



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterización de una cepa de *Escherichia coli* carente del sistema PTS y de la cepa parental JM101 en la utilización de glicerol y glucosa como fuentes de carbono para la producción de compuestos aromáticos

TESIS DE DOCTORADO

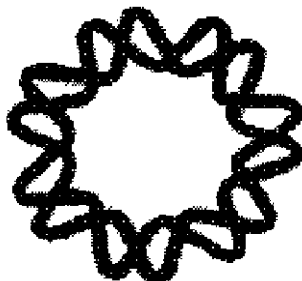
P R E S E N T A :

M.C KARLA MARTÍNEZ GÓMEZ

ASESOR:

DR. FRANCISCO GONZALO BOLÍVAR ZAPATA

INVESTIGADOR EMÉRITO



CUERNAVACA, MORELOS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, bajo la dirección del Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata.

Para la realización del trabajo se contó con los apoyos del Consejo Nacional de Tecnología (CONACyT) a través de los siguientes donativos 105782, 83039, FONSEC/SSA/ISSTE/CONACyT 44126, 12679; de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través de la DGPA/PAPIIT IN205811. Así como la beca de posgrado de CONACYT.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH

SECRETARIO: DR. MARIO SOBERON CHAVEZ.

VOCAL: DRA. ESPERANZA MARTÍNEZ.

SUPLENTE: DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ.

SUPLENTE: DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin los comentarios y propuestas de los miembros de mi comité tutorial: Dra. Alicia González y especialmente al Dr. Sergio Encarnación y técnicos de laboratorio por facilitarme los recursos para realizar el trabajo de proteómica.

A los miembros de los comités del tutorial ampliado y de tesis por la revisión de este trabajo.

A los técnicos académicos: Dra. Noemí Flores, M.C Georgina Hernández y M.C Ramón de Anda.

A los Drs. Guillermo Gosset, Adelfo Escalante y Alfredo Martínez.

A los compañeros del laboratorio Bolívar-Martínez-Gosset.

A Héctor Manuel Castañeda Aponte.

Un agradecimiento especial al Dr. Francisco Bolívar, por la revisión exhaustiva y dirección del trabajo. En especial por apoyar las iniciativas de experimentos, que fueron esenciales para responder nuevas preguntas y me permitió disfrutar de la esencia del proceso.

A mis maestros: Lidia Leal, Noemí Flores, Ramón de Anda, Inés Chávez-Béjar, Susana Romero, Juan C. Sigala.

ESPECIALES

Mi agradecimiento total a Georgina Gómez, no hay palabras para decirte cuanto te debo, amo, admiro y respeto. Quisiera tener tu energía para hacer más.

A Aída Gómez, mi primera maestra, siempre se puede saber y contribuir más.

A Renata, Ana Luisa y Gina: ustedes son causa y efecto -esto es por y para ustedes-.

Mateo, el inicio de una nueva etapa y motivación en nuestras vidas.

José Manuel, por el logro por méritos.

A la amistad que perdura, por el siempre azaroso camino que al compartirlo se compone de los bailes, llantos y convivencias: Lili, Arlette, Ana Laura y Luary.

A los entrañables zombies, chiopillines y cielo rojos: Noemí S., Chío, Victor Balderas, Ale Vargas, Brenda Barrientos y Aldo de la eterna sonrisa.

A Estefa y Viviana por compartir su amistad conmigo.

A Carol, la cómplice perfecta.

Eli, la comprensión, sabiduría nata.

Mars, tu eres amiga, fuiste zombie, cuantas canciones, cuántos libros, cuantas semejanzas.

Cali... miauuuu!

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	4
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1 Importancia de la producción biológica de los compuestos aromáticos	7
3.2 Consideraciones sobre la fisiología de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	9
3.2.1 El sistema fosfoenolpiruvato-carbohidrato de transferencia de fosfatos (PTS) en <i>Escherichia coli</i>	9
a) El transporte de carbohidratos en esta bacteria.....	9
b) Descripción del sistema PTS.....	10
c) El Sistema PTS y su relación con la represión catabólica.	12
c.1) Mecanismo que evita la inducción específica de los genes involucrados en el catabolismo de carbohidratos.	13
c.2) Mecanismo de control transcripcional con reguladores globales.....	13
c.3) Cascada de señales que modulan la represión catabólica.....	14
3.3 Estrategias de la ingeniería metabólica para aumentar la producción de los compuestos aromáticos en <i>Escherichia coli</i>	15
3.3.1 Consideraciones sobre los metabolitos E4P y PEP.....	15
3.3.2 Análisis de las redes y flujos metabólicos para la canalización de flujos a la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.	15
3.3.3 Estrategias para aumentar la disponibilidad del PEP.....	19

a) Eliminación del sistema PTS.....	19
b) Eliminación de las piruvato cinasas (PykA y PykF).	19
c) Reciclamiento del PYR a PEP	20
d) Uso de azúcares que no son transportados por el sistema PTS.	21
4. INTRODUCCION	24
4.1 Caracterización fisiológica de la cepa PB12 de <i>Escherichia coli</i> obtenida por evolución adaptativa, sobreproductora de compuestos aromáticos..	24
a) Aislamiento de la cepa PB12 en un proceso de evolución adaptativa a partir de la cepa PB11 carente del sistema PTS, derivada de la cepa silvestre JM101	24
b) Caracterización inicial de la cepa PB12	24
c) Caracterización de la cepa a nivel de secuenciación nucleotídica del genoma y estudio de algunas mutaciones importantes ocurridas en la cepa PB12.....	25
d) Uso de la cepa PB12 para la producción de compuestos aromáticos.	27
4.2 Importancia de las cepas insensibles a represión catabólica y del glicerol como fuente de carbono.....	27
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Cepas bacterianas y plásmidos	33
7.2 Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante	33

a) Extracción de ADN	33
b) Transformación por ADN	33
c) Transformación por transducción	33
d) Mutagénesis del gen <i>aroB</i> con el método de Datsenko y Wanner	33
e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
f) Oligonucleótidos	34
7.3 Condiciones de cultivo	35
a) Composición del medio mínimo M9	35
b) Composición del medio Luria (LB)	35
c) Composición del medio mínimo ARO	35
d) Preparación del preinóculo	35
e) Preparación del inóculo	35
f) Cultivos por lote en fermentador	36
g) Cultivo de células en reposo	36
7.4 Determinación de parámetros cinéticos	37
a) Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ)	37
b) Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)	37
c) Cálculo de consumo específico de azúcares (q_s)	37
d) Cálculo de producción específica de DAHP, DHS y SHIK	38
7.5 Métodos analíticos	38

a) Medición de absorbancia	38
b) Medición de la concentración de las fuentes de carbono	38
c) Medición de DAHP y otros intermediarios aromáticos	39
7.6 Análisis de la expresión de genes por RT-qPCR	39
a) Manejo de muestra y tratamiento	39
b) Extracción de RNA	39
c) RT-qPCR	40
7.7 Ensayos enzimáticos	41
7.8 Análisis proteómico.....	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
8.1 Resultados y discusión fase I	43
8.1.1 Capacidad de la cepa evolucionada PB12 de coutilizar pares de fuentes de carbono	43
8.1.2 Producción de DAHP en las cepas JM101 <i>aroB</i> ⁻ y PB12 <i>aroB</i> ⁻ transformadas con los plásmidos pRW300 <i>aroG</i> ^{fbt} y pCL <i>tkA</i> en diferentes combinaciones de dos fuentes de carbono, en el sistema de células en reposo.....	44
8.1.3 Parámetros cinéticos, curvas de crecimiento y producción de intermediarios aromáticos en cultivos en fermentadores de la cepa PB12/pRW300 <i>aroG</i> ^{fbt} , pCL <i>tkA</i> (PB12T).	47
8.1.4 Conclusiones fase I	48
8.2 Resultados y discusión fase II	50
8.2.1 Fisiología de la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol	50

8.2.1.1	Análisis transcripcional de la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol	50
	a) Glicólisis	50
	b) Pentosas-fosfato y Entner-Doudoroff	50
	c) Gluconeogénesis	51
	d) TCA, lanzadera de glioxilato y sistemas productores y consumidores de acetato ..	52
	e) El papel de los reguladores Cra y CsrB	52
	f) Genes diferencialmente expresados en la cepa PB12T entre la condición de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono y en la mezcla glucosa-glicerol.....	53
8.2.1.2	Estrés oxidativo generada por el aumento de especies reactivas de oxígeno y bajo AMPc intracelular	53
8.2.1.3	Producción de ATP y niveles ATP/ADP de la cepa PB12 crecida en glucosa y la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.	54
8.2.1.4	Producción de nucleótidos de la cepa PB12 crecida en glucosa y la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.....	55
5.2.2	Conclusiones fase II.....	55
8.3	Resultados y discusión fase III	58
8.3.1	Fisiología de la cepa JM101 crecida en glicerol	58
8.3.1.1	Análisis a nivel transcripcional y proteómico de la cepa JM101 crecida en glicerol comparada con la misma cepa crecida en glucosa	58
	a) Genes y proteínas involucrados en el transporte y metabolismo de glicerol y glucosa	58

b) Expresión de genes del metabolismo central: glicólisis, TCA, formadores y consumidores de acetato	58
c) Deficiencia de compuestos de 4 carbonos (C4) y de síntesis de aminoácidos	60
d) Estrategias de reciclamiento de carbono de la cepa JM101 crecida en glicerol	61
e) Patrón de expresión de la vía común de los aminoácidos aromáticos	61
8.3.2 Evaluación de derivadas de la cepa JM101 con inactivaciones en genes del nodo PEP-PYR.....	62
8.3.3 Síntesis de indol y evaluación de la mutante JM101 Δ <i>tnaA</i>	62
8.3.4 Conclusiones fase III	64
8.4 Resultados y discusión fase IV.....	66
8.4.1 Ingeniería de vías metabólicas para aumentar la capacidad de producción de compuestos aromáticos usando glicerol como fuente de carbono	66
8.4.1.1 Rendimientos y productividades de las cepas JM101/pJLBaroG ^{fb} <i>tk</i> A, JM101 Δ <i>pykA</i> /pJLBaroG ^{fb} <i>tk</i> A y JM101 Δ <i>pykF</i> /pJLBaroG ^{fb} <i>tk</i> A crecidas en glicerol como única fuente de carbono	66
8.4.1.2 Rendimientos y productividades de las cepas JM101, JM101 Δ <i>pykA</i> y JM101 Δ <i>pykF</i> con el operón P _{tpi} -(<i>aroG,tkA,aroB,aroD</i>) insertado en el episoma y crecidas en glicerol como única fuente de carbono	67
8.4.2 Conclusiones fase IV	67
FIGURAS Y TABLAS MENCIONADAS EN ESTA TESIS.....	69
9. CONCLUSIONES GENERALES	104
10. PERSPECTIVAS	108

11. REFERENCIAS.....	109
----------------------	-----

12. ANEXOS.....	118
-----------------	-----

Anexo I. Artículo publicado: **Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez O and Francisco Bolívar. *Microbial Cell Factories* 2008, **7**: 1.

Anexo II. Análisis de la transcripción relativa de genes del metabolismo central cuando la cepa PB12 cuando coutiliza glucosa-glicerol comparada contra PB12 glucosa y PB12 glicerol.

AnexoIII. Manuscrito: **New insights into the *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging and acetate carbon recycling metabolism responses during growth on glycerol.** Karla Martínez-Gómez, Héctor M. Castañeda, Noemí Flores, Gabriel Martínez-Batallar, Guillermo Gosset, Sergio Encarnación and Francisco G. Bolivar. Será sometida a la revista *Microbial Cell Factories*.

Anexo IV. Extracción-purificación de DAHP y condiciones cromatográficas de HPLC.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Perfiles de crecimiento y utilización de dos sustratos por la cepa silvestre JM101 y la cepa derivada PB12.....	70
Figura 2. Consumo de diferentes fuentes de carbono y producción de DAHP en células en reposo de la cepa PB12 $aroB$ /pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$	72
Figura 3. Producción de DAHP y biomasa por la cepa PB12T.....	75
Figura 4. Reacciones del metabolismo central de la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	76
Figura 5. Patrón de expresión de los genes glicolíticos y gluconeogénicos en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	77
Figura 6. Patrón de expresiones de los genes de la vía de las pentosas fosfato en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	78
Figura 7. Patrón de expresión de los genes de la vía de TCA en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	79
Figura 8. Patrón de expresión de los genes involucrados en la formación-consumo de acetato y gluconeogénicos en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	80
Figura 9. Actividad específica de la isocitrato liasa (Icl) en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa (G) y en la mezcla glucosa-glicerol (GGli).....	81
Figura 10. Patrón de expresión de los genes diferencialmente expresados en la cepa PB12T crecida en la mezcla glucosa-glicerol respecto a glucosa como única fuente de carbono.....	82
Figura 11. Relación ATP/ADP y concentraciones de ATP-ADP intracelular en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa (G) y en la mezcla glucosa-glicerol (GGli).....	83
Figura 12. Patrón de expresión de los genes involucrados en la formación de NADH ₂ en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	84
Figura 13. Relación NADH/NADH ₂ intracelular en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.....	85

Figura 14. Patrón de expresión de los genes que codifican para las transhidrogenasas en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.....	86
Figura 15. Reacciones del metabolismo central de la cepa silvestre JM101 crecida en glicerol y valores de transcripción relativa comparados con la misma cepa crecida en glucosa.....	87
Figura 16. Actividades específicas de las mutantes de la cepa JM101 parental y mutantes sencillas en los genes <i>pykA</i> y <i>pykF</i> crecidas en glicerol.....	91
Figura 17. Actividades específicas de varias proteínas del metabolismo central de la cepa JM101 crecida en glicerol y de la misma cepa crecida en glucosa.....	91
Figura 18. Cinética de crecimiento de la cepa JM101 en presencia de acetato y patrón de consumo de glucosa (o glicerol) con acetato.....	95
Figura 19. Cinética de crecimiento, producción de indol y ácidos orgánicos de las cepas JM101 y JM101 Δ <i>tnaA</i>	96
Figura 20. Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos aromáticos de las cepas JM101/pJLBaroG ^{fbr} <i>tk</i> tA, JM101 Δ <i>pykA</i> /pJLBaroG ^{fbr} <i>tk</i> tA y JM101 Δ <i>pykF</i> /pJLBaroG ^{fbr} <i>tk</i> tA.....	98
Figura 21. Umbral (<i>Cq</i>) de aparición del gene <i>ihfB</i> en experimentos de RT-qPCR realizados en las cepas JM101, PB11, PB12 y derivadas de estas en varias condiciones de crecimiento.....	103

NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

Cepas usadas en el estudio

PB12PTS ⁻ Glc ⁺	PB12
PB12 /pRW300 <i>aroG^{fabr}</i> , pCL <i>tktA</i>	PB12T

Vías metabólicas

Pentosas fosfato	PP
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	TCA

Fuentes de carbono

Glucosa	Glc
Glicerol	Gli
Arabinosa	Ara
Acetato	Ace
Gluconato	Gto

Parametros estequiométricos

q_s	Velocidad de consumo específico de la fuente de carbono [mmolC g ⁻¹ h ⁻¹]
q_p	Velocidad de producción específica de producto [mmolC g ⁻¹ h ⁻¹]
μ	Velocidad específica de crecimiento [h ⁻¹]
$Y_{x/s}$	Rendimiento biomasa/sustrato [g/mmolC]

Metabolitos intracelulares

AcCoA	Acetil coenzima A
Ac-P	Acetil fosfato
A-AMP	Acetil-adenina monofosfato
CIT	Citrato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DAHP	3-deoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato
E4P	Eritrosa 4-fosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato

F1,6P	Fructosa 1,6-fosfato
FUM	Fumarato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
Gli3P	Glicerol 3-fosfato
GOX	Glioxilato
G6P	Glucosa 6-fosfato
ICT	Isocitrato
KDPGNT	2-dehidro-3-deoxy-D-gluconate-6-phosphate
MAL	Malato
OAA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PYR	Piruvato
R5P	Ribosa 5-fosfato
RU5P	Ribulosa 5-fosfato
S7P	Seudoheptulosa 7-fosfato
SUC	Succinato
SUC-CoA	Succinil coenzima A
X5P	Xilulosa-5-fosfato
α -KG	α -cetoglutarato
1,3GP	1,3 bifosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
2PG	2-fosfoglicerato
6PNGL	6-phospho-D-glucono-1,5-lactone
6PGNT	6-fosfoguconato

1. RESUMEN

Varios compuestos de importancia comercial son sintetizados biológicamente en la vía de los aminoácidos aromáticos existente en plantas y microorganismos. La síntesis de aminoácidos aromáticos está regulada a varios niveles; sin embargo, la disponibilidad de los precursores eritrosa-4-fosfato (E4P) y particularmente el fosfoenolpiruvato (PEP) son las principales limitantes para la sobreproducción eficiente de estos compuestos.

En *Escherichia coli*, el sistema fosfoenolpiruvato:carbohidrato de transferencia de fosfatos (PTS) consume la mitad del PEP producido en glicólisis para transportar y fosforilar a una molécula de glucosa. Por lo anterior, se han construido cepas carentes del sistema PTS con la finalidad de canalizar el PEP que no es usado para el transporte de glucosa hacia la vía de los aminoácidos aromáticos. El sistema PTS está involucrado también en el proceso de represión catabólica por glucosa. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* que carecen éste sistema son capaces de coutilizar glucosa y otras fuentes de carbono, debido a la ausencia de represión catabólica y a la coexistencia de las vías glicolíticas y gluconeogénicas. La inactivación del sistema PTS (operón *ptsHlcr*) en cepas de *E. coli* causa una baja velocidad de crecimiento en glucosa comparado con las cepas silvestres. Por lo anterior se han aislado cepas que han recuperado la capacidad de crecer eficientemente en esta fuente de carbono (cepa PB12PTS⁻Glc⁺). Estas cepas se han utilizado para la sobreproducción de metabolitos aromáticos; sin embargo, no hay reportes respecto al potencial de crecimiento de cepas carentes del sistema PTS en mezclas de fuentes de carbono para incrementar la producción de compuestos aromáticos.

En este trabajo se demostró la capacidad de la cepa PB12 de coutilizar mezclas de glucosa-arabinosa, glucosa-gluconato y glucosa-glicerol. Esta capacidad le permite a la cepa aumentar su velocidad específica de crecimiento (μ) debido a que metaboliza mas moles de carbono por unidad de tiempo. La presencia de los plásmidos pRW300 $aroG^{fbr}$ y pCL $tktA$ disminuye la μ de la cepa en todas las mezclas de fuentes de carbono, pero incrementa la productividad y el rendimiento de compuestos aromáticos, especialmente con la mezcla glucosa-glicerol comparada con glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono. La producción de acetato no fue detectado en las fermentaciones con glicerol y en la mezcla glucosa-glicerol.

Con la finalidad de conocer las causas del incremento en la producción de compuestos aromáticos en la cepa crecida en la mezcla glucosa-glicerol, se realizó un estudio de la

expresión de genes del metabolismo central. Se encontró que el gene *talA* se sobrexprende (9X) en la mezcla glucosa-glicerol respecto a glucosa como única fuente de carbono. Además se detectó una menor expresión de tres genes glicolíticos (*pgi*, *gapA* y *pgk*) y varios genes del ciclo de Krebs (*gltA*, *icdA*, *sucAB*, *lpdA* y *mdh*). Estos resultados sugieren que la co-utilización de glucosa y glicerol incrementa el flujo de E4P y fructosa-6-fosfato (F6P) desde gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y seudoheptulosa-7-fosfato (S7P).

Para comprender mejor la fisiología de la cepa PB12 y la cepa parental JM101 crecidas en glicerol, se realizó un estudio transcripcional-proteómico y la evaluación de la inactivación de algunos genes relevantes del nodo PEP-piruvato (*poxB*, *ppc*, *pckA*, *pykA* and *pykF*) en la cepa JM101.

Los resultados conforme a lo esperado indican que la cepa JM101 creciendo en glicerol, sobrexprende los genes (*glpF* y *glpK*) y sobreproduce las proteínas (GlpK y GlpD) involucrados en el transporte, incorporación y metabolismo de glicerol. Se detectaron también cambios importantes en la expresión de los genes *lamB*, *malE*, *mglB*, *mglC*, *galP*, *glk* y la producción de proteínas LamB, MalE y MglB que pertenecen a los sistemas *mal/lam* y *mgl/gal*. Además, se detectó la sobrexpresión de varios genes del regulon RpoS (*poxB*, *fbaA*, *fbaB*, *pfkA*, *pfkB* y *pgi*). Estos resultados indican que durante el crecimiento en glicerol de la cepa JM101 se induce una respuesta de estrés por carbono.

Adicionalmente, la sobrexpresión de los genes que producen acetato (*poxB*, *acs*, *pta*), genes de la lanzadera de glioxilato (*aceA*, *aceB*, *glcB*) y del gene que codifica para el transportador de acetato (*actP*) sugiere que la cepa pudiera sintetizar acetato usando PoxB y consumiendo simultáneamente este metabolito cuando crece en glicerol. Consistente con esta capacidad metabólica, en la cepa JM101 crecida en glicerol, no fue detectado acetato, probablemente porque, como se señaló, esta cepa recicla acetato a través de PoxB-Acs y la lanzadera de glioxilato, en un mecanismo de "preservación de carbonos". De acuerdo a esta propuesta, la expresión de los genes que codifican para la piruvato deshidrogenasa Pdh (*aceE*, *aceF* y *lpdA*) está ligeramente subexpresados en la cepa JM101 crecida en glicerol. Este resultado también concuerda con la capacidad aparente de co-utilizar acetato y glicerol en la cepa JM101. De acuerdo a lo anterior derivadas de la cepa JM101 inactivadas en los genes *poxB* y *pckA* acumulan acetato y las μ se afectan ligeramente. Conforme a lo señalado; la subexpresión de los genes *icdA* y *lpdA* que codifican para las proteínas isocitrato deshidrogenasa y la subunidad de la succinato deshidrogenasa respectivamente, permite la propuesta de que el flujo de carbono está reducido en una sección del ciclo de Krebs, permitiendo el reciclamiento a través de la lanzadera de glioxilato ya que la expresión de los

genes *aceB*, *aceA* y *glcB* está elevada. Como resultado, menos carbono se pierde como CO₂ y los esqueletos de carbono son reciclados por vías gluconeogénicas. Esta respuesta metabólica podría ser responsable de la aparente reducción del flujo de carbono en el ciclo de Krebs; de acuerdo con lo anterior aparentemente existe una producción reducida de “metabolitos de 4 carbonos (C4)” ya que la μ aumenta cuando succinato o malato es añadido en el cultivo.

La detección de indol en la cepa JM101 cuando crece en glicerol indica un flujo importante a través de la vía de los aminoácidos aromáticos. El indol es un producto de la degradación de triptófano, y es una molécula señalizadora que activa a la proteína reguladora Crl para modular la expresión de ciertos genes pertenecientes al regulón Crl-RpoS. Sin embargo, un mecanismo de señalización de este metabolito no es claro en este momento.

Pareciera que cuando el glicerol es usado como única fuente de carbono, una respuesta de estrés, reciclamiento y preservación ocurre en la cepa JM101. Además RpoS puede ser activado por indol, permitiendo una respuesta más amplia en respuesta al crecimiento en limitación de carbono.

Finalmente, se realizaron inactivaciones individuales en los genes *pykA* y *pykF* con la finalidad de incrementar la disponibilidad de PEP para aumentar la producción de compuestos aromáticos usando glicerol como única fuente de carbono. Las cepas JM101 Δ *pykA* y JM101 Δ *pykF* transformadas con pJLBaroG^{fb}*tk*A mejoraron la producción de compuestos aromáticos comparativamente con la cepa JM101 con el mismo plásmido. La producción de compuestos aromáticos fue mayor que la correspondiente de las mismas cepas crecidas en glucosa.

En esta contribución se demuestra que la coutilización de glucosa-glicerol incrementa la producción de compuestos aromáticos en cepas carentes del sistema PTS y portadoras de los plásmidos pRW300aroG^{fb} y pCL*tk*A debido a una alta expresión del gene *talA* y baja expresión de ciertos genes glicolíticos. Fue detectado por primera vez que durante el crecimiento de la cepa JM101 en glicerol existen respuestas de estrés por carbono, reciclamiento de acetato y la regulación de RpoS probablemente a través de la señal del indol. Hasta donde sabemos, es la primera vez que la inactivación en los genes *pykA* o *pykF* es usada para incrementar la producción de compuestos aromáticos usando glicerol como única fuente de carbono en una cepa de *E. coli*.

2. ABSTRACT

Several aromatic compounds of commercial importance are biologically synthesized in the aromatic amino acids aromatic pathway ubiquitous in plants and microorganisms. The production of aromatic compounds is highly regulated at various levels; however the limited availability of the precursors eritrose-4-phosphate (E4P) and particularly phosphoenolpyruvate (PEP) are the main limitations for the overproduction of these aromatic compounds.

Escherichia coli strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) are capable of cointilizing glucose and other carbon sources due to the absence of catabolite repression by glucose. In these strains, the lack of this important regulatory and transport system allows the coexistence of glycolytic and gluconeogenic pathways. Strains lacking PTS have been constructed with the goal of canalizing part of PEP not consumed in glucose transport to the aromatic pathway. The deletion of the *ptsHlcr* operon inactivates PTS causing poor growth on this sugar; nonetheless, fast growing mutants on glucose have been isolated (PB12 PTS⁻Glc⁺ strain). These strains have been used for the production of aromatic compounds; however, there are no reported studies concerning the growth potential of strains lacking PTS in mixtures of different carbon sources to enhance the production of aromatics compounds.

In this report it was demonstrated that strain PB12 is capable of cointilizing mixtures of glucose-arabinose, glucose-gluconate and glucose-glycerol. This capacity increases its specific growth rate (μ) given that this strain metabolizes more moles of carbon source per unit time. The presence of plasmids pRW300*aroG^{fbr}* and pCL*tktA* reduces the μ of strain PB12 in all mixtures of carbon sources, but enhances the productivity and yield of aromatic compounds, especially in the glucose-glycerol mixture, as compared to glucose or glycerol cultures. No acetate was detected in the glycerol and in the glucose-glycerol batch fermentations.

A transcriptional study of central metabolic genes in the strain PB12/pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA* (PB12T) grown on the glucose-glycerol mixture was performed, with the goal of understanding the mechanisms responsible of the enhanced production of aromatic compounds in this mixture. An enhanced expression of the *talA* gene (9X) was detected in strain PB12T grown in the glucose-glycerol mixture as compared to the same strain grown on glucose. The underexpression of three genes of the glycolytic pathway (*pgi*, *gapA*, *pgk*) and some tricarboxylic acid cycle genes (TCA) (*gltA*, *icdA*, *sucAB*, *lpdA* y *mdh*) was detected.

These results suggest that the cointegration of glucose and glycerol enhanced the carbon flux towards E4P and fructose-6-phosphate (F6P) from glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and sedoheptulose-7-phosphate (S7P).

In order to understand in more detail the physiology of the PB12 derivative and the parental strain JM101 grown on glycerol, a proteomic-transcriptional study and kinetic-stoichiometric evaluation of some mutants -in the genes of the PEP-Pyruvate node (*poxB*, *ppc*, *pckA*, *pykA* and *pykF*)- of the strain JM101 grown on glycerol as sole carbon source, was performed.

The proteomic and transcriptomic studies of strain JM101 revealed overexpression of the genes (*glpF* and *glpK*) and overproduction of the proteins (GlpK and GlpD) involved in glycerol uptake, incorporation and metabolism of this carbon source. Important changes in the expression of the *lamB*, *malE*, *mglB*, *mglC*, *galP* and *glk* genes and in the production of MglB, LamB, MalE proteins of the *mal/lam*, *mgl/gal* systems and RpoS regulon (*poxB*, *fbaA*, *fbaB*, *pfkA*, *pfkB*, *pgi*) were detected. These results indicated that the strain JM101 grown on glycerol induced a stress carbon response.

Overexpression of the genes that produce and consume acetate (*poxB*, *pta*, *acs*), the genes of the glyoxylate shunt (*aceB*, *aceA*, *glcBC*) and the acetate transporter (*actP*), suggested that the strain produced acetate from pyruvate utilizing PoxB and simultaneously consumed this metabolite when growing on glycerol as the only carbon source. Consistent with this metabolic capacity, in the strain JM101 grown on glycerol, no acetate was detected, probably because this strain recycles acetate through the PoxB-Acs-glyoxylate shunt, in a “carbon preserving” mechanism. In agreement with this proposal, the genes coding for the pyruvate-dehydrogenase Pdh (*aceE*, *aceF* and *lpdA*) are slightly underexpressed in this strain growing on glycerol. Also, this result correlated with the apparent capability of acetate and glycerol cointegration in this strain in mineral media cultures. In accordance the JM101 derivative mutants with inactive *poxB* and *pckA* genes accumulate acetate and their μ are affected. In agreement, the underexpression of the *icd* and *lpdA* genes that code for IcdA and SucA respectively, allows the proposition that part of the carbon flux is reduced through the lower section of the TCA cycle, allowing carbon recycling through the glyoxylate shunt, since as mentioned the expression of the *aceB*, *aceA* and *glcB* genes is overexpressed. As a result, less carbon is lost as CO₂ in the lower section of the TCA cycle and carbon is recycled through gluconeogenic genes. Therefore this metabolic response is apparently responsible of a reduced carbon flux through the TCA cycle. In agreement with this proposition, during the growth of the strain JM101 on glycerol it appears that relatively low “4 carbon (C4)

metabolites" production through TCA occurs since the μ of this strain is enhanced in cultures grown on glycerol when succinate or malate are added to the cultures.

Indole detection in the strain JM101 grown on glycerol indicates an important carbon flux through the aromatic pathway. Indole a product of tryptophane degradation, is a signal molecule that activates Crl for modulating expression of certain genes of the RpoS-Crl regulon; however, a signaling role of this metabolite is no clear at this moment. It appears, as mentioned that when glycerol is used as a unique carbon source, a carbon stress recycling, preserving mechanism occurs. In addition genes of the RpoS regulon could be activated by indole, allowing a more adequate response to growth on carbon limited conditions.

Finally, *pykA* and *pykF* genes single inactivation were performed in the strain JM101 in order to increase PEP availability to enhance the aromatic compounds production using glycerol as carbon source. The strains JM101 Δ *pykA* and JM101 Δ *pykF* transformed with pJLBaroG^{fb}*tk*A improved the production of aromatic compounds as compared to the strain JM101 transformed with the same plasmid. The production of aromatic compounds in all the strains grown on glycerol was higher than the corresponding strains grown on glucose.

In this contribution, it has been demonstrated that the coultization of the glucose-glycerol mixture enhances the production of aromatic compounds in a strain lacking PTS by the high expression of the *talA* gene and the downregulation of certain glycolitic genes. Evidence of stress carbon responses, recyclement of acetate and RpoS action probably through indol signal during the grown of strain JM101 on glycerol, was detected for the first time. As far as we know, this is the first time that the inactivation of the *pykA* or *pykF* genes was used for enhancing the production of aromatic compounds from glycerol as unique carbon source in *E. coli* strains.

3. ANTECEDENTES

3.1 Importancia de la producción biológica de los compuestos aromáticos.

Los productos aromáticos tienen amplio uso en la industria química incluyendo farmacéuticos, solventes, pigmentos y suplementos alimenticios (L-fenilalanina, L-triptófano, L-tirosina, vainilla, ácido adípico, catecol, etc.*). La mayoría de los compuestos aromáticos son sintetizados a partir del benceno, compuesto derivado del petróleo, vinculado como causa de varios tipos de cáncer. Con la finalidad de encontrar alternativas para la producción del benceno, se han realizado trabajos para usar a microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*, para la producción de varios compuestos aromáticos.

Para que un proceso biotecnológico sea económicamente viable debe satisfacer dos condiciones importantes: el compuesto de interés debe sintetizarse con altos rendimientos respecto a la fuente(s) de carbono utilizada. La fuente de carbono por lo general es un azúcar como la glucosa que además de ser barata es una materia prima renovable; sin embargo, otras fuentes de carbono atractivas son los derivados de los compuestos lignocelulósicos (xilosa, arabinosa), y recientemente el glicerol pudiera ser atractivo debido a que es un subproducto de la síntesis de biodiesel [1,2].

En el caso particular de los compuestos aromáticos que son usados en formulaciones de medicamentos, se deben satisfacer los requisitos de configuración espacial (quiralidad) y pureza. Tal como es el caso L-shiquimato, que es usado como materia prima del medicamento "oseltamivir" el cual se comercializa con el nombre de *Tamiflu*® (Roche) [3]. Se conoce que el costo de purificar la mezcla racémica que produce la síntesis química del L-shiquimato, reduce costos en la extracción y purificación del L-shiquimato a partir del anís estrella (plantas de *Illicium*) [3]. En caso de un aumento en la demanda del oseltamivir y otros posibles antivirales, la producción de L-shiquimato a partir del anís estrella no cubriría las necesidades regionales de cada país.

Debido a lo anterior, en los últimos años en nuestro grupo de investigación se han orientado estudios para producir compuestos aromáticos a partir de materias primas renovables como glucosa, con alta eficiencia y con la quiralidad deseada usando a organismos como *Escherichia coli*. Es importante mencionar que actualmente el interés de nuestro grupo es obtener una cepa sobreproductora de L-shiquimato en medio rico; sin embargo la producción

* Catecol: materia prima para la producción de ácido adípico. Ácido adípico: materia prima del nylon 6,6. L-fenilalanina: materia prima del edulcorante *Aspartame*. L-triptófano: materia prima de aditivos de alimentos de animales, pastillas antidepresivas. L-tirosina: se usa como materia prima para la síntesis de L-DOPA, medicamento contra el Parkinson.

de compuestos en medio mínimo es aún más atractiva debido a que reduce drásticamente los costos purificación del producto (ver figura A). Para entender las estrategias que se han abordado para aumentar el rendimiento y productividad de los compuestos derivados de la vía del shiquimato (figura B), es necesario conocer sus precursores y su regulación.

La vía metabólica de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos consiste en una vía común nombrada también como vía del shiquimato (SHK) y en las vías terminales. Esta vía inicia con la condensación aldólica irreversible de eritrosa-4-fosfato (E4P) [derivado de la vía de las pentosas fosfato, PP] y del fosfoenolpiruvato (PEP) [derivado de la vía Emden-Meyerhoff-Parnas, EMP], la cual da origen al 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) y termina con el corismato (CHO) (figura B). Después de la síntesis del compuesto anterior, inician las llamadas vías terminales que permiten la biosíntesis de L-triptófano (L-trp), L-tirosina (L-tyr) y L-fenilalanina (L-phe). En *Escherichia coli* existen tres isoenzimas que catalizan la formación de DAHP [4,5], las cuales se denominan AroG, AroF y AroH y en general son llamadas DAHP sintasas. Estas enzimas están codificadas por sus genes estructurales homólogos (*aroG*, *aroF* y *aroH* respectivamente), los cuales están localizados en diferentes regiones del genoma [6]. Cada una de las enzimas es sensible de inhibición alostérica por su aminoácido aromático específico. La primera es retroinhibida por L-fenilalanina (0.1 mM), la segunda por L-tirosina (0.1 mM) y la última es inhibida parcialmente por L-triptófano. De lo anterior, se deduce, que el primer punto de control de la vía de los aminoácidos aromáticos, lo constituyen las DAHP sintasas. Sin embargo, para aumentar la productividad y el rendimiento de los compuestos de la vía del shiquimato es necesario redirigir y aumentar los flujos de carbono del metabolismo central hacia E4P y PEP [7,8]. Las estrategias para lograr lo anterior se mencionan en la sección 2.3.

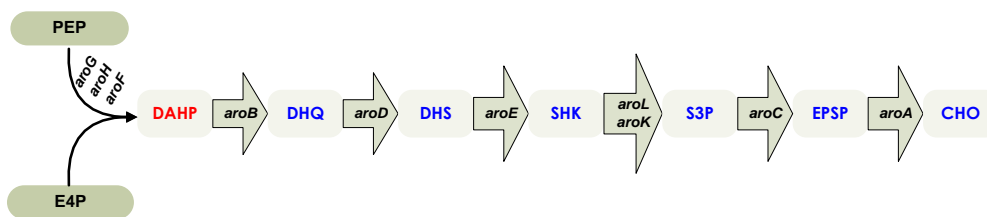


Figura A. Vía común de los aminoácidos aromáticos o vía del shiquimato. Las flechas representan los genes que codifican para las proteínas involucradas en las reacciones de la vía. DAHP: 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato 7 fosfato, DHQ (3-dehidroquinato), DHS (3-dehidroshiquimato), SHK (shiquimato), S3P (shiquimato 3-fosfato), EPSP (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato), CHO (corismato).

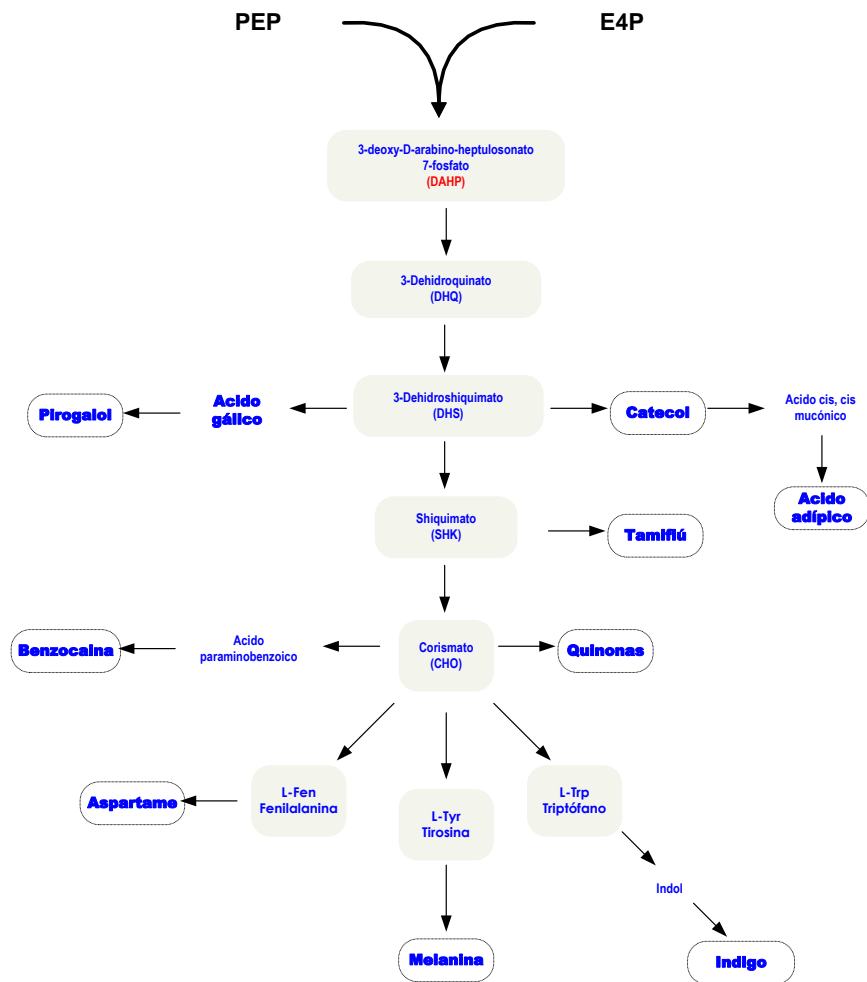


Figura B. Algunos de los productos derivados de la vía de biosíntesis los compuestos aromáticos. Los metabolitos en gris son intermediarios de la vía y los compuestos en blanco son los productos comerciales.

3.2 Consideraciones sobre la fisiología de la bacteria *Escherichia coli*

3.2.1 El sistema fosfoenolpiruvato-carbohidrato de transferencia de fosfatos (PTS) en *Escherichia coli*.

a) El transporte de carbohidratos en esta bacteria.

Los carbohidratos presentes en el medio de cultivo deben cruzar dos barreras hidrofóbicas antes de ser metabolizados, debido a que *Escherichia coli* y otras bacterias gram-negativas presentan dos membranas rodeando su citoplasma. Estas son llamadas membrana externa y

membrana del citoplasma. El espacio entre estas dos membranas se denomina periplasma. Para controlar los flujos de entrada y salidas de moléculas a través de estas barreras, la célula sintetiza proteínas que forman canales. Así, la membrana externa contiene aproximadamente 10^5 canales llamadas porinas [9]. Las proteínas OmpC y OmpF son las porinas más abundantes durante el crecimiento en condiciones de laboratorio ya que son los principales canales de entrada de la glucosa en concentraciones mayores de 0.2 mM [9,10]; sin embargo cuando la glucosa está presente en concentraciones submicromolares, se induce la síntesis de otra porina de la membrana externa llamada LamB, la cual también puede transportar maltosa, maltodextrinas y varios carbohidratos entre ellos glicerol. La difusión de los azúcares a través de las porinas es un proceso pasivo. Para que los carbohidratos crucen del periplasma a la membrana citoplasmática es necesario un transporte activo. El transporte de carbohidratos con fosforilación concomitante es realizado por el sistema PTS (figura F). Los carbohidratos o fuentes de carbono que son internalizados sin fosforilación son fosforilados con cinasas específicas del compuesto antes de metabolizarse; las permeasas responsables del transporte de este tipo de compuestos son llamadas de forma general permeasas no-PTS.

b) Descripción del sistema PTS.

El sistema PTS está involucrado en el consumo y fosforilación concomitante de varios carbohidratos y algunos alcoholes (tabla 1). Dentro la familia de transportadores el sistema PTS pertenece al grupo de los translocadores. Este sistema está ampliamente distribuido en bacterias y ausente en organismos del grupo Archaea y Eucariotes [11,12]. El sistema PTS en *Escherichia coli* consiste de (figura C):

- Dos proteínas generales de PTS; enzima I (EI) y la proteína acarreadora HPr rica en histidinas, codificadas por los genes *ptsHI*. Estas proteínas participan en la fosforilación de todos los carbohidratos tipo PTS.
- Permeasas azúcar-específicas de PTS, también llamadas enzimas II (EII); *Escherichia coli* cuenta con 21 complejos enzimáticos tipo II para el transporte de diferentes azúcares. Por ejemplo, para el transporte de glucosa se requiere del componente soluble IIA (EIIA^{glc}) y la proteína IICB que consta de un dominio soluble y un dominio integral de membrana. Estas proteínas están codificadas en los genes *crr* y *ptsG* respectivamente.

Una característica esencial del sistema PTS es que la cadena de transferencia del grupo fosfato empieza con la donación del grupo fosforil por el PEP a la enzima EI, procede vía HPr

y de ahí el grupo fosfato es donado al transportador carbohidrato específico, que para el caso del transporte de glucosa consta de la enzima hidrosoluble EIIA^{glc} y finalmente a la enzima EIIBC (figura C). Los carbohidratos fosforilados son metabolizados inmediatamente. El sistema PTS está involucrado también en los procesos de represión catabólica y quimiotaxis, en *Escherichia coli*. Las cepas que tienen mutado los componentes EI y HPr no pueden crecer en ningún sustrato PTS [11]. Sin embargo, ya que el sistema EII es específico para cada sustrato, las mutantes carentes de este componente son incapaces de crecer en el sustrato específico de la enzima. También se ha reportado que cepas carentes del sistema PTS son capaces de crecer en sustratos no PTS, debido a la regulación que ejerce el componente EII en el metabolismo, el cual se discutirá adelante [11].

Tabla A. Enzimas tipo EII / EIII y sustratos del sistema PTS

Enzima II/III	Sustrato
II ^{Nag}	<u>N-acetilglucosamina</u>
II ^{Glc} / III ^{Glc}	<u>Glucosa</u> , metil α -glucósido, α -glucósido, tioglucosa, glucosamina, sorbosa, manosa, 2-deoxyglucosa
II ^{Man} / III ^{Man}	<u>Manosa</u> , glucosa, 2-deoxyglucosa, fructosa, N-acetilglucosamina, metil- α -glucósido.
II ^{Fru} / III ^{Fru}	<u>Fructosa</u> , glucosa, sorbosa, xilitol
II ^{Gat}	<u>Galactitol</u> , glucitol
II ^{Gut} / III ^{Gut}	Glucitol, galactitol, manitol, fructosa
II ^{Mtl}	Manitol, glucitol
II ^{Bgl}	β -glucósidos, glucosa, metil- α -glucósido
II ^{Scr} / III ^{Glc}	Sacarosa
II ^{Lac}	Lactosa
II ^{Sor}	Sorbosa
II ^{Dha}	Dihidroxiacetona

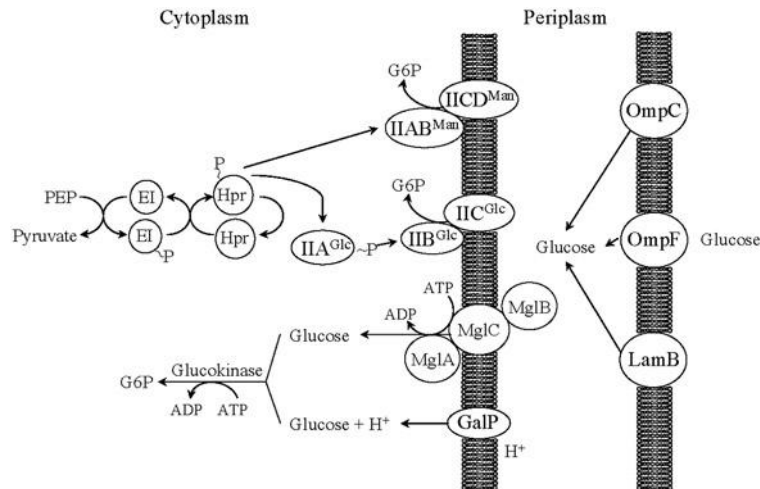


Figura C. Organización del sistema PTS. Las proteínas generales de PTS son EI y HPr. Las proteínas azúcar específicas son las EII. La figura muestra tres de los diferentes EII, para manitol (Mtl), glucosa (Glc) y manosa (Man). El componente EII, puede consistir en una proteína con varios dominios o en varias proteínas, donde al menos una es integral de membrana [11,13].

c) El Sistema PTS y su relación con la represión catabólica.

