una variedad de productos en grandes cantidades. Adicionalmente, se requiere un análisis detallado que permita determinar el impacto de las diferentes modificaciones mencionadas en la fisiología de la fábrica celular.

Otra área de oportunidad consiste en implementar estas estrategias en otros microorganismos o líneas celulares. Wlaschin y Hu (2007) expresaron el transportador de fructosa GLUT5 en células CHO, este transportador tiene un valor de  $K_m$  alto para el sustrato, por lo que lo importa a una menor tasa, comparada con el transportador GLUT1 de alta afinidad. El importe moderado permitió el cultivo de CHO en concentraciones altas de glucosa evitando el sobreflujo metabólico y la

acumulación de lactato. Esta disminución en la acumulación de lactato llevó a un incremento importante en la concentración celular final.

La implementación de fábricas celulares capaces de crecer en altas concentraciones de sustrato, producir grandes cantidades de metabolitos de interés y sin producir subproductos metabólicos indeseables, permitirá tener una alternativa a los cultivos por lote alimentado, evitando la heterogeneidad poblacional debido a gradientes de sustrato y generando una disminución en el costo operacional.

## Agradecimientos

Este trabajo es apoyado por CONACyT mediante el proyecto A1-S-8646. DV es apoyada por una beca de CONACyT con número de referencia 003760.

## Referencias

- Atsumi S, Cann A F, Connor M R, Shen C R, Smith K M, Brynildsen M P, Chou K J, Hanai T & Liao J C (2008) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* 10:305-311.
- Barford J P & Hall R J (1979) An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *Microbiology.* 114:267-275.
- Basan M, Hui S, Okano H, Zhang Z, Shen Y, Williamson J R & Hwa T (2015) Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature.* 528:99.
- Bauer K A, Ben-Bassat A R I E, Dawson M, De La Puente V T & Neway J O (1990) Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1296-1302.
- Berríos-Rivera S J, Bennett G N & San K Y (2002) Metab. Eng. of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metab. Eng.*, 4:217-229.
- Blunt W, Dartiailh C, Sparling R, Gapes D J, Levin D B & Cicek N (2019) Development of High Cell Density Cultivation Strategies for Improved Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Productivity Using *Pseudomonas putida* LS46. *Bioengineering.* 6:89.
- Borja G M, Ramírez O T & Lara A R (2014) Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente. *BioTecnología.* 17:87-109.
- Borja G M, Mora E M, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-

# Artículos

- density cultivations in batch mode. *Microb. Cell Fact.* 11:132.
- Carpenter J H (1966) New measurements of oxygen solubility in pure and natural water 1. *Limnol. Oceanogr.* 11:264-277.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Post H, Fuhrer T, Cappadona S, Sánchez-Díaz N C, Sauer U, Heck A J, Altelaar A F & Cánovas M (2014) Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 10.
- Castaño-Cerezo S, Bernal V, Röhrig T, Termeer S & Cánovas M (2015) Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N  $\epsilon$ -lysine acetylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 3533-3545.
- Chen P T, Chiang C J, Chen Y T, Lin H C, Liu C H, Chao Y P & Shaw J F (2012) Strategy for stable and high-level expression of recombinant trehalose synthase in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* 60: 6063-6068.
- Cherrington C A, Hinton M, Pearson G R & Chopra I (1991) Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 161-165.
- Childers D S, Raziunaite I, Avelar G M, Mackie J, Budge S, Stead D & Brown A J (2016) The rewiring of ubiquitination targets in a pathogenic yeast promotes metabolic flexibility, host colonization and virulence. *PLoS Pathog.* 12: e1005566.
- Cho S, Shin D, Ji G E, Heu S & Ryu S (2005) High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 119: 197-203.
- Chou C H, Bennett G N & San K Y (1994) Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 952-960.
- Chrast L, Chaloupkova R & Damborsky J (2018) Gram-scale production of recombinant microbial enzymes in shake flasks. *FEMS Microbiol. Lett.* 365: fnx265.
- Contiero J, Beatty C, Kumari S, DeSanti C L, Strohl W R & Wolfe A (2000) Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 421-430.
- Curtis S J & Epstein W (1975) Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J. Bacteriol.* 122: 1189-1199.
- De Anda R, Lara A R, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by

# Artículos

- galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8: 281-290.
- De Mey M, De Maeseneire S, Soetaert W & Vandamme E (2007) Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 689-700.
- Death A & Ferenci T (1994) Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176: 5101-5107.
- Delgado J & Liao J C (1997) Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 13: 361-367.
- Demain A L & Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27: 297-306.
- Dien B S, Nichols N N & Bothast R J (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-264.
- Djurdjevic I, Zelder O & Buckel W (2011) Production of glutamic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 320-322.
- Eiteman M A & Altman E (2006) Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol.*, 24: 530-536.
- Enjalbert B, Millard P, Dinclaux M, Portais J C & Létisse F (2017) Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Sci. Rep.* 7: 42135.
- Feist A M, Henry C S, Reed J L, Krummenacker M, Joyce A R, Karp P D, Broadbelt L J, Hatzimanikatis V & Palsson B Ø (2007) A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G & Bolívar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.*, 7: 70-87.
- Fragoso-Jiménez J C, Baert J, Nguyen T M, Liu W, Sassi H, Goormaghtigh F, Van Melderen, L, Gaytán P, Hernández-Chávez G, Martínez A, Delvigne F & Gosset G (2019) Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microb. Cell Fact.*, 18: 26.