El término represión por catabolito (CR, por sus siglas en inglés) se usa actualmente para describir un fenómeno que ocurre en todos los microorganismos, donde la presencia de una fuente de carbono en el medio puede reprimir la expresión de ciertos genes y operones relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas [14]. Este fenómeno fue estudiado extensivamente por J. Monod en 1940, quien observó que cuando a una cepa de *E. coli* se le provee de lactosa y glucosa simultáneamente en el medio de cultivo, el microorganismo consume glucosa y sólo cuando se ha terminado esta fuente de carbono, comienza a metabolizar lactosa (Monod 1942) [15]. Monod nombró a este comportamiento crecimiento diaúxico. Recientemente el término represión por catabolito se empezó a utilizar para describir el fenómeno donde la presencia de ciertos compuestos en el medio (ya sean fuentes de carbono o de nitrógeno) puede reprimir la expresión de ciertos genes u operones

[11,16-18]. Aunque la finalidad es reducir la expresión ciertos genes, el mecanismo de represión puede ser diverso. La presencia de la fuente de carbono represora es responsable de concentraciones mas bajas de inductores específicos de las vías alternativas de catabolismo, altera las actividades de reguladores específicos, o participa en la activación de proteínas de control global, tales como la proteína activadora de genes catabólicos (CAP, por sus siglas en inglés; también nombrada CRP). A continuación se presentan los mecanismos de represión catabólica mencionados y su relación con el sistema PTS, particularmente con el componente EIIA^{glc}.

c.1) Mecanismo que evita la inducción específica de los genes involucrados en el catabolismo de carbohidratos.

Este mecanismo también es llamado exclusión de inductor. Cuando un sustrato tipo PTS, como la glucosa se encuentra presente en el medio, el grupo fosfato proveniente de PEP es donado finalmente al azúcar entrante, por lo que la enzima EIIA^{glc} se encuentra predominantemente en su estado no fosforilado. Esta forma de la enzima se une a las permeasas no PTS, y como consecuencia se inhibe el transporte y la formación de los inductores de estos azúcares, por ejemplo alolactosa para la inducción de *lac*. Debido a la falta de inductores específicos, los operones respectivos permanecen en estado reprimido. Además la enzima EIIA no fosforilada también se puede unir al glicerol quinasa evitando la formación de glicerol 3-fosfato, el inductor de los genes catabólicos de glicerol [11,19]. Por otro lado el estado fosforilado de EIIA^{glc} (EIIA^{glc}-P) previene su unión a las proteínas blanco. Este tipo de mecanismo es el que ocurre en los llamados carbohidratos no PTS entre ellos lactosa, melobiosa, maltosa y glicerol.

c.2) Mecanismo de control transcripcional con reguladores globales.

En *Escherichia coli*, la proteína CRP activa la transcripción de mas de 100 promotores involucrados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa. CRP también en algunos casos está involucrado en mecanismos de represión. El proceso de activación de la transcripción por CRP es la siguiente: la proteína CRP, es un homodímero, que tiene un cambio conformacional cuando se une a su efector alostérico AMPc y por lo tanto se une eficientemente a secuencias específicas localizadas cerca o dentro de promotores para regular la trascrición [20]. De lo anterior se infiere que la regulación global por CRP depende de la cantidad intracelular de AMPc y a su vez de los niveles de CRP. Los niveles de AMPc son controlados por la actividad de la adenilato ciclasa (Cya), y la actividad de esta enzima se inhibe por EIIA^{glc}, mientras que EIIA^{glc}-P es un activador de Cya [11,19]. Hasta hace poco, el papel de EIIA^{glc}-P como activador de Cya estaba basado principalmente

en argumentos genéticos; sin embargo Krin y col. (2002) lograron demostrar que solamente el componente EIIA^{glc} del sistema PTS interactúa con Cya [21]. En este estudio se descubrió que el estado no fosforilado y fosforilado del componente EIIA^{glc} puede interactuar con Cya; sin embargo ambos estados de fosforilación no ejercen regulación sobre la actividad de Cya. Solamente en presencia del extracto de *Escherichia coli* el componente EIIA^{glc}-P ejerce actividad sobre Cya. Los autores proponen que la regulación de Cya es en conjunto EIIA^{glc}-P y un factor regulatorio presente en el extracto que aún se desconoce. Se ha reportado que CRP también controla la expresión de genes estructurales de reguladores globales como Fis [22] o contribuyendo a la selectividad del factor σ [23]. Además varios reguladores de genes glicolíticos y gluconeogénicos y genes relacionados con el metabolismo de la glucosa son controlados por otros factores transcripcionales: Cra (FruR) y Mlc [18].

c.3) Cascada de señales que modulan la represión catabólica.

De la descripción anterior es obvio que el estado de fosforilación de EIIA^{glc} es lo que determina principalmente muchas respuestas regulatorias en *Escherichia coli*. De hecho ya que EIIA^{glc} y EIIA^{glc}-P son parte de la cadena PEP-PTS, los defectos en cualquiera de las dos componentes aboliría la represión catabólica en *E.coli*. La relación EIIA^{glc} / EIIA^{glc}-P se ajusta de acuerdo a la disponibilidad del azúcar considerando el transporte por PTS. Por ejemplo cuando la glucosa es transportada, el grupo fosforil de EIIA^{glc}-P es enviado al azúcar entrante vía EIICB^{glc}, el principal transportador de glucosa de PTS. De igual manera cualquier azúcar PTS pudiera afectar indirectamente el estado de fosforilación de EIIA^{glc} drenando los grupos fosfatos al azúcar entrante. Este escenario, no provee una explicación para la fuerte represión catabólica de carbohidratos no PTS tales como glucosa-6-fosfato. Sin embargo, la glucosa 6-fosfato y varios azúcares no PTS causan la defosforilación de EIIA^{glc} en varios grados [24,25]. Para explicar este resultado inesperado, varios autores proponen que la relación PEP/piruvato está involucrada en el control del estado de fosforilación de EIIA^{glc}. La relación PEP/piruvato está influenciada por el metabolismo de carbohidratos. Si la enzima EIIA^{glc}-P es un efector de la adenilato ciclasa, la defosforilación de EIIA^{glc} resulta en una baja producción de AMPc. Sin embargo la relación de cantidad de AMPc a EIIA^{glc}-P no están correlacionados [24]. Estos resultados cuestionan el modelo regulatorio simplificado [26]. En este sentido también están los resultados de Flores et al 2005a, que demostraron que en la cepas PTS⁻, parece que existe suficiente AMPc para inducir la expresión de muchos genes y operones regulados por este metabolito. En *Escherichia coli*, pareciera que existe un factor adicional para la regulación de la adenilato

ciclasa que pudiera estar supliendo el papel del componente EIIA^{glc} en cepas PTS⁻ el cual no se conoce [27,28].

3.3 Estrategias de la ingeniería metabólica para aumentar la producción de los compuestos aromáticos en *Escherichia coli*.

3.3.1 Consideraciones sobre los metabolitos E4P y PEP.

La velocidad y rendimiento de la producción de un metabolito está limitada en última instancia por la capacidad de canalizar los flujos metabólicos del metabolismo central hacia la vía biosintética deseada [7]. El primer objetivo para la producción de compuestos aromáticos es la redirección de E4P y PEP para favorecer e incrementar la síntesis de DAHP. Esto se logra aumentando la actividad de la primera enzima de la vía. Debido a que las DAHP sintasas son inhibidas en actividad y concentración, se deduce la importancia de trabajar con versiones de las DAHP sintasas insensibles a retroinhibición y que puedan ser sobreexpresadas. Con ese objetivo, los trabajos realizados por Draths y col. (1992) [8], resaltaron la necesidad de sobreexpresar la DAHP sintasa insensible a inhibición por fenilalanina *aroG^{fbr}* (fbr, feedback resistant). Sin embargo, la alteración de esta enzima tiene un efecto marginal en el rendimiento y productividad de DAHP. Por otro lado, varios estudios han reportado que la E4P es limitante en la velocidad de síntesis de DAHP, pero no es la limitante del rendimiento, en cultivos con glucosa [7,29]. Lo anterior se confirmó mediante análisis estequiométricos, como se muestra más adelante. Por otro lado, aunque la transaldolasa (TalA) en principio tendría la misma función para generar E4P en cultivos con glucosa, se ha establecido que es menos eficiente que la transcetolasa A (TktA) para aumentar la productividad de DAHP. Sin embargo, el resultado de este trabajo y el publicado por Chen y col. 2011 [30] indican que el papel de las transcetolasas A y B también son importantes para aumentar la producción de compuestos aromáticos después de que el gene *tktA* se ha sobreexpresado [30] (figura D).

3.3.2 Análisis de las redes y flujos metabólicos para la canalización de flujos a la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos.

El segundo acercamiento es mediante el análisis de la red metabólica de interés, con un enfoque estequiométrico. Lo anterior permite evaluar los flujos óptimos y sub-óptimos y determinar los genes dispensables [31,32]. Los productos de los genes dispensables son en un principio aquellos que compiten por el metabolito de interés y por tanto limitan el redireccionamiento de los flujos. Es importante resaltar que el análisis estequiométrico no toma en cuenta necesariamente la regulación implícita en un sistema fino como lo es el

metabolismo central. Por tanto no predice la extensión de los cambios fisiológicos del organismo al eliminar algún gen. Lo anterior es particularmente cierto en el caso de modificaciones al metabolismo central, que provee de precursores y energía para la biosíntesis. Por lo anterior éstos cambios pueden causar severas perturbaciones fisiológicas. Los análisis de los flujos metabólicos planteados para la vía aromática, se basaron en trabajos realizados por Schuster y Schuster [31,32], los cuales fueron adaptados primeramente por Liao y col. (1996) [33]. Usando este acercamiento, se examinaron las reacciones que convierten las fuentes de carbono en compuestos aromáticos. Como se ha mencionado, el primer paso comprometido es la formación de DAHP; por ello, el objetivo es la canalización y condensación efectiva de E4P y PEP en este compuesto. En la figura E puede observarse que por cada dos moléculas de PEP generadas de la vía glicolítica, al menos una molécula de PEP es usada para transportar la glucosa a través del sistema PTS. El PEP se convierte en piruvato (PYR), después de que es desfosforilado para transportar a la glucosa. Así que de la inspección y análisis cuantitativo de las vías, resulta que el máximo rendimiento de DAHP a partir de glucosa es 43%. Por el contrario, evitando el flujo de PEP a piruvato el rendimiento podría incrementarse al doble (86%) (Figura F). Para reducir el flujo de PEP hacia compuestos no deseables se pueden usar varias estrategias como: a) usar mutantes carentes del sistema PTS b) usar azúcares tipo no PTS (glicerol, xilosa, arabinosa), c) reciclar el piruvato a PEP y d) reducir la formación de PYR vía las piruvato cinasas (PyK A,F). En la figura F se muestra la distribución de flujos para varias de las alternativas anteriores (Figura F).

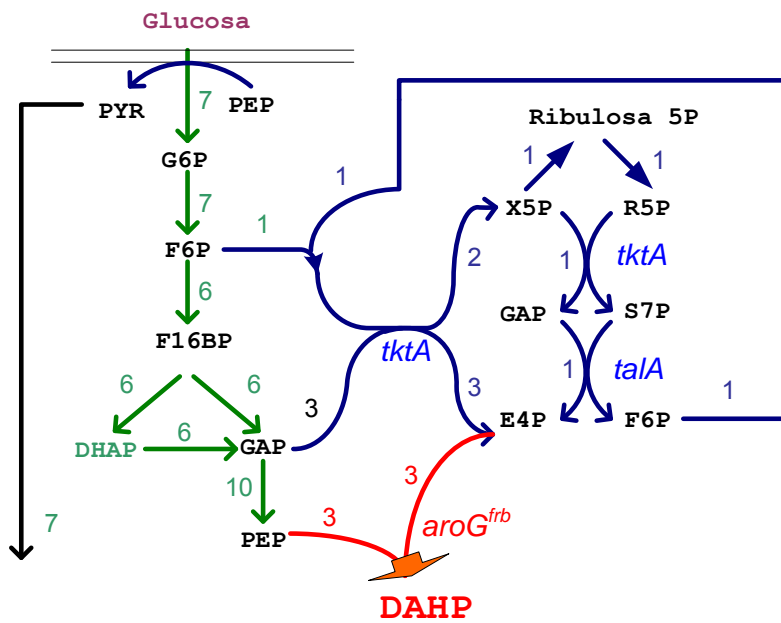


Figura D. Vía óptima y distribución de flujos para convertir glucosa a DAHP con el sistema PTS activo. Los números representan el valor de los flujos (en moles) a partir de cada compuesto.

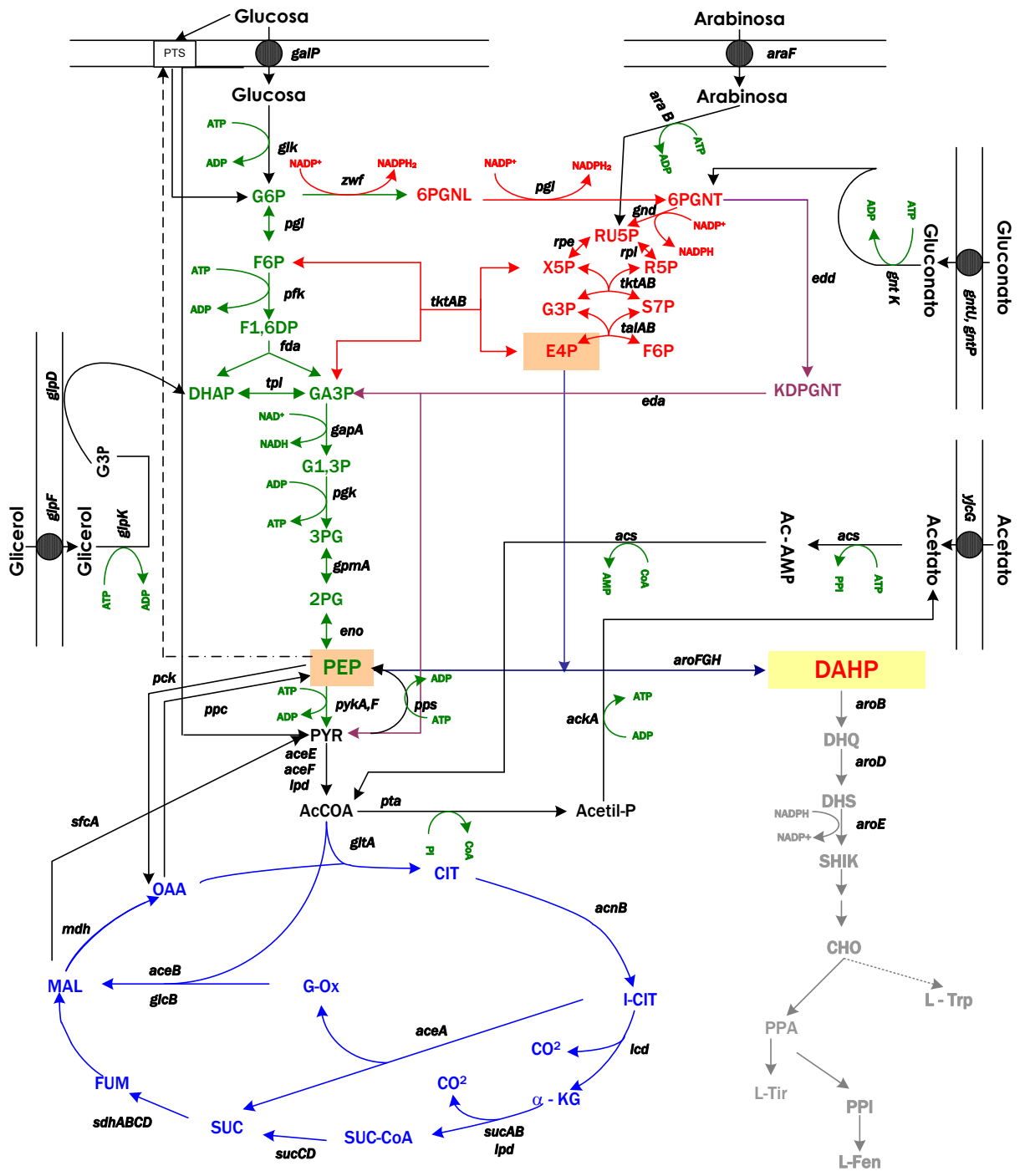


Figura E. Metabolismo central de *Escherichia coli* con las vías catabólicas de las diferentes fuentes de carbono y su relación con la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos. Abreviaciones: Gli, glicerol, Gly3P glicerol-3-fosfato, G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; PBP, fructosa-1,6-bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehído 3-fosfato; 1,3-BGP, 1,3-bifosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato; 2PG, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; 6PGLN, 6-fosfoglucono- δ -lactona; 6PGNT, 6-fosfogluconato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; S7P, pseudoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato; Ac-CoA, acetil-coenzima A; Ac-P, acetil-fosfato; A-AMP, acetil-AMP; CIT, citrato; ICT, isocitrato; GOX, glioxilato; α -KG, α -cetoglutarato; SUC-CoA, succinil-coenzima A, SUC, succinato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato.

2.3.3 Estrategias para aumentar la disponibilidad del PEP.

a) Eliminación del sistema PTS.

El PEP es usado por varias vías del metabolismo central (figura E), sin embargo, el mayor consumidor de PEP es el sistema PTS, ya que por cada dos moles producidas de PEP a partir de glucosa el sistema PTS utiliza una mol de PEP para translocar y fosforilar la glucosa en glucosa 6-fosfato. Por lo tanto, el rendimiento de los aminoácidos aromáticos está limitado ésta por la baja disponibilidad de PEP. Como ya ha sido señalado, partiendo de la necesidad de disponer de mayores concentraciones de PEP para redirigirse hacia la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos se han construido y caracterizado cepas carentes del sistema PTS ($\Delta ptsHlcr::kan$) figura E(2) [27,28,34,35]. Se demostró que la inactivación de PTS, tiene efectos positivos en la redirección hacia DAHP en una cepa que sobreexpresaba solamente *tktA* y *aroG^{fbr}* [34]. La cepa anterior acumula tres veces más DAHP que la cepa parental que tiene activo el sistema PTS. Por otra parte un estudio realizado por Báez y col (2001) [36], en un sistema de células en reposo con glucosa como fuente de carbono, con cepas isogénicas PTS⁺ y PTS⁻ que acumulan DAHP (cepas *aroB*), se obtuvo un 83% del rendimiento teórico con la cepa PTS⁻ y con una productividad 1.7 veces mayor. Es importante hacer notar que la delección del sistema PTS tiene efectos pleiotrópicos en la célula, en particular un crecimiento muy lento en glucosa como única fuente de carbono, que sólo se pueden comprender si se contempla y comprende el papel importante y global de este sistema en la regulación celular [17,19,24,24,37-39].

b) Eliminación de las piruvato cinasas (PykA y PykF).

En condiciones normales de crecimiento, el flujo glicolítico se dirige a la formación de piruvato a partir de PEP, por medio de las dos piruvato cinasas PykA y PykF (Pyks) presentes en *Escherichia coli* que tienen papeles diferentes cuando se crece en glucosa [40] (figura E). Un estudio por resonancia magnética nuclear realizado por Flores y col. [35], demostró que una cepa silvestre de *Escherichia coli* dirige 23% del PEP formado hacia PYR por medio de las piruvato cinasas. Por otro lado en una cepa carente del sistema PTS, las Pyks pueden llegar a dirigir hacia PYR el 73% del PEP producido. El estudio realizado por Gosset y col [41], abordó el efecto de las mutaciones de *pykA*, *pykF*, y de ambos genes, sobre la acumulación de DAHP, en cepas que tenían funcional o no el sistema PTS. Los experimentos llevados a cabo en cultivos por lote con medio rico con glucosa, demostraron que la eliminación de ambas piruvato cinasas en un fondo PTS⁻, junto a la sobreexpresión de *tktA* y *aroG^{fbr}*, se obtenía 3.4 veces mas acumulación de DAHP por peso seco de células que

la cepa con el mismo fondo pero con las Pyks activas. Por otra parte estudios realizados con una cepa con fondo PTS⁻ PykA⁻ PykF⁻ en medio mínimo en un sistema de células en reposo indica que la inactivación de ambas enzimas aumenta el consumo específico de glucosa pero no aumenta la producción de L-fenilalanina. Lo anterior probablemente es debido a que la cepa en ausencia de las Pyk no genera suficiente ATP a través de la vía de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Tesis maestría de Adriana Cortázar, 2005) [42].

c) Reciclamiento del PYR a PEP.

La enzima gluconogénica fosfoenolpiruvato sintetasa (PEP sintetasa, Pps) convierte piruvato en fosfoenolpiruvato, con el gasto de dos enlaces de alta energía del ATP. Esta enzima es necesaria en cultivos con piruvato, lactato o acetato como fuentes de carbono. La sobreexpresión de esta enzima (30 veces) en una cepa silvestre de *Escherichia coli* en cultivo en lote causa inhibición del crecimiento de la célula [43]. Esto aparentemente se debe a que se genera un ciclo fútil, ya que el sistema PTS sensa altas concentraciones de PEP estimulando al doble el catabolismo de glucosa, saturando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), y consecuentemente generando subproductos como piruvato y acetato. Para evitar el fenómeno anterior, Liao y col (1994) [29], realizaron el estudio con una cepa silvestre, en un sistema de células en reposo. La coexpresión de los genes *pps*, *tktA* y *aroG^{fbr}* aumentaron el rendimiento de DAHP (90% del teórico) en cultivos con glucosa. Por otro lado Yi y col. (2003) [44] sobreexpresaron los genes anteriores en una cepa mutante del sistema PTS, y sobreexpresando el facilitador de glucosa (Glf) de *Zymomonas mobilis* en cultivo en batch logrando una producción con un rendimiento de 90% de DAHP. Los estudios anteriores confirmaron que la disponibilidad PEP es limitante en el rendimiento. Una de las desventajas de sobreexpresar el gene *pps* es que impone una carga metabólica adicional a la célula.

d) Uso de azúcares que no son transportados por el sistema PTS.

La internalización de azúcares no PTS como arabinosa, xilosa y glicerol es mediada por permeasas de alta afinidad dependientes de ATP o por difusión facilitada. Una vez traspasada la membrana citoplásmica los azúcares son fosforilados por cinasas específicas para cada azúcar, a expensas de ATP. La arabinosa y xilosa, tienen un rendimiento molar teórico de DAHP del 71%, aún sin reciclamiento del piruvato. Uno de los primeros estudios para analizar la producción de precursores de la vía con azúcares no PTS, fue el realizado por Patnaik y col. [29]. Estos estudios fueron realizados en un sistema de células en reposo y con el gen *aroB* inactivo. Esta cepa por lo tanto acumula DAHP en el medio. Fue demostrado

que en presencia de xilosa, y con la sobreexpresión de *aroG^{frb}* se alcanzó el máximo teórico (71%). La sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas Pps y TktA no tuvieron efecto en rendimiento y tampoco en la productividad. Aunque se esperaba que Pps no tuviera ningún efecto, la falta de sobreexpresión del gene *tktA* para el aumento de DAHP, fue un hecho inesperado. Aparentemente al usar xilosa como fuente de carbono, existe una mejor distribución del carbono entre PEP y E4P. Un estudio realizado por Li y col. (1999), comparando el rendimiento de compuestos aromáticos (DHS, DHQ, DAH y ácido gálico) en cultivos por lote alimentado y sobreexpresando solamente *aroG^{frb}* confirmaron que en estas condiciones el rendimiento es mayor en arabinosa y xilosa respecto a glucosa [45]. La sobreexpresión de los genes *aroG^{frb}* y *tktA* en plásmidos aumentaron el rendimiento solamente en el cultivo con glucosa [45] .

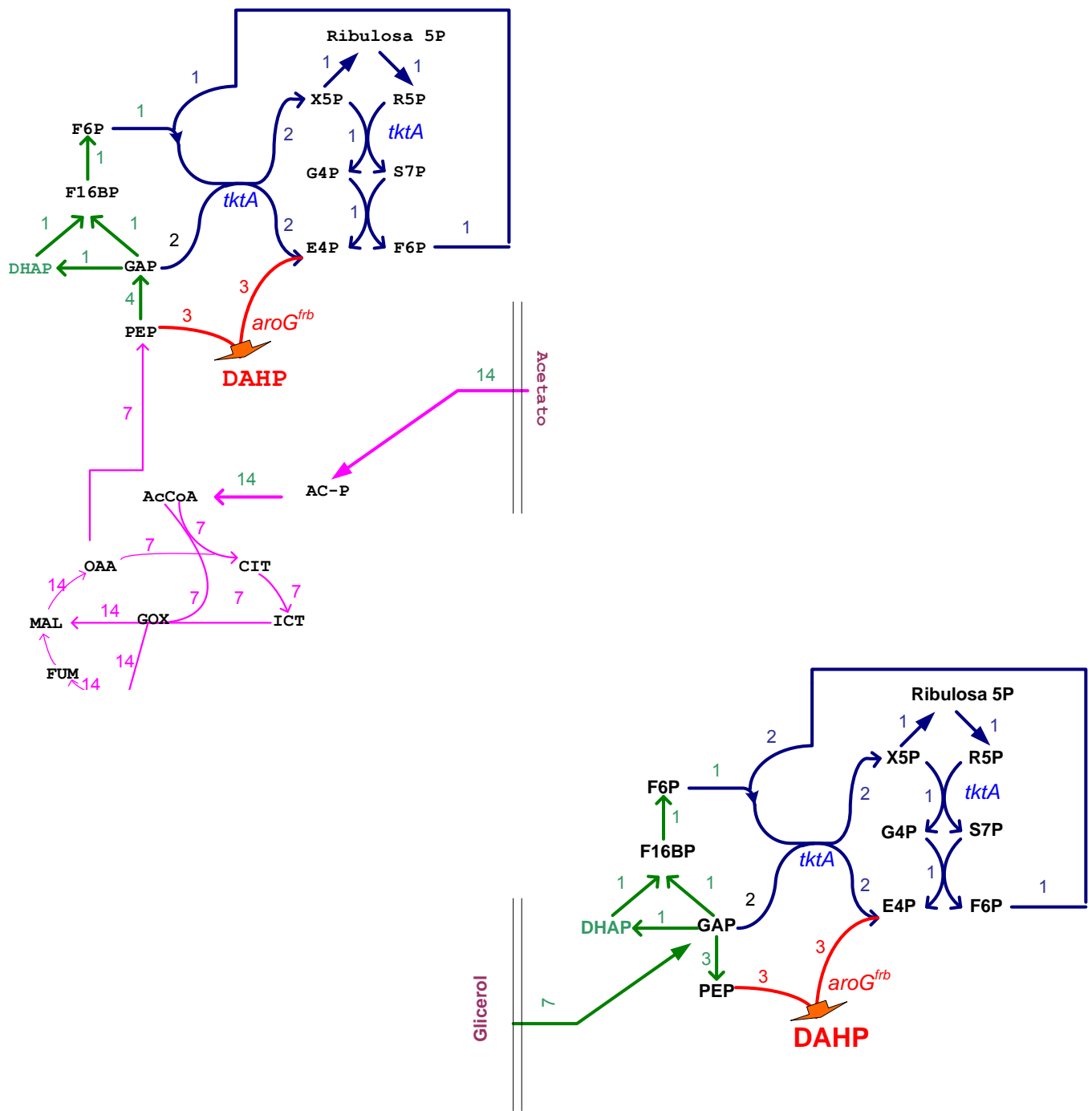


Figura G. Cálculo realizado en éste trabajo para determinar el rendimiento máximo teórico cuando se utilizan acetato y glicerol como fuentes de carbono. El rendimiento es igual a la relación de las moles dirigido hacia DAHP sobre las moles totales de la fuente de carbono.

4. INTRODUCCION

4.1 Caracterización fisiológica de la cepa PB12 de *Escherichia coli* obtenida por evolución adaptativa, sobreproductora de compuestos aromáticos.

a) Aislamiento de la cepa PB12 en un proceso de evolución adaptativa a partir de la cepa PB11 carente del sistema PTS, derivada de la cepa silvestre JM101.

La cepa PB11 fue obtenida a través de la inactivación del operón *ptsHlcr* en la cepa silvestre JM101. La cepa PB11 disminuyó severamente su crecimiento en glucosa respecto a la cepa JM101 (0.11 vs 0.72 hr⁻¹). Por lo anterior se decidió someter a la cepa PB11 a un proceso de evolución adaptativa en quimiostato. El proceso consistió en crecer a la cepa PB11 en un fermentador con medio mínimo y 0.2% de glucosa. Cuando la cepa alcanzó aproximadamente la densidad óptica de 2.5 se inició la alimentación de M9 fresco una velocidad de 0.52 L/hr. A este flujo se lavaron todas las células que no podían crecer a una velocidad mayor a 0.4 hr⁻¹. Después de tres volúmenes de residencia se incremento el flujo en 0.1 L/hr. PB12 se obtuvo del primer proceso de lavado [27,34].

b) Caracterización inicial de la cepa PB12.

Como se ha mencionado, la derivada PB12 se obtuvo a partir de PB11 por adaptación evolutiva en quimiostato. La cepa PB12 ha recuperado la capacidad de crecer en glucosa ($\mu = 0.42 \text{ hr}^{-1}$), pero crece a menor velocidad que la cepa silvestre JM101 ($\mu = 0.71 \text{ hr}^{-1}$) [28]. Una caracterización preliminar de la cepa PB12 demostró que utiliza GalP y Glk para transportar y fosforilar la glucosa [27,28,34,46,47]. Sin embargo el incremento en la transcripción de los genes *glk* y *pgi* los cuales codifican para las enzimas glucoquinasa (Glk) y fosfoglucosa isomerasa (Pgi), sugerían que en la cepa PB12 existían mutaciones que permitían transformar glucosa en fructosa 6-fosfato y como consecuencia de esto la capacidad de dirigir mayor flujo de esqueletos de carbono a la vía de la glucólisis. El trabajo de Flores y colaboradores [37] relacionado con el análisis del transcriptoma de 100 genes de la cepa demuestra que en PB12 existe un conjunto de genes cuya transcripción ha sido incrementada con relación a la cepa silvestre. Entre estos genes se encuentran como ya se señaló *glk*, *pgi* y varios genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de la lanzadera de glioxilato.

Por otro lado, el estudio de Flores y colaboradores (2002) [47], utilizando espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR) demostró que los flujos de carbono en la PB12 con respecto a la cepa progenitora PB11PTS⁻ y la silvestre eran diferentes. En particular

en el primer paso de la glicólisis donde la cepa PB12 tiene un flujo de 93.1% comparado con la cepa silvestre de 76.6%. Entre otros cambios relevantes en los flujos de carbono se encuentran: la reducción de 22.3% a 5.3% en el primer paso del brazo oxidativo de la pentosa 5-fosfato de la cepa mutante con respecto a la silvestre. En la cepa PB12 el brazo de síntesis de la ribosa 5-fosfato es compartido con la fosfogluconato-deshidrogenasa (Pgd) y el brazo no oxidativo de las pentosas fosfato. Por otro lado el flujo de piruvato a acetil coenzima A aumentó dos veces en la PB12 con respecto a la silvestre. En PB12 hay ausencia del flujo a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboquinasa (Pck) en la cepa silvestre es de 7.7%.

c) Caracterización de la cepa a nivel de secuenciación nucleotídica del genoma y estudio de algunas mutaciones importantes ocurridas en la cepa PB12.

Inicialmente en la cepa PB12 se detectaron dos mutaciones, en los genes *arcB* y *rpoS*. Cabe recordar que el sistema ArcA-ArcB es un sistema de dos componentes que reprime la transcripción de genes involucrados en la respiración aeróbica y activa operones que codifican para enzimas microaeróbicas o fermentativas en respuesta a las condiciones redox. En el metabolismo central, ArcA reprime la expresión de genes del ciclo de TCA y de la lanzadera de glioxilato en condiciones de limitación de oxígeno. En condiciones de crecimiento anaerobio, ArcB se autofosforila y cataliza la transfosforilación de ArcA; en ese estado ArcA reprime los genes regulados por esta proteína. En crecimiento aeróbico, la forma oxidada de las quinonas inhibe la fosforilación de ArcB [48]. La mutación en *arcB*, cambió un residuo de Tyr por uno de Cys en la segunda región transmembranal de la proteína codificada en este gen [49]. Inicialmente se pensó que esta mutación podría estar afectando la autofosforilación de ArcB, por lo cual esta proteína podría estar afectando la fosforilación de ArcA y ésta pudiera estar uniéndose deficientemente a las regiones reguladoras y aumentar la transcripción de los genes reprimidos por ArcA, sin embargo nuevos resultados sugieren que en realidad la mutación en ArcB se seleccionó para que este “sensor” fuera parcialmente insensible a los estímulos que desfosforilarían a ArcA y que le impedirían actuar como regulador negativo ante la sobreexpresión de estos genes debido a la pérdida de *rppH*, como se menciona más adelante (Aguilar *et al.*, manuscrito en proceso). Lo anterior es congruente con una ligera sobreexpresión de los genes de TCA en la cepa PB12. Otra mutación detectada en la cepa PB12 fue en el gen *rpoS*, [50]. Este gen codifica para el factor sigma S, el cuál es el regulador maestro de la respuesta a estrés, y está involucrado en la transcripción de varios genes para que se expresan en fase estacionaria y/o en condiciones de limitación de glucosa.

Por otra parte el compuesto ppGpp es una molécula señalizadora que refleja el estado energético de la célula; bajos niveles de ppGpp generan una serie de señales que indican una limitación de nutrientes y por tanto la transcripción de éstos por *rpoS*. En este gen se detectó una mutación puntual que genera un codón de paro (TCG por TAG) en el nucleótido 98 el cuál generaría un péptido incompleto. A éste tipo de codón de paro se le conoce como tipo ámbar. Sin embargo, ciertas cepas de *E. coli* que poseen una mutación en el gene *supE* (que codifica para un RNA de transferencia) pueden reconocer el codón de paro ámbar e incorporar una glutamina [51]. La cepa JM101 posee la mutación en dicho gen por tanto su derivada PB12 podría suprimir al menos parcialmente este tipo el codón de paro [27]. Cabe mencionar que durante la secuenciación del genoma de la cepas parental y derivadas PTS⁻ se pudo detectar que la mutación mencionada ya estaba presente en la cepa JM101. Cuando se inactiva *rpoS* en la cepa PB11 se disminuye la μ de la cepa en glucosa en medio mínimo, esto resultado indica que el gene es funcional. Recientemente se ha secuenciado completamente el genoma de la cepa PB12 usando dos metodologías de las compañías Nimblegen Inc e Illumina Inc. En ambas metodologías se coincidió en la detección de 21 mutaciones puntuales no sinónimas en genes estructurales y entre ellas genes 8 en genes reguladores. Uno de los resultados mas relevantes de este estudio fue el encontrar una deleción en la cepa PB12 de un fragmento cromosomal de aproximadamente 10 kb. En esta región cromosomal deletada se localizan los genes *galR*, *mutH* y *rppH*. *galR* es uno de los represores del gene *galP* (GalP) que codifica para el transportador de galactosa y que es usado por las cepas PTS⁻ para transportar glucosa. Esta mutación explica que la expresión de *galP* sea constitutiva en las cepas PTS⁻ derivadas de PB11. *rppH* codifica para la RNAsa RppH que inicia la degradación del mRNA mediante la hidrólisis del extremo 5' trifosfatado a monofosfatado la cual propicia posteriormente, la degradación del mensajero por la RNAsa E. La inactivación de este gene en la cepa PB11PTS⁻Glc⁻ aumenta su μ en un 261% por lo cual se propone que la perdida de este gene también fue ventajosa y por lo tanto fue seleccionada. De lo anterior se deduce que al no existir esta nucleasa en PB12, los niveles de los RNA mensajeros de varios genes son mas estables y por lo tanto se encuentran en concentraciones superiores en la cepa evolucionada con respecto a las cepas parentales PB11 y JM101 (Aguilar et al., manuscrito en proceso). Por otra parte, como ya se señaló se detectaron mutaciones puntuales en genes reguladores de la cepa PB12. Además de las mutaciones en *arcB* y *rpoS* se detectaron otras en *barA*, *rpoD*, *rna* y en otros *locis* que codifican para reguladores putativos: *yjjU*, *rssA* y *ypdA*. *barA* "bacterial adaptative responses", codifica para la proteína sensora histidina quinasa del sistema de dos componentes BarA-UrvY BarA activa a UrvY el cual activa la expresión de los genes no

codificantes *csrB* y *csrC* los cuales a su vez regulan negativamente a *csrA*. La cinasa sensora *barA* es estimulada fisiológicamente por formato, acetato, propionato y otras fuentes de carbono. CsrA es un regulador global, que regula postranscripcionalmente la expresión de genes de metabolismo central, motilidad, formación de biofilmes, virulencia y patogénesis. De forma interesante, CsrA regula antagonísticamente glicólisis y gluconeogénesis, ya que la primera es regulada positivamente y la segunda negativamente. La modificación de *barA* podría haberse generado para favorecer la glicólisis aun en condiciones gluconeogénicas. La inactivación de *barA* en la cepa PB12 disminuye su crecimiento en un 5%. Curiosamente al complementar la mutación en la una cepa PB12 Δ *barA* usando un plásmido de bajo número de copias, la cepa disminuye su μ en 14 %. Sin embargo este efecto no se puede atribuir exclusivamente a la acción de *barA* sino también al uso del plásmido.

d) Uso de la cepa PB12 para la producción de compuestos aromáticos.

La cepa PB12 se ha usado para producir compuestos aromáticos. Como ya ha sido señalado, partiendo de la necesidad de disponer de una concentración intracelular de PEP más elevado para la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos se han construido y caracterizado cepas carentes del sistema PTS(Δ *ptsHIcrr::kan*) [27,34,35,40,50], figura F(3). Se demostró que la delección de PTS, tiene efectos positivos en la redirección hacia DAHP en una cepa que sobrepresaba solamente *tktA* y *aroG^{fbr}* [34]. La cepa PB12 se ha usado como fondo genético para para la producción de L-fenilalanina en cultivos en reposo. La cepa PB12 transformada con un plásmidos para redirigir el flujo hacia aromáticos (pJLBaroG^{fbr}) y una versión insensible a retroinhibición de la corismatomutasa-prefenato deshidrogenasa (ev2) es capaz de producir L-fenilalanina con un rendimiento de 60% del teórico contrario a la cepa parental (JM101) con los mismos plásmidos produce 38% [52]. Actualmente varias derivadas de PB12 se emplean para estudiar la producción de L-shiquimato. Se ha reportado que con la cepa PB12*aroK⁻aroL⁻* transformada con los plásmidos *aroG^{fbr}*, *tktA*, *aroB* y *aroE* puede producir hasta 7 gr/L de compuestos aromáticos con un rendimiento de 0.29 mol/mol [53].

4.2 Importancia de las cepas insensibles a represión catabólica y del glicerol como fuente de carbono.

Como se mencionó, la glucosa es la fuente de carbono mas utilizada en los cultivos de *Escherichia coli* y otras bacterias. Sin embargo actualmente las fuentes de carbono que son de gran importancia son los que derivan de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos que contienen una mezcla de xilosa, arabinosa y glucosa. Alternativamente el glicerol ha

aumentado su importancia como fuente de carbono ya que es derivado de la biosíntesis del biodiesel [1,2,54]. Si los materiales que contienen mezcla de fuentes de carbono son usados para un cultivo por una cepa silvestre, la represión catabólica exhibida permitiría seleccionar la fuente de carbono donde más rápidamente crece dejando las fuentes de carbono no preferidas. Lo anterior se refleja en un mayor tiempo de fermentación, acumulación de subproductos que afectan la utilización de las fuentes de carbono siguientes. Lo anterior impacta en la productividad por lo que es de interés por contar con cepas que cutilicen mezclas de fuentes de carbono en forma simultánea. Un trabajo reciente analiza la capacidad de producción *in silico* de una cepa no modificada para la producción de compuestos aromáticos, y el glicerol fue la mejor fuente carbono [55]. Sin embargo estudios de ingeniería metabólica para la producción de compuestos aromáticos no han sido reportados.

Por lo anteriormente mencionado, en este trabajo estudiamos el potencial de cutilización de mezclas de fuentes de carbono de la cepa PB12 para incrementar la producción de compuestos aromáticos, la fisiología de la cepa PB12 transformada con los plásmidos pRW300 $aroG^{ibr}$ y pCL $tktA$ durante la producción de dichos compuestos en medio mínimo y el estudio del metabolismo de glicerol en la cepa parental JM101 para su posterior modificación en la producción de compuestos aromáticos.

5. HIPOTESIS

Mediante el uso de la cepa evolucionada PB12 carente de la represión catabólica pero de crecimiento rápido en glucosa, se podrán emplear mezclas de fuentes de carbono que podrían metabolizarse simultáneamente para aumentar la producción de compuestos aromáticos en crecimiento en medio mínimo. De lo anterior resulta relevante el estudio de la fisiología de esta cepa durante la producción de compuestos aromáticos en medio mínimo coutilizando diferentes fuentes de carbono.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Con base en el conocimiento sobre las cepas JM101 y su derivada PB12 que coutiliza ciertas mezclas de fuentes de carbono - por la ausencia del sistema PTS - seleccionar la mezcla de fuentes que incremente a mayores niveles la producción de compuestos aromáticos (DAHP, DHS, SHIK) en medio mínimo en cultivo por lote. Estudiar la fisiología bacteriana en las condiciones de producción.

6.2 Objetivos específicos

Primera fase

Definir las fuentes de carbono que coutiliza la cepa PB12 y analizar la producción de compuestos aromáticos en esta cepa y en derivadas con los plásmidos pCLtktA y pRW300aroG^{fbr} que permiten redirigir y canalizar el flujo de carbono hacia la vía de los aromáticos.

- Definir las fuentes de carbono que coutiliza la cepa evolucionada PB12. Seleccionar aquellas mezclas en las que se encuentre un aumento en la μ ; comparar y confirmar la coutilización de fuentes de carbono a través de la determinación de los patrones de consumo de éstas en las cepas JM101 y PB12. Además, evaluar en estas fermentaciones los parámetros cinéticos: rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$), el consumo específico de las fuentes de carbono (q_s) y producción de ácido acético.
- Definidas las mezclas de fuentes de carbono que coutiliza la cepa PB12, determinar en un sistema de células en reposo, con la cepa PB12aroB/pCLtktA, pRW300aroG^{fbr} los siguientes parámetros cinéticos: q_s , rendimiento del compuesto aromático DAHP ($Y = \text{DAHP}/\text{fuentes de carbono}$) y productividad específica de DAHP (q_{DAHP}).
- Usando la cepa PB12/pCLtktA, pRW300aroG^{fbr} (PB12T), evaluar el comportamiento de la producción de compuestos aromáticos en fermentador en las mezclas de carbono cuya mejor productividad y/o rendimiento se hayan obtenido en el sistema de células en reposo. Evaluar q_s , rendimientos (producto/sustrato) y productividades específicas de DAHP, DHS y SHIK (q_{DAHP} , q_{DHS} y q_{SHIK}).

Segunda fase

Estudio de la fisiología de la cepa PB12T crecida en la mezcla glucosa-glicerol, que fue la condición en la cual se obtuvo mayor producción de compuestos aromáticos

- Analizar por RT-qPCR la expresión de genes de transporte y metabolismo central (glicólisis, pentosas-fosfato, ciclo de los ácidos tricarboxílicos) de la cepa PB12T en medio mínimo con la mezcla glucosa-glicerol como fuentes de carbono.
- Medición de niveles de ATP/ADP⁺ y cofactores (NADPH₂/NADP⁺), (NADH₂/NAD⁺) de la cepa PB12T crecida en la mezcla glucosa-glicerol

Tercera fase

Estudio de la fisiología de la cepa silvestre JM101 crecida en glicerol.

- Analizar por RT-qPCR la expresión de genes de transporte y metabolismo central (glicólisis, pentosas-fosfato, ciclo de los ácidos tricarboxílicos) de la cepa JM101 crecida en glucosa y en glicerol como únicas fuentes de carbono.
- Medición de actividades específicas de algunas enzimas clave en la cepa JM101 crecida en glicerol como única fuente de carbono.
- Realizar geles de proteínas en electroforesis en 2 dimensiones e identificar proteínas (MALDI-TOF) diferencialmente producidas en la cepa JM101 crecida en glicerol respecto a glucosa como únicas fuentes de carbono.
- Realizar inactivaciones *tnaA* y *rpoS* y de genes clave del nodo PEP: *pckA*, *poxB*, *ppc*, *pykA*, *pykF*. Evaluar los parámetros estequiométricos y cinéticos en estas mutantes.

Cuarta fase

Ingeniería de vías metabólicas en la cepa JM101 para propiciar el aumento en la capacidad de producción de compuestos aromáticos usando como fuente de carbono glicerol.

- Usando la cepa JM101/pJLBaroG^{fbr}tktA, JM101ΔpykA/pJLBaroG^{fbr}tktA y JM101ΔpykF/pJLBaroG^{fbr}tktA crecida en glicerol, evaluar el comportamiento de la producción de compuestos aromáticos, rendimiento y productividades específicas de DAHP, DHS y SHIK (qDAHP, qDHS, qSHIK).
- Usando las cepas JM101-PtpiA(aroG,tktA,aroB,aroD), JM101ΔpykA-PtpiA(aroG,tktA,aroB,aroD) y JM101ΔpykF-PtpiA(aroG,tktA,aroB,aroD), evaluar el comportamiento de la producción de compuestos aromáticos, rendimiento y productividades específicas de DAHP, DHS y SHIK (qDAHP, qDHS, qSHIK).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas utilizadas para la determinación de los patrones de consumo y parámetros cinéticos en fermentador fueron la cepa silvestre JM101PTS⁺ y cepas isogénicas con inactivaciones en los genes *poxB*, *ppc*, *pck*, *pykA*, *pykF*, *rpoS* y *tnaA*. Otra cepa utilizada fue PB12PTS⁻Glc⁺. La cepa utilizada para el estudio de células en reposo fue la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ pero mutada en el gen *aroB*. Las características relevantes de las cepas y los plásmidos utilizados están descritas en las tablas 13 y 14.

7.2 Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante.

a) Extracción de ADN.

Para comprobar todas las mutaciones en los genes se extrajo el ADN cromosomal de las cepas candidatas de acuerdo a las instrucciones de QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA).

b) Transformación por ADN.

Las cepas se transformaron usando el método de electro-transformación [56].

c) Transformación por transducción.

Las derivadas de JM101 inactivadas en los genes *pckA*, *ppc*, *pykA*, *pykF*, *rpoS* y *tnaA*, fueron obtenidas por transducción con el fago P1 usando a las cepas de la colección Keio [57] inactivadas en los genes mencionados.

d) Mutagénesis del gen *aroB* con el método de Datsenko y Wanner.

Este método para interrumpir genes de *Escherichia coli* fue desarrollado por Datsenko y Wanner [58]. El procedimiento utiliza la recombinasa del fago λ , la cual es sintetizada en un plásmido de bajo número de copias (pKD46) curable por temperatura e inducida bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. El gen que se desea reemplazar se selecciona con un gen de resistencia a cloramfenicol que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen aproximadamente 36 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover y nucleótidos con secuencias de homología al plásmido pKD46. Los oligonucleótidos utilizados para este procedimiento han sido descritos y se presentan en la tabla 15. Las cepas JM101PTS⁺Glc⁺ y PB12PTS⁻Glc⁺ fueron transformadas con el plásmido

PKD46, el cual tiene un cassette de resistencia a ampicilina (Ap^r). Se platearon éstos cultivos en cajas de Luria con ampicilina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. Se aisló una colonia de cada cepa y se hicieron electrocompetentes en medio SOB con 0.1mM de arabinosa. Estas células electrocompetentes fueron transformadas con el producto de PCR antes mencionado, el cual tiene una secuencia homóloga a los extremos del gen *aroB* y también el gen de resistencia a Cm. Las células transformadas se dejaron recuperar durante 3 horas a 30°C y posteriormente fueron plateadas en cajas con Cm 30 $\mu\text{g/ml}$ (Cm^{30}) y se incubaron toda la noche a 42°C. De las colonias resistentes a cloramfenicol se sembraron 10, y se le hicieron pruebas de resistencia a ampicilina (Amp^{200}) y Cm (Cm^{30}). Se seleccionaron aquellas colonias que fueron resistentes a Cm y sensibles a Amp. A estas colonias seleccionadas se le hicieron pruebas de PCR con oligonucleótidos (SAB1, SAB2) que están a 200 pb de los extremos del gen *aroB*. De las colonias seleccionadas, fue elegida una por cada cepa candidata que tenía el tamaño de producto deseado (aproximadamente 1221 pares de bases, datos no mostrados). Los productos de PCR fueron secuenciados y los resultados de la secuenciación indicaban que en lugar del gen *aroB* se encontraba el cassette de Cm^r en las derivadas de ambas cepas. El gen *aroB* está interrumpido con un cassette que confiere resistencia a cloramfenicol, por lo cual se aislaron transductantes en medio Luria y se seleccionaron a las mutantes capaces de crecer con cloramfenicol a 30 $\mu\text{g/ml}$. A estas cepas se le hicieron dos pruebas. La primera fue una prueba fenotípica, ya que estas cepas deben ser incapaces de crecer en medio mineral con glucosa sin aminoácidos aromáticos. Las cepas seleccionadas no pueden crecer en este medio sin suplemento de estos aminoácidos. Adicionalmente se realizó un PCR con los oligonucleótidos que son complementarios a los extremos del gen que codifica para la resistencia a cloramfenicol. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa, y se obtuvo un fragmento de un tamaño de 1200 pb de la región interrumpida que era lo esperado (no se presentan datos).

e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las recomendaciones para la enzima Platinum Taq-DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, C.A, USA) .Las reacciones se realizaron en el equipo Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Pomona, C.A, USA).

f) Oligonucleótidos: Las secuencia de oligonucleótidos utilizados se presentan en la tabla 15. Para el caso de la mutación del gen *aroB* (DAB1 y DAB2) se diseñaron de acuerdo a las recomendaciones de Datsenko y Wanner (2000) [58] tal y como se muestra en la tabla 15. Las bases escritas en cursivas son aquellas homologas al gen *aroB*, las bases escritas en negritas son homologas al plásmido pKD46 (ver más adelante mutagénesis gen *aroB*). El

resto de los oligos contienen secuencias de oligonucleótidos usadas para la comprobación de las mutaciones realizadas en los respectivos genes.

7.3 Condiciones de cultivo.

a) Composición del medio mínimo M9.

El medio mínimo M9 contiene los siguientes compuestos por litro: Na_2HPO_4 (6 g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (0.5 g), NH_4Cl (1 g), MgSO_4 (2 mM), CaCl_2 (0.1 mM), Vit B1 (0.01 g) y la(s) fuente(s) de carbono a la concentración indicada posteriormente para matraces bafleados y fermentadores.

b) Composición del medio Luria (LB).

El medio Luria contiene los siguientes compuestos por litro: 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura, 10 gr NaCl, 1.5% de bacto agar.

c) Composición del medio mínimo ARO.

El medio mínimo ARO contiene los siguientes compuestos por litro: K_2HPO_4 14g, KH_2PO_4 16g, NH_4SO_4 5g, MgSO_4 1g. Para la preparación del preinóculo el medio ARO fue suplementado con 15 g/L de extracto de levadura. Las células en reposo fueron resuspendidas en medio ARO adicionado con L-tirosina (8 mg/L), L-triptófano (4 mg/L), L-fenilalanina (8 mg/L), ácido paraminobenzoico (62 mg/L), ácido dihidroxibenzoico (35 mg/L) y ácido parahidroxibenzoico (2 mg /L). La(s) fuente(s) de carbono se ajustaron a la concentración indicada.

d) Preparación del preinóculo.

Se tomó una asada proveniente de un congelado en glicerol de cada cepa y se inoculó en tubos de ensaye con 3 ml de medio LB. En el caso de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ se adicionó al medio (Km) a una concentración final de 30 $\mu\text{g/ml}$. Los tubos se incubaron toda la noche a 37°C.

e) Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó en matraces con baffles con 50 ml de M9-glucosa (2 g/L) y Km (30 $\mu\text{g/ml}$). A este medio le fue inoculado 200 μl del preinóculo, el cual fue incubado a 37°C por 12 horas aproximadamente.

g) Cultivos por lote en fermentador.

Los cultivos en fermentador se realizaron por duplicado en fermentadores de un litro marca Applikon (Autoclavable Bio Reactor) equipado con las consolas siguientes: ADI 1010 BioControler y ADI 1025. Las fermentaciones iniciaron con una densidad óptica de 0.1 (600 nm). El medio usado fue M9 con 4 g/L de las fuentes de carbono seleccionadas. En los cultivos con dos fuentes de carbono se usaron 2 g/L de cada fuente de carbono. El IPTG se agregó al inicio de la fermentación a una concentración final de 0.1 mM. Las condiciones del cultivo se mantuvieron a una temperatura de 37°C, la agitación a 600 rpm y el pH a 7 ajustado con NH₄OH (2%). Para calcular las μ y patrones de consumo de las fuentes de carbono, se tomó muestra cada hora, midiendo la densidad óptica en espectrofotómetro a 600 nm y centrifugando muestras para análisis posterior de las fuentes de carbono y compuestos aromáticos por HPLC [59].

h) Cultivo de células en reposo.

El sistema de células en reposo se ha aplicado a nivel de estudios teóricos de producción y bioprocesos de varios compuestos entre ellos: DAHP, fenilalanina, ácido láctico, acetoína y nisina. En este sistema las células se mantienen sin crecimiento pero en estado metabólico activo. Por otro lado, a nivel de estudios teóricos, es un sistema relativamente simple para evaluar la producción de metabolitos en “estado pseudo-estacionario”, es decir, los nutrientes y las condiciones ambientales tienen un cambio mínimo. En este estudio se decidió usar las cepas PB12*aroB*(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*) y JM101*aroB*(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*) para analizar la producción de DAHP en virtud de que estas cepas tienen bloqueada la vía de biosíntesis de aromáticos, así la cantidad de DAHP es proporcional al flujo de carbono dirigido hacia la vía aromática [29].

Los inóculos de las cepas PB12PTS⁻Glc⁺*aroB*(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*) y JM101*aroB*(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*) fueron crecidos durante 12 horas en medio mineral ARO, con extracto de levadura (15 g/L) y glucosa (10 g/L) y se cosecharon al final de la fase logarítmica. Estos inóculos, se centrifugaron y lavaron dos veces con medio mineral, y fueron resuspendidos en medio mínimo ARO a una densidad óptica (600nm) entre 4 y 3. Al medio le fue adicionado tirosina (8 mg/L), triptófano (4 mg/L), fenilalanina (8 mg/L), ácido paraminobenzoico (62 mg/L), ácido dihidroxibenzoico (35 mg/L) y ácido parahidroxibenzoico (2 mg/L). Este experimento se realizó en matraces de 250 mL con baffles; el volumen de trabajo fue de 50mL. Se utilizaron 7.5 g/L de todas las fuentes de carbono, excepto en las mezclas de fuente de carbono que se usaron 3.5 g/L de cada fuente. La composición del

medio ARO no permite la formación de biomasa y por tanto el crecimiento, manteniendo a las “células en reposo”. Sin embargo, las células siguen activas metabólicamente y pueden canalizar el carbono hacia la biosíntesis de compuestos aromáticos [7,36]. Las células en reposo se trataron con IPTG después de 1 hora de iniciada la fermentación. El IPTG se adicionó a una concentración de 0.1 mM, excepto en la prueba de inducción a varias concentraciones del inductor (datos no mostrados). Se tomaron muestras de 1 mL cada dos o tres horas, se determinó la densidad óptica con espectrofotómetro a 600 nm, se centrifugó la muestra y se guardó el sobrenadante para analizar por HPLC las fuentes de carbono y el DAHP. El análisis de DAHP fue realizado con el ensayo del ácido tiobarbitúrico [60].

7.4 Determinación de parámetros cinéticos.

a) Cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ).

La μ fue calculada en la fase logarítmica con la ecuación de crecimiento $X_t = X_0 e^{\mu t}$, donde

X_t = biomasa (g/L) al tiempo t

X_0 = biomasa inicial (g/L)

μ = velocidad específica de crecimiento

t = tiempo (h)

Las μ fueron determinadas ajustando los datos de biomasa contra el tiempo con regresión exponencial, los coeficientes de correlación siempre fueron iguales o mayores a 0.98.

b) Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)

El rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) fue estimado como el coeficiente de regresión lineal de la concentración de biomasa (g/L) contra la concentración de sustrato (mmolC de sustrato(s) / L) (glucosa, arabinosa, glicerol, xilosa y las mezclas correspondientes) (s) [49]. Los coeficientes de correlación siempre fueron mayores 0.97.

c) Cálculo de consumo específico de azúcares (q_s)

La velocidad específica de consumo de fuentes de carbono (q_s) fue determinada como la relación de μ y $Y_{x/s}$ [49].

d) Cálculo de producción específica de DAHP, DHS y SHIK.

La producción específica de DAHP, DHS y SHIK (q_{DAHP} , q_{DHS} , q_{SHIK}) fue determinada calculando para cada producto el rendimiento producto/ biomasa ($Y_{\text{prod}/X}$) y multiplicando cada una por el valor de μ correspondiente.

7.5 Métodos analíticos.

a) Medición de absorbancia.

La densidad óptica (600nm), absorbancia de la coloración obtenida con el ensayo del ácido tiobarbitúrico (549 nm) y absorbancia del NAD^+ (340 nm) generado por el ensayo de medición del gluconato (ver inciso b), fueron medidos con el espectrofotómetro Lambda 11 Perkin Elmer, Pomona, CA. La DO_{600} fue convertida a peso seco usando la relación 1 DO = 0.37 g/L de biomasa seca [59].

b) Medición de la concentración de las fuentes de carbono.

Las concentraciones de fuentes de carbono y metabolitos producidos fueron determinados por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; 9 μM), Bio Rad, CA, USA. La fase móvil fue H_2SO_4 5mM con un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C. La D-glucosa, L-arabinosa, L-xilosa, D-glicerol y ácido acético fueron medidos por arreglo de fotodiodos a 210nm. El D-gluconato fue medido con el kit enzimático D-Gluconic acid/D-Glucono-d-lactone (Boehringer-Mannheim/ R-Biopharm) [59].

c) Medición de DAHP y otros intermediarios aromáticos.

Las concentraciones de SHIK y DHS fueron determinadas por HPLC con una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; 9 μM), Bio Rad, CA, USA. La fase móvil fue H_2SO_4 5mM con un flujo de 0.5 ml/min y a una temperatura de 50°C [59]. La medición de DAHP es conocida como la técnica del ácido tiobarbitúrico. La técnica fue desarrollada por Srinivasan y Sprinson en 1959 [60], y se basa en la coloración rosa que desarrolla el β -formilpiruvato (derivado del DAHP) al reaccionar con el periodato de sodio. La absorbancia de la coloración rosa es medida a 549 nanómetros y el valor de la concentración de DAHP se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{Abs}_{549} \times 334 \times \text{dilución} = \text{nanomoles DAHP/ml de sobrenadante.}$$

7.6 Análisis de la expresión de genes por RT-qPCR

a) Manejo de muestra y tratamiento

Se obtuvieron las muestras de cultivo a 1 DO directamente del reactor, usando una manguera de 1mm de diámetro y colectando el cultivo en tubos estériles de 15 ml que contenían 2 ml de la solución de protección (RNAprotect Bacteria Reagent, Quiagen™). Se colectaron alrededor de 7 ml de cultivo y se mezclaron cuidadosamente con la solución mencionada. Después de 1 min, las muestras se centrifugaron 8 minutos a 8000 rpm. El paquete de células tratadas y centrifugadas fué congelado inmediatamente a -70°C hasta la extracción de RNA. Estas muestras no se mantenían más de tres días en congelación.

b) Extracción de RNA

A los pellets congelados se le adicionaron 1 ml de buffer I (Sacorosa 0.3 M, Acetato de Sodio 0.1 M), y después se le trataron con 20 μ l de lisozima (10mg/ml en buffer TE) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente a la mezcla, se le agregaron 2 ml de buffer II (Acetato de sodio 0.01M y SDS al 2%) se incubó por 3 minutos a 65°C. A este lisado se le agregó 2 ml de fenol caliente y se incubó por 3 min a 65°C. Se realizó una segunda extracción con fenol caliente pero sin incubar. Posteriormente la fase acuosa se trató con fenol:cloroformo (1:1), precipitado con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol, se centrifugó 15min/4°C/10000 rpm. Las muestras se resuspendieron en 300 μ l de agua con DNase libre RNase (Ambion Inc, TX, USA). A la muestra anterior se le extrajo dos veces con 1 volumen de cloroformo. Finalmente, las muestras se precipitaron y se resuspendieron con 300 μ l de buffer TE (Ambion Inc, TX, USA). Se analizó la integridad de todas las muestras de RNA en geles agarosa con formaldehído. Las concentraciones de RNA se midieron usando un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), las relaciones 260/280 and 260/230 se examinaron para descartar contaminación con proteína y solventes. Las relaciones 260/280nm y 260/230nm estuvieron entre 1.9- 2.0 y 2.0-2.3 respectivamente para todas las muestras. Las muestras se guardaron a -70°C. Se realizaron cinco extracciones de igual número de fermentaciones independientes por cepa. El tratamiento con DNAsa del RNA total fue con el kit TURBO DNA-free kit (Ambion Inc, TX, USA) a 37°C por 30 min siguiendo las instrucciones del proveedor. Para determinar si las muestras de RNA estaban contaminados con DNA genómico, se realizaron PCRs con primers para amplificar al gene *arcA* (Tabla 14). Las muestras de RNA que amplificaban producto se desechaban. Adicionalmente, al RNA tratado con DNAsa se le sometió a un análisis de RT-qPCR del mismo gene usando los oligos [*arcAa* (forward) and *arcAb* (reverse)] (Tabla 14). Como en el

caso del PCR, todas las muestras utilizadas no amplifican. El cDNA fue sintetizado usando el kit RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis kit usando las condiciones del proveedor (Fermentas, Inc.). Aproximadamente a 5 µg de RNA por cada reacción se le añadieron la mezcla de 10 pmol/µl de los primers específicos cuya secuencia ha sido publicada [27,28,49,50,61]. El cDNA fue el templado de ensayo de RT-qPCR.

c) RT-qPCR

Los ensayos de RT-qPCR fueron realizados con los equipos ABI Prism 7000 Sequence Detection System y 7300 Real Time PCR System (PerkinElmer/Applied Biosystems) usando el kit Maxima^R SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas Life Sciences, USA). Se usaron platos de 96 pozos MicroAmp optica (Applied Biosystems, Ca, USA). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min at 95 °C, y dos pasos de 95°C for 15 s y 60°C for 60 s con un total de 40 ciclos y el protocolo de disociación (95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 15 s and 60°C for 15s). Las secuencias de DNA de los primers se diseñaron usando el programa Primer Express (PE/Applied Biosystems). La longitud de los oligonucleótidos usados (forward y reverse), estaban entre 18 y 21 nucleotidos, con un % de GC entre 45 y 60 y una T_m entre 58 y 60°C. El tamaño de los amplimeros fue de 101pb. El volumen final de la reacción fue 12 ml, con una concentración de 0.2 µM del primer y 5 ng del cDNA cada gene blanco. Los ensayos de RT-qPCR se realizaron al menos cinco veces (permitiendo una desviación estándar máxima de 0.3 entre muestras). Un control sin templado se incluyó para cada gene y los valores de todos aparecen después del ciclo 31. Se hicieron curvas estándar para evaluar la eficiencia del RT-qPCR y todos los genes tienen una R² arriba de 0.9976 con pendientes de -3.4 y -3.7. El análisis de los datos se realizó con el método descrito por Livak and Shmittge [62]. Los datos fueron normalizados usando el gene *ihfB* como control interno (gene de referencia). El nivel de expresión de este gene fue reproducible en todas las condiciones analizadas; esta es la característica más importante que un gene de referencia debe cumplir de acuerdo a la guía MIQE [63]. La figura 22 incluye los valores de *ihfB* detectados en las cepas usadas y derivadas en distintas condiciones de crecimiento. Estos resultados demuestran la estabilidad de la expresión de este gene de referencia en todas las cepas usadas en los estudios para las condiciones usadas en este trabajo, también en reportes de estas cepas y derivadas. Por cada gene analizado el nivel de transcripción de la cepa parental (JM101 o PB12) es considerado como uno. Por lo tanto los datos de expresión de las cepas problema se reportan como niveles relativos de expresión. Los resultados se presentan son el resultado del promedio de varios experimentos independientes

7.7 Ensayos enzimáticos

Para cada ensayo enzimático realizado, aproximadamente 15 ml de cultivo fue cosechado y centrifugado a 10,000 rpm, a 4°C por 1 min. Los paquetes celulares se guardaron a -20°C hasta que el ensayo enzimático se realizó (no más de 3 días después de la cosecha). Antes de cada ensayo los pellets se disolvieron en la solución amortiguadora específica de la enzima problema. Las células redisueltas en la solución amortiguadora se rompieron con tres pasos de sonicación de (20 s a 14 milliohms) y después de centrifugaron a 10,000 rpm, 4°C por 10 min. Los ensayos enzimáticos se realizaron a 30°C usando el espectro Thermo Spectronic-Biomate. Los sustratos y solución amortiguadora respectivos de cada ensayo se mezclaron en la celda espectrofotométrica hasta una reacción final de 1 ml. La longitud de onda y el coeficiente de extinción molar para el NADH₂, NADP⁺ y NADPH₂ son de 340 nm y 6.22 cm⁻¹ mM⁻¹ respectivamente. Para la fenilhidrazina-HCl, la longitud de onda y los coeficientes de extinción fueron de 324 nm 16.8 cm⁻¹ mM⁻¹ respectivamente. Una unidad de actividad específica (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para convertir el sustrato a el producto por minuto por miligramo de proteína. La cantidad de proteína fue medida por el método de Bradford usando albúmina bovina como estándar. Las soluciones amortiguadoras utilizados para los ensayos enzimáticos fueron las siguientes: Piruvato cinasa (Pyk): 100mM Tris-HCl pH: 7.5, 5mM ADP, 1mM DTT, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.5 fosfoenolpiruvato (PEP), 0.25mM NADH, 10 U Lactato deshidrogenasa (LDH) [64]. PEP carboxilasa (Ppc): 60mM Tris-HCl pH: 9.0, 10mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃, 0.15mM NADH, 5mM PEP y 2U Malato deshidrogenase (MDH) [65]. PEP carboxicinas (PckA): 10mM Buffer TES pH: 6.6, 10mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1mM DTT, 10mM ADP, 75mM NaHCO₃, 0.3mM NADH, 20 U Malato deshidrogenase (MDH); se añadía el extracto celular, se incubaba 37°C por 15 min entonces se le agregaba PEP 10mM para empezar la reacción [65]. Enzima Mállica (MEZ, MaeB): 100mM Tris-HCl pH: 7.8, 5mM MgCl₂, 0.6 NADP⁺, 40mM ácido málico [65]. Isocitrato liasa (ICL): 50mM morpholipepropanesulfonic acid (MOPS) pH: 7.3, 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 4mM fenilhidrazina HCl (FH) y 12.5mM L-isocitrato (IC) [66].

7.8 Análisis proteómico

La extracción de proteínas y el gel electroforético en dos dimensiones fue hecho como se describe en [67]. Los geles se tiñeron con coomasie coloidal [68] y se escanearon en un densitometro (GS-800 densitometer) (Bio-Rad, Hercules, CA). Las imágenes digitales se escanearon y analizaron con el software PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad). Cada experimento se realizó por triplicado. Una vez que la imagen digital de cada gel fue comparada contra el resto las entidades electroforéticas de interés se cortaron, acilarón, redujeron, digirieron y

transfirieron automáticamente para un análisis en MALDI con el robot Proteineer SP II and SP que usa el programa de control SPcontrol 3.1.48.0 v (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), con la ayuda del kit de digestión DP Chemicals 96 gel (Bruker Daltonics) y procesados en un MALDI-TOF Autoflex (Bruker Daltonics), para obtener la huella digital másica. Se realizaron 100 disparos satisfactorios en 20 pasos-disparos, el umbral del pico de resolución se estableció en 1500, la relación señal ruido se estableció en 6. El espectrograma fue anotado con el programa flexAnalysis 1.2 v SD1 Patch 2 (Bruker Daltonics). La búsqueda de las huellas másicas se realizó en MASCOT [69] y para compararlas se usó la base de datos UNIPROT 2011-01 [70] con los siguientes parámetros: Taxon: *Escherichia coli*, tolerancia de masas: 200 ppm, se permitió un corte en falso (miss-cleavage), como modificación fija: carbamidomethyl y la modificación variable fue oxidación con metionina [70].

8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Resultados y discusión fase I

8.1.1 Capacidad de la cepa evolucionada PB12 de coutilizar pares de fuentes de carbono.

La inexistencia de una fase diaúxica en crecimiento en matraces además del aumento en la μ (μ mayor a 0.4 +/- 10%) fue indicativo de una posible coutilización de los azúcares del medio de cultivo como previamente se había reportado para el caso de la mezcla glucosa-acetato [28]. Por lo tanto, de la cinéticas de crecimiento previamente realizada en matraces se seleccionaron las mezclas de azúcares que en principio serían coutilizadas por la cepa PB12 y la cepa parental JM101(PTS⁺). Se eligieron las siguientes mezclas: glucosa-arabinosa, glucosa-glicerol, glucosa-gluconato y glicerol-arabinosa. Las tres primeras se seleccionaron porque en estas combinaciones se obtuvieron mayores μ respecto a glucosa como única fuente de carbono. La combinación de dos fuentes de carbono no PTS arabinosa-glicerol fue elegida porque en los matraces no siempre era evidente una fase diauxica.

La cepa PB12 consume simultáneamente los carbohidratos de las mezclas glucosa-arabinosa y glucosa-gluconato (Figura 1). En el caso de la mezcla glucosa-glicerol el consumo de glicerol se retarda en las primeras dos horas de crecimiento. Por otro lado, el patrón de consumo de la cepa PB12 en la mezcla de dos fuentes de carbono no PTS, arabinosa-glicerol, es diferente a los anteriores. La cepa PB12 consume primeramente arabinosa y después glicerol (datos nos mostrados), es decir aparentemente la arabinosa reprime catabólicamente a glicerol, lo cual demuestra que la represión catabólica por azúcares tipo no PTS sigue presente en esta cepa. De acuerdo con lo esperado, la cepa parental JM101, tiene un consumo secuencial de los azúcares, consumiendo primero aquella fuente de carbono que mantiene la mayor μ (Figura 1, Tabla 1). Debido a la alta μ de la cepa JM101 en todas las fuentes de carbono, la cepa consume rápidamente el segundo sustrato, por lo que los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos en la segunda fuente de carbono son aparentes. Sin embargo, se realizaron cinéticas con ésta cepa en una sola fuente de carbono para conocer los parámetros cinéticos y estequiométricos reales (Tabla 2). La fuente preferida de carbono es glucosa ($\mu = 0.72 \text{ h}^{-1}$), posteriormente arabinosa ($\mu = 0.64 \text{ h}^{-1}$) y al final glicerol ($\mu = 0.47 \text{ h}^{-1}$) (Tabla 2). En el caso de JM101, crecida en la mezcla arabinosa y glucosa, es de llamar la atención que el consumo de arabinosa comienza aún antes de que la glucosa se haya consumido totalmente del medio de cultivo, es decir que la

velocidad de respuesta es la más rápida en condiciones de limitación de la fuente de carbono preferencial (Figura 1). En el caso de glucosa y glicerol el consumo de la segunda fuente comienza después de media hora de acabada la glucosa (Figura 1). El tiempo de consumo de la cepa JM101 de la tres combinaciones de azúcares es menor respecto al tiempo de consumo de los mismos por PB12, contrario a lo reportado en otras cepas PTS⁻ Glc⁺ (Figura 1) [38]. Sin embargo, esta menor velocidad específica (q_s) de consumo también está ligada a una menor generación de ácido acético y un mayor rendimiento de biomasa/fuente de carbono (Tabla 1 y 2). La cantidad de ácido acético total producido depende de la combinación de azúcares utilizada y también de la cepa. En general la cepa PTS⁺ produce más ácido acético en las mismas fuentes de azúcares, aunque la excepción es la mezcla arabinosa-glucosa, donde ambas cepas alcanzan la misma concentración final de ácido acético (Tabla 1). Una característica de la q_s de la cepa PB12 crecida en glucosa es que es menor a la cepa parental. Adicionalmente los azúcares no PTS estudiados se transportan a mayor velocidad que la propia glucosa. De lo anterior se deduce que la ventaja de cointilizar dos fuentes de carbono es el consumo de más moles de carbono por unidad de tiempo que las moles consumidas cuando la cepa crece en glucosa como única fuente de carbono (ver Tablas 1 y 2). También es importante hacer mención que la q_s de las fuentes cointilizadas tienen valores que están en un intervalo muy pequeño (35.50 a 40.80), lo cual indica que las capacidades de transporte de cointilización no son arbitrarias y están aparentemente controladas por la misma capacidad metabólica de la cepa.

8.1.2 Producción de DAHP en las cepas JM101aroB⁻ y PB12PTSaroB⁻ transformadas con los plásmidos pRW300aroG^{fbr} y pCLtktA en diferentes combinaciones de dos fuentes de carbono, en el sistema de células en reposo.

En este estudio se decidió usar las cepas PB12aroB(pRW300aroG^{fbr}, pCLtktA) y JM101aroB(pRW300aroG^{fbr}, pCLtktA) para analizar la producción de DAHP en el sistema de células en reposo, por las características de este sistema (ver materiales y métodos) y además porque estas cepas tienen bloqueada la vía de biosíntesis de aromáticos. Así la cantidad de DAHP que se genera es proporcional al flujo de carbono dirigido hacia la vía aromática. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, arabinosa, acetato, glicerol y gluconato a una concentración aproximada de 7.0 g/L cuando se utilizaron como única fuente de carbono. Se eligieron las mezclas de glucosa-arabinosa, glucosa-acetato, glucosa-glicerol y glucosa-gluconato para evaluar el efecto de la cointilización de estas tres fuentes de carbono sobre la q_{DAHP} y rendimiento de DAHP. La Figura 2 muestra la utilización de las diferentes fuentes de carbono y la producción de DAHP. El rendimiento teórico en glucosa y arabinosa ha sido calculado por Liao y col. en (1996) [33], realizando una inspección

cuidadosa de las vías involucradas y un cálculo de flujos involucrados en la producción de DAHP (Figura E). Esta inspección es bastante aceptada para el cálculo de rendimientos debido a que las vías involucradas en la producción de DAHP no son complejas. Los máximos teóricos son aquellos alcanzados en una situación en donde no existen precursores metabólicos que sean dirigidos a la formación de biomasa, como es el caso del sistema de células en reposo (Liao et al., 1996) [33]. Debido a que no hay reportes del rendimiento máximo de DAHP cuando se usan glicerol, acetato y gluconato como fuentes de carbono, se calculó el rendimiento teórico mediante el proceso sugerido por Liao y col. (1996) [33] (Figura G). Por otra parte, se aplicó la fórmula sugerida por Li y Frost para calcular el rendimiento máximo teórico en dos fuentes de carbono [45].

La fórmula aplicada para calcular los máximos teóricos cuando se consumen dos fuentes de carbono fue la siguiente:

$$Y_{max} = Y_{glc}(m_{glc}) + Y_i(m_i), \text{ donde}$$

Y_{max} = Rendimiento teórico máximo con dos fuentes de carbono

Y_{glc} = rendimiento teórico en glucosa

m_{glc} = fracción molar de la glucosa

Y_i = rendimiento teórico en la segunda fuente

m_i = fracción molar de la segunda fuente

$m_T = (\text{moles de glucosa} + \text{moles de segunda fuente}) / \text{moles totales}$

$m_{glc} = \text{moles de glucosa} / m_T$

$m_i = \text{moles de la segunda fuente} / m_T$

De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 3, los rendimientos más altos respecto al teórico en una sola fuente de carbono son en arabinosa y gluconato (100% del teórico). El rendimiento en glucosa es del 65% del teórico. La q_{DAHP} aumenta

significativamente respecto a glucosa en arabinosa 0.95, y en las mezclas glucosa-arabinosa 0.95 y glucosa-glicerol 1.37 (Tabla 3, Figura 2). El aumento en la productividad específica de compuestos aromáticos en estas fuentes de carbono puede ser resultado del aumento en la q_s , ya que se sabe que q_s y productividad están correlacionados. Sin embargo, en el cultivo con glicerol se obtiene una mayor q_s y similar q_{DAHP} que en glucosa, aunque también tiene mayor producción de ácido acético (Tabla 3, Figura 2). Lo anterior indica que la cepa PB12 $aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) posiblemente incrementa el flujo glicolítico cuando utiliza el glicerol como única fuente de carbono para aumentar así el flujo de acetil-coenzima A (AcCoA) para alimentar al TCA para generar suficiente ATP, NADH y NADPH para satisfacer la demanda de éstos cofactores por sobreexpresión de los plásmidos pRW300 $aroG^{fbr}$ y pCL $tktA$. Lo anterior concuerda con reportes acerca de aumentos de flujo hacia AcCoA en cultivos crecidos en glicerol y sobreexpresando el gene $tktA$ [71]. Por otro lado, aunque no existen reportes de alto rendimiento en arabinosa en un sistema de células en reposo (100% teórico, Tabla 3), se tienen reportes de alta productividad y rendimiento en xilosa con cepas PTS⁺ (Liao, 1996) [33]. El alto rendimiento en xilosa se atribuyó a que existe una mejor distribución de PEP y E4P cuando se usa xilosa como fuente de carbono. Arabinosa y xilosa son isómeros, que comparten el punto de entrada al metabolismo central (X5P) (Figura C) y por lo tanto la misma propuesta de Liao [33] podría explicar el alto rendimiento en arabinosa. A este respecto también se ha demostrado que cultivos en reposo con xilosa como fuente de carbono no necesitan la sobreexpresión del gene $tktA$ [33]. Sin embargo la cepa PB12 $aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) si necesita la sobreexpresión del gene $tktA$ aún en arabinosa y en la mezcla arabinosa-glucosa, ya que la productividad y rendimiento se disminuye a la mitad sin la sobreexpresión de $tktA$ (datos no mostrados). Lo anterior indica que cuando la cepa metaboliza a la arabinosa aumentan las pozas de pentosas fosfatadas (Figura C), los cuales son sustrato de las transcetolasas (A y B) y transaldolasas (A y B) las cuales envían el flujo hacia la vía EMP, lo anterior aumentaría el flujo hacia PEP y posteriormente a PYR. Lo anterior concuerda con la detección de un aumento de piruvato en el medio de cultivo (datos no mostrados). Cabe recordar que la cepa PB12 tiene ya un alto flujo glicolítico y tiene sobreexpresados varios genes glicolíticos en cultivos en glucosa [37,47]. Por otra parte los rendimientos y productividades en la cepa silvestre JM101 $aroB$ transformada con los plásmidos (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$) están muy por debajo de la cepa PB12 $aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$). Lo cual indica que la sobreexpresión de los genes $tktA$ y $aroG^{fbr}$ son insuficientes en el contexto de esta cepa silvestre para redirigir el flujo de PEP hacia la vía de aromáticos, aún en azúcares no PTS. Lo anterior es contrario a lo reportado para otras cepas silvestres [33] (Tabla 4).

8.1.3 Parámetros cinéticos, curvas de crecimiento y producción de intermediarios aromáticos en cultivos en fermentadores de la cepa PB12/pRW300aroG^{fbr}, pCLtkA (PB12T).

Con la finalidad de evaluar la producción de aromáticos en un cultivo tipo lote, la cepa PB12 transformada con los plásmidos pRW300aroG^{fbr} y pCLtkA (cepa PB12T) fue crecida en el fermentador conforme a las condiciones señaladas en la sección de materiales y métodos. Se eligieron como fuentes de carbono a estudiar: arabinosa y las mezclas glucosa-arabinosa y glucosa-glicerol, debido a que en estas combinaciones fue en donde se obtuvo mayor rendimiento y/o productividad de DAHP en el sistema de células en reposo. Es importante mencionar que los plásmidos de la cepa fueron inducidos con IPTG (0.1 mM) desde el inicio de la fermentación. La producción de DAHP, DHS y SHK fue tomada como medida directa de la canalización de carbono hacia la vía de aromáticos. Es importante señalar que no se trabajó con la cepa PB12aroB(pRW300aroG^{fbr}, pCLtkA), ya que la μ de la cepa PB12aroB aún sin plásmidos disminuye considerablemente aún en exceso de aminoácidos y vitaminas aromáticas. Además, se buscó analizar la capacidad de producir compuestos aromáticos en presencia del producto *aroB* para demostrar que el flujo de carbono hacia la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos estaba siendo incrementado en un cultivo por lote en las condiciones de fermentador utilizadas. La cepa PB12T disminuye su μ en todas las fuentes de carbono respecto a su crecimiento sin plásmidos (Tablas 1,2 y 5). En la combinación arabinosa-glucosa la μ disminuye de 0.55 a 0.42 h⁻¹. La disminución de la μ es mayor en glucosa-glicerol (de 0.32 a 0.13 h⁻¹) con una fase de retardo (fase lag) de 15 horas aproximadamente. En glucosa la reducción de la μ es de 0.42 h⁻¹ a 0.32 h⁻¹; sin embargo tiene una fase de retardo de 25 horas. En todas las fuentes de carbono el rendimiento biomasa/sustrato(s) (g/mmolC) disminuyó respecto a la cepa sin plásmidos (Tablas 1,2 y 5), lo cual podría ser consecuencia de la redirección de los flujos de carbono y de la sobreproducción de de las proteínas TktA y AroG^{fbr}. Aunque la μ fue mayor en arabinosa y en la mezcla arabinosa-glucosa también lo fué la producción de ácido acético (0.12 y 0.13 g/L respectivamente). Lo anterior podría ser consecuencia de la actividad concertada de las transcetolasas (A y B) que canalizan el flujo de pentosas hacia glicólisis y las enzimas glicolíticas que redirigen éste flujo hacia glicólisis aumentando las pozas de PYR y AccoA, saturando TCA y por lo tanto las enzimas AckA y Pta convierten este AcCoA en ácido acético. Un dato transcripcional obtenida en este trabajo, concuerda con esta hipótesis, ya que se detectó una menor expresión del gene *gltA* que codifica para la isocitrato sintasa (primera enzima de TCA) en condiciones de producción (el dato se muestra mas adelante); lo cual sugiere que la canalización de AcCoA hacia TCA podría estar limitada en la cepa PB12T. Lo anterior concuerda con la hipótesis de la menor canalización de AcCoA hacia

TCA lo cual podría favorecer su desviación hacia acetato por la vía Pta/AckA. El mayor rendimiento de producción de compuestos aromáticos se presentó en la cepa crecida en la mezcla glucosa-glicerol (Figura 3, Tabla 5). En esta combinación, la cepa tiene un rendimiento de compuestos aromáticos tres veces mayor que en glucosa, lo cual es atractivo para un sistema de producción considerando también que la glucosa y el glicerol son compuestos de bajo costo. Además la q_{DAHP} es aproximadamente cuatro veces mayor respecto a glucosa (Figura 3 y Tabla 5). Además no se produjo ácido acético durante esta fermentación.

8.1.4 Conclusiones fase I

- La ausencia del sistema PTS permite en la cepa evolucionada PB12PTS⁻Glc⁺ la coutilización de varias fuentes de carbono por la ausencia de represión catabólica mediada por EIIA^{glc}. Los patrones de consumo demuestran que esta cepa puede coutilizar pares de fuentes de carbono glucosa-glicerol, glucosa-gluconato y glucosa-arabinosa. La coutilización de fuentes de carbono le permite a esta cepa metabolizar más mmoles de C por unidad de tiempo, y así incrementar su μ .
- El sistema de células en reposo demostró que la coutilización de fuentes de carbono es favorable para aumentar la productividad de DAHP en la cepa PB12PTS⁻Glc⁺aroB⁻ (pRW300aroG^{fbr}, pCLtktA). La productividad específica de DAHP aumenta respecto a glucosa en todas las mezclas de fuentes de carbono. Es importante mencionar que lo anterior fué el primer reporte publicado de estudios de producción de compuestos aromáticos con cepas coutilizando fuentes de carbono en el sistema de células en reposo [72,73].
- En cuanto a la cepa PB12 transformada con los plásmidos pRW300aroG^{fbr} y pCLtktA, aumentó su productividad específica de DAHP (respecto a glucosa) en glucosa-glicerol en un sistema por lote en fermentadores. La mezcla en la cual se obtuvo el mayor rendimiento (molC/molC) (36%) de compuestos aromáticos/fuente(s) de carbono. Lo anterior sentó las bases para explorar al glicerol como una fuente de carbono interesante para la producción de compuestos aromáticos.

Los resultados y conclusiones anteriores fueron publicados en el artículo: **Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate**

phosphotransferase system. Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez O and Francisco Bolívar. *Microbial Cell Factories* 2008, **7**: 1. (Anexo I)

8.2 Resultados y discusión fase II

8.2.1 Fisiología de la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.

8.2.1.1 Análisis transcripcional de genes del metabolismo central de la cepa PB12T crecida en glucosa y en glucosa-glicerol comparada con la PB12 crecida en glucosa.

a) Glicólisis

Los genes de la glicólisis que disminuyen su transcripción son *pgi*, *gapA*, *pgk* (Figuras 4 y 5). *Pgi*, es la enzima que compromete la mayor parte de la glucosa-6P a la glicólisis, *gapA* codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que cataliza la única reacción generadora de poder reductor (NADH₂) en la glicólisis (Figura E). Por otra parte *pgk* cataliza la reacción que compromete a G1,3PG a 3PG con la formación de 2 moléculas de ATP (Figura C). El gen *pgi* tiene promotores que son reconocidos por los factores sigma RpoD y RpoS, es regulado positivamente por SoxS y a nivel postranscripcional es regulado negativamente por CsrA. *gapA* es regulado positivamente por CRP y además posee una secuencia de reconocimiento de RpoS [74]; sin embargo estudios en PB12 han demostrado que *gapA* no es transcrito por sigma 38 al menos cuando la cepa es crecida en medio mínimo en glucosa. *gapA* y *pgk* son regulados negativamente por Cra(FruR) [75]. Los genes *pfkA*, *fbaA*, *eno* y *pykF* también son reprimidos por Cra; sin embargo ninguno de ellos cambia su expresión significativamente. Se ha demostrado que *gapA* y *eno* disminuyen su transcripción en cepas de *Escherichia coli* creciendo en limitación de carbono [76]. Lo anterior presumiblemente para prevenir el flujo de carbono al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y mantener un flujo suficiente en la vía de las pentosas-fosfato para la síntesis de precursores biosintéticos. Probablemente esta misma estrategia es la usada por la cepa PB12T. Es importante mencionar que dada la subexpresión del gene *pgi*, podría especularse una redistribución de los flujos de carbono en este nodo que pudiera impactar en el bajo crecimiento de la cepa PB12T en estas condiciones de producción. Estos resultados también sugieren que los genes *pgi*, *gapA* y *eno* podrían ser cuellos de botella para aumentar la producción de PEP en estas condiciones.

b) Pentosas-fosfato y Entner-Doudoroff.

En la vía no oxidativa de las pentosas fosfato solamente se sobreexpresa el gene *tktB* y cuando la cepa crece en glucosa-glicerol el gene *talA* es el que se expresa en niveles más elevados (Figura 6). El aumento de la expresión del gene *talA* (transcetolasa A) solamente durante el crecimiento en glucosa-glicerol explicaría parcialmente el aumento en la

producción de compuestos aromáticos. La transcetolasa A es reversible y condensa S7P (seudoheptulosa 7-fosfato) y G3P (gliceraldehído 3-fosfato) para formar F6P (Fructosa-6P) y E4P, cabe recordar que el glicerol consumido se incorpora como DHAP que se interconvierte rápidamente a su isómero G3P (Figura C). Esto explicaría el aumento de F6P y E4P. Se sabe que los genes *tktB* y *talA* están regulados por RpoS y responden al aumento del alarmón ppGpp [61,77]. Por otra parte aunque los genes de la vía no oxidativa de las pentosas fosfato *zwf* y *gnd* no parecen tener cambios significativos en su expresión comparativamente con la cepa PB12. Lo anterior podría ser indicativo de que la distribución de G6P se haya modificado respecto a la cepa parental (PB12). Dos elementos de que lo anterior pudiera estar ocurriendo, son la disminución de transcripción del gene *pgi* y el hecho de que el uso de la vía oxidativa de las pentosas fosfato ahorra una molécula de ATP, cuya generación disminuye drásticamente en las cepas en condiciones de producción (ver mas adelante). Sin embargo también se sabe que cepas que contienen con estrés oxidativo tienen esta redistribución de flujos como se menciona adelante [78].

c) Gluconeogénesis

Algunos de los genes gluconeogénicos que están sobreexpresados son *fbaB*, *gapC-1*, *gapC-2*. Se sabe que el gene *fbaB* es transcrito por RpoS [61,79-81]. Adicionalmente los genes *gapC-1* y *gapC-2* son reprimidos por FNR [82]. Una diferencia importante entre las condiciones de crecimiento en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, es el nivel de expresión del gene *pps* que codifica para la fosfoenolpiruvato sintasa Pps (Figura 7), la cual sintetiza PEP a partir de PYR con inversión de una molécula de ATP. Este gene está 4 veces sobreexpresado durante el crecimiento en glucosa (Figura 7). *pps* es activado por Cra y reprimida por CsrA. Se sabe que la sobreexpresión del gene *pps* causa una disminución de crecimiento en cepas silvestres de *Escherichia coli* creciendo en glucosa, debido a que el aumento de PEP causa inhibición del sistema PTS y por tanto una disminución del transporte de glucosa [29]. Sin embargo en cepas carentes del sistema PTS y disminuidos en el flujo de PEP hacia PYR se esperaría que el aumento de transcripción del gene *pps* no causaría un problema para el crecimiento. Sin embargo no se puede descartar que la sobreexpresión del gene *pps* pudiera causar un conflicto debido a la generación de un ciclo fútil y que sea la causa de una fase lag más prolongada durante el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono. Adicionalmente, la disminución de la expresión del gene *pps* podría indicar que la cepa tiene una mayor poza de PEP cuando crece en glucosa-glicerol y por tanto no necesita reciclarla a partir de PYR.

d) TCA, lanzadera de glioxilato y sistemas productores y consumidores de acetato.

Pareciera que la estrategia de la célula cuando crece en glucosa o en la mezcla glucosa-glicerol es disminuir el flujo de AcCoA hacia TCA, no solo disminuyendo el nivel de transcripción de genes de la glicólisis encargadas de generar PYR sino también el de la mayoría de los genes que participan en el TCA (Figura 7) e incrementar la transcripción de los genes de la lanzadera de glioxilato (operón *aceBAK*, *glcB* y *glcC*) (Figura 8). La regulación del operon *aceBAK* es compleja ya que es activada por IHF y Cra, mientras que es reprimida por IclR y CRP. De acuerdo con los datos transcriptómicos (*aceB*) y de la actividad específica de su producto isocitrato liasa (Icl) (ver adelante), estas cepas aparentemente usan preferencialmente la lanzadera de glioxilato para reducir la pérdida de carbonos y mantener un flujo de esqueletos de carbono para la formación de intermediarios biosintéticos (Figura 7 y 8). Como se señaló, los datos de transcripción están sustentados en los valores de actividad específica de Icl, enzima codificada por *aceA* involucrada en la lanzadera de glioxilato, que se encuentran elevados en las cepas productoras respecto a las cepas control (Figura 9). Se propone que el acetato sea el inductor de la lanzadera de glioxilato y que la sobreexpresión del operón *aceBAK* está coordinada con la sobreexpresión de los genes productores y consumidores de acetato. En este contexto la cepa crecida en glucosa tiene aumentados los niveles de transcrito de los genes *pta* y *acs*, lo cual concuerda con lo reportado por trabajos de nuestro grupo [27,28,49,50,61]. Sin embargo, es importante hacer notar que el nivel de transcripción del gen *poxB* está disminuido en las cepas en condiciones de producción (Figura 7 y 8).

e) El papel de los reguladores Cra y CsrB.