- Fuentes L G, Lara A R, Martínez L M, Ramírez O T, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2013) Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microb. Cell Fact.*, 12: 42.
- Galindo J, Barrón B L & Lara A R (2016) Improved production of large plasmid DNA by enzyme-controlled glucose release. *Ann. Microbiol.* 66: 1337-1342.
- Gokarn R, Evans J, Walker J, Martin S, Eiteman M & Altman E (2001) The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 188-195.
- Habicher T, John A, Scholl N, Daub A, Klein T, Philip P & Büchs J (2019) Introducing substrate limitations to overcome catabolite repression in a protease producing *Bacillus licheniformis* strain using membrane-based fed-batch shake flasks. *Biotechnol. Bioeng.* 116: 1326-1340.
- Han Q & Eiteman M A (2019) Acetate formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* K-12 with an elevated NAD (H) pool. *Eng. Life Sci.*
- Han C, Zhang W C, You S & Huang L Y (2004) Knockout of the ptsG gene in *Escherichia coli* and cultural characterization of the mutants. *Chin. J. Biotechnol.* 20: 16-20.
- Hu W S, Dodge T C, Frame K K & Himes V B (1987) Effect of glucose on the cultivation of mammalian cells. *Dev. Biol. Stand.* 66: 279-290.
- Hwang K W, Raje M, Kim K J, Stark B C, Dikshit K L & Webster D A (2001) *Vitreoscilla* Hemoglobin intracellular localization and binding to membranes. *J. Biol. Chem.* 276: 24781-24789.
- Jaén K E, Lara A R & Ramírez O T (2013) Effect of heating rate on pDNA production by *E. coli*. *Biochem. Eng.* 79: 230-238.
- Jayapal K P, Wlaschin K F, Hu W & Yap M G (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 103: 40.
- Jeong J Y, Kim Y J, Cho N, Shin D, Nam T W, Ryu S & Seok Y J (2004) Expression of ptsG encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 38513-38518.
- Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D & Büchs J (2006) Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol. Bioeng.* 95: 433-445.
- Juárez M, González-De la Rosa C H, Memún E, Sigala J C & Lara A R (2017) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the growth performance of CHO-K1 cells. *Biotechnol. J.* 12: 1600438.

- Jung Y K & Lee S Y (2011) Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 151: 94-101.
- Jung Y K, Kim T Y, Park S J & Lee S Y (2010) Metab. Eng. of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 105: 161-171.
- Keasling J D (2010) Manufacturing molecules through Metab. Eng. *Science*, 330: 1355-1358.
- Kim J Y & Cha H J (2003) Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 841-853.
- Kim S Y, Nam T W, Shin D, Koo B M, Seok Y J & Ryu S (1999) Purification of Mlc and analysis of its effects on thepts expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 25398-25402.
- Kimata K, Inada T, Tagami H & Aiba H (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol.* 29: 1509-1519.
- Knabben I, Regestein L, Marquering F, Steinbusch S, Lara A R & Büchs J (2010) High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150: 73-79.
- Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J & Büchs J (2007) High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *J. Biotechnol.* 132: 167-179.
- Knoll A, Maier B, Tscherrig H & Büchs J (2005) The oxygen mass transfer, carbon dioxide inhibition, heat removal, and the energy and cost efficiencies of high pressure fermentation. *J. Technol. Transfer.* 92: 77-99.
- Korz D J, Rinas U, Hellmuth K, Sanders E A & Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39(1), 59-65.
- Krause M, Ukkonen K, Haataja T, Ruottinen M, Glumoff T, Neubauer A, Neubauer P & Vasala A (2010) A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 11.
- La Merie Business Intelligence. (2018). Disponible en: <http://www.lamerie.com>.
- Lara A R (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 10: 209-223.
- Lara A R & Ramírez O T (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications. Recombinant gene expression. Humana Press, Totowa, NJ.