Los datos transcriptómicos sugieren que en la cepa PB12T crecida solamente en glucosa los genes regulados por Cra y CsrB podrían actuar sinérgicamente causando una desviación no favorable de glucosa hacia la formación de glicógeno y la utilización de glicerol parece inactivar parcialmente a *csrB*. La sobreexpresión de los genes *ldhA* (Figura 5) en glucosa-glicerol indica un aumento en el flujo hacia piruvato pero también una inactivación al menos parcial del gene *csrB*. Se ha reportado la sobreexpresión del gene *ldhA* en cepas que son mutantes en *csrB* pero también en mutantes de *glgA*, es decir en cepas que acumulan menos glicógeno [83]. Esto indica que la cepa crecida solamente en glucosa aparentemente pudiera estar produciendo mucho glucógeno y que el glicerol estaría inactivando parcialmente el gene *csrB*, evitando la pérdida de carbonos hacia esa vía y canalizándolos hacia la glicólisis o hacia la vía de pentosas fosfato. Por otra parte Cra actúa cuando los niveles de los metabolitos F1,6P y F6P son bajos. Si los niveles de estos compuestos

aumentan cuando la cepa cutiliza glucosa-glicerol, algunos de los genes que son mas sensibles a ser reprimidos o activados por Cra son menos afectados. Al canalizar mas glucosa 6-P (G6P) hacia la glicólisis también se invierten mas moléculas de ATP por tanto sería una razón adicional por la cual la producción de ATP es menor en glucosa-glicerol (Figura C). Durante la cutilización de glucosa-glicerol, se elimina el posible ciclo futil a nivel del gene *pps*. El aumento de transcripción del gene *pdhR* (figura 10), sugiere que existe un aumento de PYR durante el crecimiento en la mezcla glucosa-glicerol [83].

f) Genes diferencialmente expresados en la cepa PB12T entre la condición de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono y en la mezcla glucosa-glicerol.

Como se mencionó el perfil de transcripción de genes de la cepa PB12T en las condiciones de crecimiento en glucosa como única fuente de carbono y en la mezcla glucosa-glicerol es similar. Sin embargo un subconjunto de 14 genes se expresan diferencialmente entre ambas condiciones. Algunos de estos genes pertenecen al regulon de Cra: *ppsA*, *aceA*, *aceB*, *glcC* y *pdhR* (Figura 10). Estos genes están menos expresados en la condición glucosa-glicerol respecto a glucosa excepto el gene *pdhR*. Otro conjunto de genes son regulados por ArcA: *ldhA* y *glcB* (Figura 10). Otros genes diferencialmente expresados pertenecen al regulón RpoS: *pfkB*, *fbaA*, *acnA* y *talA* (Figura 10). Estos genes se expresan en mayor medida en la condición glucosa-glicerol respecto glucosa. Estos resultados sugieren:

- Una poza ligeramente mayor de F6P y E4P en la condición glucosa-glicerol respecto al crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.
- Una poza ligeramente mayor de PEP en la condición glucosa-glicerol respecto al crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.
- Una acción preferencial de RpoS en la condición glucosa-glicerol respecto al crecimiento en glucosa como única fuente de carbono.
- Un estado redox diferencial en la condición glucosa-glicerol respecto al crecimiento en glucosa como única fuente de carbono (más NADH₂ y NAPH₂).

8.2.1.2 Estrés oxidativo generada por el aumento de especies reactivas de oxígeno y bajo AMPc intracelular.

Los datos transcriptómicos indican que la cepa podría estar creciendo en estrés oxidativo. El estrés oxidativo es ocasionado por la generación de radicales libres del tipo H₂O₂ (peróxido, especies reactivas de oxígeno ERO) durante la oxidación de NADH₂ en la cadena respiratoria, por la acumulación de antibióticos cíclicos-redox y también como respuesta a la

acumulación de compuestos aromáticos (polifenoles) en el citoplasma [84-89]. Durante el análisis de la expresión, varios genes sobrepresados se pudieron agrupar en el regulon SoxRS o de estrés oxidativo. Estos genes son *acnA*, *cpdA*, *eda*, *edd*, *fumC*, *ompF*, *tktB*, *talA*, *edd* (Figuras 6, 8 y 10). Varios reportes argumentan una sensibilidad al estrés oxidativo mayor en cepas de *E. coli* que han sido modificadas para reducir su genoma y también un redireccionamiento del metabolismo central de carbono de glicólisis hacia la vía de las pentosas fosfato en estas condiciones [78,90]. Como se ha mencionado, es probable que la cepa PB12T en condiciones de producción tenga una distribución mayor de la G6P hacia la vía de las pentosas fosfato en comparación a su cepa parental PB12. *Escherichia coli* ha desarrollado sistemas para detoxificar radicales libres como son las proteínas que atrapan a las ERO y que reparan el DNA contra daño generado por los radicales libres. Por ejemplo, el regulador SoxRS activa la expresión de *micF* un RNA antisentido que se aparea perfectamente al mRNA de *ompF*. Se propone que mediante la disminución de esta porina abundante en *Escherichia coli* se previene la entrada al citoplasma de estos antibióticos [87]. La expresión del gene *ompF* esta disminuida en su expresión 10 veces en la cepa PB12T (Figura 10). Cabe mencionar que OmpF es una de las porinas más importantes para el transporte de glucosa hacia el periplasma y por tanto su subexpresión podría ser una de las causas del bajo transporte de glucosa y en consecuencia de la baja velocidad de crecimiento de la cepa. Estudios realizados en este trabajo indican que el gene *ompC* que codifica para OmpC otra porina importante para el transporte de glucosa, también está subexpresado (datos no mostrados) pero no a los niveles de *ompF*. Por otra parte se ha demostrado que la sobreexpresión en multicopia del gene *cpdA* (fosfodiesterasa de AMPc) incrementa la resistencia al estrés a cepas de *Escherichia coli*, esto debido a que aparentemente en estas condiciones bajan los niveles de AMPc intracelular, inactivando parcialmente a CRP [91]. Esta inactivación parcial de CRP favorece la expresión de genes regulados por RpoS [91]. En la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, el nivel de expresión relativa del gene *cpdA* es alto, alrededor de 3 veces respecto a la cepa PB12 (Figura 10). Si durante el crecimiento de la cepa PB12T los niveles de AMPc son bajos entonces probablemente varios de los genes activados por CRP se subexpresarían y favorecerían la acción de RpoS como pareciera sucede en esta cepa.

8.2.1.3 Producción de ATP y niveles ATP/ADP de la cepa PB12 crecida en glucosa y la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.

La cepa PB12T tiene severamente disminuida la producción de ATP; sin embargo la relación ATP/ADP se mantiene (Figura 11, A). Este es un dato muy interesante que indica que las

estrategias de regulación de los genes y de los flujos parecieran estar encaminadas a mantener esta relación constante y para lograrlo tiene que disminuir tanto la producción como el consumo de ATP tal como se demuestra en la figura 11, B. Para disminuir el consumo de ATP es necesario también disminuir las reacciones biosintéticas y su cofactor NADPH_2 . En el crecimiento en glucosa-glicerol hay una producción ligeramente mas baja de ATP que en glucosa pero también de ADP (Figura 11). Esta baja producción de ATP en la mezcla glucosa-glicerol podría deberse a varios factores: a) a que la internalización de glicerol en el metabolismo central requiere de la inversión de ATP; b) a que el PEP se está redirigiendo a la vía del shikimato y c) un incremento en la canalización del flujo de carbono hacia la lanzadera de glioxilato lo cual disminuye la formación de NADH_2 y ATP.

8.2.1.4 Producción de nucleótidos de la cepa PB12 crecida en glucosa y la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.

Los genes que codifican para proteínas que producen NADH_2 están severamente subexpresados en la cepa PB12T comparado con la cepa PB12 crecida solo en glucosa (Figura 12). Lo anterior es congruente con los niveles de $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ (Figura 13). En las cepas productoras el gene que codifica para la transhidrogenasa encargada de regenerar NADPH_2 a partir de NADH_2 (*pntA*) está subexpresado mientras que el gene que codifica para la transhidrogenasa encargada de regenerar NADH_2 a partir de NADPH_2 (*udhA*) está sobrepresado (Figura 14). Lo anterior explica los bajos niveles de NADPH_2 (Figura 13). Se sabe que el gene *udhA* se sobrepresa en mutantes carentes de *pgi* aparentemente para restablecer el crecimiento en condiciones de exceso de producción de NADPH_2 [92]. En la cepa PB12T se sobrepresa el gene *udhA* a un mayor nivel en las condiciones de crecimiento en la mezcla de glucosa-glicerol (Figura 13). Lo anterior también es congruente con el señalamiento de que la cepa podría estar metabolizando la G6P de manera mas importante a través de la vía oxidativa de las pentosas fosfato debido a la subexpresión del gene *pgi* en las condiciones de producción. Cabe recordar que la vía oxidativa de las pentosas fosfato generan dos moléculas de NADPH_2 (Figura E).

8.2.2 Conclusiones fase II

- En la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol la subexpresión de los genes *pgi*, *gapA*, *pgk*, de varios de los genes de TCA (*gltA*, *icdA*, *sucAB*, *lpdA* y *mdh*) combinado con la sobrepresión de los genes de la lanzadera de glioxilato (*aceBA* y *glcB*), sugiere que la cepa reduce el flujo de carbono en glicólisis, aumentando el flujo a

través de las pentosas fosfato, disminuyendo el flujo de PYR- AcCoA a través de TCA y usando la lanzadera de glioxilato como vía principal anabólica .

- El aumento de la expresión del gen *talA* en la cepa productora solamente en el crecimiento en la mezcla glucosa-glicerol, coincide con el aumento en la producción de E4P y F6P y por tanto también con la producción de compuestos aromáticos.
- Algunos genes regulados por Cra (*ppsA*, *aceA* y *aceB*) cambian su expresión en la condición glucosa versus glucosa-glicerol. Esta expresión diferencial sugiere una disminución en la afinidad de Cra, por algunos operones, lo cual está relacionado con un aumento en la poza de fructosa-6P y fructosa 1-6-fosfato en la condición glucosa-glicerol. La fase lag prolongada durante el crecimiento en glucosa probablemente pudiera estar relacionado con la sobreexpresión del gene *ppsA*, que pudiera generar un ciclo fútil. El glicerol como fuente de carbono pareciera eliminar el conflicto en este nodo importante del metabolismo.
- Los datos transcripcionales sugieren que en esta cepa crecida solamente en glucosa actúan sinérgicamente los genes regulados por Cra y CsrB, causando una desviación no favorable de glucosa hacia la formación de glicógeno. La coutilización de la mezcla glucosa-glicerol parece inactivar parcialmente la expresión del gene *csrB*. La sobreexpresión del gene *ldhA* en glucosa-glicerol indica un aumento en el flujo hacia piruvato pero también una inactivación, al menos parcial, del gene *csrB*. Es relevante mencionar que un trabajo reciente realizado por Chen y colaboradores., 2011 [30] se decidió inactivar al gene *ldhA* y sobreexpersar *talA* para sobreproducir shiquimato en medio mínimo en una cepa de *E. coli*, ambos genes están diferencialmente expresados en la cepa PB12 crecida en glucosa-glicerol y por tanto sugiere que estos genes tienen un papel relevante en condiciones de producción en medio mínimo, como se sugiere en este trabajo de tesis.
- Se detectaron tres posibles cuellos de botella para la generación de PEP en éstas condiciones, los cuales fueron a nivel de los genes *pgi*, *gapA*, *pgk*.
- Aunque existe una menor producción de ATP en las cepas productoras de compuestos aromáticos, la relación ATP/ADP no cambia en ninguna condición. Lo anterior indica que las estrategias de regulación de genes y del flujo de carbono, parecen estar orientadas a mantener esta relación constante.
- Los niveles $NADH_2/NAD^+$ y $NAPDH_2/NAPD^+$ están claramente disminuidos en la cepa PB12(pRW300*aroG^{fbr}*, pCL*tktA*). Lo anterior posiblemente para mantener un balance entre catabolismo y anabolismo.

Los resultados anteriores se están organizando en un manuscrito titulado: **Physiology of a PTS strain growing on glucose and glucose-glycerol during production of aromatic compounds in mineral media**. Karla Martínez-Gómez, Noemí Flores, Guillermo Gosset, Octavio Tonatiuh Ramírez and Francisco Bolívar. En preparación.

Nota: Se incorpora en el anexo II, el análisis transcripcional de la cepa PB12 crecida en la mezcla de glucosa-glicerol.

8.3 Resultados y discusión fase III

Para comprender con mayor detalle la fisiología de PB12(pRW300 $aroG^{fbr}$ pCL $tktA$), cuando cointiliza fuentes de carbono, se decidió que además de conocer el perfil de transcripción de la cepa PB12 crecida en glicerol como única fuente de carbono, había que profundizar en la fisiología de la cepa parental JM101 creciendo en glicerol.

Los resultados sobre la fisiología de la cepa JM101 crecida en glicerol son los siguientes:

8.3.1 Fisiología de la cepa JM101 crecida en glicerol.

8.3.1.1 Análisis a nivel transcripcional y proteómico de la cepa JM101 crecida en glicerol comparada con la misma cepa crecida en glucosa.

a) Genes y proteínas involucrados en el transporte y metabolismo de glicerol y glucosa.

Los genes involucrados en el transporte (*glpF*) y fosforilación del glicerol (*glpK*) están sobreexpresados en la cepa JM101 crecida en glicerol (Tabla 6). De acuerdo a lo esperado el producto del gene *glpK* (GlpK) está sobreproducido 16.18 veces respecto a glucosa (Tabla 7). El gen *glpD* que codifica para la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa no está sobreexpresado de manera importante; sin embargo su producto (GlpD) está sobreproducido 3.6 veces (Tabla 7). Los análisis de proteómica y transcriptómica revelaron que algunos genes de los regulones de maltosa (*mal/lam*) y galactosa (*mgI/gal*) están sobreexpresados: *lamB*, *malE*, *mgIA*, *galP*, *glk* y *pgm* (Tabla 6). También las proteínas correspondientes se producen en mayor cantidad MglB (63.35X), MalE (5.66X) y LamB (5.49X) (Tabla 7). Se sabe que la sobreexpresión de estos genes está correlacionada a altos niveles de AMPc-CRP y la síntesis de los maltodextrinas y D-galactosa como autoinductores. Los genes *malE* y el operón *mgIABC* también están regulados por RpoS [81].

b) Expresión de genes del metabolismo central: glicólisis, TCA, formadores y consumidores de acetato.

Los análisis de transcriptómica revelaron la sobreexpresión de los genes *glk*, *pfkA*, *pfkB*, *pykA* (Tabla 6). *glk* codifica para la glucocinasa (Glc), la cual fosforila la glucosa para convertirla a glucosa-6P cuando es transportada del periplasma al citoplasma por GalP o MglABC. Este gene tiene un promotor putativo para RpoS y es ligeramente reprimida por Cra [75]. Glc tiene homología con Mlc el represor del operon *mal*. Glc puede unirse al promotor del gene *ptsG*, liberando a Mlc e incrementando la represión del gene *malT* [93]. De acuerdo a lo anterior el gene *ptsG* está subexpresado en la cepa JM101 crecida en glicerol. La

sobreexpresión del gene *glk* probablemente se realiza para poder consumir la glucosa producida por la degradación de glicógeno y para controlar parcialmente una sobreinducción del operon *mal*. Los genes que codifican para la fosfofructocinasa I y II (*pfkA* y *pfkB*) están sobreexpresados. Los productos de estos genes PfkA y PfkB convierten fructosa a fructosa-6P con el gasto de una molécula de ATP, este es un paso irreversible en la glucólisis y por tanto un importante punto de control del flujo. El gene *pfkA* es regulado positivamente por CsrA [94] y RpoS-Cri [74,81]. El gen *pfkB* es regulado negativamente por CsrA [94] y también tiene un promotor regulador por RpoS [95]. El gene *pykA* está sobreexpresado en la cepa JM101 crecida en glicerol lo cual ya había sido reportado para otras cepas crecidas en glicerol [96,97]. Los genes *pykA* y *pykF* que codifican para las piruvato cinasas PykA y PykF respectivamente, tienen promotores regulados por RpoS, pero *pykF* está regulado negativamente por Cra. Alostéricamente ambas piruvato cinasas tienen propiedades diferentes; PykF es activada por fructosa 1,6 fosfato mientras que PykA es activada por AMP y algunos azúcares de las pentosas fosfato. Para clarificar el papel de *pykA* y *pykF* en el metabolismo de JM101 creciendo en glicerol, se construyeron mutantes sencillas en los genes *pykA* y *pykF*. Se encontró que la actividad de piruvato cinasas es mayor en la cepa parental, seguida por la mutante en el gene *pykF*, mientras que la menor la actividad específica fue en la mutante en el gene *pykA*. (Figura 16) Esto confirma que la actividad de mayor relevancia durante el crecimiento en glicerol es la de PykA. Como fue sugerido por Oh y colaboradores [96], las propiedades alostéricas de esta enzima son importantes durante el crecimiento en glicerol, pero además como fue demostrado en este experimento su síntesis es favorecida en la cepa JM101 crecida en glicerol. Los genes *poxB*, *acs*, *pta*, *aceA*, *aceB*, *pckA*, están sobreexpresados (Figura 15, Tabla 6). Los productos de estos genes están involucrados en la síntesis-consumo de acetato y su incorporación a vías gluconeogénicas. *poxB* y *acs* se sobreexpresan en condiciones de limitación de fuente de carbono y son parte del regulón RpoS [80,81,98]. Ya que no fue detectado acetato ni otro ácido orgánico durante el crecimiento en glicerol es posible proponer que el acetato formado por PoxB se reconsume via Acs. De acuerdo a esta hipótesis, las mutantes con el gene *poxB* inactivado acumulan acetato muy tempranamente en el cultivo, como se discute en las siguientes secciones. La sobreexpresión de los genes *aceA*, *aceB* y *glcB* indican la inducción de la transcripción de los genes de la lanzadera de glioxilato por acetato. Se midió la actividad específica de la isocitrato liasa (Icl) y solamente se detectó actividad en la cepa JM101 crecida en glicerol (Figura 17). El gene *pckA* está altamente sobreexpresado y su producto (PckA) sobreproducido (Figuras 15 y 17, Tablas 6 y 7). PckA cataliza la formación de PEP a partir de oxalacetato liberando una molécula de CO₂ (Figura 15). Ya que el oxalacetato es una

molecula indispensable para regenerar TCA y además está altamente comprometido a la formación de aspartato, la sobreexpresión y sobreproducción del gene *pckA* parece contradictoria; sin embargo, si el metabolismo a través de acetato-lanzadera de glioxilato está funcionando durante el crecimiento en glicerol, la sobreexpresión del gene *pckA* es indispensable para completar el sistema, si la enzima MaeB no tiene una alta actividad específica, como parece ser el caso el caso en la cepa JM101 crecida en glicerol en donde la actividad específica de la enzima MaeB es menor respecto a la detectada en glucosa (Figura 17).

Los genes *acnA*, *acnB*, *fumA* y *fumB* en JM101 creciendo en glicerol están sobreexpresados respecto al crecimiento en glucosa (Figura 15, Tabla 6). Los productos de los genes *acnA*, *acnB* son la aconitasa A y B, las cuales catalizan la formación de isocitrato a partir de citrato. El gene *acnA* es regulado positivamente por Crp, SoxRS, FNR y reprimido por ArcA [99]. Además AcnA es una enzima cuya actividad específica es activada *in vitro* por ácido indoleacético [100]. Por otra parte, el gene *acnB* es regulado por RpoS y la sobreexpresión de este gen se encontró en cepas creciendo en medio mínimo con acetato. AcnB se usa preferencialmente en la bacteria cuando se crece en sustratos donde se induce la lanzadera de glioxilato [101]. El gene *icd* fue subexpresado en la cepa JM101 crecida en glicerol comparado con la misma cepa crecida glucosa. La expresión de los genes *mdh* y *sucAB* parece también estar ligeramente reducida (Figura 15 y Tabla 6). La sobreexpresión del gene *fumB* (Tabla 6) no era esperada ya que este gene es transcrito preferencialmente en condiciones anaeróbicas [102]. La enzima fumarasa B tiene mas afinidad por malato que por fumarato, así que aparentemente funciona como enzima alternativa en anaerobiosis. De manera interesante, el sistema de dos componentes DcuSR (sensor asociado a membrana DcuS y el regulador citoplasmico DcuR) induce la transcripción del operon *dcuB-fumB* (DcuB, transportador de compuestos de 4 carbonos), el operon *frdABCD* (complejo anaeróbico de la fumarato reductasa), y el gene *DctA* (que codifica para transportador de compuestos C4, derivados de TCA). La sobreexpresión de los genes *fumB* y *frdABCD* sugiere una probable carencia de compuestos C4 como se demuestra en la siguiente sección.

c) Deficiencia de compuestos de 4 carbonos (C4) y de síntesis de aminoácidos.

En la cepa JM101 creciendo en glicerol se detectó una baja producción de GlnA (glutamina sintasa) (Tabla 7); GlnA es responsable de la síntesis de L-glutamina. Se creció a la cepa JM101 en glicerol con presencia de glutamina (0.005 gr/L) y la μ se incrementó 10% (Tabla 8). Se ha especulado que en algunas circunstancias se previene la excesiva formación de

glutamina, con la finalidad de ahorrar ATP, glutamato y NADPH₂ [103]. El NADPH₂ ahorrado se puede convertir en NADH con la UdhA transhidrogenasa. Tal vez este sea el caso en JM101 crecida en glicerol ya que el gene *udhA* está sobrepresado (Tabla 6). Si el flujo hacia isocitrato es menor en la cepa JM101 crecida en glicerol respecto a glucosa, lo anterior pudiera disminuir el α -cetoglutarato disponible para la producción de succinil-CoA, del cual derivan succinato, fumarato, malato y oxalacetato. Para probar esta posibilidad se analizó el crecimiento de la cepa JM101 crecida en glicerol adicionado con malato y succinato. Ambos compuestos aumentan la μ en 15% (Tabla 8). Esta deficiencia de síntesis de compuestos C4 es congruente con la sobrepresión de los genes *frdABCD* y *fumB*, así como el incremento de la μ cuando la cepa crece en succinato y malato. La deficiencia en C4 afectaría también la síntesis de los aminoácidos de 4 carbonos: aspartato y asparagina. La deficiencia en la producción de C4 también correlaciona con la menor expresión de los genes *icd* y *lpdA* (Tabla 6).

d) Estrategias de reciclamiento de carbono de la cepa JM101 crecida en glicerol.

La sobrepresión de los genes *poxB*, *acs*, *pta*, *aceA*, *aceB* y *pckA* y el consumo de acetato en la cepa JM101 crecida en glicerol indican que la cepa aparentemente produce y consume simultáneamente el acetato sintetizado (Figura 18 y Tabla 10). Las mutantes en los genes *poxB* y *pckA* acumulan acetato en fases tempranas de la fermentación. Lo anterior sugiere que la cepa JM101 cuando crece en glicerol como fuente de carbono, recicla carbono a través de PoxB, Acs, lanzadera de glioxilato y PckA. Lo anterior probablemente para preservar parte del carbono y evitar su pérdida en CO₂ a través de TCA. También se inducen los genes gluconeogénicos en la región superior de la glicólisis, para sintetizar glucosa 6-fosfato a partir de glicerol. Todos estos genes están regulados por RpoS, lo que indica un crecimiento en estrés por carbono. Lo anterior es congruente con los resultados de que esta cepa en estas condiciones de crecimiento con glicerol como única fuente de carbono, pareciera estar deficiente en la producción de compuestos de 4 carbonos a nivel de TCA.

e) Patrón de expresión de la vía común de los aminoácidos aromáticos

De manera interesante algunos genes clave de la vía del shikimato se sobrepresan cuando la cepa crece en glicerol, por ejemplo, *aroB*, *aroD*, *aroE* y *aroL* (Tabla 6). Por otra parte ninguno de los tres genes que codifican para las DAHP sintasas (*aroG*, *aroH*, *aroF*) cambian significativamente su expresión. Adicionalmente el transportador de compuestos aromáticos *aroP* está ligeramente sobrepresado. Es interesante que para los genes *aroB*, *aroD* y *aroE* no existe ningún regulador conocido. En el caso del gene *aroL* se sabe que es regulado

negativamente por TrpR y TyR, cuyos correpresores son triptófano y tirosina respectivamente [104].

8.3.2 Evaluación de derivadas de la cepa JM101 con inactivaciones en genes del nodo PEP-PYR.

Adicionalmente se construyeron algunas mutantes del nodo PEP-PYR. Se evaluó el efecto de las mutaciones en los genes *ppc*, *pckA*, *poxB*, *pykA*, *pykF* y *rpoS* en los parámetros cinéticos y estequiométricos y se compararon con la cepa silvestre crecida en glicerol como única fuente de carbono. Se evaluaron las mutantes en cultivos en matraz usando medio mínimo con glicerol o glucosa como únicas fuente de carbono, midiendo el efecto de las mutaciones en la μ , velocidad de consumo de sustrato (q_s) y rendimiento biomasa sustrato ($Y_{x/s}$). La mutante en *rpoS* tiene dos horas de retraso en la adaptación en medio mineral, pero una vez adaptada la μ es la misma que la cepa parental (Tabla 9). Sin embargo, esta mutante en *rpoS* tiene una menor consumo específico de glicerol (28%) y más alta $Y_{x/s}$ (23%) que la cepa parental (Tabla 9). Con el menor consumo de glicerol aparentemente existiría una redistribución de genes importantes que permiten mantener la μ . Aunque RpoS no está directamente relacionado con los genes que permiten incorporar glicerol al metabolismo central (*glpF*, *glpD* y *glpK*), su relación con el gene *glpD* es indirecta a través de ArcAB. Algunos reportes argumentan una retroalimentación de RpoS-ArcA [101]. Es claro es que RpoS es fundamental para la adaptación y mantener un mayor consumo de glicerol en medio mineral. Sin embargo más estudios sobre el papel de RpoS se pueden realizar. La mutante en el gene *poxB* tiene la misma μ , q_s and $Y_{x/s}$ que la cepa parental pero acumula acetato en una fase temprana del cultivo (Tabla 9). Este resultado puede explicarse en dos formas: la inactivación del gene *poxB* produce una baja en la expresión del gene *acs* o la redirección de piruvato a través de PoxB es necesaria para la inducción de la lanzadera de glioxilato. La mutante en el gene *pckA* tiene dos horas de adaptación al medio mineral: sin embargo, ni la q_s ni $Y_{x/s}$ se afecta, aunque se detectó acetato en fases tempranas de la fermentación (Tabla 9). PckA es importante para la adaptación de JM101 en glicerol. Por otra parte la mutante en el gene *ppc* es incapaz de crecer en glicerol o en glucosa como únicas fuentes de carbono.

8.3.3 Síntesis de indol y evaluación de la mutante JM101 Δ *tnaA*.

Una de las proteínas altamente expresadas durante el crecimiento en glicerol fue TnaA, correspondiente a la triptofanasa indo-liasa (Tabla 7). Esta proteína cataliza la conversión de indol a piruvato, amonio y succinato. Se midió la actividad específica de Tna a 1 DO; y esta

resultó 400% veces mayor en glicerol comparada con glucosa a la misma DO. Se detectó producción de indol durante el crecimiento de JM101 crecida en glicerol, encontrándose dos picos de producción uno justo antes de alcanzar 1 DO (0.83 DO) y otro justo antes de alcanzar la fase estacionaria (Figura 19). Se evaluó a la mutante JM101 Δ *tnaA* en biorreactores y no se detectaron cambios en la μ , q_s y $Y_{x/s}$ (Figura 19). Sin embargo la cepa JM101 Δ *tnaA* alcanzó una menor densidad óptica que la cepa silvestre (Figura 19). La cepa JM101 Δ *tnaA* produce 0.3 gr/l de ácido acético y trazas de ácido láctico. Los resultados anteriores sugieren un papel importante del indol durante el crecimiento de JM101 en glicerol. Se sabe que el indol y el compuesto llamado autoinductor-2 son vías de señalización célula-célula en *E. coli*. Ambas señales están involucradas en la regulación de genes de formación de flagelo y motilidad, expresión de sistemas de secreción tipo-III, transcripción del operón *ftsQAZ*, inhibición de la replicación de DNA, y en la activación de vías degradativas [105]. El indol influye en la transcripción mediada por SdiA. SdiA es un sensor de la señales de “quorum sensing”. A 30°C el indol vía SdiA aparentemente reprime significativamente a genes involucrados en la síntesis de biosíntesis de pirimidina (*carAB*, *pyrLBI*, *pyrC*, *pyrD*, *pyrF* and *upp*) y transporte de uracilo (*uraA*) y a la vez induce la biosíntesis de purinas (*purEK*, *purHD*, *purC*, *purM*, *purL*, *purR* and *purT*) [106]. Adicionalmente el indol induce prematuramente la expresión de *crl* a nivel transcripcional y traduccional. Crl, también es considerado un nuevo sensor ambiental [81]. Crl estimula la actividad de RpoS, lo cual produce un aumento en la velocidad de transcripción de genes regulados por RpoS en la fase estacionaria [107]. Entonces ¿por que producir indol cuando la cepa está creciendo en glicerol? Quizá el indol es parte de una señal adaptativa que modula la acción de genes durante todo el crecimiento de JM101 en glicerol que es una fuente de carbono pobre. La síntesis de triptófano, histidina, NAD y nucleótidos (purinas y pirimidinas) usan PRPP (5-fosfo-D-ribosil-a-1-fosfato) como precursor y cerca de un 30-40% del PRPP sintetizado se utiliza para la síntesis de nucleótidos y un 15% de triptófano. Probablemente la continua síntesis de indol a partir de triptófano aumenta la demanda de PRPP, incrementando el flujo de DHAP que es dirigido hacia la vía de las pentosas fosfato. Si la demanda de triptófano es bloqueada, el flujo de entrada de DHAP (G3P) que antes era dirigido hacia pentosas-fosfato ahora es dirigido hacia glicólisis, el cual es incapaz de contener todo el flujo de AcCoA que viene desde piruvato y este compuesto entonces se convierte en ácido acético y ácido láctico. El segundo escenario involucra el papel señalizador del indol. Como se mencionó el indol induce prematuramente la expresión de la proteína Crl a nivel transcripcional y traduccional. La proteína Crl estimula la actividad de RpoS, e incrementa la velocidad de transcripción de los genes del regulón RpoS en fase estacionaria. De hecho mutantes en los

genes *cri* o *rpoS* tienen bajas producciones de las proteínas FbaB, TalA, PykF, PfkA, GltA y PoxB. Una menor producción de PoxB y TalA en la cepa JM101 Δ *tnaA* podría explicar un alto flujo glicolítico, mientras que la baja producción de GltA explica la incapacidad de redirigir el flujo de AcCoA hacia TCA. Posiblemente, el crecimiento balanceado en glicerol restringe el flujo a través de la vía no oxidativa de las pentosas fosfato, disminuyendo de forma importante la síntesis de Ribosa-5fosfato y PRPP necesario para producción de nucleótidos. De hecho, las proteínas Cdd, Udp, DeoD se sobrepresaron durante el crecimiento de JM101 en glicerol (Tabla 7), estas proteínas están involucradas en vías de reciclamiento de purinas y pirimidinas. Se sabe que esas tres proteínas se sobrepresan en condiciones de limitación de PRPP.

8.3.4 Conclusiones fase III

- La cepa silvestre JM101 crecida en glicerol, sobrepresa genes y sobrepduce proteínas involucrados en el transporte de glucosa y otros carbohidratos, como son los regulones de maltosa (*mal/lam*) y galactosa (*mgI/gal*): *lamB*(LamB 5.49X), *malE*(MalE 5.66X), *mgIB* (MgIB 63.35X), *galP*, *glk* y *pgm*. Estos genes se pueden considerar como sensores del crecimiento en estrés por carbono. Varios de los genes glicolíticos sobrepresados, *glk*, *pfkA*, *pfkB*, *fbaA*, *fbaB* son regulados por RpoS. La sobrepresión de los genes *poxB*, *acs*, *pta*, *aceA*, *aceB*, *pckA* y el consumo de acetato en la cepa JM101 crecida en glicerol indica que la cepa produce y consume simultáneamente el acetato producido. Las mutantes inactivadas en los genes *poxB* y *pckA* acumulan acetato en fases tempranas de la fermentación. Lo anterior sugiere que la cepa JM101 cuando crece en glicerol como fuente de carbono, recicla carbono a través de PoxB, Acs, lanzadera de glioxilato y PckA. También se sobrepresan los genes gluconeogénicos en la región superior de la glicólisis, para sintetizar glucosa 6-fosfato a partir de glicerol. Todos estos genes están regulados por RpoS, lo que indica un crecimiento en estrés por carbono. Congruentemente con lo anterior hay una reducción aparente en la síntesis de compuestos de 4 carbonos del TCA, ya que al agregar algunos de estos compuestos se incrementó la μ de las cepas creciendo en glicerol. Lo anterior está soportado por la subexpresión de algunos genes de TCA como *icdA*, *lpdA* y *mdh* involucrados en la síntesis de estos compuestos de 4 carbonos.
- RpoS es importante para adaptarse a medio mineral con glicerol como única fuente de carbono y también repercute en la eficiencia de consumo de glicerol (Yx/s y qs). La cepa JM101 crecida en glicerol, produce indol en fases tempranas del cultivo. La cepa

inactivada en el gene *tnaA* (JM101 Δ *tnaA*) produce acetato y lactato cuando crece en glicerol contrario a la cepa parental. Lo cual sugiere un papel importante de la proteína TnaA y/o del indol. Probablemente para inducir a Crl que es corregulador de RpoS; sin embargo, un papel como señalizador aún no puede establecerse con certeza. Es la primera vez que se aborda el probable papel del indol en una cepa silvestre crecida en glicerol en medio mínimo.

Se tiene elaborado un manuscrito donde se presenta el análisis de la fisiología de la cepa JM101 crecida en glicerol: **New insights into the *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging and acetate carbon recycling metabolism responses during growth on glycerol.** Karla Martínez-Gómez, Héctor M. Castañeda, Noemí Flores, Gabriel Martínez-Batallar, Guillermo Gosset, Sergio Encarnación and Francisco G. Bolívar[§], que se enviará a la brevedad a la misma revista. (Anexo III).

8.4 Resultados y discusión fase IV

8.4.1 Ingeniería de vías metabólicas para aumentar la capacidad de producción de compuestos aromáticos usando glicerol como fuente de carbono.

8.4.1.1 Rendimientos y productividades de las cepas JM101/pJLBaroG^{fbt}tktA, JM101ΔpykA/pJLBaroG^{fbt}tktA y JM101ΔpykF/pJLBaroG^{fbt}tktA crecidas en glicerol como única fuente de carbono.

Todas las cepas que fueron transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fbt}tktA e inducidas desde el inicio de la fermentación disminuyen su velocidad respecto a las mismas cepas sin plásmido (Tabla 11, Figura 20). La cepa silvestre crecida en glicerol posee un μ de 0.50 hr⁻¹ mientras que en presencia del plásmido e inducida reduce su μ a 0.22 hr⁻¹. Para el caso de la cepa que se le inactivó el gen *pykA* la reducción es de 0.4621 a 0.067 hr⁻¹ y la cepa con el gen *pykF* inactivado de 0.4073 a 0.1143 hr⁻¹. El efecto en el crecimiento es más drástico para el caso de la cepa mutante en el gen *pykA*, ya que reduce su μ a más del 85% pero también es la mejor productora, ya que en esta cepa (*pykA*⁻), se tiene un rendimiento del 80% del máximo teórico de compuestos aromáticos (Tabla 11, Figura 20). Lo anterior refleja la producción de compuestos aromáticos a costa de la producción de biomasa. En la tabla 11 se muestran los rendimientos y productividades de DAHP y aromáticos de las diferentes cepas. En la figura 20 se puede observar los crecimientos, los consumos de fuentes de carbono y las producciones de compuestos aromáticos. El máximo rendimiento teórico en glicerol es 0.42 molC/molC. La producción de compuestos aromáticos inicia en la etapa tardía de la fase exponencial, correspondiente a una biomasa de 0.4 gr/L, continuando en la fase estacionaria cuando la concentración de compuestos aromáticos es la máxima alcanzada. La mayor concentración de compuestos aromáticos corresponde al DAHP. Los metabolitos DHS y SHIK se encuentran en menor concentración, pero de forma significativa en todas las cepas, siendo la cepa JM101ΔpykF/pJLBaroG^{fbt}tktA en la que se detectó a mayores niveles (Figura 20).

8.4.1.2 Rendimientos y productividades de las cepas JM101, JM101ΔpykA y JM101ΔpykF con el operón Ptpi-(*aroG,tktA,aroB,aroD*) insertado en el episoma y crecidas en glicerol como única fuente de carbono.

Con la finalidad de tener cepas que contengan con una menor carga metabólica debido al plásmido, a las cepas JM101, JM101 Δ pykF y JM101 Δ pykA se les insertó en el episoma un operón con los genes *aroG*, *tktA*, *aroB* y *aroD* en tándem bajo el promotor del gen *tpi* (triosa fosfato-isomerasa) [108]. A esta construcción se le denominó P*tpi*-(*aroG*, *tktA*, *aroB*, *aroD*). Las cepas con el operón integrado crecidas en matraz con glicerol como única fuente de carbono incrementaron su μ con respecto a las respectivas cepas que poseen el plásmido pJLBaroG^{fbr} *tktA*. Respecto a sus cepas parentales tan solo se notó una ligera disminución en sus velocidades de crecimiento. La μ de la cepa JM101 P*tpi*-(*aroG*, *tktA*, *aroB*, *aroD*) es 1.86 veces mayor que la de la parental con el plásmido, y tan solo se reduce su μ 16 % con respecto a la cepa silvestre (tabla 12). Esto representa una recuperación del 28% de su velocidad de crecimiento con respecto a la cepa JM101(pJLBaroG^{fbr} *tktA*). En el caso de la cepa JM101 Δ pykA P*tpi*-(*aroG*, *tktA*, *aroB*, *aroD*), la recuperación de la velocidad es drástica. La cepa con el plásmido presentó una reducción del 85% en su μ , mientras que la versión con el operón integrado tan solo redujo su velocidad 12% respecto a la cepa silvestre. Lo anterior representa una recuperación del 73%. Como se puede ver en la tabla 12, la cepa JM101 Δ pykF P*tpi*-(*aroG*, *tktA*, *aroB*, *aroD*) presentó una μ similar a su cepa parental inmediata, representando el caso más exitoso de la recuperación de la μ , alcanzando un incremento de 3.6 veces con respecto a la JM101 Δ pykF(pJLBaroG^{fbr} *tktA*). Sin embargo, esta mayor velocidad de consumo de glicerol también se refleja en una producción de compuestos aromáticos de un orden de magnitud menor en todas las cepas (Tabla 12). Además contrario a las cepas con plásmido, las cepas con el operón insertado en el episoma producen acetato.

8.4.2 Conclusiones fase IV

- La estrategia de inactivar a las piruvato cinasas en la cepa silvestre JM101 para acumular el PEP producido fue exitosa para aumentar la producción de compuestos aromáticos. Las cepas JM101, JM101 Δ pykA y JM101 Δ pykF transformadas con el plásmido pJLBaroG^{fbr} *tktA* e inducidas desde el inicio de la fermentación disminuyen su velocidad específica de crecimiento respecto a las mismas cepas sin plásmidos. La cepa JM101 Δ pykA(pJLB *aroG*^{fbr} *tktA*) tiene el mayor rendimiento de compuestos aromáticos, pero también la menor velocidad de crecimiento en glicerol como única fuente de carbono.

- La inserción en el episoma del operon P_{tpi}-(*aroG*,*tktA*, *aroB*, *aroD*) no fue exitosa para aumentar el rendimiento de compuestos aromáticos; sin embargo, otros promotores pueden ser evaluados así como la inserción de múltiples copias de este operón en cromosoma.

FIGURAS Y TABLAS MENCIONADAS EN ESTA TESIS

Figura 1. Perfiles de crecimiento y utilización de dos sustratos por la cepa silvestre JM101 y la cepa derivada PB12.

Los cultivos aeróbicos en fermentador de ambas cepas contenían glucosa (2 g/L equivalente a 65 mmolC/L) y otro carbohidrato (2 g/L, equivalente a aproximadamente 65 mmolC/L). Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%. Eje X: concentración de sustratos y biomasa.

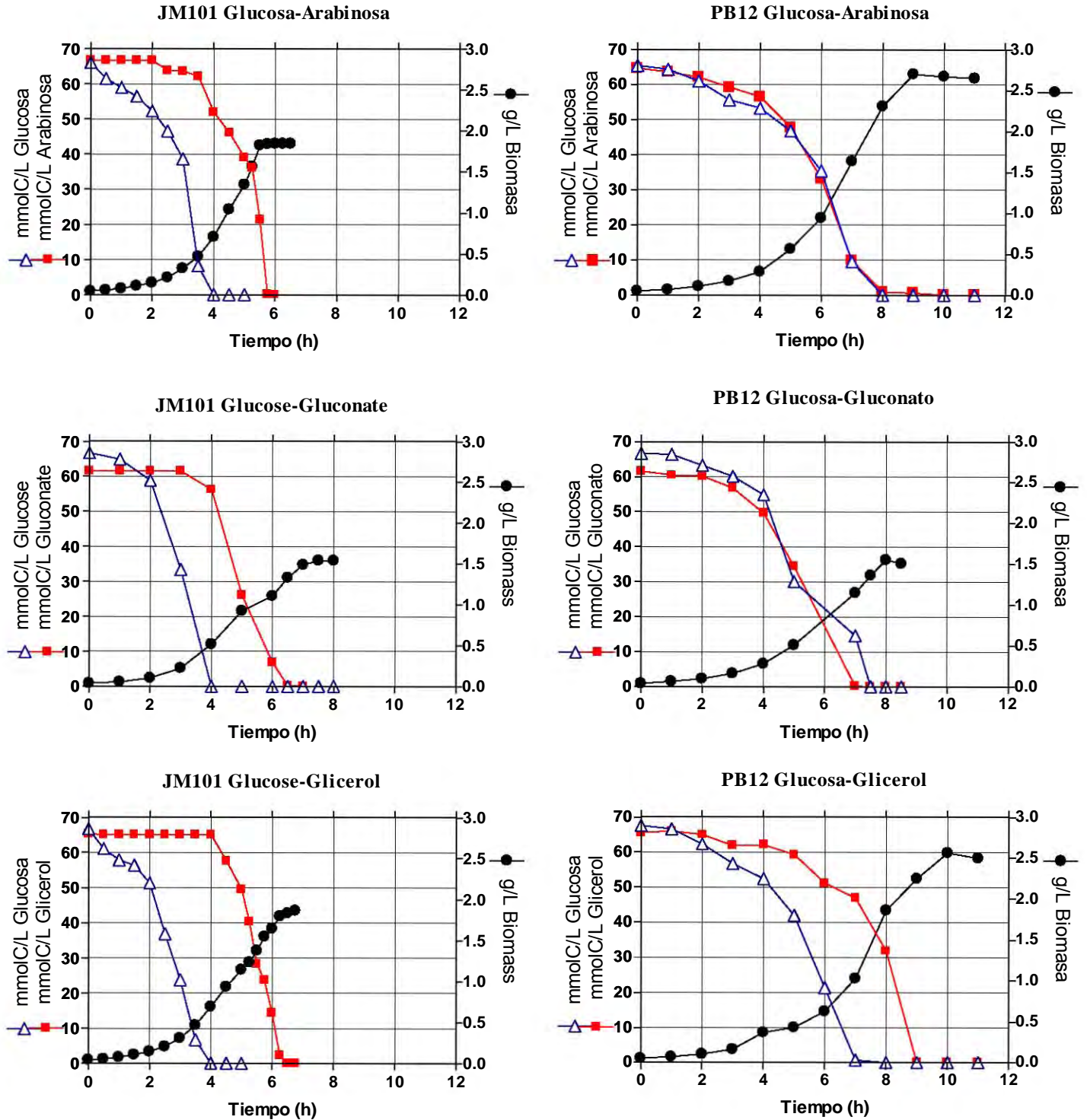


Tabla 1. Parámetros cinéticos de las cepas JM101 y PB12 en mezclas de dos fuentes de carbono.

Fuentes de carbono	JM101				PB12			
	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L
Glucosa + Arabinosa	0.72 (0.64)	0.0180 (0.0.012)	40.68 (7.64)	0.30	0.55	0.0144	38.19	0.30
Glucosa + Glicerol	0.72 (0.45)	0.0171 (0.006)	43.11 (8.55)	0.13	0.50 (0.20)	0.0136 (0.017)	38.23 (9.24)	0.03
Glucosa + Gluconato	0.72 (0.33)	0.00108 (0.0133)	70.33 (20.62)	0.49	0.51	0.0125	40.80	0.39

Los valores entre parentésis son los parámetros correspondientes a segunda la fuente de carbono. * Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la cepas JM101 y PB12 en una sola fuente de carbono crecidas en fermentador.

Fuentes de carbono	JM101				PB12			
	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L
Glucosa	0.72	0.01800	71.88	0.44	0.42	0.0171	24.50	0.30
Arabinosa	0.68	0.0066	155.84	0.50	0.50	0.0081	62.50	0.33
Glicerol	0.47	0.01070	43.90	0.18	0.32	0.0086	37.17	0.05
Gluconato	0.69	0.0049	80.00	0.55	0.51	0.0094	42.50	0.40

* Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%.

Figura 2. Consumo de diferentes fuentes de carbono y producción de DAHP en células en reposo de la cepa PB12aroB/pRW300aroG^{br}, pCLtktA. Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%. Eje X: concentración de sustratos y DAHP.

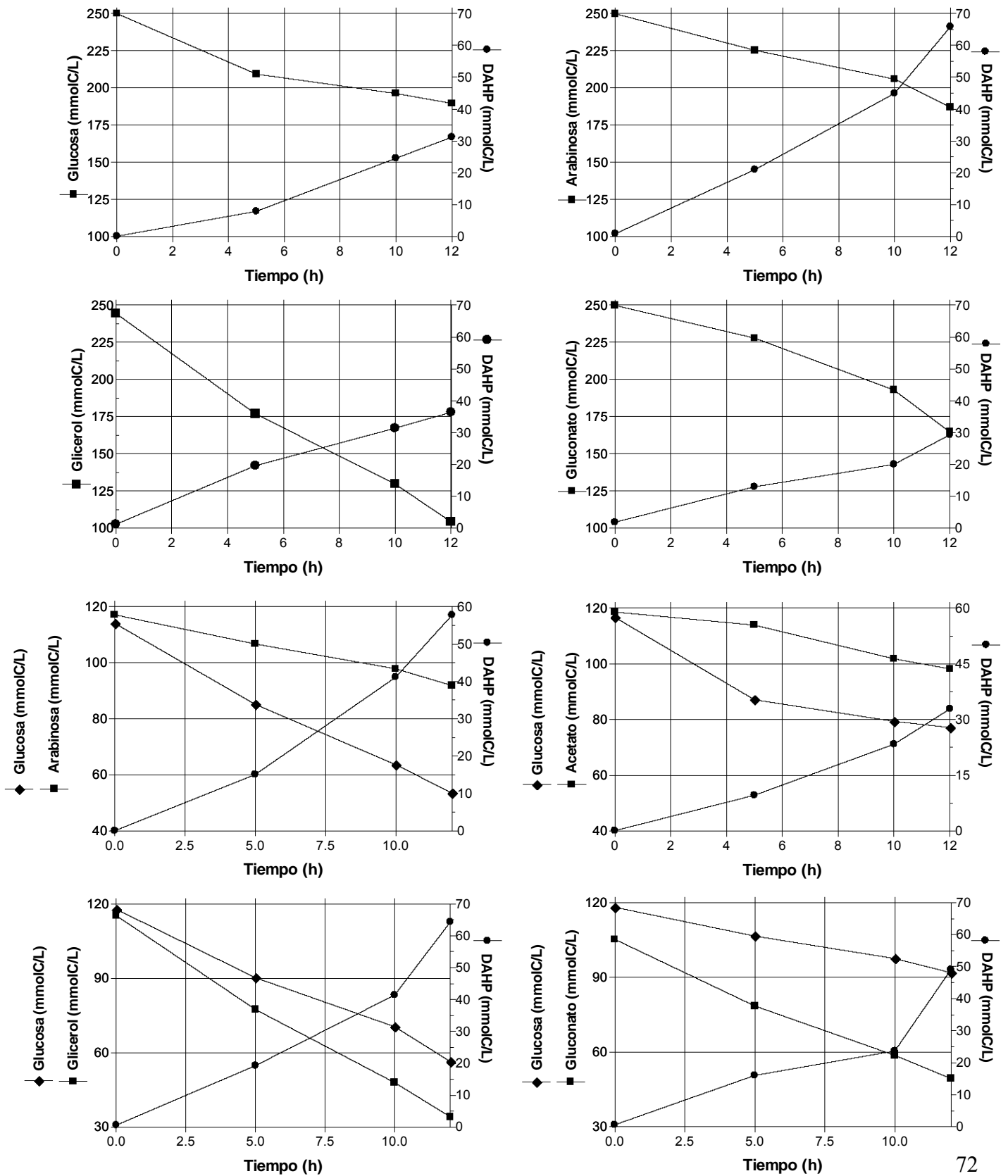


Tabla 3. Parámetros cinéticos en la producción de DAHP de la cepa PB12aroB⁻/pRW300aroG^{fb}r, pCLtkA en células en reposo en varias fuentes de carbono y mezclas.

Carbon sources	q _{DAHP} (mmol DAHP/g _{dcw} *hr)	q _s (mmol /g _{dcw} *hr)	Y (mmol DAHP/ mmol carbon sources)	% (Y _{real} /Y _{theoretic})
Glucosa	0.42	0.40	0.56	65
Arabinosa	0.95	0.67	0.71	100
Acetato	0.00	0.00	0.00	---
Gluconato	0.50	1.19	0.50	100
Glicerol	0.36	4.68	0.13	30
Glucosa-Arabinosa	0.95	1.55	0.74	91
Glucosa-Acetato	0.67	2,91	0.32	100
Glucosa-Glicerol	1.36	2.62	0.41	61
Glucosa-Gluconato	0.76	1.14	0.41	60

* Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%.

Tabla 4. Parámetros cinéticos en la producción de DAHP de la cepa JM101aroB⁻/pRW300aroG^{fb}r, pCLtkA en células en reposo.

Fuente de carbono (F.C)	q _{DAHP} (mmol DAHP/gr p. seco cél *hr)	qs (mmol fuente de carbono/ gr p. seco cél* hr)
Glucosa	0.017	2.26
Arabinosa	0.027	0.08
Acetato	<0.01	-----
Gluconato	<0.01	-----
Glicerol	<0.71	-----

* Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%.

Tabla 5. Parámetros cinéticos y de producción de intermediarios aromáticos de la cepa PB12T crecida en fermentador y en varias fuentes de carbono.

Carbon Sources	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	q_s mmolC/g _{DCW} hr	q_{DAHP} mmolC _{DAHP} /g _{DCW} hr	q_{DHS} mmolC _{DHS} /g _{DCW} hr	q_{SHIK} mmolC _{SHIK} /g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	Y _{arom} mmolC/mmolC
Glucosa	0.32	0.0093	34.33	1.3575	0.1464	0.1435	0.06	0.07
Arabinosa	0.42	0.0066	64.61	3.5085	0.2359	0.0523	0.35	0.12
Glicerol	0.09	0.0081	11.15	0.6600	0.8000	0.2000	0.00	0.25
Glucosa-Arabinosa	0.42	0.0061	68.85	7.7967	0.3619	0.1367	0.30	0.13
Glucosa-Glicerol	0.13	0.0076	17.11	9.0498	1.9112	0.9124	0.00	0.36

*Las concentraciones de carbohidratos fueron de 4 gr/L en el caso de glucosa y 2gr/L de cada fuente de carbono cuando se utilizo mezclas. Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <10%.

Figura 3. Producción de DAHP y biomasa por la cepa PB12T

Los cultivos aeróbicos en fermentador de las dos cepas contenían como única fuente de carbono glucosa, arabinosa y glicerol (4 g/L equivalent a 130 mmolC/L), cuando fueron mezclas con otro carbohidrato 2 gr/L (equivalente a 65 mmolC/L) de cada fuente de carbono. El IPTG (0.1 mM) fue añadido al medio desde el inicio de la fermentación. Las diferencias entre los valores fue menor al <10%. Eje X: concentración de biomasa y DAHP.

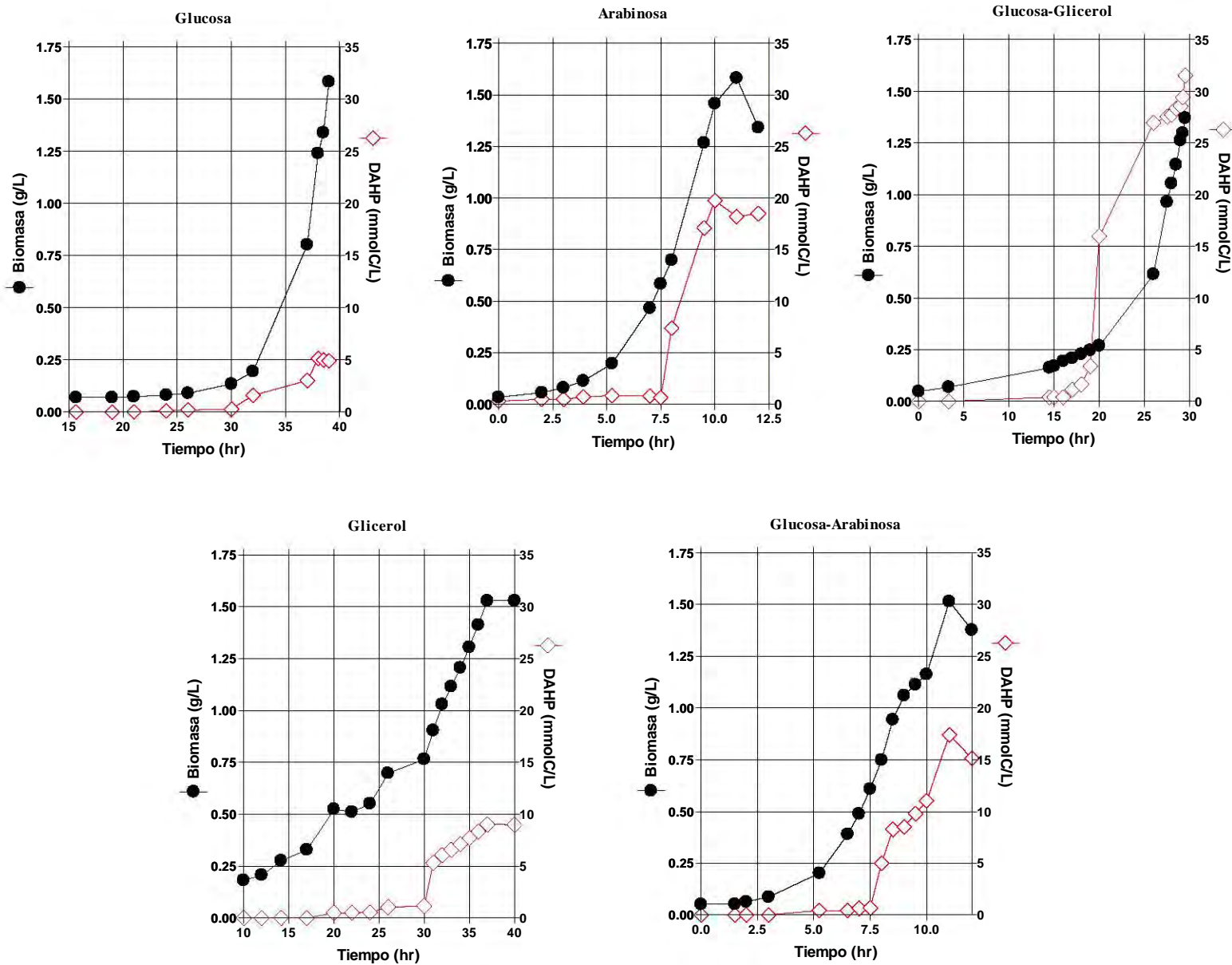
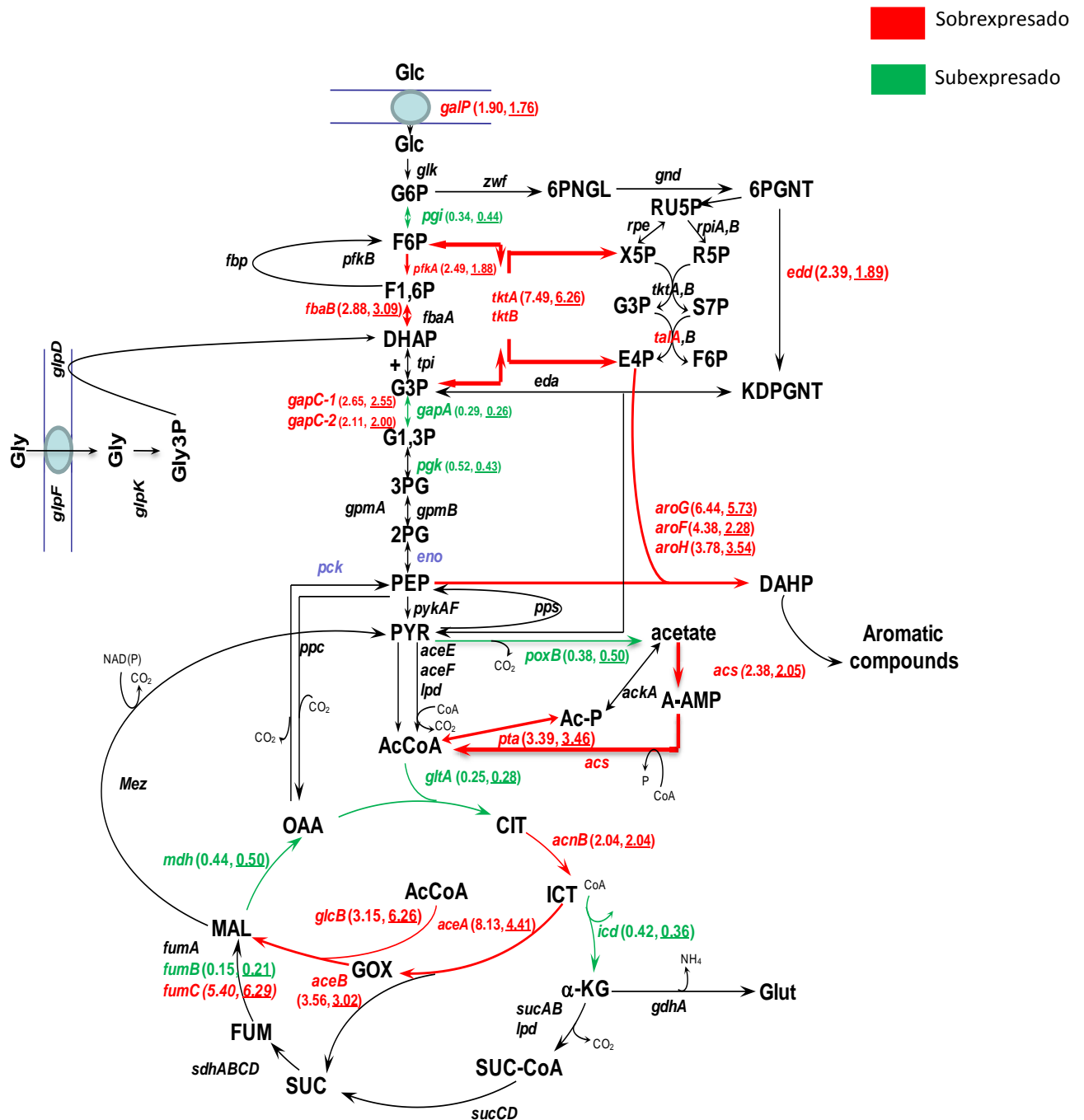


Figura 4. Reacciones del metabolismo central de la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa. Se muestran los valores de expresión que son similares en ambas condiciones (subrayados condición glucosa-glicerol).



Los resultados de los patrones de transcripción son el resultado del promedio de al menos cinco experimentos con cDNAs distintos que provinieron de igual número de fermentaciones independientes. A menos que exista una aclaración, solamente se presentan aquellos genes que poseen una desviación estándar aceptable para experimentos de transcripción con RT-PCR (menor o igual al 30%). En todos los casos el nivel de expresión se compara con respecto a PB12.

Figura 5. Patrón de expresión de los genes glicolíticos y gluconeogénicos en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

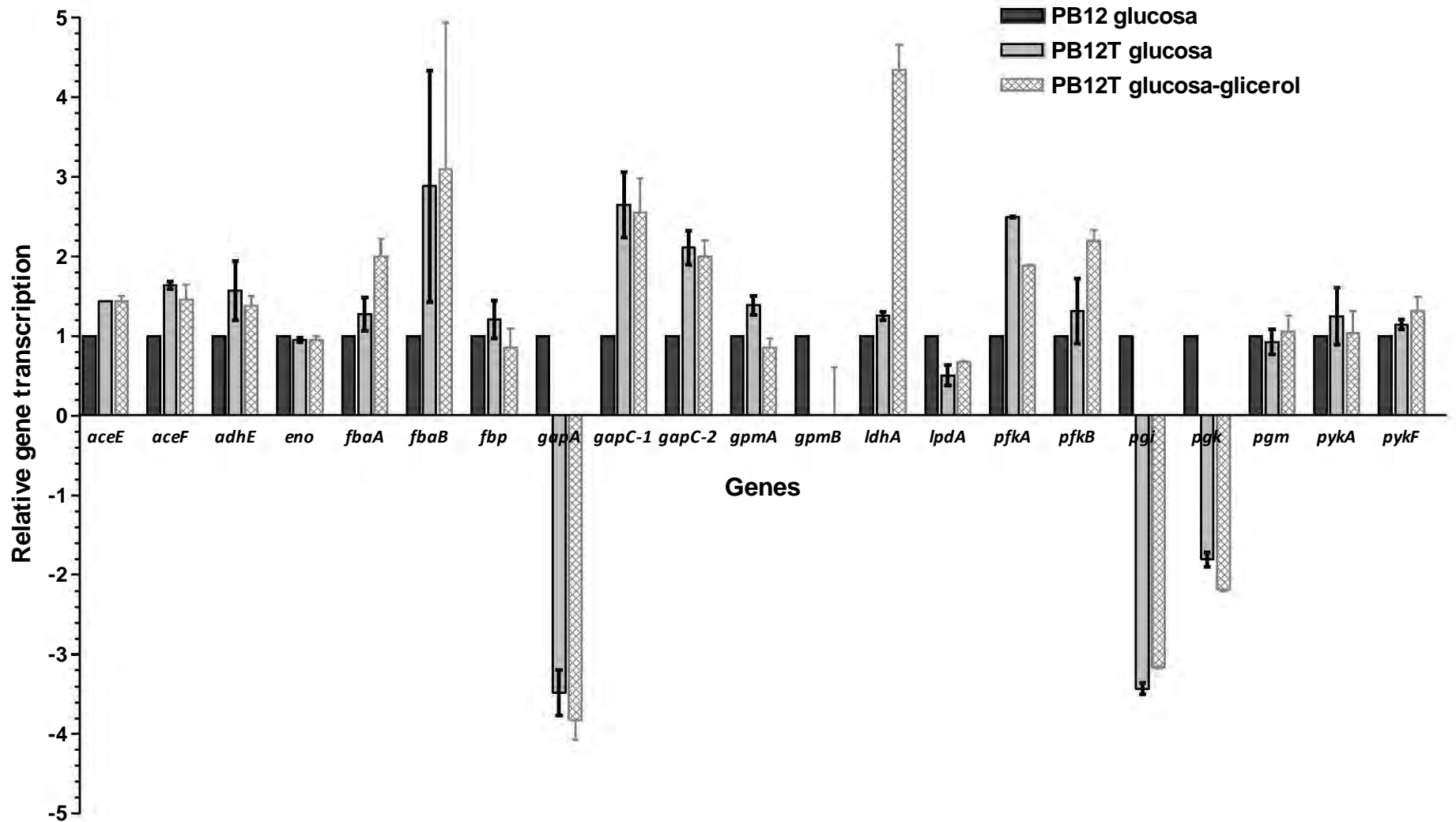


Figura 6. Patrón de expresiones de los genes de la vía de las pentosas fosfato en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

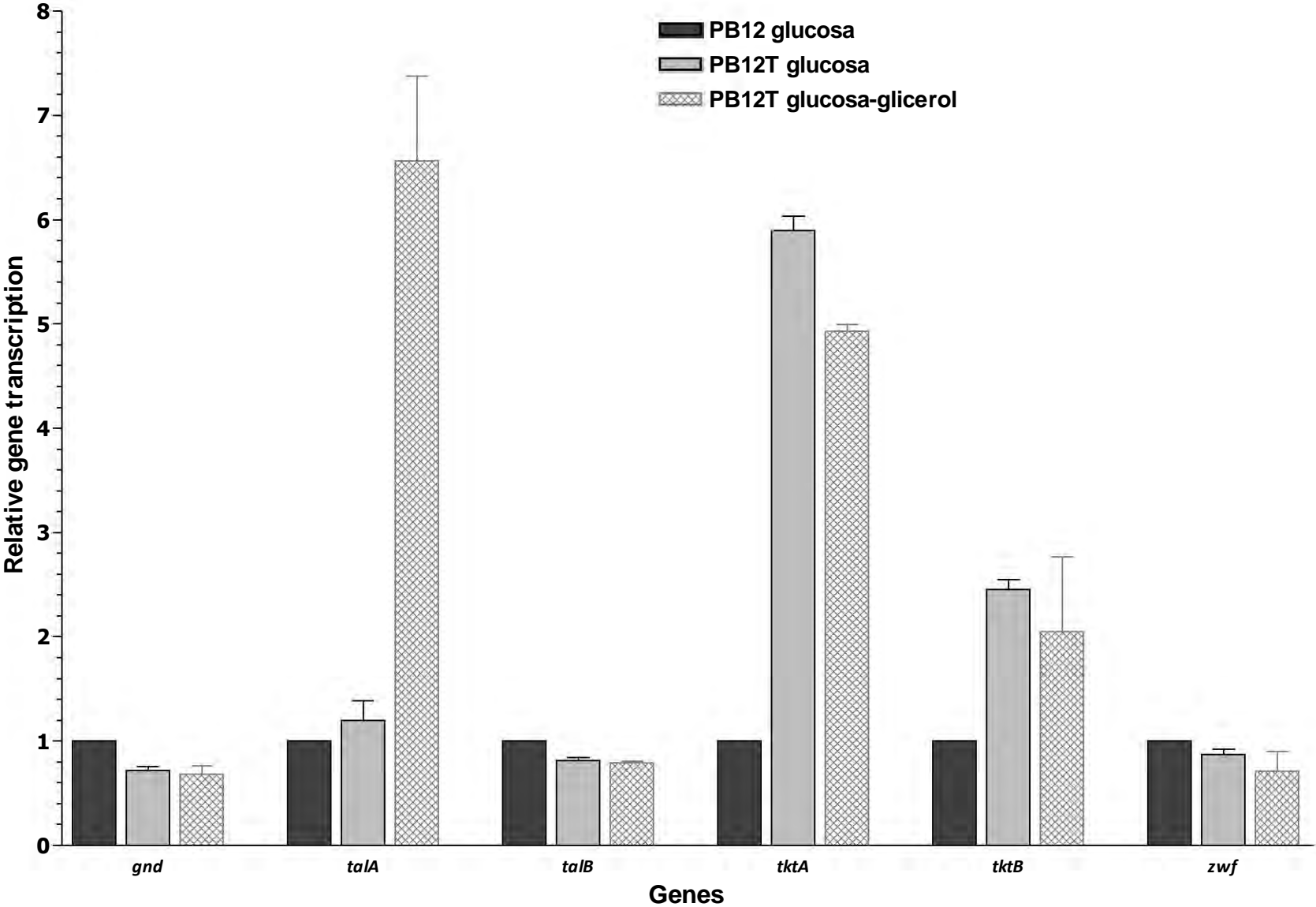


Figura 7. Patrón de expresión de los genes de la vía de TCA en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

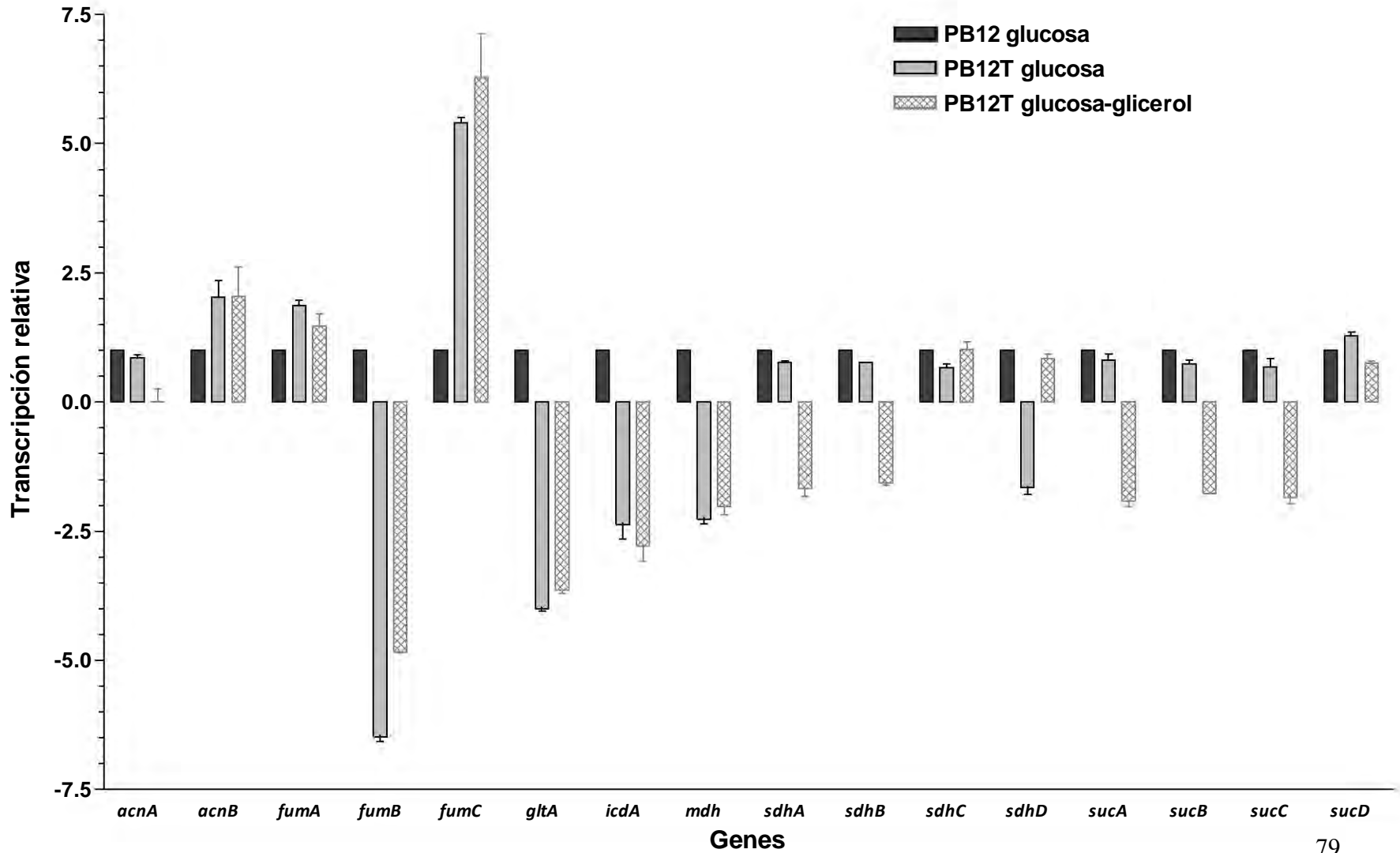


Figura 8. Patrón de expresión de los genes involucrados en la formación-consumo de acetato y gluconeogénicos en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

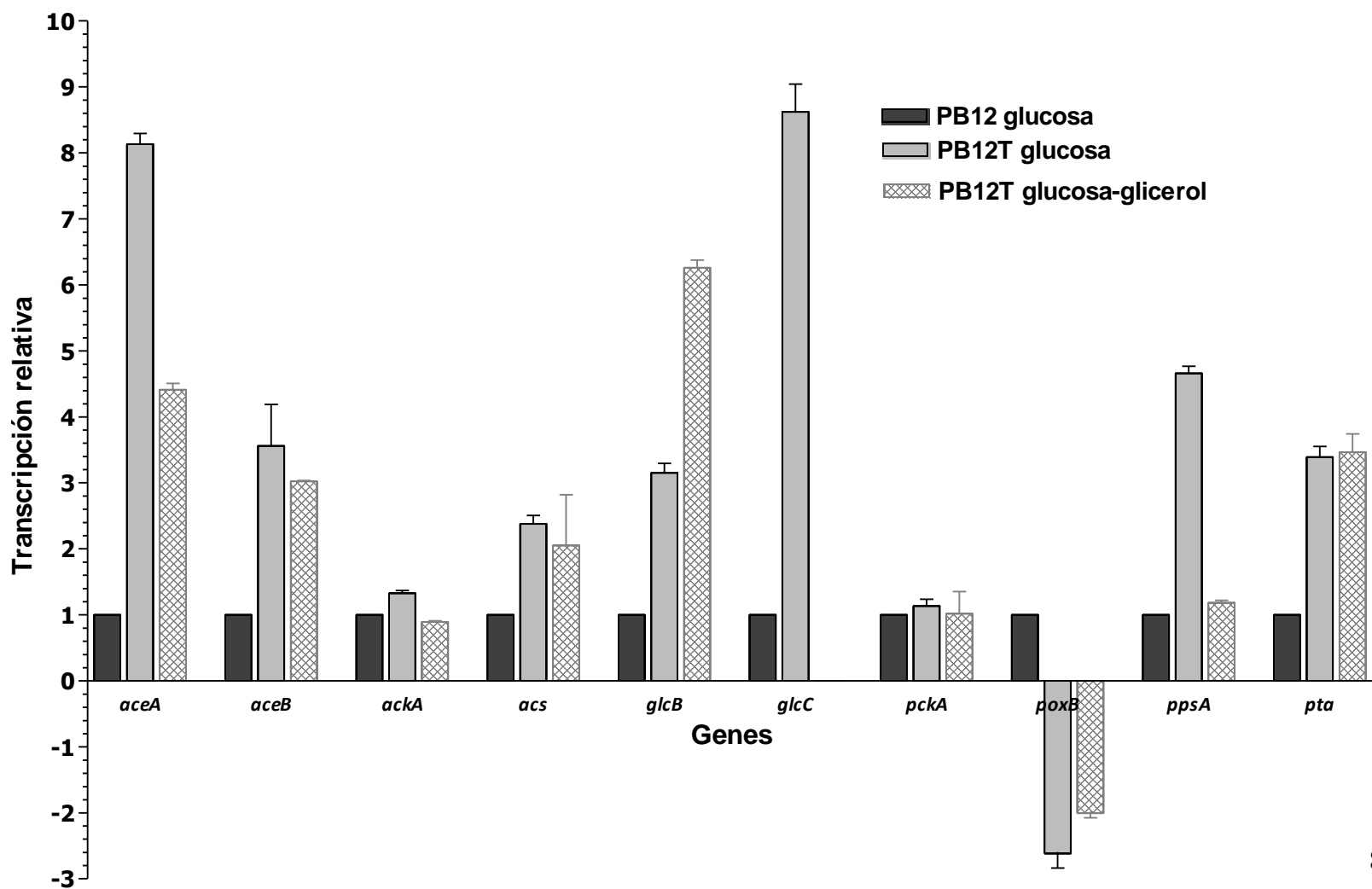


Figura 9. Actividad específica de la isocitrato liasa (Icl) en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa (G) y en la mezcla glucosa-glicerol (GGli).

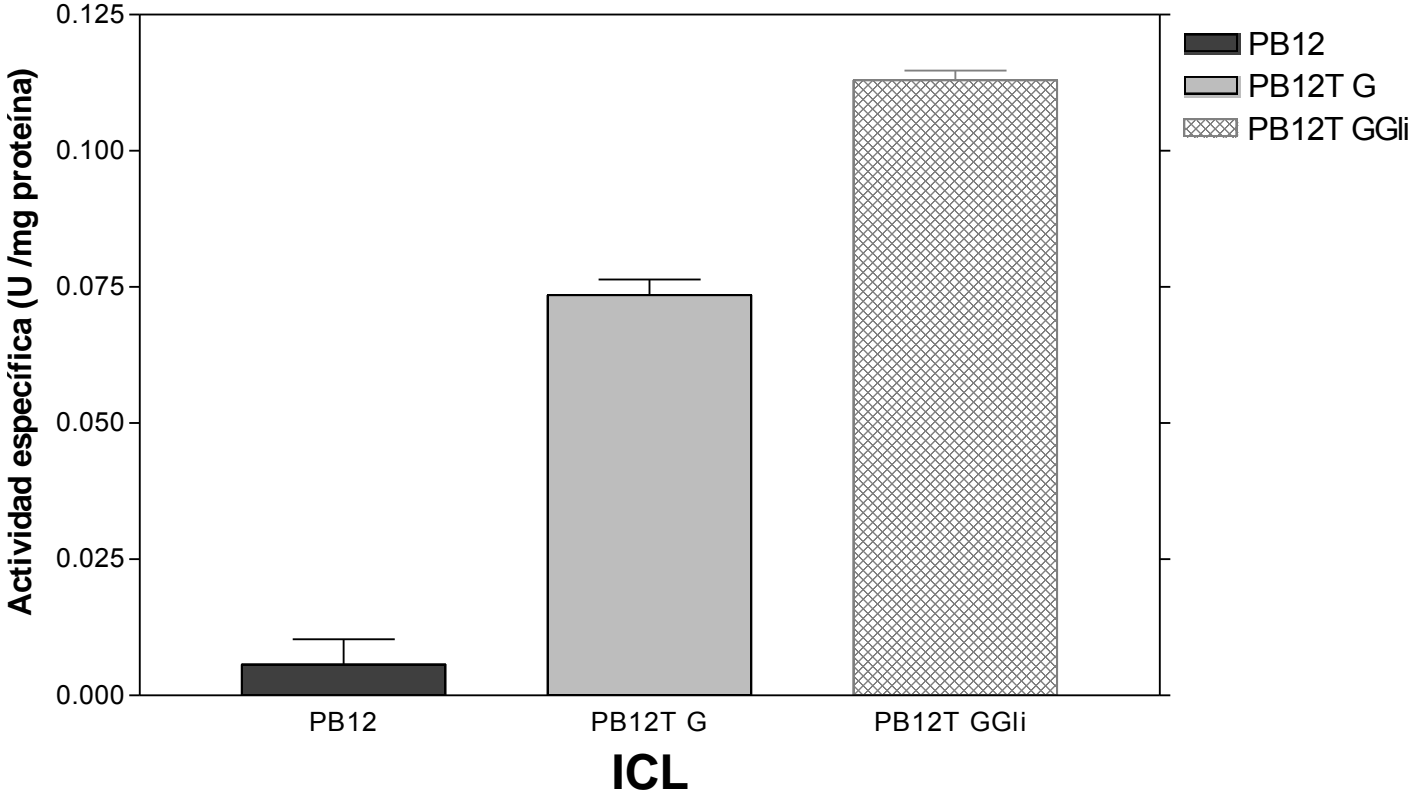


Figura 10. Patrón de expresión de los genes diferencialmente expresados en la cepa PB12T crecida en la mezcla glucosa-glicerol respecto a glucosa como única fuente de carbono.

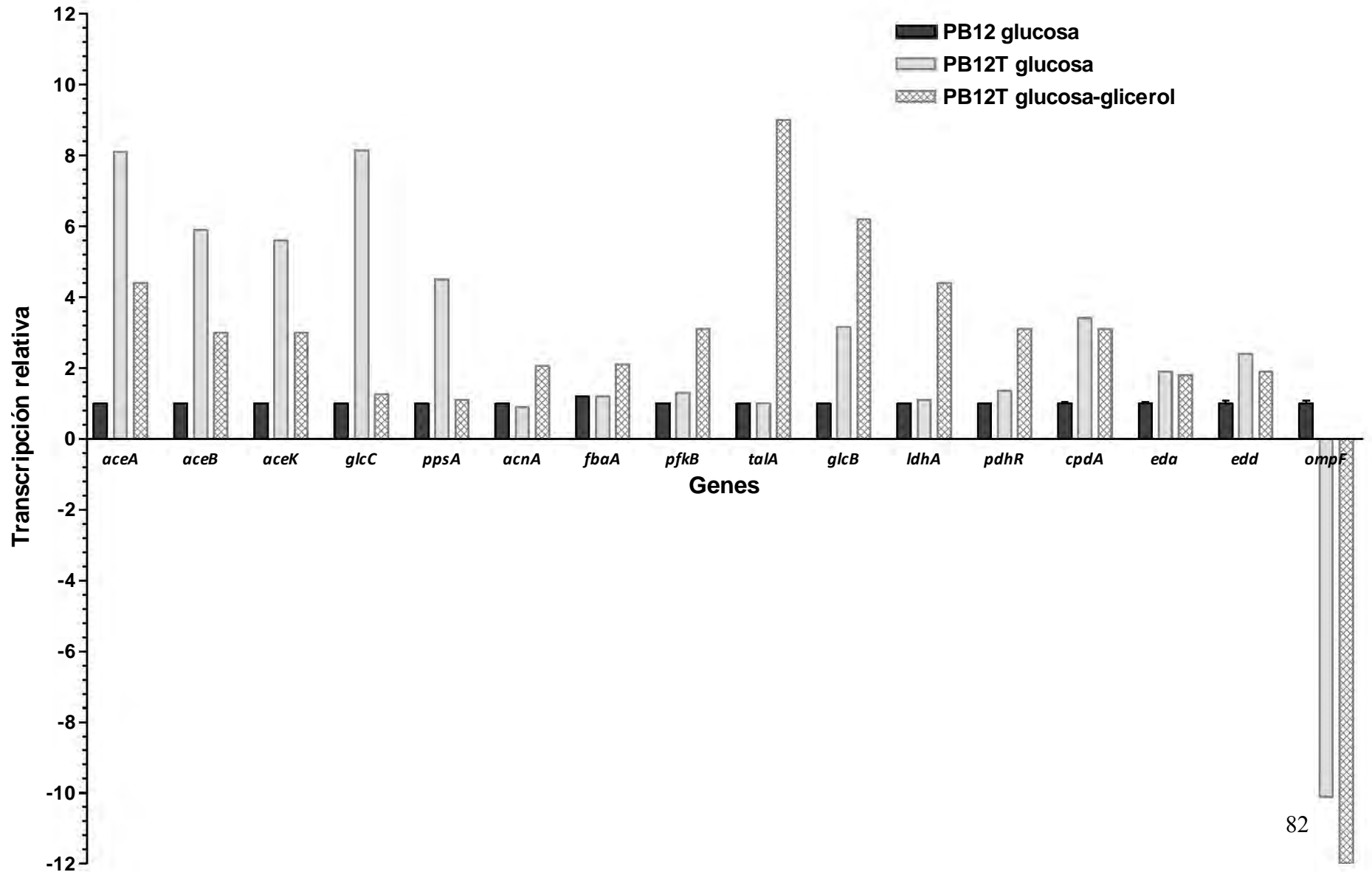


Figura 11. Relación ATP/ADP y concentraciones de ATP-ADP intracelular en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa (G) y en la mezcla glucosa-glicerol (GGli).

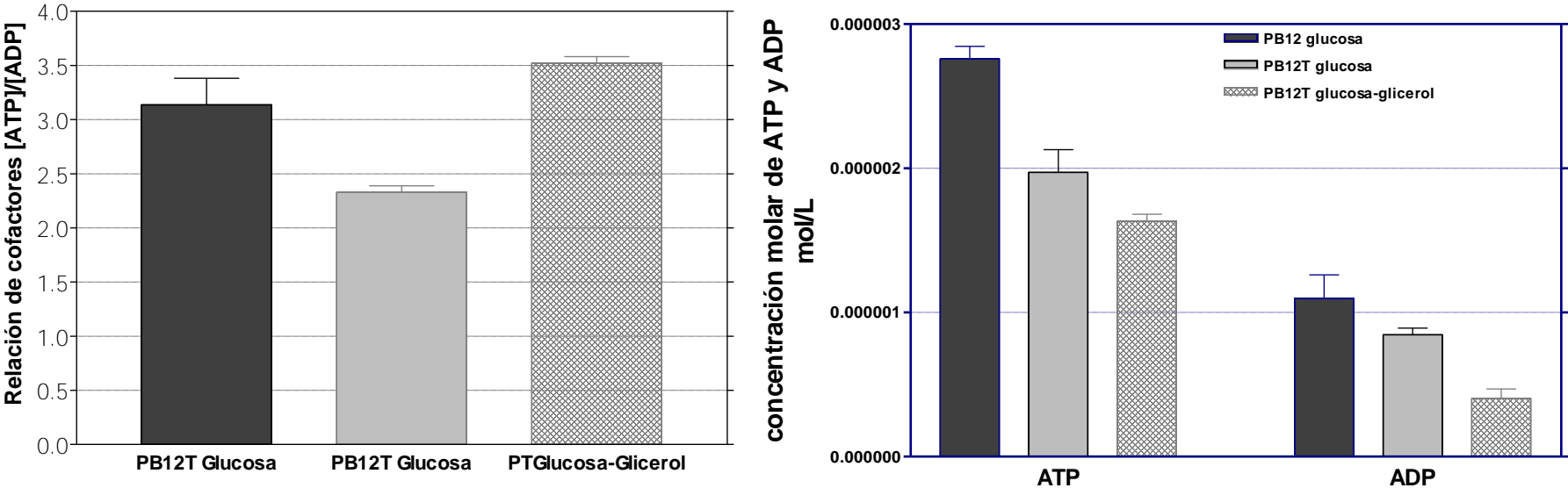


Figura 12. Patrón de expresión de los genes involucrados en la formación de NADH_2 en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

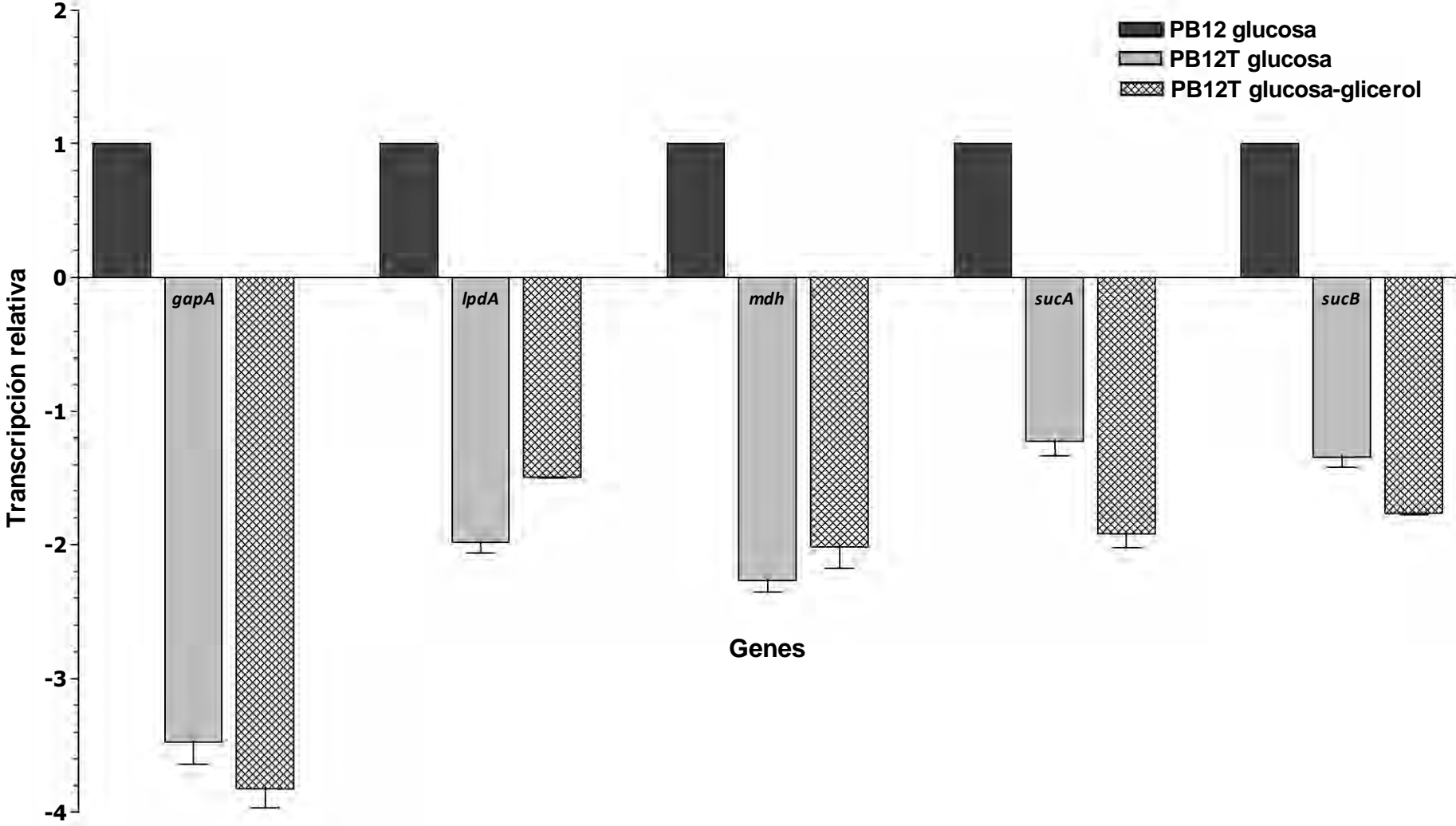


Figura 13. Relación NADH/NAD₂ intracelular en la cepa PB12 crecida en glucosa y PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol.

*Nota no hay replicas.

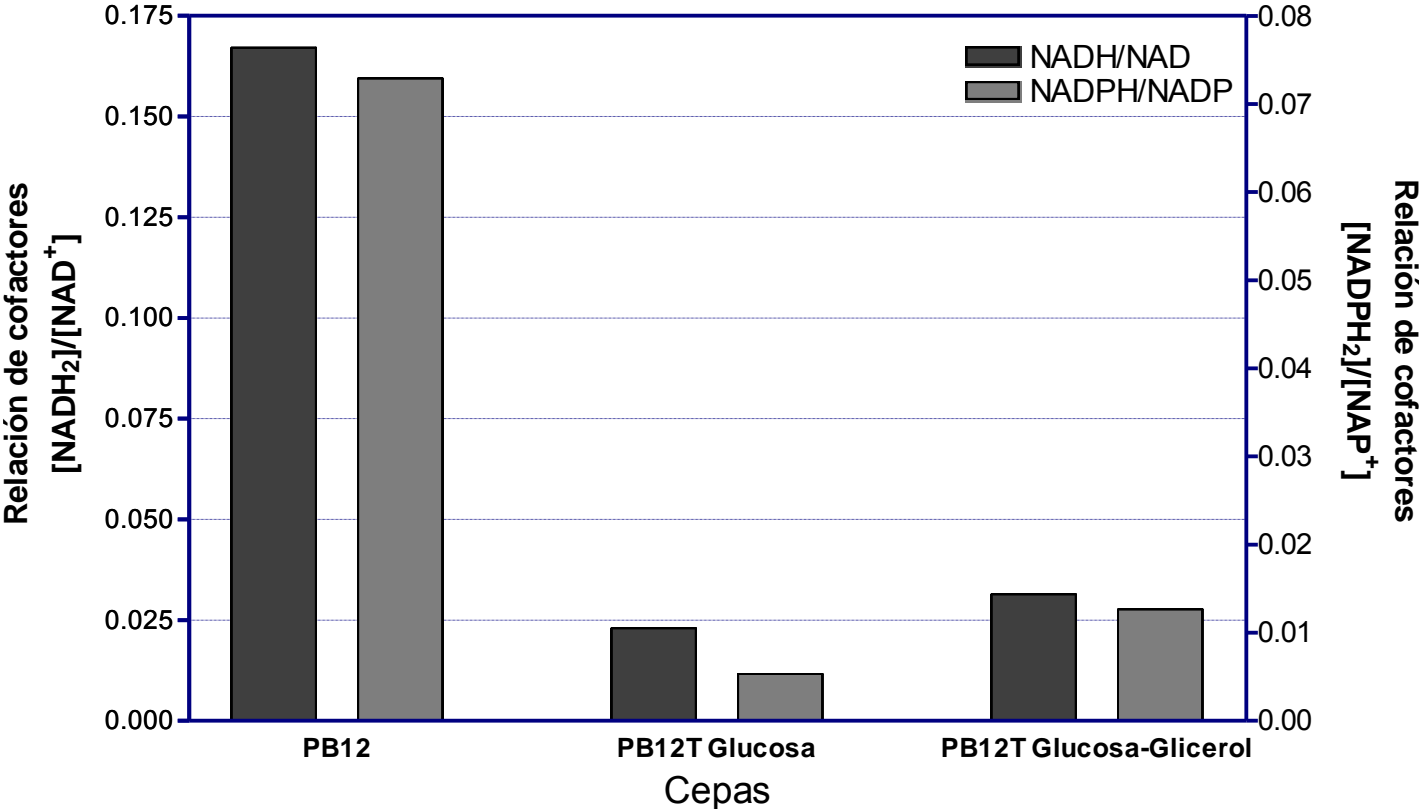


Figura 14. Patrón de expresión de los genes que codifican para las transhidrogenasas en la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol, comparada con PB12 crecida solo en glucosa.