- Lara A R, Caspeta L, Gosset G, Bolívar F & Ramírez O T (2008) Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: An alternative to fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 893-901.
- Lee S Y (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14: 98-105.
- Liberti M V & Locasale J W (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends. Biochem. Sci.* 41: 211-218.
- Licona-Cassani C, Lara A R, Cabrera-Valladares N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2014) Inactivation of pyruvate kinase or the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system increases shikimic and dehydroshikimic acid yields from glucose in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microb. Biotech.* 24: 37-45.
- March J C, Eiteman M A & Altman E (2002) Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5620-5624.
- Matsui T, Shinzato N, Yokota H, Takahashi J & Sato S (2006) High cell density cultivation of recombinant *E. coli* with a pressurized culture. *Process Biochem.* 41: 920-924.
- McDonald T P, Walmsley A R & Henderson P J (1997) Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* 272: 15189-15199.
- Molenaar D, Van Berlo R, De Ridder D & Teusink B (2009) Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol. Syst. Biol.* 5.
- Negrete A, Majdalani N, Phue J N & Shiloach J (2013) Reducing acetate excretion from *E. coli* K-12 by over-expressing the small RNA SgrS. *New Biotechnol.* 30: 269-273.
- Negrete A, Ng W I & Shiloach J (2010) Glucose uptake regulation in *E. coli* by the small RNA SgrS: comparative analysis of *E. coli* K-12 (JM109 and MG1655) and *E. coli* B (BL21). *Microb. Cell Fact.* 9: 75.
- Pablos T E, Sigala J C, Le Borgne S & Lara A R (2014) Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* 9: 791-799.
- Paczia N, Nilgen A, Lehmann T, Gätgens J, Wiechert W & Noack S (2012). Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in



- various microorganisms. *Microb. Cell Fact.* 11: 122.
- Panula-Perälä J, Šiurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn M G & Neubauer P (2008) Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 7: 31.
- Perrenoud A & Sauer U (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187: 3171-3179.
- Phue J N & Shiloach J (2004) Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *J. Biotechnol.* 109: 21-30.
- Ramírez E A, Velázquez D & Lara A R (2016) Enhanced plasmid DNA production by enzyme-controlled glucose release and an engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 38: 651-657.
- Riesenber D, Schulz V, Knorre W A, Pohl H D, Korz D, Sanders E A, Ross A & Deckwer W D (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.* 20: 17-27.
- Rozpędowska E, Hellborg L, Ishchuk O P, Orhan F, Galafassi S, Merico A, Woolfit M, Compagno, C & Piškur J (2011) Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* 2:302.
- Rue S M, Anderson P W, Gaylord M R, Miller J J, Glaser S M & Lesley, S. A. (2019) A high-throughput system for transient and stable protein production in mammalian cells. *High-Throughput Protein Production and Purification*. Humana, New York, NY.
- Samper G P (2019) The Crabtree effect shapes *Saccharomyces cerevisiae* lag phase.
- Sánchez A M, Bennett G N & San K Y (2005) Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol. Prog.* 21: 358-365.
- Selifonova O V, Jessen H, Gort S J, Selmer T & Buckel W (2002) 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds. PCT WO 02/ 42418.
- Sigüenza R, Flores N, Hernández G, Martínez A, Bolivar F & Valle F (1999) Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 587-592.
- Soto R, Caspeta L, Barrón B, Gosset G, Ramírez O T & Lara A R (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA production by a

- metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng.* 56: 165-171.
- Suthers PF & Cameron DC (2005) Production of 3-hydroxypropionic acid in recombinant organisms. US patent 6,852,517.
- Szenk M, Dill K A & de Graff A M (2017) Why do fast-growing bacteria enter overflow metabolism? Testing the membrane real estate hypothesis. *Cell Syst.* 5: 95-104.
- Tsang A W & Escalante-Semerena J C (1998) CobB, a new member of the SIR2 family of eukaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide: 5, 6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* 273: 31788-31794.
- Underwood S A, Zhou S, Causey T B, Yomano L P, Shanmugam K T & Ingram L O (2002) Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6263-6272.
- Valgepea K, Adamberg K, Nahku R, Lahtvee P J, Arike L & Vilu R (2010) Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase. *BMC Syst. Biol.* 4: 166.
- Varma A & Palsson B O (1994) Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotech.* 12: 994.
- Veit A, Polen T & Wendisch V F (2007) Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 406-421.
- Vemuri G N, Altman E, Sangurdekar D P, Khodursky A B & Eiteman M A (2006b) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3653-3661.
- Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2002) Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1715-1727.
- Vemuri G N, Eiteman M A & Altman E (2006a) Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 538-542.
- Walsh G (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* 36: 1136-1145.
- Wei X X & Chen G Q (2008) Applications of the Vhb gene vgb for improved microbial fermentation processes. Methods in enzymology. Academic Press.

- Withers S T, Gottlieb S S, Lieu B, Newman J D & Keasling J D (2007) Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6277-6283.
- Wlaschin K F & Hu W S (2007) Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J. Biotechnol.* 131: 168-176.
- Wolfe A J (2005). The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12-50.
- Yang H, Liao Y, Wang B, Lin Y & Pan L (2011) Draft genome sequence of *Escherichia coli* XH001, a producer of L-threonine in industry. *J. Bacteriol.* 193.
- Zeng H & Yang A (2019) Modelling overflow metabolism in with flux balance analysis incorporating differential proteomic efficiencies of energy pathways. *BMC Syst. Biol.*, 13: 3.
- Zhang J, Sprung R, Pei J, Tan X, Kim S, Zhu H & Zhao Y (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol. & Cell. Proteomics.* 8: 215-225.
- Zhuang K, Vemuri G N & Mahadevan R (2011) Economics of membrane occupancy and respiration. *Mol. Syst. Biol.* 7.