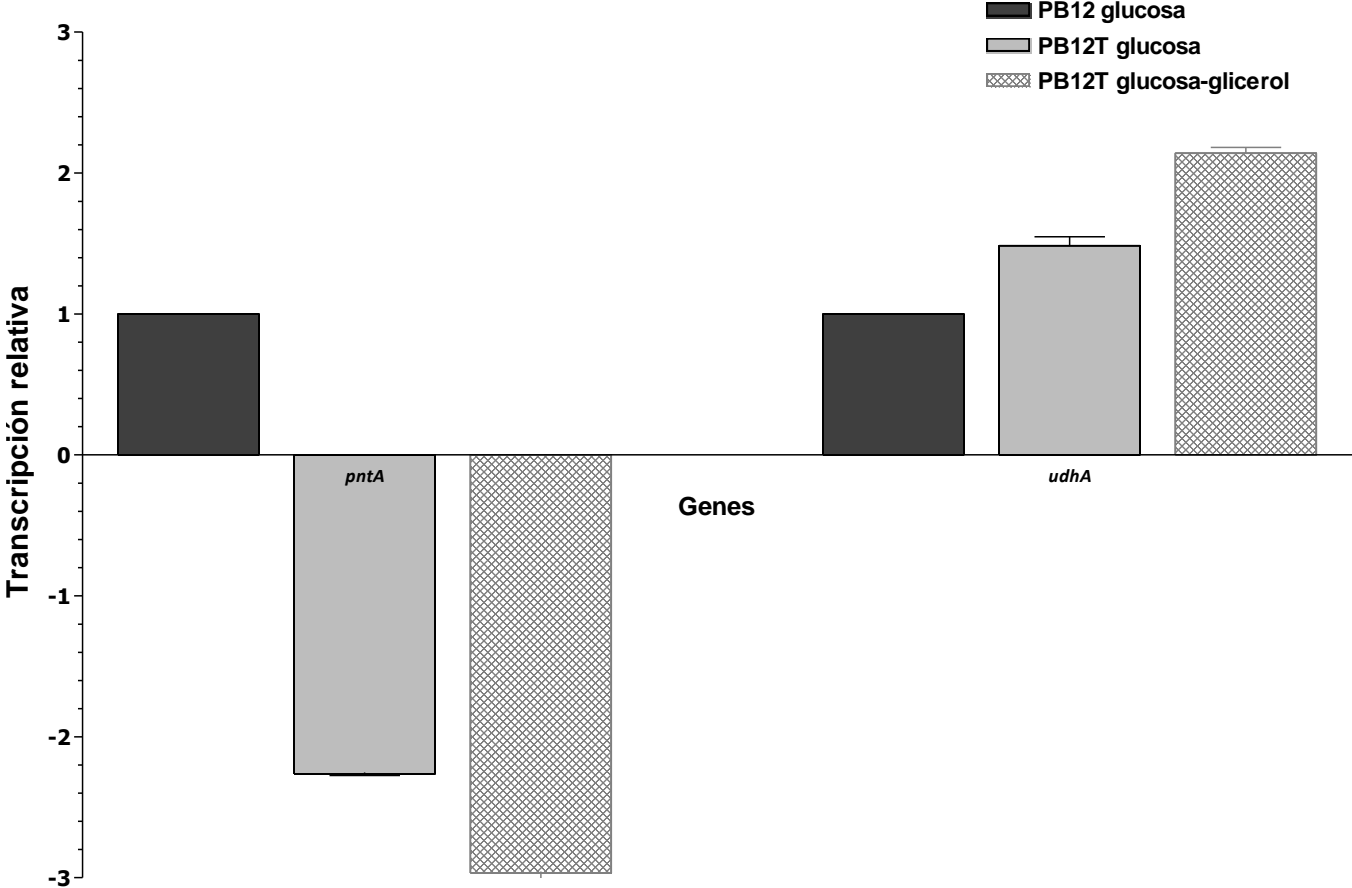


Figura 15. Reacciones del metabolismo central de la cepa silvestre JM101 crecida en glicerol y valores de transcripción relativa comparados con la misma cepa crecida en glucosa.

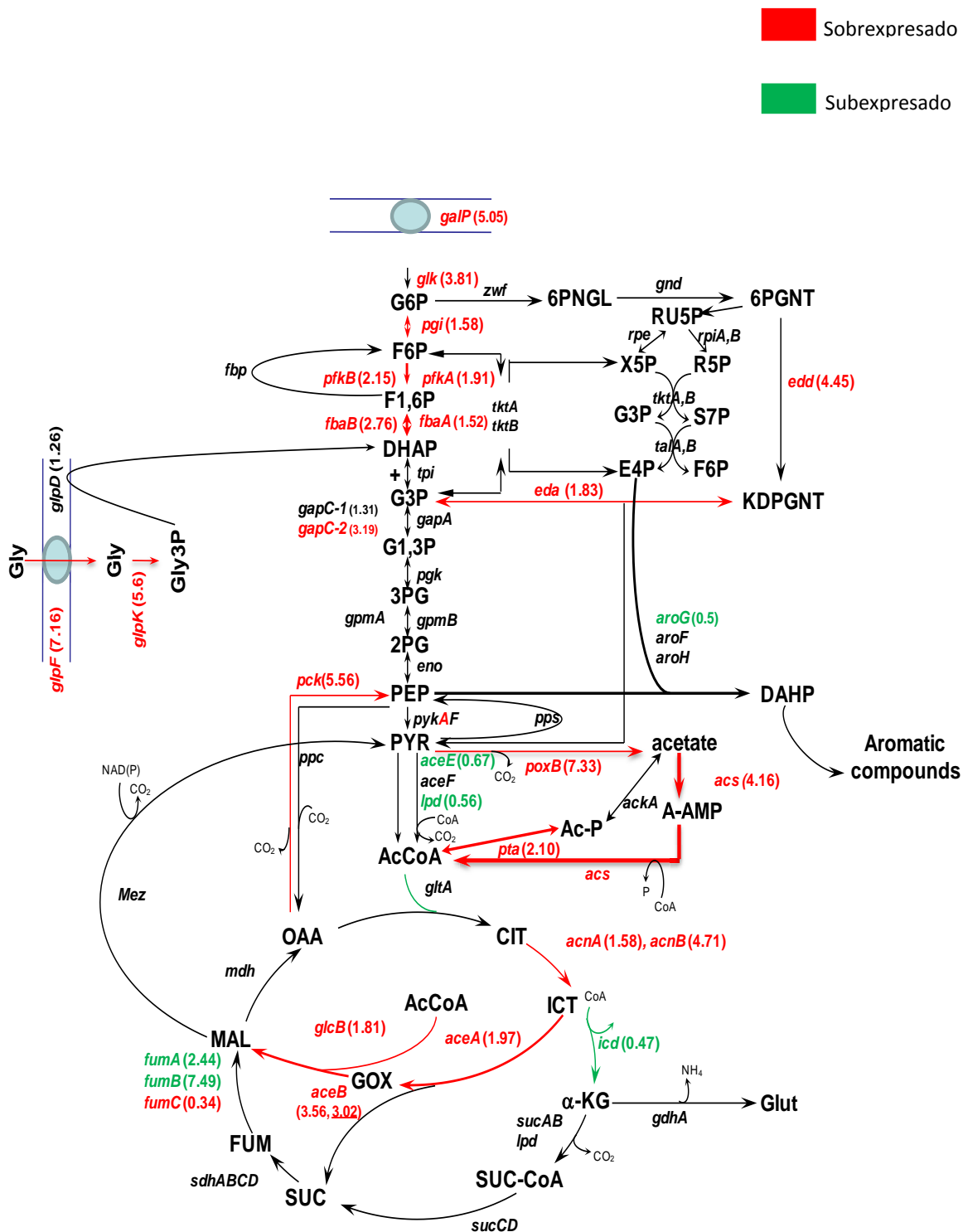


Tabla 6. Valores de transcripción de varios genes determinados por RT-qPCR en la cepa JM101 crecida en glicerol comparada con la misma cepa crecida en glucosa.

Los resultados de los patrones de transcripción son el resultado del promedio de al menos cinco experimentos con cDNAs distintos que provinieron de igual número de fermentaciones independientes. A menos que exista una aclaración, solamente se presentan aquellos genes que poseen una desviación estándar aceptable para experimentos de transcripción con RT-PCR (menor o igual al 30%). El nivel de expresión relativa como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Glicólisis	Gluconeogénicos, anapleróticos y lanzadera de glioxilato	TCA
<i>aceE</i> 0.67 + 0.17		
<i>aceF</i> 0.80 + 0.22		
<i>eno</i> 0.86 + 0.12		
<i>fbaA</i> 1.52 + 0.09	<i>aceA</i> 1.97 + 0.39	<i>acnA</i> 1.58+0.26
<i>fbaB</i> 2.76 + 0.22	<i>aceB</i> 1.95 + 0.06	<i>acnB</i> 4.71+0.47
<i>gapA</i> 0.72 + 0.06	<i>ackA</i> 1.49 + 0.28	<i>fumA</i> 2.44+0.45
<i>gapC-1</i> 1.31 + 0.10	<i>acs</i> 4.16 + 0.34	<i>fumB</i> 7.49+0.40
<i>gapC-2</i> 3.19 + 0.67	<i>fbp</i> 1.51 + 0.10	<i>fumC</i> 0.34+0.10
<i>glk</i> 3.81 + 0.14	<i>glcB</i> 1.81 + 0.56	<i>gltA</i> 0.76+0.02
<i>gpmA</i> 0.90 + 0.09	<i>glcC</i> 1.81 + 0.28	<i>icd</i> 0.47+0.1
<i>lpdA</i> 0.56 + 0.05	<i>maeB</i> 1.23 + 0.01	<i>mdh</i> 0.65+0.10
<i>pfkA</i> 1.91 + 0.22	<i>pckA</i> 5.56 + 1.77	<i>sdhA</i> 1.04+0.01
<i>pfkB</i> 2.15 + 0.01	<i>poxB</i> 7.33 + 0.56	<i>sdhB</i> 1.37+0.42
<i>pgi</i> 1.58 + 0.37	<i>ppc</i> 1.11 + 0.14	<i>sdhC</i> 0.92+0.05
<i>pgk</i> 1.08 + 0.13	<i>pta</i> 2.10 + 0.23	<i>sdhD</i> 1.13+0.21
<i>pykA</i> 1.77 + 0.10	<i>ppsA</i> 1.26 + 0.22	<i>sucA</i> 0.81+0.13
<i>pykF</i> 0.98 + 0.09	<i>sfcA</i> 2.05 + 0.34	<i>sucB</i> 0.80+0.23
<i>tpi</i> 1.36 + 0.10		<i>sucC</i> 0.79+0.07
		<i>sucD</i> 1.36+0.13
Pentosas fosfato y Entner- Doudoroff	Regulon Gal/Lam	Respiracion, transhidrogenasas
<i>eda</i> 1.83+0.29	<i>galP</i> 5.05+0.26	
<i>edd</i> 4.45+0.29	<i>galR</i> 0.38+0.13	<i>frdA</i> 1.58+0.15
<i>gnd</i> 0.80+0.00	<i>galS</i> 0.57+0.01	<i>frdB</i> 1.73+0.11
<i>talA</i> 1.64+0.47	<i>galT</i> 0.49+0.00	<i>frdC</i> 4.68+0.21
<i>talB</i> 0.60+0.01	<i>lamB</i> 1.36+0.30	<i>frdD</i> 2.01+0.34
<i>tktA</i> 1.22+0.06	<i>mglB</i> 5.05+0.58	<i>pntA</i> 0.69+0.03
<i>tktB</i> 0.70+0.11	<i>mglC</i> 2.28+0.12	<i>udhA</i> 4.89+0.88
<i>zwf</i> 1.34+0.04	<i>malE</i> 1.77 + 0.20	
	<i>pgm</i> 2.37+0.62	

Metabolismo de glicerol

glpF 7.16 + 0.15
glpK 5.60 + 0.87
glpD 1.26 + 0.25
glpR 2.40 + 0.06

Vía del shiquimato

aroA 0.81 + 0.03
aroB 1.98 + 0.59
aroC 1.34 + 0.02
aroD 3.29 + 0.07
aroE 5.47 + 0.16
aroF 1.32 + 0.08
aroG 0.50 + 0.13
aroH 1.36 + 0.13
aroK 1.01 + 0.07
aroL 2.48 + 0.09

Reguladores

arcA 1.25+0.29
arcB 4.45+0.56
creB 3.19+0.55
creC 6.27+1.69
crp 1.71+0.12
csrA 1.03+0.14
csrB 0.48+0.10
cyaA 1.64+0.24
fadR 1.22+0.31
fruR 3.00+0.20
iclR 0.29+0.10
ihfA 1.15+0.25
mlc 1.18+0.15
pdhR 0.57+0.19
ptsG 0.14 + 0.02
rpoS 1.04+0.22

Transportadores/porinas

actP 13.49+1.31
aroP 1.61+0.00
shiA 0.75+0.02
ompC 0.17 + 0.01
ompF 1.17 + 0.21

Otras

cpdA 1.64 + 0.32
gdhA 1.13 + 0.00

Tabla 7. Proteínas diferencialmente producidas en la cepa silvestre JM101 crecida en glicerol, comparada con la misma cepa crecida en glucosa.

Las intensidades de los spots fueron cuantificados con el programa ProQuest. Solo los fenotipos reproducibles de tres experimentos fueron cuantificados*. Test del estudiante con valores de $p \leq 0.05$

Nombre de la proteína	Relación de intensidades en el gel 2DE de las proteínas en glicerol respecto a glucosa
Argininosuccinato sintasa (ArgG)	0.37
Citidina diaminasa (Cdd)	6.03
Fumarato hidratasa clase I (FumA)	2.08
Proteína de unión a Galactosa y Glucosa (MglB)	63.35
Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GlpD)	3.61
Glicerol cinasa (GlpK)	16.18
Glutamina sintetasa (GlnA)	0.32
Factor de unión a GTP (LepA)	0.29
Proteína periplásmica de unión a lisina-arginina y ornitina (ArgT)	1.96
Porina C (OmpC)	0.32
Malato deshidrogenasa (Mdh)	1.97
Proteína de unión a maltosa (MalE)	5.66
Proteína receptora del fago lambda (LamB)	5.49
Fosfenolpiruvato carboxinasa (Pck)	11.15
Enzima I del sistema PTS (Pts I)	0.24
Fosforilasa de nucleótidos púricos (DeoD)	2.08
Tagatosa-bifosfato aldolasa (GatY)	4.04
Talosa B (TalB)	1.50
Triptofanasa A (TnaA)	17.03
Uridina fosforilasa (Udp)	5.92

Figura 16. Actividades específicas de las mutantes de la cepa JM101 parental y mutantes sencillas en los genes *pykA* y *pykF* crecidas en glicerol.

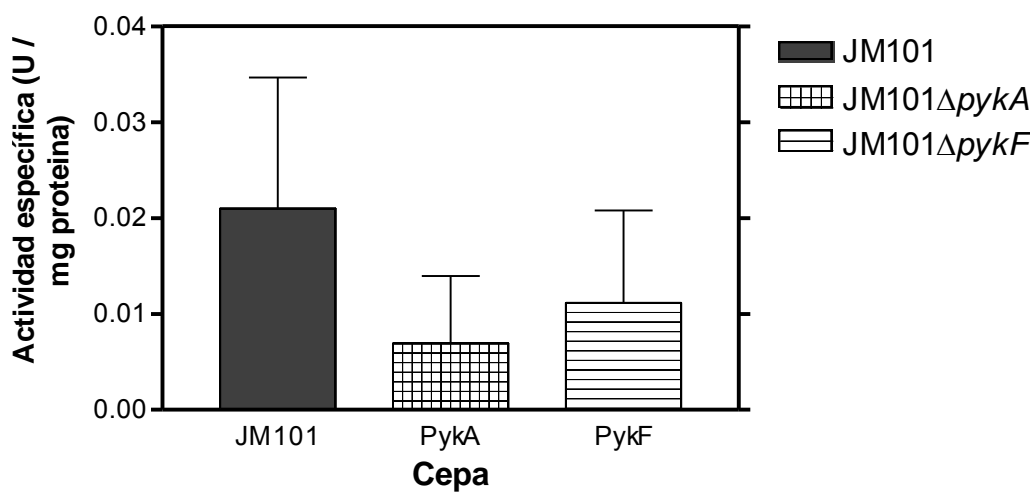


Figura 17. Actividades específicas de varias proteínas del metabolismo central de la cepa JM101 crecida en glicerol y de la misma cepa crecida en glucosa.

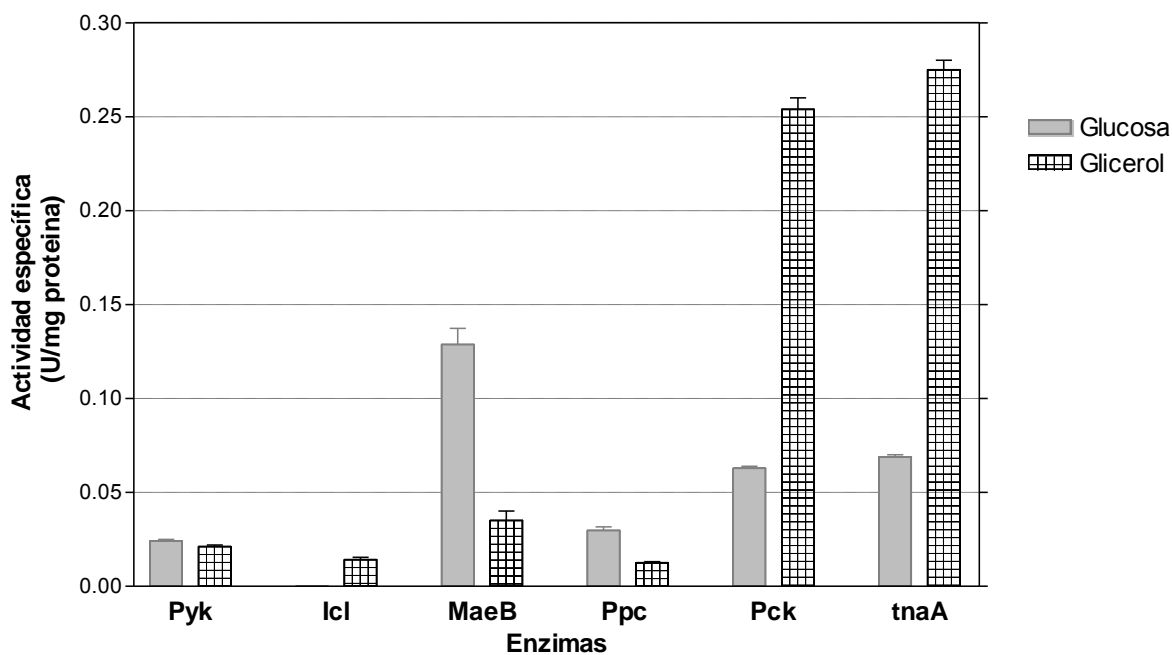


Tabla 8. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa JM101 crecida en glicerol en presencia de algunos compuestos de 4 carbonos.

Condition	μ hr^{-1}
JM101	0.49
JM101+ L-glutamina	0.54
JM101+ L-glutamato	0.48
JM101+ malato	0.56
JM101+ succinato	0.54
JM101+L-arginina	0.50
JM101+L-aspartato	0.52
JM101+L-lisina	0.44
JM101+L-asparagina	0.50
JM101+L-citrato	0.45

* Se muestran los valores promedio de tres fermentaciones. Las diferencias fueron menores al <5%

Tabla 9. Velocidades específicas de crecimiento (μ) y parámetros estequiométricos de varias cepas mutantes crecida en glicerol (a) y en glucosa (b).

(a)

Cepa	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	q_s (mmolC/g _{dcw} *h)	g/L acetato acumulado
JM101	0.47 (+/- 0.03)	0.014(+/-0.001)	34.262 (+/-) 2.22	No detectado
JM101 Δ <i>rpoS</i>	0.44 (+/- 0.02)	0.018 (+/- 0.002)	24.790 (+/- 2.57)	No detectado
JM101 Δ <i>pykA</i>	0.46 (+/-0.02)	0.015 (+/-0.001)	30.33(+/-)0.120	No detectado
JM101 Δ <i>pykF</i>	0.46(+/-0.02)	0.014(+/- 0.002)	31.42(+/-)1.00	No detectado
JM101 Δ <i>poxB</i>	0.44 (+/- 0.01)	0.012 (+/- 0.001)	35.499 (+/- 2.13)	0.14
JM101 Δ <i>pckA</i>	0.45(+/-0.03)	0.014(+/-0.001)	33.32 (+/-4.55)	0.12
JM101 Δ <i>galP</i>	0.49	ND	ND	No detectado
JM101 Δ <i>tnaA</i>	0.42	ND	ND	0.37
JM101 Δ <i>ppc</i>	No crece			

(b)

Cepa	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	Q_s (mmolC/g _{dcw} *hr)	gr/L acetato
JM101	0.69 (+/- 0.06)	0.013(+/-0.001)	51.831 (+/-) 2.22	0.5-1
JM101 Δ <i>rpoS</i>	0.71 (+/- 0.1)	0.013 (+/- 0.004)	54.54 (+/- 8.34)	0.5-1
JM101 Δ <i>poxB</i>	0.68 (+/-0.07)	0.014 (+/-0.002)	50.712(+/- 2.50)	0.4-1
JM101 Δ <i>pykF</i>	ND	ND	ND	
JM101 Δ <i>pykA</i>	ND	ND	ND	
JM101 Δ <i>pckA</i>	0.62(+/-0.09)	0.023(+/-0.011)	33.32 (+/-16.82)	0.7-1
JM101 Δ <i>galP</i>	0.49	ND	ND	
JM101 Δ <i>tnaA</i>	ND	ND	ND	
JM101 Δ <i>ppc</i>	No crece			

(+/-) Desviación estándar de al menos cinco experimentos.

ND* No determinado

Tabla 10. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa JM101 crecida en glucosa o glicerol con 0.3gr/L de acetato.

Condición	μ hr^{-1}	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	q_s (mmolC / g_{dcw} *hr)	mmolC of acetato producido (+) o consumido (-)
JM101glucosa	0.69 (+/- 0.03)	0.013(+/-0.001)	51.831 (+/-) 2.22	+28.166
JM101 glicerol	0.49 (+/- 0.03)	0.014(+/-0.001)	34.262 (+/-) 2.22	No detectado
JM101 glucosa-glicerol	0.72 (0.45)	0.0171 (0.006)	43.11 (8.55)	+4.14
JM101 glicerol-acetato	0.43 (+/- 0.06)	0.011(+/-0.002)	39.49 (+/-) 2.22	-11.00
JM101 glucosa-acetato	0.72(+/-).01, 0.1(+/-)0.01	0.013(+/-0.001)	55.38(+/-)4.13	+6.00

JM101 crecida en las mezclas glucosa-glicerol y glucosa-acetato tiene dos velocidades específicas de crecimiento. (+/-) Desviación estándar de al menos tres experimentos.

Figura 18. Cinética de crecimiento de la cepa JM101 en presencia de acetato y patrón de consumo de glucosa (o glicerol) con acetato.

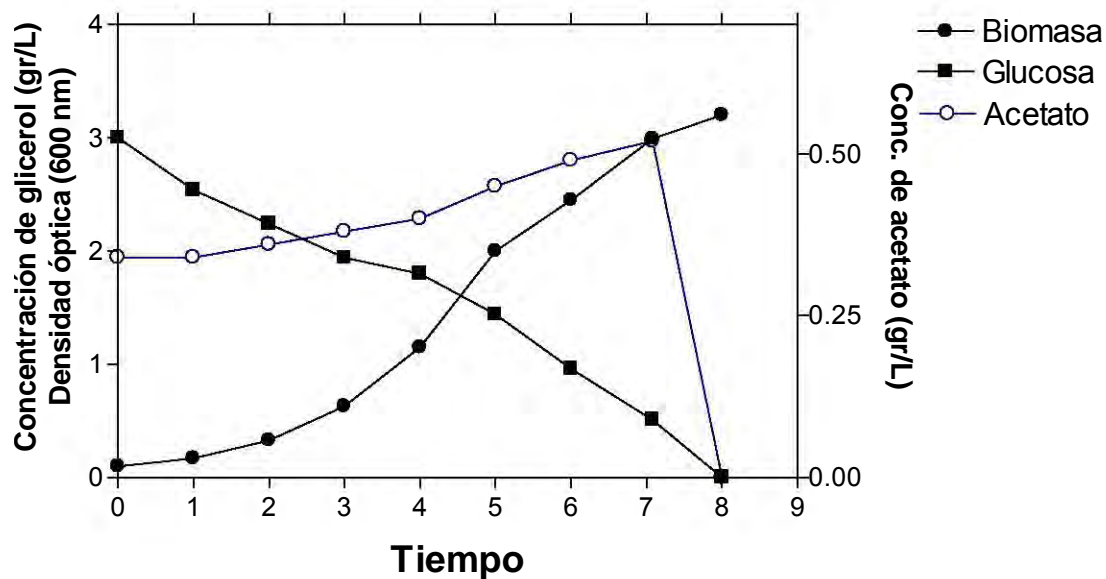
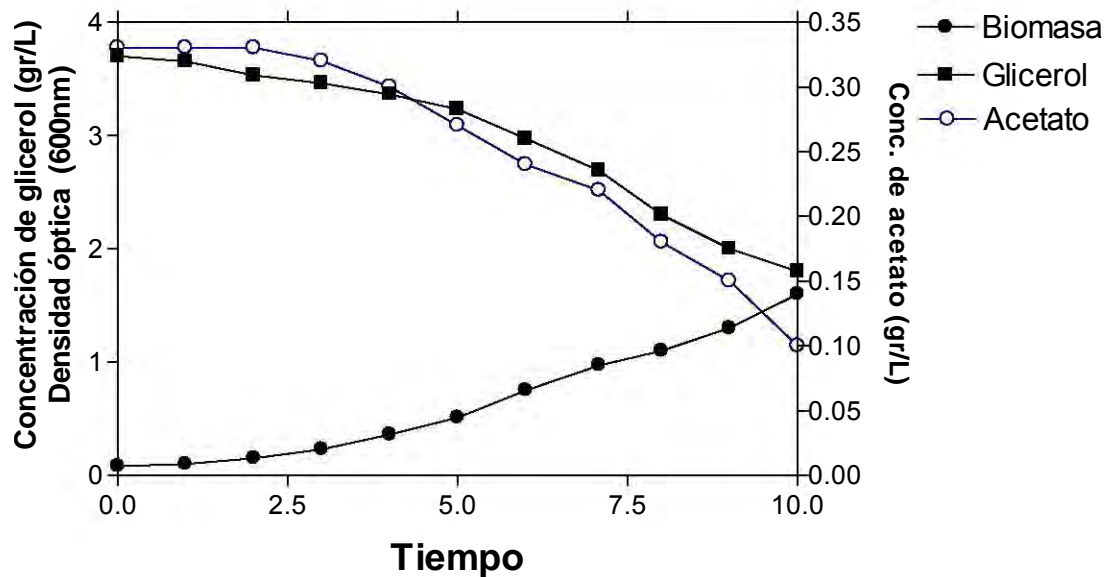


Figura 19. Cinética de crecimiento, producción de indol y ácidos orgánicos de las cepas JM101 y JM101 Δ tnaA.

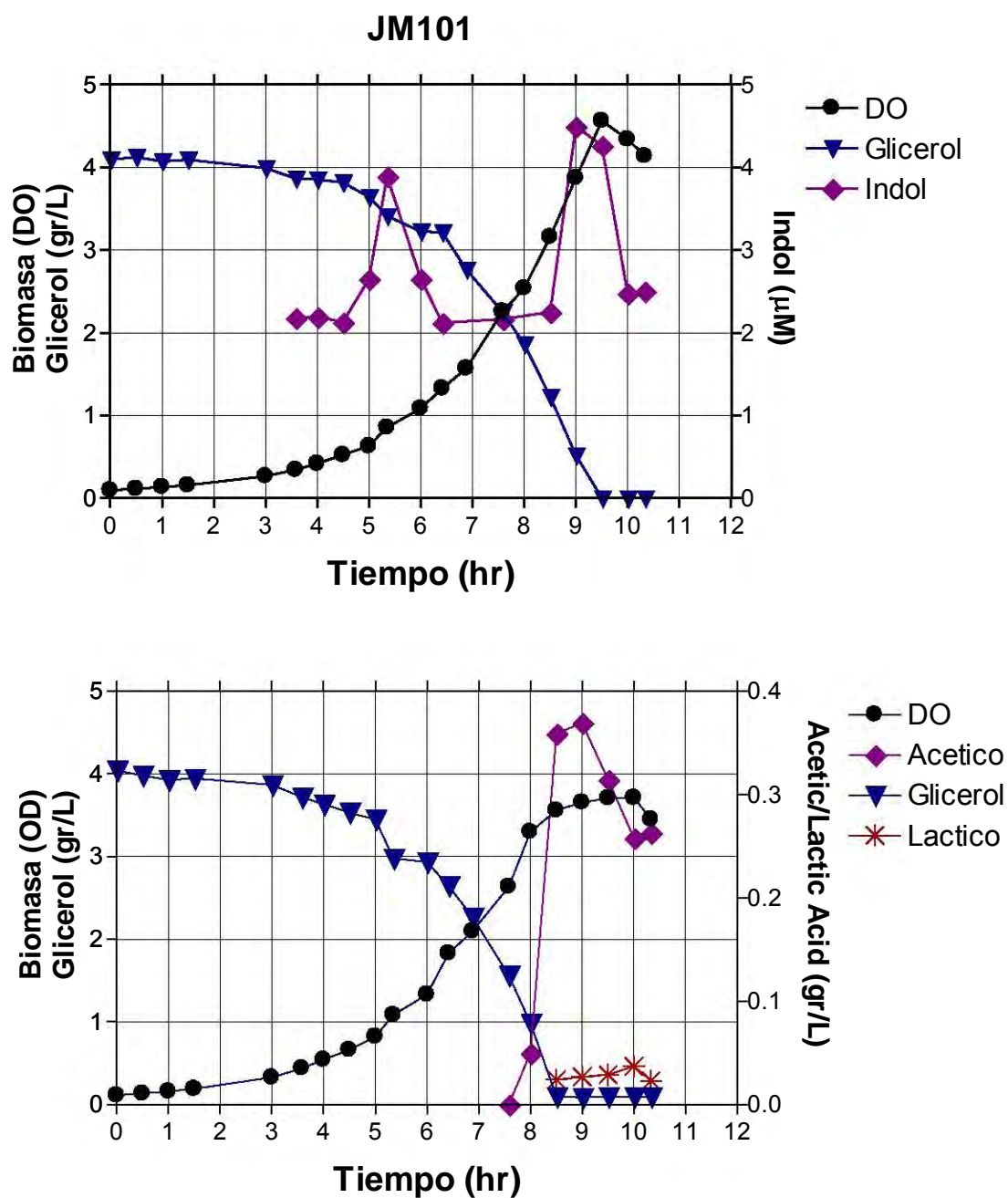


Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos de producción de compuestos aromáticos de las cepas JM101/pJLBaroG^{fbr}tktA, JM101ΔpykA/pJLBaroG^{fbr}tktA y JM101ΔpykF/pJLBaroG^{fbr}tktA crecidas en glicerol como única fuente de carbono.

	JM101 /pJLBaroG ^{fbr} tktA	JMAΔpykA /pJLBaroG ^{fbr} tktA	JMΔpykF /pJLBaroG ^{fbr} tktA
μ (1/hrs)	0.2246	0.0670	0.1158
Tiempo de adaptación	1	3	1
DO max (gr/l)	0.7696	0.8512	0.7992
	(22hrs)	(45hrs)	(47 hrs)
DAHP max (mmolC/l)	48.8317	63.1940	55.755
Arom max (mmolC/l)	69.6857	87.7099	81.319
Tiempo de producción de DAHP	6	7.5	9

	JM101 /pJLBaroG ^{fbr} tktA	JMAΔpykA /pJLBaroG ^{fbr} tktA	JMΔpykF /pJLBaroG ^{fbr} tktA
Y_{DAHP} (mmolC DAHP/mmolC S)	0.4329	0.6020	0.4742
Y_{Arom} (mmolC Arom /mmolC S)	0.6131	0.7930	0.6614
Y_{DAHP} (mmolS/mmolDAHP)	0.1850	0.2570	0.2000
Y_{Arom} (mmolS/mmolArom)	0.2660	0.3390	0.2800
Y_{DAHP}/Y_{max}	0.4405	0.6119	0.4762
Y_{arom}/Y_{max}	0.6333	0.8071	0.6667
q_{DAHP} (mmolC/gr)	0.0972	0.0403	0.0549
q_{Arom} (mmolC/gr)	0.1377	0.0531	0.0766

Figura 20. Cinéticas de crecimiento y producción de compuestos aromáticos de las cepas JM101/pJLBaroG^{fbr}tktA, JM101ΔpykA/pJLBaroG^{fbr}tktA y JM101ΔpykF/pJLBaroG^{fbr}tktA.

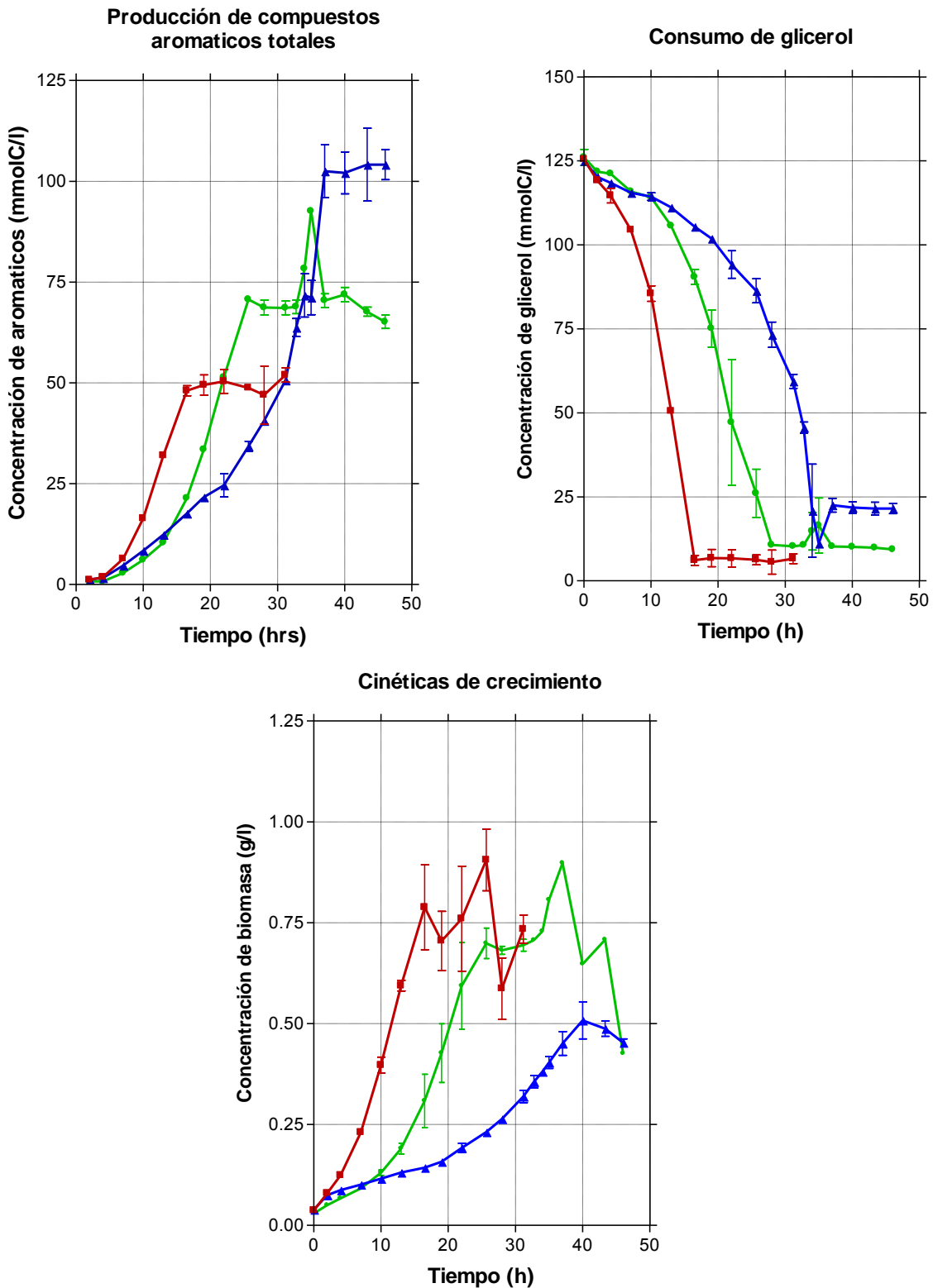


Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos de producción de compuestos aromáticos de las cepas JM101 Ptpi-(*aroG,tktA,aroB,aroD*), JM101Δ*pykA* Ptpi-(*aroG,tktA,aroB,aroD*) y JM101Δ*pykF* Ptpi-(*aroG,tktA,aroB,aroD*).

Cepa	Y _{x/s} (gr/mmolC)	μ (1/hrs)	q _s (mmolC/gr)	Y _{arom} (mmolC compuestos arom/mmolC)
JM101	0.015	0.500	33.333	0
JM101Ptpi- (<i>aroG,tktA,aroB,aroD</i>)	0.007	0.419	59.814	0.021
JM101Δ <i>pykA</i>	0.013	0.460	35.380	0
JM101Δ <i>pykA</i> Ptpi- (<i>aroG,tktA,aroB,aroD</i>)	0.010	0.405	40.889	0.083
JM101Δ <i>pykF</i>	0.013	0.410	31.530	0
JM101Δ <i>pykF</i> Ptpi- (<i>aroG,tktA,aroB,aroD</i>)	0.014	0.423	29.866	0.040

Tabla 13. Cepas de Escherichia coli usadas en el estudio (orden alfabetico).

Cepa	Características relevantes	Referencias
JM101	<i>supE, thi, δ(lac-proAB), F'</i>	[109]
JM101Δ <i>pck</i>		Este trabajo
JM101Δ <i>poxB</i>		[49]
JM101Δ <i>ppc</i>		Este trabajo
JM101Δ <i>pykA</i>		Este trabajo
JM101Δ <i>pykF</i>		Este trabajo
JM101Δ <i>rpoS</i>		[61]
JM101Δ <i>tnaA</i>		Este trabajo
PB12	Proviene de la cepa PB11PTS ⁻ Glc ⁻ que es a su vez derivada de la cepa JM101. Tiene el mismo genotipo que JM101, excepto que tiene deletado el operón <i>ptsH/crr</i> y es Glc ⁺ .	[34]
PB12 <i>aroB</i>		Este trabajo

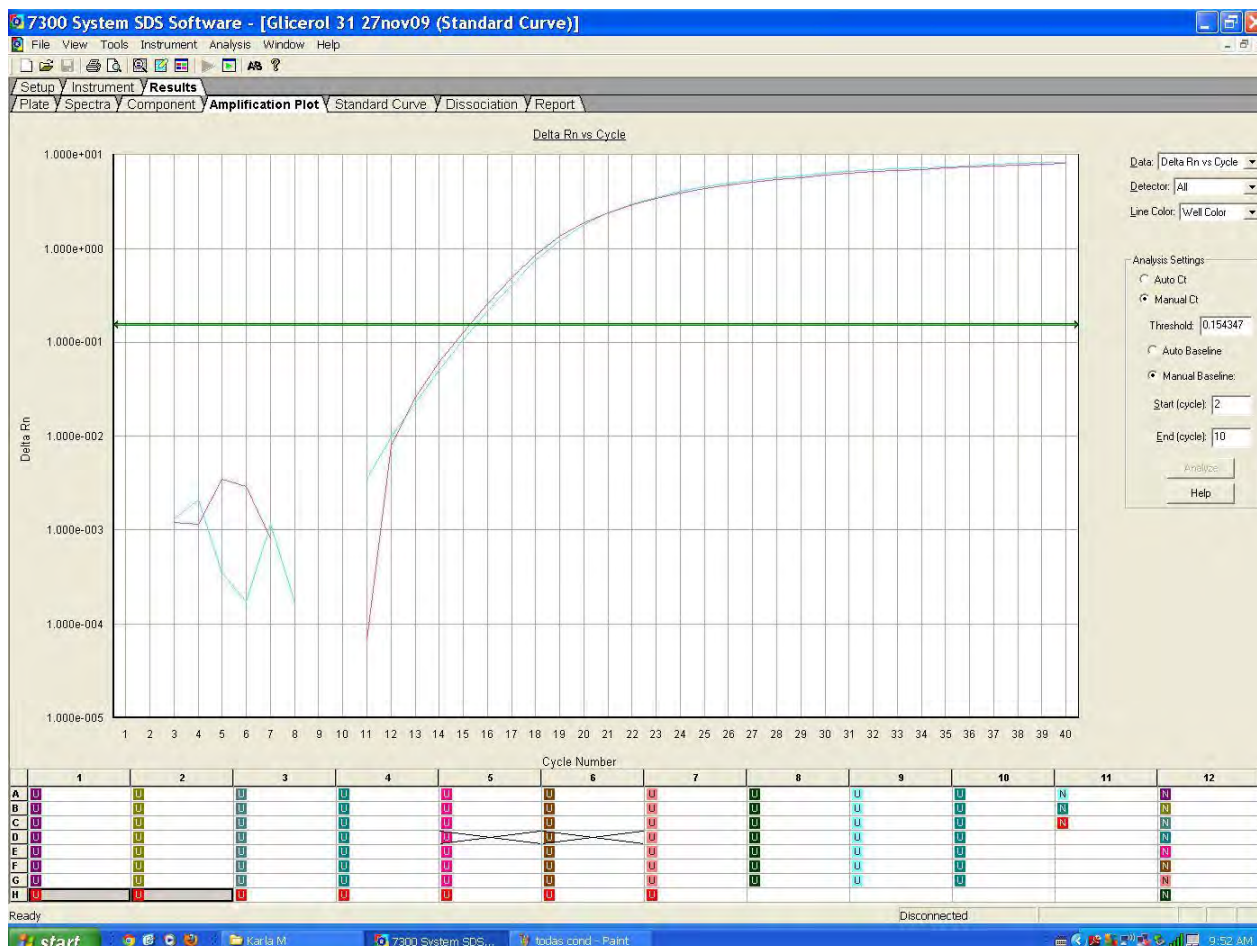
Tabla 14. Plásmidos usados en el estudio.

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pRW300 $aroG^{fbr}$	$aroG^{fbr}$ bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> inducible con IPTG; porta gen de resistencia a tetraciclina. Origen de replicación del plásmido pBR322.	[109] [41]
pCL $tktA$	$tktA$ bajo el control de su promotor constitutivo; porta gen de resistencia a espectinomicina. Origen de replicación pACYC184.	[41]
pJL $BaroG^{fbr} tktA$	$tktA$ y $aroG^{fbr}$ bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> inducible con IPTG. Origen de replicación del plásmido pACYC.	[110]
pKD46	Contiene los genes <i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> de la recombinasa del fago λ . Promotor inducible por arabinosa (pBAD).	[58]
pKD3	Porta gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por regiones FRT.	[58]

Tabla 15. Oligonucleótidos usados en el estudio.

Nombre	Secuencia
DAB1 (Forward)	5'- <i>GAT GAT CAA AGC GCT AAA GTG GTT GCA AAC CAG ATT ATT</i> <i>CAC TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G</i> -3'
DAB2 (Reverse)	5'- <i>GTC TTC TGG TTT GAA TTC ATC CAT TTA ACA CCC CAC TAA AAG</i> <i>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</i> -3'
SAB1 (Forward)	5'-GAT CTG CGG TTC GCC ACG TT-3'
SAB2 (Reverse)	5'- CAC CGC CGC GTG AAG TTC TGG -3'
pckAFw .	5'-CAG GAA TGC GAT TCC ACT CA-3'
pckARv	5'-GTG CAG CGT ATC GTG GAT AA-3'
ppcFw	5'-GCA TCT TAT CCG ACC TAC AC-3'
ppcRv	5'-GCC TGT AGC AGA GTA GAG AA-3'
pykAFw	5'-CTG AAG GAA TCG CGT CGT TTT GA-3'
pykARv	5'-CGG CGG ATG AAT GAA GAA-3'
pykFor	5'-CGG CGG ATG AAT GAA GAA-3'
pykRev	5'-ACA AGC ACA CAT TCC TCT GCA-3'
tnaAFw	5'-TTC TGT AGC CAT CAC CAG AG-3'
tnaARv	5'-CCG GCA AGA TCA ACA GGT AA-3'
arcAa	5'-CCA CGA CCA AGC TAA TGA TG-3'
arcAb	5'-ACA ACG GAC GAT GAG TTA CG-3'

Figura 21. Umbral (C_q) de aparición del gene *ihfB* en experimentos de RT-qPCR realizados en las cepas JM101, PB11, PB12 y derivadas de estas en varias condiciones de crecimiento.



Cepas	Condición	Cq	Cepas	Condición	Cq
M101	Glucosa	17.18	PB12T	Glucosa	17.41
JM101	Glicerol	17.33	PB12T	Glucosa-Glicerol	17.77
PB12	Glucosa	17.58			

9. CONCLUSIONES GENERALES

- La ausencia del sistema PTS permite en la cepa evolucionada PB12 la cointilización de varias fuentes de carbono por la ausencia de represión catabólica mediada por EIIA^{glc}. Los patrones de consumo demuestran que esta cepa puede cointilizar pares de fuentes de carbono: glucosa-glicerol, glucosa-gluconato y glucosa-arabinosa. La cointilización de fuentes de carbono le permite a esta cepa metabolizar más cantidad de de carbono por unidad de tiempo, y así incrementar su velocidad específica de crecimiento.
- El sistema de células en reposo demostró que la cointilización de fuentes de carbono es favorable para aumentar la productividad de DAHP en la cepa PB12 $aroB$ (pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL tkA). La productividad específica de DAHP aumenta respecto a glucosa en todas las mezclas de fuentes de carbono. Es importante mencionar que lo anterior fué el primer reporte publicado de estudios de producción de compuestos aromáticos con cepas cointilizando fuentes de carbono en el sistema de células en reposo.
- La cepa PB12 transformada con los plásmidos pRW300 $aroG^{fbr}$ y pCL tkA (cepa PB12T), aumentó su productividad específica de DAHP (respecto a glucosa) en la mezcla glucosa-glicerol en un sistema por lote en fermentadores. En esta mezcla se obtuvo el mayor rendimiento (molC/molC) (36%) de compuestos aromáticos/fuente(s) de carbono. Lo anterior sentó las bases para explorar al glicerol como una fuente de carbono interesante para la producción de compuestos aromáticos.
- En la cepa PB12T crecida en glucosa y en la mezcla glucosa-glicerol la subexpresión de los genes *pgi*, *gapA*, *pgk*, de varios de los genes de TCA (*gltA*, *icdA*, *sucAB*, *lpdA* y *mdh*) combinado con la sobreexpresión de los genes de la lanzadera de glioxilato (*aceBA* y *glcB*), sugiere que la cepa disminuye el flujo de carbono en glicólisis, aumentando el flujo a través de las pentosas fosfato, reduciendo también el flujo de PYR a AcCoA a través de TCA y usando la lanzadera de glioxilato como vía principal anabólica .
- El aumento de la expresión del gen *talA* en la cepa PB12T solamente en el crecimiento en la mezcla glucosa-glicerol, sugiere que la cointilización de glucosa y glicerol pudiera incrementar el flujo de E4P y fructosa-6-fosfato (F6P) desde gliceraldehido-3-fosfato (G3P) y pseudoheptulosa-7-fosfato (S7P). Lo anterior concuerda con el aumento en la producción de compuestos aromáticos y con la expresión diferencial de algunos genes regulados por Cra.

- Algunos genes regulados por Cra (*ppsA*, *aceA* y *aceB*) cambian su expresión en el crecimiento con la mezcla glucosa-glicerol comparada con la del crecimiento en glucosa. Esta expresión diferencial sugiere una disminución en la afinidad de Cra por algunos operones, lo cual está relacionado con un aumento en la poza de fructosa-6P y fructosa 1-6-fosfato en la condición glucosa-glicerol. La fase *lag* prolongada durante el crecimiento en glucosa probablemente pudiera estar relacionada con la sobreexpresión del gene *ppsA*, que podrá generar un ciclo fútil. El glicerol como fuente de carbono pareciera eliminar el ciclo inútil en este nodo importante del metabolismo.
 - Los datos transcriptómicos sugieren que en esta cepa crecida solamente en glucosa, actúan sinérgicamente los genes regulados por Cra y CsrB, causando una desviación desfavorable de glucosa hacia la formación de glicógeno. La coutilización de la mezcla glucosa-glicerol parece inactivar parcialmente la expresión del gene *csrB*. La sobreexpresión del gene *ldhA* en glucosa-glicerol indica un aumento en el flujo hacia piruvato pero también una inactivación al menos parcial del gene *csrB*.
 - Se detectaron tres posibles cuellos de botella para la generación de PEP en éstas condiciones, los cuales fueron a nivel de los genes *pgi*, *gapA*, *pgk*.
 - Los niveles $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ y $\text{NAPDH}_2/\text{NAPD}^+$ están claramente disminuidos en la cepa PB12T pero la relación ATP/ADP no cambia en ninguna condición. La disminución de la producción de cofactores reducidos y oxidados probablemente mantiene un balance entre catabolismo (generadora de ATP) y anabolismo (consumidora de ATP).
-
- La cepa silvestre JM101 crecida en glicerol, sobreexpresa genes y sobreproduce proteínas involucrados en el transporte de glucosa y otros carbohidratos, como son los regulones de maltosa (*mal/lam*) y galactosa (*mgl/gal*): *lamB*(LamB 5.49X), *malE*(MalE 5.66X), *mglB* (MglB 63.35X), *galP*, *glk* y *pgm*. Estos genes se pueden considerar como sensores del crecimiento en estrés por carbono. Varios de los genes glicolíticos sobreexpresados, *glk*, *pfkA*, *pfkB*, *fbaA*, *fbaB* son regulados por RpoS. La sobreexpresión de los genes *poxB*, *acs*, *pta*, *aceA*, *aceB*, *pckA* y el consumo de acetato en la cepa JM101 crecida en glicerol, indica que la cepa produce y consume simultáneamente el acetato producido. Las mutantes sencillas inactivadas en los

genes *poxB* y *pckA* acumulan acetato en fases tempranas de la fermentación. Lo anterior sugiere que la cepa JM101 cuando crece en glicerol como fuente de carbono, recicla carbono a través de PoxB, Acs, lanzadera de glioxilato y PckA. También se sobreexpresan los genes gluconeogénicos en la región superior de la glicólisis, para sintetizar glucosa 6-fosfato a partir de glicerol. Todos estos genes están regulados por RpoS, lo que indica un crecimiento en estrés por carbono. Congruentemente con lo anterior hay una reducción aparente en la síntesis de compuestos de 4 carbonos del TCA, ya que al agregar algunos de estos compuestos se incrementó la μ de las cepas creciendo en glicerol. Lo anterior está soportado por la subexpresión de algunos genes de TCA como *icdA*, *lpdA* y *mdh* involucrados en la síntesis de estos compuestos de 4 carbonos.

- RpoS es importante para adaptarse a medio mineral con glicerol como única fuente de carbono y también repercute en la eficiencia de consumo de glicerol ($Y_{x/s}$ y q_s). La cepa JM101 crecida en glicerol, produce indol en fases tempranas del cultivo. La cepa inactivada en el gene *tnaA* (JM101 Δ *tnaA*) produce acetato y lactato cuando crece en glicerol contrario a la cepa parental. Lo anterior sugiere un papel importante de la proteína TnaA y/o del indol, probablemente para inducir a Crl que es corregulador de RpoS. Sin embargo, un papel del indol como señalizador aún no puede establecerse con certeza. Esta es la primera vez que se aborda el probable papel del indol en una cepa silvestre crecida en glicerol en medio mínimo.

- La estrategia de inactivar a las piruvato cinasas en la cepa silvestre JM101 para acumular el PEP producido fue exitosa para aumentar la producción de compuestos aromáticos. Las cepas JM101, JM101 Δ *pykA* y JM101 Δ *pykF* transformadas con el plásmido pJLBaroG^{ibr},*tktA* e inducidas desde el inicio de la fermentación, disminuyen su velocidad específica de crecimiento respecto a las mismas cepas sin plásmidos. La cepa JM101 Δ *pykA*/pJLBaroG^{ibr},*tktA* tiene el mayor rendimiento de compuestos aromáticos, pero también la menor velocidad de crecimiento en glicerol como única fuente de carbono. La inserción en el episoma del operon Ptpi-(*aroG*,*tktA*, *aroB*, *aroD*) no fue exitosa para aumentar el rendimiento de compuestos aromáticos. Sin

embargo, otros promotores pueden ser evaluados, así como la inserción de múltiples copias de este operón en cromosoma.

10. PERSPECTIVAS

- Modificar a la cepa PB12 en varios genes que parecen limitar la productividad y rendimiento de compuestos aromáticos en medio mínimo: inactivar *ppsA* (para evitar la fase lag prolongada en glucosa como fuente de carbono) y poner copias extra en cromosoma de los genes cuyos productos pudieran ser cuellos de botella para la generación de PEP *pgi*, *gapA*, *pgk*.
- Investigar el papel del indol en la cepa JM101 creciendo en glicerol en medio mínimo.
- Evaluar otros promotores del para el operón *aroG,tktA*, *aroB*, *aroD*.

11. REFERENCIAS

1. Vasudevan P, Briggs M: **Biodiesel production-current state of the art and challenges.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2008, **35**: 421-430.
2. Bisen P, Sanodiya B, Thakur G, Baghel R, Prasad G: **Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification.** *Biotechnology Letters* 2010, **32**: 1019-1030.
3. Bradley D: **Star role for bacteria in controlling flu pandemic?** *Natural Review Drug Discovery* 2005, **4**: 945-946.
4. Zurawski G, Gunsalus RP, Brown KD, Yanofsky C: **Structure and regulation of *aroH*, the structural gene for the tryptophan-repressible 3-deoxy-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthetase of *Escherichia coli*.** *Journal of Molecular Biology* 1981, **145**: 47-73.
5. Tribe DE, Camakaris H, Pittard J: **Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates.** *Journal of Bacteriology* 1976, **127**: 1085-1097.
6. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M *et al.*: **The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12.** *Science* 1997, **277**: 1453-1462.
7. Liao JC, Chao YP, Patnaik R: **Alteration of the biochemical valves in central metabolism of *Escherichia coli*.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **745**: 21-34.
8. Frost JW, Draths KM: **Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds.** *Annu Rev Microbiol* 1995, **49**: 557-579.
9. Nikaido H: **Permeability of the Outer Membrane of Bacteria.** *Angew Chem Int Ed Engl* 1979, **18**: 337-350.
10. Death A, Notley L, Ferenci T: **Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress.** *J Bacteriol* 1993, **175**: 1475-1483.
11. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: **Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems.** *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* 1996, **2**: 1149-1174.
12. Saier MH, Jr.: **Vectorial Metabolism and the Evolution of Transport Systems.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182**: 5029-5035.
13. Gosset G: **Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2005, **4**: 14.

14. Stülke Jr, Hillen W: **Carbon catabolite repression in bacteria.** *Current Opinion in Microbiology* 1999, **2**: 195-201.
15. Legout S: **Jacques Monod (1910-1976) and his publications in the "Annales de l'Institut Pasteur".** *Research in Microbiology* 2010, **161**: 74-76.
16. Wanner BL, Kodaira R, Neidhardt FC: **Regulation of lac Operon Expression: Reappraisal of the Theory of Catabolite Repression.** *Journal of Bacteriology* 1978, **136**: 947-954.
17. Lengeler JW, Titgemeyer F, Vogler AP, Wohrl BM: **Structures and Homologies of Carbohydrate: Phosphotransferase System (PTS) Proteins.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 1990, **326**: 489-504.
18. Saier MH, Ramseier TM: **The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**: 3411-3417.
19. Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: **Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.** *Microbiology Molecular Biology Review* 1993, **57**: 543-594.
20. Zheng D, Constantinidou C, Hobman JL, Minchin SD: **Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling.** *Nucleic Acids Research* 2004, **32**: 5874-5893.
21. Krin E, Sismeiro O, Danchin A, Bertin PN: **The regulation of Enzyme IIAGlc expression controls adenylate cyclase activity in Escherichia coli.** *Microbiology* 2002, **148**: 1553-1559.
22. Nasser W, Schneider R, Travers A, Muskhelishvili G: **CRP modulates fis transcription by alternate formation of activating and repressing nucleoprotein complexes.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**: 17878-17886.
23. Colland F, Barth M, Hengge-Aronis R, Kolb A: **[sigma] factor selectivity of Escherichia coli RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors.** *EMBO J* 2000, **19**: 3028-3037.
24. Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Yoshida H, Takahashi H *et al.*: **Inducer exclusion in Escherichia coli by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc.** *Molecular Microbiology* 1998, **30**: 487-498.
25. Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Inada T, Aiba H *et al.*: **Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in Escherichia coli.** *Molecular Microbiology* 1998, **28**: 755-765.
26. Notley-McRobb L, Death A, Ferenci T: **The relationship between external glucose concentration and cAMP levels inside Escherichia coli: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase.** *Microbiology* 1997, **143**: 1909-1918.

27. Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Martínez A, Escalante A *et al.*. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**: 105-116.
28. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R *et al.*: **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* 2005, **7**: 70-87.
29. Patnaik R, Liao JC: **Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield.** *Appl Environ Microbiol* 1994, **60**: 3903-3908.
30. Chen PT, Chiang CJ, Wang JY, Lee MZ, Chao YP: **Genomic engineering of *Escherichia coli* for production of intermediate metabolites in the aromatic pathway.** *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2011, **42**: 34-40.
31. Schuster R, Schuster S: **Refined algorithm and computer program for calculating all non negative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed.** *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 1993, **9**: 79-85.
32. Schuster S, Kahn D, Westerhoff HV: **Modular analysis of the control of complex metabolic pathways.** *Biophysical Chemistry* 1993, **48**: 1-17.
33. Liao JC, Hou SY, Chao YP: **Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism.** *Biotechnology Bioengineering* 1996, **52**: 129-140.
34. Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*.** *Natural Biotechnology* 1996, **14**: 620-623.
35. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: **Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy.** *Metabolic Engineering* 2002, **4**: 124-137.
36. Baez JL, Bolivar F, Gosset G: **Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system.** *Biotechnology Bioengineering* 2001, **73**: 530-535.
37. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda Rn, Leal L, Malpica R *et al.*: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *Metabolic Engineering* 2005, **7**: 70-87.

38. Hernández M, Valle, Bolívar, Gosset: **Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli*; mutant devoid of the phosphotransferase system.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, **57**: 186-191.
39. Deutscher J, Francke C, Postma PW: **How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**: 939-1031.
40. Ponce E, Flores N, Martínez A, Valle F, Bolívar F: **Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis.** *J Bacteriol* 1995, **177**: 5719-5722.
41. Gosset G, Yong-Xiao J, Draths KM: **A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*.** *J Ind Microbiol* 1996, **17**: 47-52.
42. Cortazar Adriana: *Efecto de la inactivación de las isoenzimas de piruvato cinasa sobre el metabolismo central y la capacidad de síntesis de compuestos aromáticos en cepas de *Escherichia coli* que carecen del sistema de fosfotransferasa.* Universidad Autónoma de México; 2005.
43. Patnaik R, Roof WD, Young RF, Liao JC: **Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle.** *J Bacteriol* 1992, **174**: 7527-7532.
44. Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW: **Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E.coli*.** *Biotechnol Progress* 2003, **19**: 1450-1459.
45. Li K, Frost JW: **Microbial Synthesis of 3-Dehydroshikimic Acid: A Comparative Analysis of D-Xylose, L-Arabinose, and D-Glucose Carbon Sources.** *Biotechnol Progress* 1999, **15**: 876-883.
46. Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Gosset G *et al.*: **Nutrient scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenol pyruvate: carbohydrate phosphotransferase system as explored by gene expression profile.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2005, **10**: 51-63.
47. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F: **Analysis of Carbon Metabolism in *Escherichia coli* Strains with an Inactive Phosphotransferase System by ¹³C Labeling and NMR Spectroscopy.** *Metabolic Engineering* 2002, **4**: 124-137.
48. Georgellis D, Kwon O, Lin ECC, Wong SM, Akerley BJ: **Redox Signal Transduction by the ArcB Sensor Kinase of *Haemophilus influenzae* Lacking the PAS Domain.** *J Bacteriol* 2001, **183**: 7206-7212.
49. Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A *et al.*: **Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **8**: 209-221.
50. Flores N, Escalante A, de Anda R, Baez-Viveros JL, Merino E, Franco B *et al.*: **New insights on the role of the sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli***

strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *J Mol Microbiol Biotech* 2007.

51. Goodman HM, Abelson John, Landy Arth, Brenner S, Smith JD: **Amber Suppression: a Nucleotide Change in the Anticodon of a Tyrosine Transfer RNA.** *Nature* 1968, **217**: 1019-1024.
52. Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**: 516-524.
53. Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez O *et al.*: **Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2010, **9**: 21.
54. Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R: **Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **94**: 821-829.
55. Ahn Jo : **Exploring the Effects of Carbon Sources on the Metabolic Capacity for Shikimic Acid Production in *Escherichia coli* Using In Silico Metabolic Predictions.** *J Microbiol Biotechnol* 8 A.D., **18**: 1773-1784.
56. Sharma R: **CaSRT: Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium.** *Biotechniques* 1996, **20**: 42-44.
57. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M *et al.*: **Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.** *Mol Syst Biol* 2006, **2**.
58. Datsenko KA, Wanner BL: **One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci, USA* 2000, **97**: 6640-6645.
59. Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez O *et al.*: **Coultization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2008, **7**: 1.
60. Srinivasan PR, Sprinson DB: **2-Keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase.** *J Biol Chem* 1959, **234**: 716-722.
61. Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B .: **New Insights into the Role of Sigma Factor RpoS as Revealed in *Escherichia coli* Strains Lacking the Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2008, **14**: 176-192.
62. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.

63. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M *et al.*: **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.** *Clin Chem* 2009, **55**: 611-622.
64. Sridhar J, Eiteman MA, Wiegel JW: **Elucidation of Enzymes in Fermentation Pathways Used by *Clostridium thermosuccinogenes* Growing on Inulin.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**: 246-251.
65. der Werf MJV, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG: **Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp. 130Z*.** *Archives of Microbiology* 1997, **167**: 332-342.
66. Ramirez-Trujillo JA, Encarnacion S, Salazar E, de los Santos AG, Dunn MF, Emerich DW *et al.*: **Functional Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* Acetate Metabolism Genes *aceA*, *SMc00767*, and *glcB*.** *J Bacteriol* 2007, **189**: 5875-5884.
67. Salazar E, Diaz-Mejia JJ, Moreno-Hagelsieb G, Martinez-Batallar G, Mora Y, Mora J *et al.*: **Characterization of the *NifA-RpoN* Regulon in *Rhizobium etli* in Free Life and in Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**: 4510-4520.
68. Higareda-Almaraz J, Enriquez-Gasca M, Hernandez-Ortiz M, Resendis-Antonio O, Encarnacion-Guevara S: **Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective.** *BMC Systems Biology* 2011, **5**: 96.
69. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20**: 3551-3567.
70. The UniProt Consortium: **The universal protein resource (UniProt).** *Nucl Acids Res* 2008, **36**: D190-D195.
71. Jung YM, Lee JN, Shin HD, Lee YH: **Role of *tktA* gene in pentose phosphate pathway on odd-ball biosynthesis of poly-[beta]-hydroxybutyrate in transformant *Escherichia coli* harboring *phbCAB* operon.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004, **98**: 224-227.
72. Meijnen JP, Verhoef S, Briedljal A, de Winde J, Ruijsenaars H: **Improved para-hydroxybenzoate production by engineered *Pseudomonas putida* S12 by using a mixed-substrate feeding strategy.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, **90**: 885-893.
73. Gosset G: **Production of aromatic compounds in bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology* 2009, **20**: 651-658.
74. Olvera L, Mendoza-Vargas A, Flores N, Olvera M, Sigala JC, Gosset G *et al.*: **Transcription Analysis of Central Metabolism Genes in *Escherichia coli* Possible Roles of sigma 38 in Their Expression, as a Response to Carbon Limitation.** *PLoS ONE* 2009, **4**: e7466.
75. Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A: **Novel Members of the *Cra* Regulon Involved in Carbon Metabolism in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2011, **193**: 649-659.

76. Hardiman T, Lemuth K, Keller MA, Reuss M, Siemann-Herzberg M: **Topology of the global regulatory network of carbon limitation in *Escherichia coli***. *Journal of Biotechnology* 2007, **132**: 359-374.
77. Harinarayanan R, Murphy H, Cashel M: **Synthetic growth phenotypes of *Escherichia coli* lacking ppGpp and transketolase A (tktA) are due to ppGpp-mediated transcriptional regulation of tktB**. *Molecular Microbiology* 2008, **69**: 882-894.
78. Rui B, Shen T, Zhou H, Liu J, Chen J, Pan X *et al.*: **A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress**. *BMC Systems Biology* 2010, **4**: 122.
79. Dong T, Kirchhof M, Schellhorn H: **RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12**. *Molecular Genetics and Genomics* 2008, **279**: 267-277.
80. L Notley and T Ferenci: **Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*?** *J Bacteriol* 1996, **178**: 1465-1468.
81. Lelong C, Aguiluz K, Luche S, Kuhn L, Garin J, Rabilloud T *et al.*: **The Crl-RpoS Regulon of *Escherichia coli***. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007, **6**: 648-659.
82. Salmon K, Hung Sp, Mekjian K, Baldi P, Hatfield GW, Gunsalus RP: **Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12**. *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**: 29837-29855.
83. Jiang GR, Nikolova S, Clark DP: **Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli***. *Microbiology* 2001, **147**: 2437-2446.
84. Braun V: **Regulation of iron uptake minimizes iron-mediated oxidative stress**. *J Biosci* 1998, **23**: 483-489.
85. Calhoun LN, Kwon YM: **Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review**. *Journal of Applied Microbiology* 2011, **110**: 375-386.
86. Krapp AR, Humbert MaV, Carrillo N+: **The soxRS response of *Escherichia coli* can be induced in the absence of oxidative stress and oxygen by modulation of NADPH content**. *Microbiology* 2011, **157**: 957-965.
87. Kuczynska-Wisnik D, Matuszewska E, Furmanek-Blaszk B, Leszczynska D, Grudowska A, Szczepaniak P *et al.*: **Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signalling**. *Research in Microbiology* 2010, **161**: 847-853.
88. Storz G, Imlay JA: **Oxidative stress**. *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**: 188-194.
89. Smirnova GV, Samoylova ZY, Muzyka NG, Oktyabrsky ON: **Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress**. *Free Radical Biology and Medicine* 2009, **46**: 759-768.

90. Iwadate Y, Honda H, Sato H, Hashimoto M, Kato Ji: **Oxidative stress sensitivity of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome.** *FEMS Microbiology Letters* 2011, **322**: 25-33.
91. Barth E, Gora KV, Gebendorfer KM, Settele F, Jakob U, Winter J: **Interplay of cellular cAMP levels, σ^S activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2009, **155**: 1680-1689.
92. Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T, Sauer U: **Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA.** *FEMS Microbiology Letters* 2001, **204**: 247-252.
93. Lengsfeld C, Schonert S, Dippel R, Boos W: **Glucose- and Glucokinase-Controlled *mal* Gene Expression in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2009, **191**: 701-712.
94. Tony R. And Jacky L.Snoep. Glycolysis and Flux Control. Edited by Bock . EcoSal-*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology . 2005. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
95. Lacour S, Landini P: **{ σ }S-Dependent Gene Expression at the Onset of Stationary Phase in *Escherichia coli*: Function of { σ }S-Dependent Genes and Identification of Their Promoter Sequences.** *J Bacteriol* 2004, **186**: 7186-7195.
96. Oh MK, Liao JC: **Gene Expression Profiling by DNA Microarrays and Metabolic Fluxes in *Escherichia coli*.** *Biotechnol Progress* 2000, **16**: 278-286.
97. Peng L, Shimizu K: **Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **61**: 163-178.
98. Weber H, Polen T, Heuveling VF, Hengge AR: **Genome wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli* sigma S dependent genes, promoters and sigma factor selectivity.** *J Bacteriol* 2005, **187**: 1591-1603.
99. Cronan J, Subrahmanyam S: **FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency.** *Molecular Microbiology* 1998, **29**: 937-943.
100. Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Pucci P, Defez R: **Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2006, **152**: 2421-2431.
101. Cunningham L, Gruer MJ, Guest JR: **Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*.** *Microbiology* 1997, **143**: 3795-3805.
102. Tseng CP: **Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products.** *FEMS Microbiol Lett* 1997, **157**: 67-72.
103. Kumar R, Shimizu K: **Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *gdhA*, *glnL*, *gltB*, *D* mutants under different carbon and nitrogen limitations in the continuous culture.** *Microbial Cell Factories* 2010, **9**: 8.

104. Lawley B, Pittard AJ: **Regulation of *aroL* expression by TyrR protein and Trp repressor in *Escherichia coli* K-12.** *J Bacteriol* 1994, **176**: 6921-6930.
105. Joloba ML, Rather PN: **Mutations in *deoB* and *deoC* alter an extracellular signaling pathway required for activation of the *gab* operon in *Escherichia coli*.** *FEMS Microbiology Letters* 2003, **228**: 151-157.
106. Lee J, Zhang XS, Hegde M, Bentley WE, Jayaraman A, Wood TK: **Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*.** *ISME J* 2008, **2**: 1007-1023.
107. Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ: **From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 1996, **20**: 911-917.
108. Rodríguez Ruiz JA: *Incorporación de modificaciones genéticas a una cepa de *Escherichia coli* para modular la expresión de genes que permitan acumular shikimato.* Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
109. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynker HL, Boyer HW *et al.*: **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.** *Gene* 1977, **2**: 95-113.
110. Balderas-Hernandez V, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernandez-Chavez G, Baez-Viveros J *et al.*: **Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*.** *Microbial Cell Factories* 2009, **8**: 19.

12. ANEXOS

- Anexo I. Artículo publicado: **Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez O and Francisco Bolívar. *Microbial Cell Factories* 2008, **7**: 1.
- Anexo II. Análisis de la transcripción relativa de genes del metabolismo central cuando la cepa PB12 cuando coutiliza glucosa-glicerol comparada contra PB12 glucosa y PB12 glicerol.
- Anexo III. Manuscrito: **New insights into the *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging and acetate carbon recycling metabolism responses during growth on glycerol.** Karla Martínez-Gómez, Héctor M. Castañeda, Noemí Flores, Gabriel Martínez-Batallar, Guillermo Gosset, Sergio Encarnación and Francisco G. Bolivar. Será sometida a la revista *Microbial Cell Factories*.
- Curva de DAHP

Research

Open Access

Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system

Karla Martínez¹, Ramón de Anda¹, Georgina Hernández¹, Adelfo Escalante¹, Guillermo Gosset¹, Octavio T Ramírez² and Francisco G Bolívar*¹

Address: ¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001 CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México and ²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001 CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México

Email: Karla Martínez - karlamg@ibt.unam.mx; Ramón de Anda - deanda@ibt.unam.mx; Georgina Hernández - ginah@ibt.unam.mx; Adelfo Escalante - adelfo@ibt.unam.mx; Guillermo Gosset - gosset@ibt.unam.mx; Octavio T Ramírez - tonatiuh@ibt.unam.mx; Francisco G Bolívar* - bolivar@ibt.unam.mx

* Corresponding author

Published: 22 January 2008

Received: 2 October 2007

Microbial Cell Factories 2008, **7**:1 doi:10.1186/1475-2859-7-1

Accepted: 22 January 2008

This article is available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/1>

© 2008 Martínez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) are capable of coutilizing glucose and other carbon sources due to the absence of catabolite repression by glucose. In these strains, the lack of this important regulatory and transport system allows the coexistence of glycolytic and gluconeogenic pathways. Strains lacking PTS have been constructed with the goal of canalizing part of the phosphoenolpyruvate (PEP) not consumed in glucose transport to the aromatic pathway. The deletion of the *ptsHlcr* operon inactivates PTS causing poor growth on this sugar; nonetheless, fast growing mutants on glucose have been isolated (PB12 strain). However, there are no reported studies concerning the growth potential of a PTS⁻ strain in mixtures of different carbon sources to enhance the production of aromatics compounds.

Results: PB12 strain is capable of coutilizing mixtures of glucose-arabinose, glucose-gluconate and glucose-glycerol. This capacity increases its specific growth rate (μ) given that this strain metabolizes more moles of carbon source per unit time. The presence of plasmids pRW300*aroG^{fb}* and pCL*tktA* reduces the μ of strain PB12 in all mixtures of carbon sources, but enhances the productivity and yield of aromatic compounds, especially in the glucose-glycerol mixture, as compared to glucose or glycerol cultures. No acetate was detected in the glycerol and the glucose-glycerol batch fermentations.

Conclusion: Due to the lack of catabolite repression, PB12 strain carrying multicopy plasmids containing *tktA* and *aroG^{fb}* genes is capable of coutilizing glucose and other carbon sources; this capacity, reduces its μ but increases the production of aromatic compounds.

Background

Glucose is the preferred carbon source for *Escherichia coli* (*E. coli*); the presence of this monosaccharide inhibits the utilization of secondary carbon sources. This process is known as carbon catabolite repression, and the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) is the main regulator of this response. The PTS components EI, HPr, EIIGlc, EIICB^{Glc} encoded by the *ptsHICrr* operon and the *ptsG* gene, as well as other important proteins like the adenylate cyclase (Cya) and the cAMP-CRP complex, are members of the carbon catabolite modulon regulating the activities of genes involved in carbon transport [1-5]. The inactivation of PTS has pleiotropic effects in *E. coli*. It has been demonstrated that the deletion of the *ptsHICrr* operon drastically reduces the specific growth rate (μ) of the cell (from 0.7 to 0.1 hr⁻¹) when growing on glucose as the only carbon source. In this type of strains, the overexpression of several genes involved in carbon utilization occurs as a response to carbon limited conditions. Accordingly, the cell is capable of cointilizing glucose with several other carbon sources that are not only carbohydrates. The absence of functional PTS (PTS⁻) permits the coexistence of glycolytic and gluconeogenic pathways in this type of strains [6-8]. PTS⁻ strains have been constructed with the goal of canalizing part of the phosphoenolpyruvate (PEP) not utilized in glucose transport to the synthesis of aromatic compounds [9-13]. However, as already mentioned, the absence of PTS causes poor growth on glucose. As such, PTS⁻ strains are not suitable for aromatic production purposes. Therefore, additional modifications are required to increase glucose transport and phosphorylation capacities in the PTS⁻ cell. Starting from the PTS⁻ PB11 strain (derived from JM101) in which the *ptsHICrr* operon was deleted, several fast growing mutants on glucose have been selected using a chemostat fed with glucose at progressively higher rates [9]. One of these fast growing mutants ($\mu = 0.42$ hr⁻¹), named PB12 PTS⁻Glc⁺, uses the GalP and Glk proteins for glucose transport and phosphorylation, respectively, as has been previously demonstrated. Moreover, not only the carbon glycolytic flux in PB12 PTS⁻Glc⁺ strain is highly increased as compared to PB11 [6], but also PB12 is capable of increasing the yield of aromatic compounds from glucose as compared to the wild type strain (Fig. 1) [13,14]. Finally, it has also been shown that strain PB12 maintains the capacity of cointilizing glucose and acetate with the consequent increase in its μ , similarly to what happens with the parental PB11 strain. These results indicate that in these PTS⁻ strains the carbon catabolite repression by glucose is not working for many carbon sources, which explains why strain PB11 is capable of cointilizing glucose and several other carbon sources [7,8]. In this report we analyze the capability of strain PB12 of simultaneously utilizing glucose and other carbon sources, as well as its

capacity of enhancing the production of aromatic compounds due to this carbon cointilization capability.

Results

Cointilization of glucose and other glycolytic carbon sources by PB12

Strain PB12 presents a high glycolytic carbon flux when glucose is used as the only carbon source [6]. Therefore, the capacity of cointilizing several glycolytic metabolized carbon sources was analyzed in this strain. As shown in table 1 and figure 2, PB12 has the capacity of growing relatively fast on glucose and in other glycolytic carbon sources such as arabinose, glycerol and gluconate. When a mixture of glucose and one of these other carbohydrates was used in the fermentor as carbon sources, PB12 cointilized clearly in all cases, both carbohydrates three hours after the culture was started, while the parental strain JM101 exhibited different behaviors depending on the mixture present in the medium. Namely, glycerol uptake by JM101 initiated when glucose was completely exhausted, whereas for arabinose and gluconate, consumption of the second carbon source occurred when glucose was approximately 8.3 and 25 mmolC/L, respectively. Interestingly, only small amounts of acetic acid were detected when strain PB12 was grown on glycerol or in the glucose-glycerol mixture, whereas larger amounts were detected in the other mixtures (Tables 1 and 2). Carbon source utilization patterns and kinetic and stoichiometric parameters of the parental strain JM101 and its derivative PB12 grown in the different mixtures are shown in figure 3 and table 2, respectively.

Aromatic metabolite production in strain PB12 using different mixtures of carbohydrates as carbon sources

With the goals of increasing the production of the first aromatic intermediate metabolite of the shikimate pathway, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) and of measuring the carbon flux in this pathway by avoiding its transformation into subsequent compounds, a mutation in the *aroB* gene in strain PB12 was constructed (details in Methods). This mutation cancels the transformation of DAHP into 3-dehydroquinate (DHQ) (Fig. 1). In addition, strain PB12 and its *aroB*-derivative were cotransformed with the compatible plasmids pRW300*aroG^{fbr}* and pCL*tktA*. These plasmids carry the *tktA* and *aroG^{fbr}* genes that code for the transketolase A (TktA) and the AroG^{fbr} DAHP synthase insensitive to feedback inhibition by phenylalanine [9-14]. The transcription of *tktA* is under its constitutive promoter, while that of *aroG^{fbr}* is under the control of the *lacUV* promoter that is induced with IPTG (details in Methods). TktA is involved in the synthesis of erythrose 4-P (E4P) one of the two precursors of DAHP. The second enzyme, AroG, is one of the three isoenzymes involved in the synthesis of DAHP from E4P and PEP (Fig. 1). It has been reported

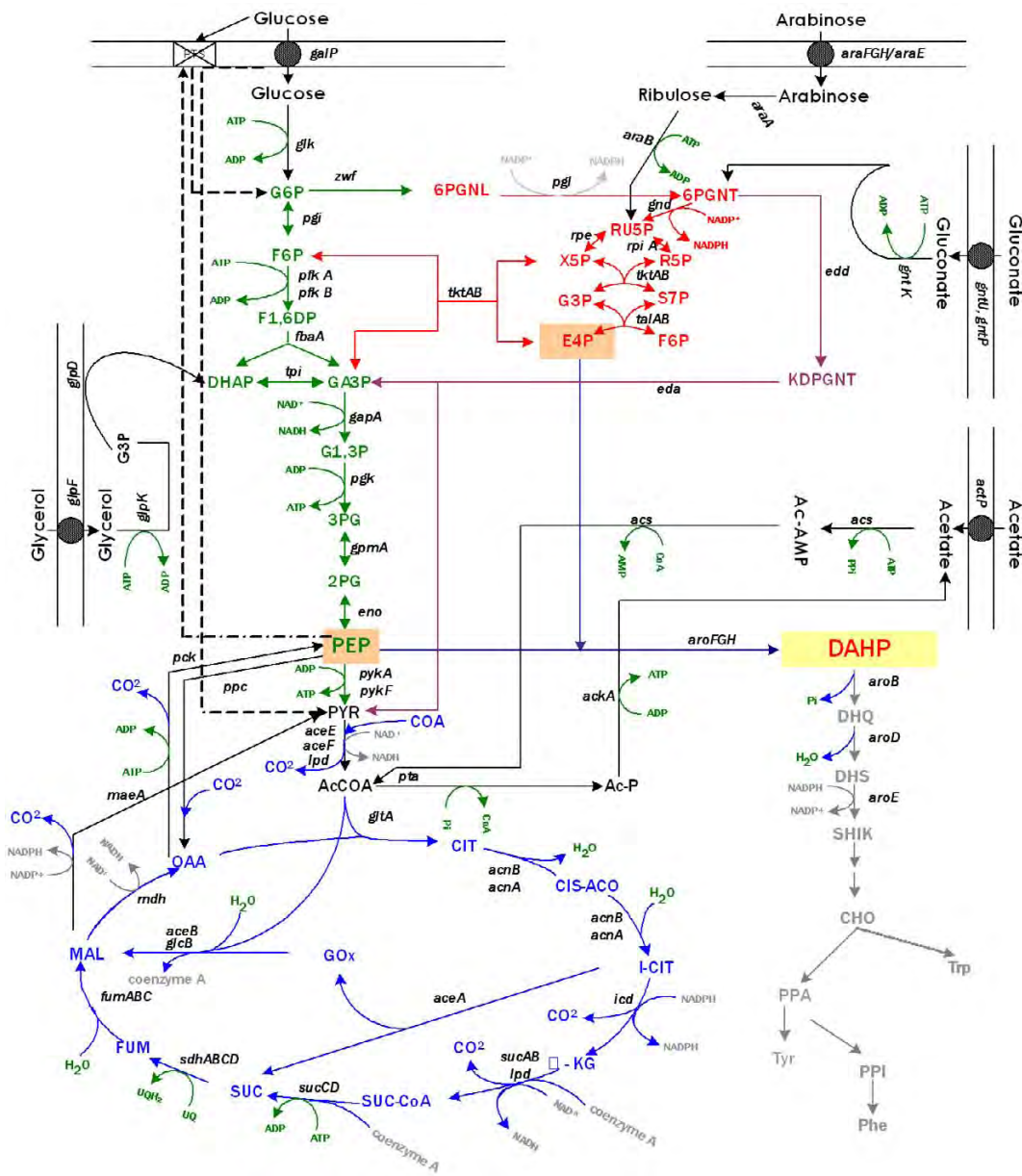


Figure 1

Central metabolic and aromatic pathways. The figure shows key metabolites, genes involved in their transformation, and genes coding for carbon transporters for those carbon sources coutilized by strain PB12. In this strain PTS is not functional. PB12 utilizes GalP permease and Glk for glucose transport and phosphorylation, respectively. Therefore, PEP that is not used for this purpose can be canalized for aromatic production [6,7]. Broken lines indicate the usual role and synthesis of some metabolites in the presence of PTS. Abbreviations are: glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-phosphate (F1,6P), dihydroxy-acetone-phosphate (DHAP), glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P), glyceraldehyde-1,3-phosphate (G1,3P), 3-phosphoglycerate (3PG), 2-phosphoglycerate (2PG), phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR), acetyl-CoA (AcCoA), acetyl phosphate (Ac-P), acetyl-AMP (Ac-AMP), citrate (CIT), glyoxylate (GOx), α -ketoglutarate (α -KG), succinyl-coenzyme A (SUC-CoA), succinate (SUC), fumarate (FUM), malate (MAL), oxaloacetate (OAA), 6-phosphogluconolactone (6PGNL), 6-phosphogluconate (6PGNT), ribulose-5-phosphate (RU5P), ribose-5-phosphate (R5P), xylulose-5-phosphate (X5P), pseudoheptulose-7-phosphate (S7P), erythrose-4-phosphate (E4P), 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPGNT), 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP), 3-dehydroquininate (DHQ), 3-dehydroshikimate (DHS), shikimate (SHIK), chorismate (CHO), prephenate (PPA), phenylpyruvate (PPI), L-phenylalanine (Phe), L-tyrosine (Tyr), L-tryptophane (Trp).

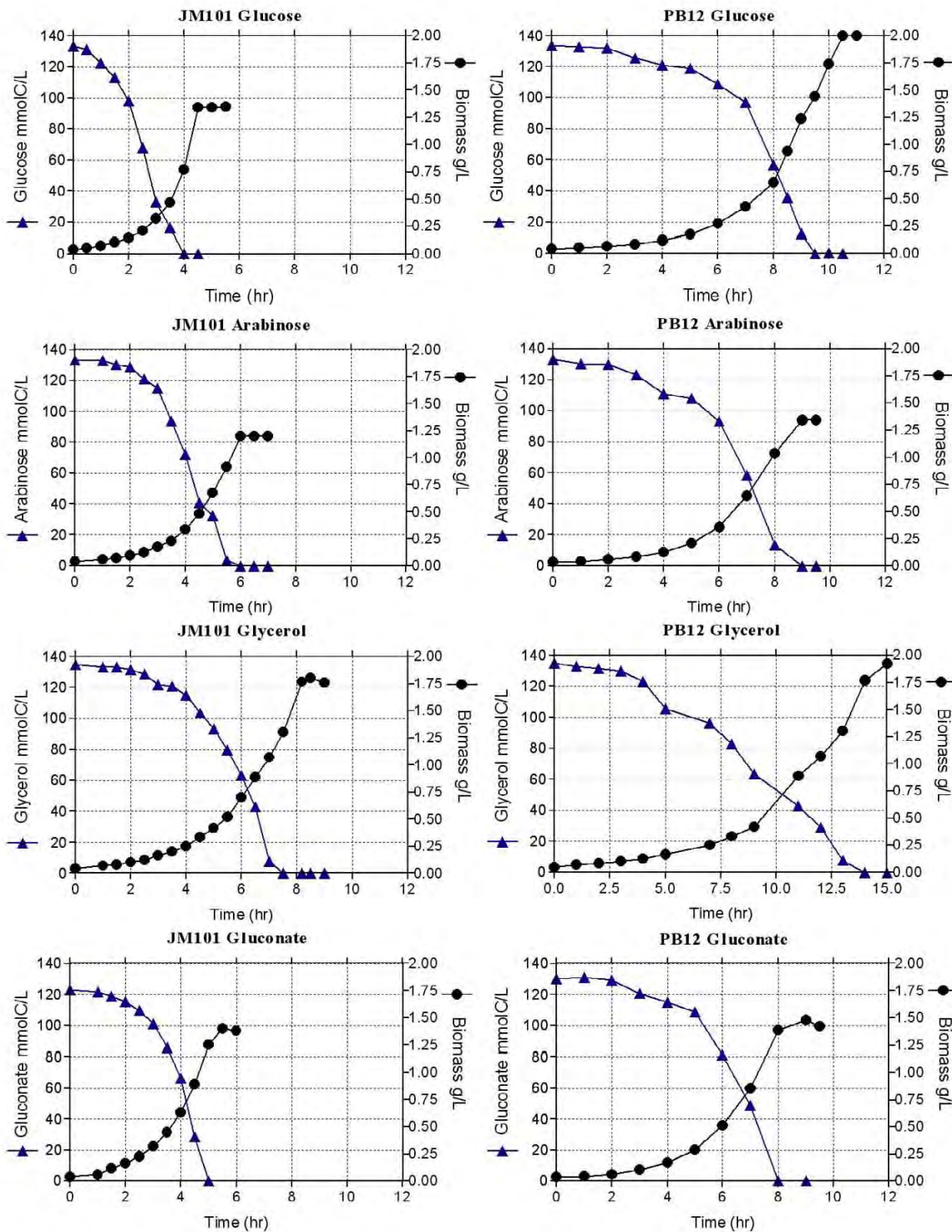


Figure 2
Growth profile and substrate utilization of the wild type JM101 strain and its derivative PB12 on one carbon source. Fermentor cultures of the two strains grown aerobically in M9 medium containing only one carbon source: glucose, gluconate, arabinose, or glycerol (4 g/L, equivalent to approximately 130 mmolC/L). Growth was monitored and the carbohydrates concentrations were assayed. The production of acetate was also measured. Mean values from two independent cultures are shown. Differences between values in these experiments were <10%.

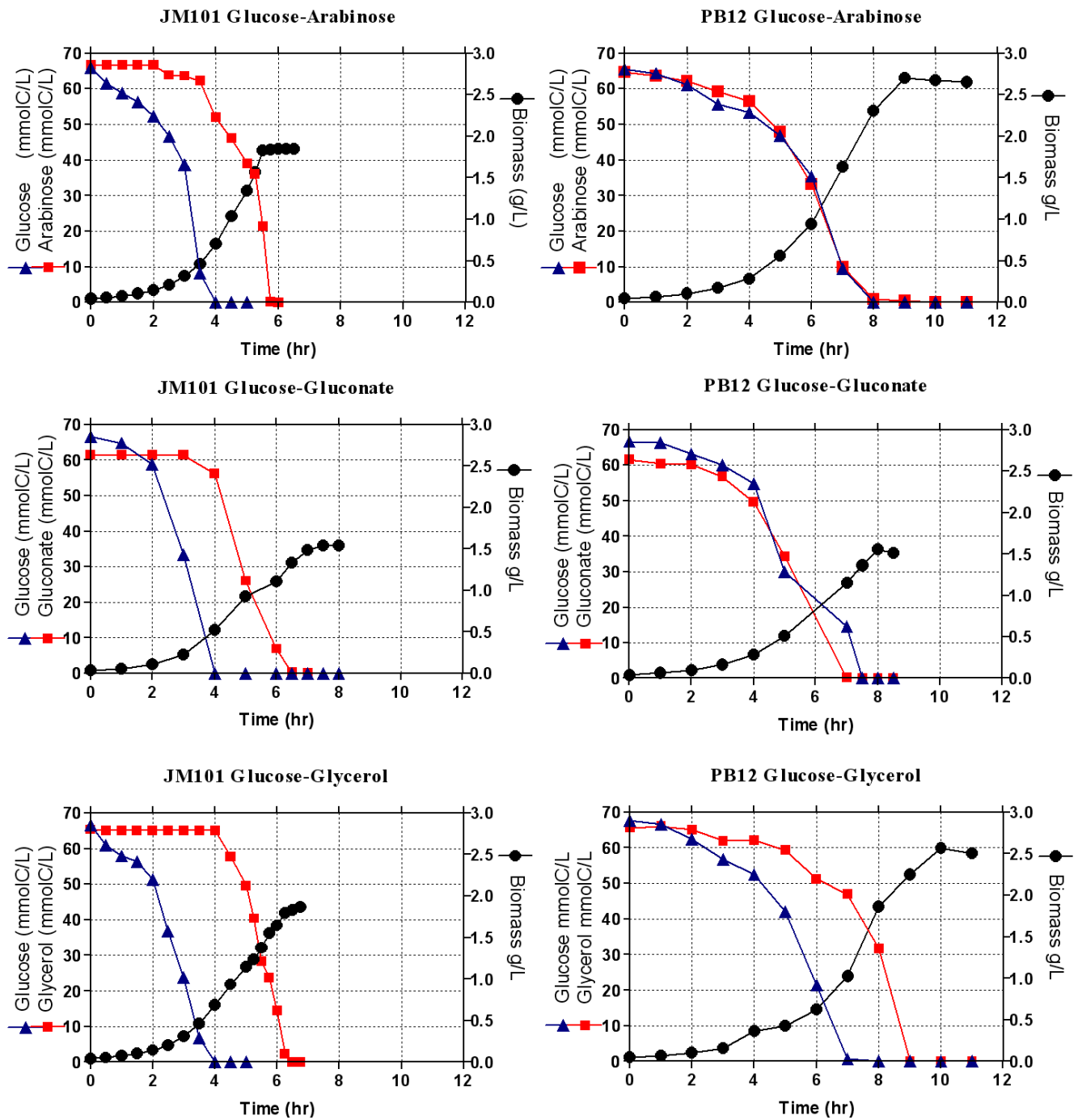


Figure 3
Growth profile and substrate utilization of the wild type JM101 strain and its derivative PB12 on mixtures of two carbon sources. Fermentor cultures of the two strains grown aerobically in M9 medium containing mixtures of glucose (2 g/L equivalent to 65 mmolC/L) and other carbohydrate (2 g/L, equivalent to approximately 65 mmolC/L). Growth was monitored and the concentrations of glucose and of the other carbohydrates were assayed. The production of acetate was also measured. Mean values from two independent cultures are shown. Differences between values in these experiments were <10%.

Table 1: Kinetic and stoichiometric parameters for strain JM101 and its derivative PB12 PTS-Glc⁺, using one carbon source.

Carbon sources	JM101				PB12			
	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L
Glucose	0.72	0.01800	71.88	0.44	0.42	0.0171	24.50	0.30
Arabinose	0.68	0.0066	155.84	0.50	0.50	0.0081	62.50	0.33
Glycerol	0.47	0.01070	43.90	0.18	0.32	0.0086	37.17	0.05
Gluconate	0.69	0.0049	80.00	0.55	0.51	0.0094	42.50	0.40

that overexpression of these two genes when present in multicopy plasmids enhances the production of aromatic compounds [9-16].

• *DAHP production in PB12 aroB-(pRW300aroG^{fb}r pCLtktA) resting cells*

As can be seen in figure 4, DAHP production in strain PB12aroB-(pRW300aroG^{fb}r pCLtktA) yielded similar values with glucose, gluconate and glycerol, whereas it doubled with arabinose. Interestingly, resting cell cultures on arabinose alone produced slightly more DAHP than with the glucose-arabinose mixture, and about the same amount of DAHP than that of the glucose-glycerol mixture. However, the productivity (qDAHP), in the glucose-glycerol mixture was superior to the one obtained for any other carbon source or analyzed combinations of carbon sources (Table 3). DAHP production and yields in strain JM101aroB- carrying the same plasmids were 25 and 50 times lower, respectively, than the values obtained in strain PB12aroB-(pRW300aroG^{fb}r pCLtktA) (data not shown).

• *Aromatic intermediate production in the fermentor by the strain PB12 (pRW300aroG^{fb}r pCLtktA)*

Figures 5 and 6 show the production of DAHP, DHS and SHIK by strain PB12 (pRW300aroG^{fb}r pCLtktA) when grown in the fermentor using different carbon sources. It

is important to emphasize that the highest DAHP titer (31.33 mmolC/L, equivalent to 0.9 g/L) occurred in the case of the glucose-glycerol mixture, which almost doubled the amount obtained in arabinose and in the glucose-arabinose mixture and is three times higher than the amount produced in the glycerol culture (Fig. 5). Interestingly the highest production of DHS and SHIK also occurred in the glucose-glycerol culture and slightly lower in the glycerol glucose-glycerol mixture fermentation (Fig. 6). Table 4 shows the specific productivity values for these aromatic compounds that are also higher in the glucose-glycerol mixture. Other parameters determined during these fermentations, including acetate concentrations, are also presented in table 4.

Discussion

The deletion of the *ptsHICrr* operon exerts pleiotropic effects on the general physiology of the cell. PB11 grows very slowly ($\mu = 0.1$ hr⁻¹) when cultured on glucose as the only carbon source due to its inability to efficiently transport and phosphorylate glucose. Under such conditions, a nutrient scavenging stress response is induced which is responsible for the overexpression of many genes encoding carbon transport and metabolism proteins [7,8]. Due to the lack of the EIIA^{Glc} component, mainly responsible for catabolite repression, the PB11 strain is capable of utilizing secondary carbon sources in the presence of glu-

Table 2: Kinetic and stoichiometric parameters for strain JM101 and its derivative PB12 PTS-Glc⁺, using a mixture of two carbon sources.

Carbon sources	JM101				PB12			
	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ g/mmolC	qs mmolC/g _{DCW} hr	acet _{max} g/L
Glucose + Arabinose	0.72 (0.64)	0.0180 (0.0012)	40.68 (7.64)	0.30	0.55	0.0144	38.19	0.30
Glucose + Glycerol	0.72 (0.45)	0.0171 (0.006)	43.11 (8.55)	0.13	0.50 (0.20)	0.0136 (0.017)	38.23 (9.24)	0.03
Glucose + Gluconate	0.72 (0.33)	0.00108 (0.0133)	70.33 (20.62)	0.49	0.51	0.0125	40.80	0.39

Different parameters (μ , qs and $Y_{x/s}$, see Methods) were determined for strain JM101 and its derivative PB12 PTS-Glc⁺ using mixture of two carbon sources. The numbers in parentheses indicate data for the specific strain in those stages in which only the remaining carbon source was available. In the case of JM101, the remaining carbon source was arabinose, glycerol, or gluconate, whereas glycerol was for PB12.

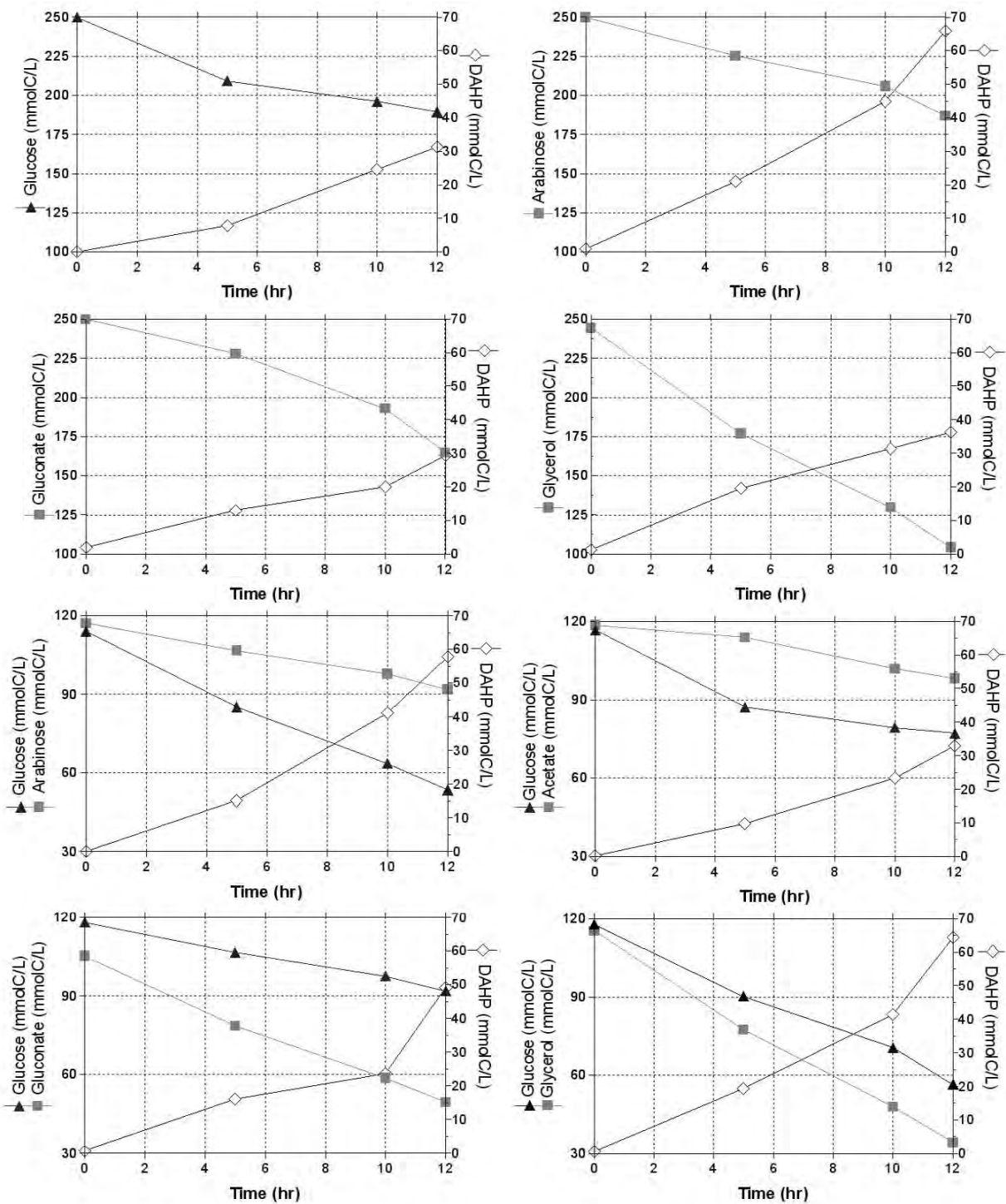


Figure 4
Substrate utilization and DAHP production by resting cells of strain PB12 PTS-Glc⁺aroB⁻ (pRW300aroG^{fb}r pCLtkA). Resting cells were incubated with the different carbohydrates in the conditions described in Methods. Carbon utilization and the production of DAHP were measured at different times after the addition of the carbohydrates. Mean values from two independent experiments are shown; differences between values in these experiments were <10%. The biomass value for the glycerol-glucose mixture was approximately 0.66 g/L, whereas for the rest of the carbon sources was 1.064 g/L (data not shown).

Table 3: DAHP productivity and other important parameters determined for strain PB12 PTS-Glc⁺aroB⁻(pRW300aroG^{br} pCLtktA) in resting cells.

Carbon sources	q _{DAHP} mmolC DAHP/g _{DCW} hr	q _s mmolC/g _{DCW} hr	Y mmolC DAHP/mmolC carbon sources
Glucose	2.44	4.72	0.52
Arabinose	5.09	4.93	1.03
Acetate	0.00	0.00	0.00
Gluconate	2.15	6.15	0.35
Glycerol	2.75	10.97	0.25
Glucose-Arabinose	4.52	6.72	0.67
Glucose-Acetate	2.57	4.69	0.55
Glucose-Glycerol	8.63	15.63	0.55
Glucose-Gluconate	3.80	6.44	0.59

cose. The induction of several cAMP/CRP regulated genes in this strain suggests that the adenylate cyclase is still producing cAMP and unpublished evidence indicates that less cAMP is produced in the PB11 and PB12 strains as compared to the paternal JM101 strain (de Anda unpublished results). Nevertheless, there is apparently enough cAMP to allow the transcription of many cAMP-CRP regulated genes in these PTS⁻ strains [7,8]. Additionally, the transcription of the *rpoS* gene, that encodes the sigma factor RpoS for growth on non-optimal conditions, is upregulated in these strains. It is known that RpoS regulates various operons, including glycolytic genes, when *E. coli* cells are grown in non-optimal conditions [8,17-22]. Strain PB12 PTS-Glc⁺, derived from strain PB11PTS⁻ in an adaptive evolution process, is capable of growing faster on glucose ($\mu = 0.42 \text{ hr}^{-1}$). It has been previously demonstrated that when strain PB12 carries plasmids with the *tktA* and *aroG^{br}* genes, the overexpression of these genes is responsible for canalizing part of the PEP, not utilized in glucose transport due to the absence of PTS, to the synthesis of aromatic compounds [9-14].

In this report we have demonstrated that strain PB12 is still capable of coutilizing other carbohydrates with glucose. This capacity was explored with the goal of further increasing the production of aromatic compounds in minimal medium, using strain PB12(pCLtktA, pRW300aroG^{br}). The obtained results indicate that certain carbohydrate mixtures, especially glucose-glycerol, increase the capacity of aromatic metabolite production in both, resting cell and fermentor experiments. Such capacity was enhanced by more than six-fold (5.00 to 31.33 mmolC/L) in the case of DAHP in the fermentor experiments when compared to glucose as the only carbon source. Interestingly, less biomass (1.4 g/L) was produced in the glucose-glycerol mixture than in the other cultures and no acetate was detected in the glycerol and glucose-glycerol cultures. Furthermore, the yield of aromatics compounds obtained in this last mixture in batch conditions (0.36 mmolC/mmolC) is high and represents 53% of the maximum theoretical yield.

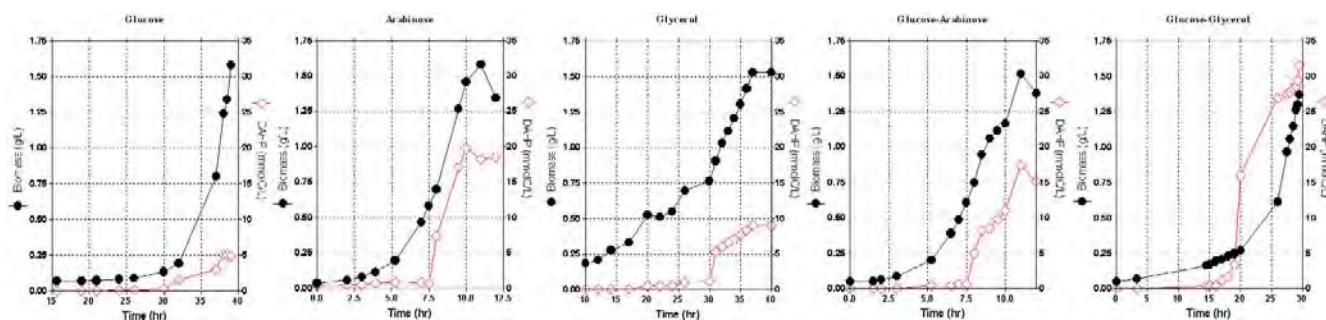


Figure 5
DAHP production by strain PB12 PTS-Glc⁺(pRW300aroG^{br} pCLtktA). Fermentor cultures of strain PB12 carrying these plasmids, grown aerobically in minimal medium, containing either a final concentration of 4 g/L equivalent to approximately 130 mmolC/L (in the case of one carbon source), or 2 g/L equivalent to approximately 65 mmolC/L, of each carbohydrate (when mixtures of two were utilized). Acetate concentrations were also measured in these fermentations and are reported in table 4. Mean values from two independent cultures are shown. Differences between values in these experiments were <10%. IPTG (0.1 mM) was included in the medium at the beginning of the fermentations.

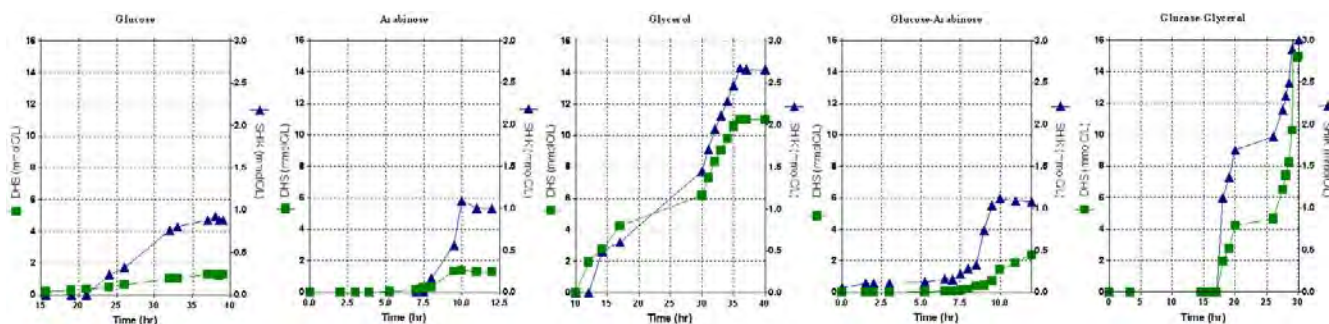


Figure 6
DHS and SHIK production by strain PB12 PTS-Glc⁺(pRW300aroG^{ibr} pCLtktA). The same fermentations for the production of DAHP were used for the measurements of DHS and SHIK intermediates. Mean values for two independent cultures are shown. Differences between values in these experiments were <10%.

It is important to emphasize that the presence of these two carbohydrates as carbon sources increased the μ of PB12, as compared to the value obtained on glucose or glycerol. However, when the glucose-glycerol mixture was used by the PB12 strain carrying both plasmids – pCLtktA and pRW300aroG^{ibr} – in the presence of IPTG where, as mentioned the best yield of aromatic compounds was obtained, then its μ was reduced as compared to the one obtained on glucose, although the lag phase was half of that obtained on glucose alone. It has been proposed that the presence of plasmids, which was confirmed during different fermentation steps, and the induction of the transcription of the *aroG^{ibr}* gene with IPTG could cause a metabolic burden responsible for slower specific growth rates and longer lag phases, like the one obtained in the glucose culture [14]. The increased production of aromatic compounds is probably not only the result of a different carbon utilization capability but also of a modified carbon flux metabolism than the one present when the cell is grown only on glucose. Glycerol enters the glycolytic pathway as glycerol-3P and it is transformed to 3-dihydroxyacetone-phosphate (DHAP); this compound isomerizes to glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) (Fig. 1).

This metabolite is the substrate of the TktA enzyme that interconnects glycolysis with the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway and interconverts G3P and fructose-6P (F6P) into E4P and xylulose-5-phosphate (X5P) (Fig. 1) [22,23]. This situation could explain why glycerol and glucose, better than any other carbohydrate mixture, were capable of modifying and enhancing the carbon flux into E4P and possibly PEP, both precursors of DAHP, by increasing the production of aromatic intermediates including DHS and SHIK [24].

It is also interesting that no acetate was detected during the growth on glycerol and in the glucose-glycerol mixture in the fermentors, while acetic acid was produced in other mixtures, especially in those where the strains grew faster. This last result indicates that while PB12(pCLtktA pRW300aroG^{ibr}) was coutilizing glycerol and glucose, it could also be utilizing previously produced acetate. Alternatively, the cells might not be producing large amounts of acetate in these conditions. This last alternative is in agreement with the low μ of this strain under the growth conditions in the fermentor. In accordance with this last proposition are the smaller q_s values obtained for

Table 4: Kinetic and stoichiometric parameters determined for strain PB12 PTS-Glc⁺ (pRW300aroG^{ibr} pCLtktA) grown in the fermentor.

Carbon Sources	μ hr ⁻¹	$Y_{X/S}$ g/mmolC	q_s mmolC/g _{DCW} hr	q_{DAHP} mmolC _{DAHP} /g _{DCW} hr	q_{DHS} mmolC _{DHS} /g _{DCW} hr	q_{SHIK} mmolC _{SHIK} /g _{DCW} hr	acet _{max} g/L	Y_{arom} mmolC/mmolC
Glucose	0.32	0.0093	34.33	1.3575	0.1464	0.1435	0.06	0.07
Arabinose	0.42	0.0066	64.61	3.5085	0.2359	0.0523	0.35	0.12
Glycerol	0.09	0.0081	11.15	0.6600	0.8000	0.2000	0.00	0.25
Glucose-Arabinose	0.42	0.0061	68.85	7.7967	0.3619	0.1367	0.30	0.13
Glucose-Glycerol	0.13	0.0076	17.11	9.0498	1.9112	0.9124	0.00	0.36

DAHP, DHS and SHIK productivities and other important kinetic and stoichiometric parameters determined in the fermentor using strain PB12 PTS-Glc⁺(pRW300aroG^{ibr} pCLtktA). The expression of the *aroG^{ibr}* gene was induced with IPTG.

PB12(pCL*tktA* pRW300*aroG^{fb}*) strain on all the different carbon sources as compared to those obtained for strain JM101. In strain PB12(pCL*tktA* pRW300*aroG^{fb}*) such condition could diminish metabolic overflow which is responsible for acetate production. These results are interesting and indicate that the capacity of cointilizing certain carbohydrate mixtures is an important characteristic that allows this strain important carbon flux rearrangements. Namely in the case of the glucose-glycerol mixture, it diminishes its specific growth rate, increasing time of production, but enhancing the yields and productivities of aromatic compounds and reducing acetate production. These results indicate that strains that grow slower than the parental wild type could be better production strains because part of the carbon flux is utilized not for biomass and acetate production but for the synthesis of the desired metabolite. Further experiments, especially those conducted in enriched minimal media, usually utilized for the optimization of production processes [14-16,25], are required to demonstrate the real potential of this capacity under such growing conditions. Nevertheless, *E. coli* capability of cointilizing glucose with certain carbon sources in the absence of PTS is an important property that should be studied because it could have useful industrial possibilities.

Certainly, the use of *E. coli* strains lacking the PTS system, with additional mutations and in which several other genes coding for enzymes involved in the aromatic pathway are overexpressed, have been already described for the production of aromatic molecules like shikimate, a precursor of Tamiflu, an antiviral drug that could be used in a possible influenza pandemic. Optimized processes have been reported that allow the production of around 70 g/l of shikimate with a yield of 0.26 g shikimate/g glucose and a total aromatic yield of 0.328 g/g glucose in feed-batch fermentations using enriched minimal medium [26]. Our group has already reported the utilization of strain PB12 derivatives to overproduce phenylalanine, using enriched minimal medium at the level of 1 lt. fermentors. In these conditions, the yield of L-phenyl-

alanine from glucose increased 65% as compared to the isogenic PTS⁺ strain [13,14]. Preliminary results using derivatives of strain PB12 in which the overexpression of certain genes coding for enzymes involved in the shikimate pathway was achieved in enriched minimal medium at the level of 1 lt. fermentors, produce 7 g/l of shikimate with a yield of 0.282 g shikimate/g glucose and a total aromatic yield of 0.39 g/g glucose (unpublished results). Additional mutations that we are incorporating in PB12 production derivative strains (like *pykA* and or *pykF* to modulate the glycolytic flux, and a mutation isolated in another PB12 derivative that allows very fast growth rates in acetate [$\mu = 0.9 \text{ hr}^{-1}$]) could increase the production capabilities of PB12 and other PTS⁻ derivative strains. Finally, an additional consideration about the importance of characterizing these PTS⁻ strains is that in the scenario of a world influenza pandemic, it is important to develop national and regional capabilities to produce antiviral drugs like Tamiflu or Relenza and the next generations of antiviral aromatic molecules, using biotechnological strategies with optimized engineered strains.

Methods

Bacterial strains and plasmids

E. coli strains and plasmids used in this study are presented in table 5.

Genetic procedures and recombinant DNA techniques

PCR reactions were performed using Platinum Taq polymerase according to the manufacturer recommendations (Invitrogen, Ca., USA). The DNA sequences of the oligonucleotides (DAB1 and DAB2) for the interruption of the *aroB* gene are presented in table 6. This table also includes the sequences of the oligonucleotides (SAB1 and SAB2) utilized for demonstrating the interruption of the *aroB* gene in strains JM101 and PB12. Mutagenesis of the *aroB* gene in strains JM101 and PB12 was obtained using the Datsenko and Warner methodology [27]. This method utilizes a λ phage derivative and low copy number plasmid pKD45. Details of the procedure have been described elsewhere [27].

Table 5: Escherichia coli strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant genotype	Reference
JM101	<i>supE, thi Δ(lac-proAB), F' traD36 proA⁺ proB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>	[31]
PB12	This strain was derived from PBI IPTS-Glc, a <i>ptsHlcr</i> deletion derivative of strain JM101. PB12 has the same genotype of PBI1 and at least three additional mutations (<i>arcB</i> , <i>rpoS</i> and a mutation responsible for the upregulation of genes involved in the ppGpp metabolism) that appeared during the selection of this fast growing mutant on glucose.	[7,9,21]
PB12 <i>aroB</i> ⁻ pRW300	PB12 <i>aroB::cat</i> <i>aroG^{fb}</i> is under the control of the IPTG inducible promoter <i>lacUV5</i> ; carrying tetracycline resistance. Replication origin of pBR322.	This work [16] [10]
pCL <i>tktA</i>	<i>tktA</i> is under its constitutive promoter carrying spectinomycin resistance. Replication origin of pACYC184.	[16]

Table 6: DNA sequences of the oligonucleotides utilized in this work.

Name	Nucleotide sequence
DAB1 (Forward)	5'-GAT GAT CAA AGC GCT AAA GTG GTT GCA AAC CAG ATT ATT CAC TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G-3'
DAB2 (Reverse)	5'-GTC TTC TGG TTT GAA TTC ATC CAT TTA ACA CCC CAC TAA AAG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG-3'
SAB1 (Forward)	5'-GAT CTG CGG TTC GCC ACG TT-3'
SAB2 (Reverse)	5'-CAC CGC CGC GTG AAG TTC TGG-3'

Growth conditions

• Batch cultures

M9 medium, consisting of (per liter): Na₂HPO₄, 6 g; KH₂PO₄, 3 g; NaCl, 0.5 g; NH₄Cl, 1 g; MgSO₄, 2 mM; CaCl₂, 0.1 mM; Vit B1, 0.01 g, and glucose, 2 g, was utilized for growing fermentor inocula. A higher concentration of glucose or other carbohydrates (4 g/L, around 130.00 mmolC/L, depending of the molecular weight of the carbon source), was utilized in the fermentor (1 L, working volume: 0.75 L) studies when only one carbon source was employed. When two carbon sources were used, the same amount of each (2 g/L, approximately 65 mmolC/L) was employed. IPTG (0.1 mM) was added at the beginning of the fermentation. Tetracycline (30 µg/ml) and spectinomycin (100 µg/ml) were included in the medium for plasmid maintenance.

• Resting cells

ARO medium (per liter: K₂HPO₄, 14 g; KH₂PO₄, 16 g; NH₄SO₄, 5 g, and MgSO₄, 1 g) with glucose (7 g/L) and 10 g/L yeast extract were utilized for growing the inocula in resting cell experiments. Inocula were washed twice with ARO medium and resuspended in 50 ml of the same medium in 250 ml shake flasks, lacking yeast extract and supplemented with aromatic aminoacids, vitamins, L-tyrosine (8 mg/L), L-tryptophan (4 mg/L), L-phenylalanine (8 mg/L), p-aminobenzoic acid (62 mg/L), dihydroxybenzoic acid (35 mg/L), and p-hydroxybenzoic acid (2 mg/L). Glucose or other carbohydrates were added at a final concentration of 7 g/L (around 228 mmolC). When a mixture of two carbohydrates was employed, equal amounts of both (3.5 g/L; approximately 114 mmolC) were utilized. For resting cell experiments, IPTG (0.1 mM) was added after one hour of fermentation. In these conditions *E. coli* cells do not grow but are still metabolically active and can canalize carbon skeletons into the production of aromatic compounds [12,28]. For plasmid maintenance, (30 µg/ml) and spectinomycin (100 µg/ml) were utilized.

Kinetic and stoichiometric parameters

• Batch cultures

Data represent the average of at least three different cultures. Cell growth was measured by monitoring the optical density 600 nm (OD₆₀₀) in a spectrophotometer

(Beckman DU700). OD₆₀₀ was converted into dry cellular weight (biomass concentration) using a standard curve (1 OD₆₀₀ = 0.37 g/L of dry cellular weight). Specific growth rates (μ) were determined by fitting the biomass data versus time to exponential regressions. The biomass yield ($Y_{X/S}$) was estimated as the coefficient of linear regression of biomass concentration versus substrate concentration (glucose, arabinose, glycerol, gluconate, or glucose plus other carbon source) in grams of biomass/mmolC of substrate(s). The specific carbon consumption rate (q_s) was determined as the ratio of μ to $Y_{X/S}$. Cells were grown in the fermentor on glucose alone or glucose and either arabinose, glycerol, or gluconate as carbon sources.

• Resting cells

Specific glucose consumption and product formation rates were determined for each strain by linear regression of four data points over the 12-hr time span of an experiment. Constant DAHP production and carbohydrate consumption rates were found for all strains indicating that carbon catabolism was in a physiological quasi-steady-state [12,28,29]. For *aroG^{br}* overexpression, cells were grown in the presence of 0.1 mM IPTG.

Analytical methods

Metabolite concentrations were determined with an HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refraction index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, MA). For determination of D-glucose, L-arabinose, D-glycerol, 3-dehydroshikimate (DHS), shikimate (SHIK) and acetic acid, an Aminex HPX-87H column (300 7.8 mm; 9 Åm) (Bio-Rad, Hercules, CA) was used. Running conditions were: mobile phase, 5 mM H₂SO₄; flow, 0.5 mL/min, and temperature, 50°C. Under these conditions glucose and acetic acid were detected by refraction index. D-gluconic acid was determined by enzymatic assay (Boehringer-Mannheim, Darmstadt, Germany). DAHP concentrations were determined using the thiobarbituric assay [30].

Conclusion

PTS⁻ strains are capable of cointilizing different mixtures of carbon sources due to the lack of glucose catabolite repression. The PTS⁻ strain PB12, carrying multicopy plasmids with *tktA* and *aroG^{br}* genes, was capable of cointilizing glu-

cose and glycerol. This capacity diminished its specific growth rate but increased six-fold the production of DAHP, and the production of acetate was not detected. These results suggest that at least in this PTS⁻ strains in these growing conditions, slower growth rates allow better carbon utilization strategies for production purposes, diminishing metabolic overflow.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KM and FB designed experiments, analyzed the results and wrote the manuscript. KM carried out the experiments while GH and RA helped with analytical and fermentation experiments. AE, GG and OTR critically revised the results and the manuscript. All the authors have read and approved the publication of the manuscript.

Acknowledgements

We thank M. Enzaldo, R. Martínez, B. Urióstegui, and J. Salazar for their technical assistance. We are also grateful to Paul Gaytán, Jorge Yáñez and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides and M. Sánchez-Alvarez for proof-reading the manuscript. This work was supported by grants 43243-Z and 44126 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and grant PAPIIT IN220403-2 from UNAM, México.

References

- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: **Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Volume 2*. 2nd edition. Edited by: Neidhardt C. ASM Press, Washington, USA; 1996:1149-1174.
- Saier MH, Ramseier TM: **The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.** *J Bacteriol* 1996, **178**:3411-3417.
- Saier MH: **Vectorial metabolism and the evolution of the transport system.** *J Bacteriol* 2002, **182**:5029-5035.
- Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas A, Saier MH: **Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2004, **186**:3156-3524.
- Gutiérrez-Ríos RM, Freyre-González JA, Resendis O, Collado-Vides J, Gosset G: **Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in Escherichia coli.** *BMC Microbiol* 2007, **7**:53.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F: **Analysis of carbon metabolism in Escherichia coli strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy.** *Metab Eng* 2002, **4**:124-137.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Metab Eng* 2005, **7**:70-87.
- Flores S, Flores N, De Anda R, González A, Escalante A, Gosset G, Bolívar F: **Nutrient scavenging stress response in an Escherichia coli strain lacking the phosphoenol pyruvate: carbohydrate phosphotransferase system as explored by gene expression profile.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2005, **10**(1):51-63.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: **Pathway engineering for the production of aromatic compounds in Escherichia coli.** *Nat Biotechnol* 1996, **14**:620-623.
- Gosset G, Yong-Xiao J, Draths KM: **A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in Escherichia coli.** *J Ind Microbiol* 1996, **17**(1):47-52.
- Berry A: **Improving production of aromatic compounds by metabolic engineering.** *Trends Biotechnol* 1996, **14**:250-256.
- Báez JL, Bolívar F, Gosset G: **Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in Escherichia coli devoid of the glucose phosphotransferase transport system.** *Biotechnol Bioeng* 2001, **73**:530-535.
- Báez-Viveros JL, Osuna J, Hernández-Chávez G, Soberón X, Bolívar F, Gosset G: **Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in Escherichia coli.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **87**:516-524.
- Báez-Viveros JL, Flores N, Juárez K, Castillo-España P, Bolívar F, Gosset G: **Metabolic transcription analysis of engineered Escherichia coli strains that overproduce L-phenylalanine.** *Microb Cell Fact* 2007, **6**:28.
- Frost JW: **Enhanced production of common aromatic pathway compounds.** *US Patent 5168056* 1992.
- Frost JW, Draths KM: **Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds.** *Annu Rev Microbiol* 1995, **49**:557-579.
- Death A, Ferenci T: **Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of Escherichia coli to growth with limiting carbohydrates.** *J Bacteriol* 1994, **176**:5101-5107.
- Ferenci T: **Hungry bacteria. Definition and properties of a nutritional state.** *Environ Microbiol* 2001, **3**:605-609.
- Hengge AR: **Regulatory gene expression during entry into stationary phase.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Volume 2*. 2nd edition. Edited by: Neidhardt C. ASM Press, Washington, USA; 1996:1497-1512.
- Weber H, Polen T, Heuveling VF, Hengge AR: **Genome wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli sigma S dependent genes, promoters and sigma factor selectivity.** *J Bacteriol* 2005, **187**:1591-1603.
- Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: **New insights on the role of the sigma factor RpoS as revealed in Escherichia coli strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *J Mol Microbiol Biotech* 2007 in press.
- Lengeler JW, Drows G, Schlegel H: **The RelA/SpoT modulon controls anabolic pathways and macromolecule biosynthesis.** In *Biology of prokaryotes* Edited by: Lengeler JW, Drows Gerhart, Schlegel HG. Blackwell Publishing, NuevaYork, USA; 1999:505-509.
- Frankel DG: **Glycolysis.** In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology Volume 2*. 2nd edition. Edited by: Neidhardt C. ASM Press, Washington, USA; 1996:189-196.
- Sprenger GA: **Aromatic amino acids.** In *Aromatic amino acid biosynthesis - pathways, regulation and metabolic engineering* Edited by: Wendiisch VF. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; 2006:93-127.
- Jian Yi KM, Draths KL, Frost JW: **Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in Escherichia coli.** *Biotech Prog* 2003, **19**:1450-1459.
- Chandran SS, Yi J, Draths KM, von Daeniken R, Weber W, Frost JW: **Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid.** *Biotech Prog* 2003, **19**:808-814.
- Datsenko KA, Wanner BL: **One step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci, USA* 2000, **97**:6640-6645.
- Liao JC, Chao YP, Patnaik R: **Alteration of the biochemical valves in central metabolism of Escherichia coli.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **745**:21-34.
- Emmerling M, Bailey JE, Sauer U: **Glucose catabolism of Escherichia coli strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzyme.** *Metabolic Eng* 1999, **1**:117-127.
- Srinivasan PR, Sprinson DB: **2-Keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase.** *J Biol Chem* 1959, **234**(4):716-22.
- Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S: **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.** *Gene* 1977, **2**(2):95-113.

Transcripción relativa de genes del metabolismo central cuando la cepa PB12 cuando cutiliza glucosa-glicerol comparada con PB12PTS⁻Glc⁺ crecida en glucosa y glicerol como únicas fuentes de carbono .

Cuando la cepa PB12 crece en la mezcla de glucosa-glicerol, en primera instancia aumenta su μ comparado con su crecimiento solo en glucosa de 0.40 hr^{-1} a 0.50 hr^{-1} ; la q_s total, es decir de la utilización de las dos fuentes de carbono es igual $38.23 \text{ mmolC/gr}^* \text{ hr}$, donde las q_s parciales de glucosa y glicerol son 28.29 y 9.94 respectivamente. Se esperaba que mediante el perfil de trascrición de genes se pudiera conocer cuales eran los genes que respondían ante las señales intracelulares del metabolismo de dos fuentes de carbono. Se agruparon los perfiles de trascrición de la cepa PB12PTS⁻Glc⁺ creciendo en la mezcla glucosa-glicerol en 4 grupos:

- a) Un grupo de genes cuya expresión relativa no cambie en ninguna condición, (e.j glucosa y glicerol (como únicas fuentes de carbono) y en la mezcla glucosa-glicerol.
- b) Un grupo de genes cuya expresión relativa sea a igual PB12 crecida en glucosa pero diferente a PB12 crecida en glicerol.
- c) Un grupo de genes cuya expresión relativa sea igual a PB12 crecida en glicerol pero diferente a glucosa.
- d) Un grupo de genes cuya expresión relativa sea propia de la mezcla glucosa-glicerol (es decir no sea de ninguna de las categorías anteriores).

De los 110 genes analizados, 73 están en la categoría a, 16 están en la categoría b, 11 están en la categoría c y 10 en la categoría d.

b) *aceK, aroL, cyaA, frdA, frdB, frdC, fumC, gapA, glk, glpF, glpK, gnd, iclR, poxB, spoT, talA*. (Figura A1).

c) *aceA, aroE, creB, creC, edd, fadR, frdD, fumB, mgIC, ppsA*. (Figura A2).

d) *acs, fruR, galR, galS, galT, gapC-1, gapC-2, glcB, gltA, ldhA, tktB*. (Figura A3).

Lo que resalta con estos datos es los genes que se transcriben diferencialmente son los que tienen relación la regulación de la lanzadera de glioxilato (*aceK, iclR, fadR y fruR*), la respiración anaerobia (*frdA, frdD*), y algunos genes gluconeogénicos (*aceA, ppsA*) (Figuras A1, A2 y A3).

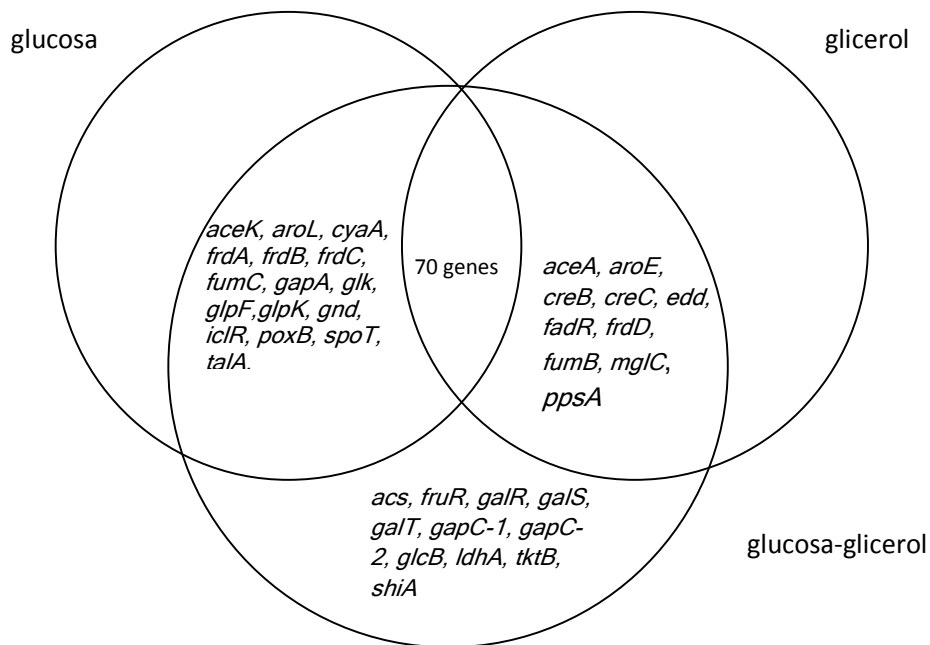


Figura 1. Agrupación de expresión de genes de la cepa PB12 en glucosa-glicerol de acuerdo a su comparación con las condiciones en una sola fuente de carbono.

El gen *fadR* está sobrepresado en la condición glicerol y glucosa-glicerol respecto a glucosa (Figura A2). FadR es un regulador negativo del metabolismo de ácidos grasos y metabolismo de acetato mientras que regula positivamente la biosíntesis de ácidos grasos insaturados. Por otra parte el gene *iclR* (IclR) que codifica para un regulador negativo del operón *aceBAK* no cambia su nivel de expresión en PB12 glucosa y PB12 glucosa-glicerol, sin embargo, está altamente sobrepresado en PB12 creciendo en glicerol (Figura A2). El gene *iclR* se autoregula negativamente y además FadR es su regulador positivo. La sobrepresión del gene *iclR* no es congruente con la sobrepresión de *fadR* solamente en la condición glucosa-glicerol. Los reguladores del operón *aceBAK* son IclR(-), Crp(-), Cra(+), ArcA(-), IHF(+). En PB12 creciendo en glucosa-glicerol los genes *aceA* y *aceK* están ligeramente sobrepresado respecto a glucosa (Figura A1 y A2). Se sabe que el mayor efecto represor sobre este operón es de Crp y esta podría ser la razón por la cual estos genes estén sobrepresados aún cuando su represor este altamente

sobreexpresado. De manera interesante el gene *galS* está subexpresado en la condición glucosa-glicerol (Figura A3). El gen *galS* es regulado positivamente por CRP-AMPc y negativamente por GalR. Cabe recordar que el gen *galR* está ausente en la cepa PB12 por lo tanto el efecto represor no está presente sobre GalS, por tanto su subexpresión podría deberse a los bajos niveles de Crp-AMPc. *acs* es otro gene que depende de CRP y que está subexpresado en la condición glucosa-glicerol respecto a glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono (Figura A3). Por otra parte es importante hacer notar que la expresión del gene que codifica para el regulador de respuesta CreC (*creC*) del sistema de dos componentes CreBC es máxima cuando crece en la mezcla glucosa-glicerol (Figura A2). Se sabe que el regulador CreC se encuentra en grandes concentraciones durante condiciones fermentativas y/o durante el crecimiento en sustratos gluconeogénicos como glicerol, piruvato. También se conoce que CreBC y ArcAB controlan el flujo a nivel de PEP-Pir-AccoA y que la conversión de PEP a Pyr es menor en mutantes de CreB.

Por tanto los datos transcriptómicos sugieren que durante la coutilización de glucosa-glicerol se el uso de la lanzadera de glioxilato y probablemente la reducción del flujo PEP-Pyr-AcCoA, favoreciendo el de PEP hacia TCA por medio de la enzima Ppc (Figura E).

New insights into the *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol

Karla Martínez-Gómez^{1*}, Héctor M. Castañeda¹, Noemí Flores¹, Gabriel Martínez-Batallar³, Octavio T. Ramírez², Guillermo Gosset¹, Sergio Encarnación³ and Francisco G. Bolívar[§]

¹ Departamentos de Ingeniería Celular y Biocatálisis y ² Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos, CP 62250, México.

³ Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, CP 62210, México.

[§]Corresponding author

Email addresses:

KMG: karlamg@ibt.unam.mx

HMC: emeth29@gmail.com

NF: noemi@ibt.unam.mx

GMB: angelmb@ccg.unam.mx

OTR: tonatiuh@ibt.unam.mx

GG: gosset@ibt.unam.mx

SE: encarnac@ccg.unam.mx

FB: bolivar@ibt.unam.mx

Abstract

Background

A study of the *Escherichia coli* physiology during the growth on glycerol was performed combining transcriptomic-proteomic analysis and kinetical and stoichiometric evaluations of some derivative strains carrying inactivated genes of the phosphoenolpyruvate (PEP) – pyruvate (PYR) node, *rpoS* and *tnaA*. New stress and carbon scavenging features detected in the *Escherichia coli* strain JM101 grown on glycerol are presented.

Results

Metabolic central genes transcriptomic and proteomic analysis of the strain JM101 growing in bioreactors using glycerol as the only carbon source revealed important changes in the expression of the *lamB*, *malE*, *mglB*, *mglC*, *galP* and *glk* genes and synthesis of the MglB, LamB, MalE proteins corresponding to the *mal/lam*, *mgl/gal* systems and RpoS regulons (*poxB*, *fbaA*, *fbaB*, *pfkA*, *pfkB*, *pgi*). Overexpression of the *poxB*, *pta*, *acs*, genes of the glyoxylate shunt (*aceBA*, *glcBC*) and the acetate transporter (*actP*), correlated with the apparent capability of acetate and glycerol coutilization in this strain in mineral media cultures. No acetate production was detected in JM101 strain cultures growing on glycerol. The expression of some glycolytic genes of the strain JM101 grown on glycerol was not significantly modified as compared to the growth on glucose. However, the expression of some other genes was underexpressed including the *aceE*, *aceF* and *lpdA* genes that code for Pyruvate dehydrogenase complex (Pdh), in agreement with a possible carbon flux deviation into the PoxB, Acs and glyoxylate shunt. Several gluconeogenic and the *glk* genes were overexpressed. The transcription of level of the *icd* gene from the tricarboxylic acid cycle (TCA) was also underexpressed in agreement with a carbon recycling response through the glyoxylate shunt. The complete inactivation of the *rpoS* gene – by a cassette insertion - had an important effect on the stoichiometric parameters and in the adaptation growth on glycerol of this strain. The derivative carrying the inactivated *poxB* gene accumulated acetate in early phases of the fermentation, in agreement with a carbon recycling role of PoxB in these growing conditions. Strains with inactivated *pykA* or *pykF* gene single mutants have the same specific growth rates (μ), even when the total pyruvate kinase (PYK) specific activity in the strain carrying the *pykA* inactivation is lower as compared to the strain with the inactivated *pykF* gene and the parental strain JM101. The derivative carrying the inactivated *ppc* gene is incapable of growing on glycerol or glucose as the only carbon source. The μ of the JM101

strain grown on glycerol was enhanced when malate (MAL) or succinate (SUC) were added to the culture. The overexpression of the *fumB* gene and the *frdABCD* operon in aerobic conditions was not expected but is possibly related with an apparent low production of C4 compounds, as suggested by the increase of the μ of the JM101 strain when certain C4 compounds were included in the medium. These results are in agreement with the decrease in a complete TCA cycle utilization and simultaneous carbon recycling through the glyoxylate shunt. The tryptophanase A (TnaA) was highly produced and micromolar quantities of indole produced by this enzyme during the culture were detected in the strain JM101 growing on glycerol. Additionally, the isogenic derivative strain carrying the inactivated *tnaA* gene reached lower biomass as compared to the wild type. In this strain no indole was detected and acetic and lactic acids were produced.

Conclusions

The overexpression of genes and overproduction of proteins of the *mal/lam*, *mgl/gal* regulons and certain genes regulated by RpoS, indicate that the JM101 strain grown on glycerol induced a stress carbon response. Overexpression of the genes and overproduction of their coded proteins, involved in glycerol uptake and metabolism are responsible of transport and incorporation of this carbon source. Overexpression of several genes including glycolytic and gluconeogenic genes in the upper part of the glycolytic pathway is responsible of the production of glucose 6-phosphate (G6P). The overexpression of the *poxB*, *acs*, *pta*, *acnB* and the glyoxylate shunt genes indicates that the strain is producing acetate from PYR utilizing PoxB and simultaneously consuming this metabolite when growing on glycerol as the only carbon source. It has been proposed that *E. coli* cells growing slowly on glucose apparently reduce their carbon flux through the Pdh system which yields directly acetyl-coenzyme A (AcCoA) from PYR and increase their carbon flux through PoxB enzyme that produces acetate and reducing power at the membrane from PYR. Acetate as part of the gluconeogenic metabolism is consumed by Acs and transformed into AcCoA in a “carbon preserving” regulatory mechanism. Consistent with this metabolic capacity, in the JM101 strain cultures grown on glycerol, no acetate was detected, probably because this strain recycles acetate through the PoxB-Acs-glyoxylate shunt. In agreement with this proposal, the genes coding for Pdh (*aceE*, *aceF* and *lpdA*) are slightly underexpressed in this strain growing on glycerol. In accordance the JM101 derivative mutants with inactive *poxB* or *pckA* genes accumulate acetate and their μ are affected. The induction of these genes apparently permitted a more efficient utilization and recycling of carbon. In agreement, the underexpression of the *icd* and *lpdA* genes that code for IcdA and SucA, allows the proposition that part of the carbon flux is reduced through the lower part of the TCA

cycle, allowing carbon recycling through the glyoxylate shunt since the *aceBA* and *glcB* genes are overexpressed. As a result, less carbon is lost as CO₂ in the lower part of the TCA cycle (Figure 1) and carbon is recycled through the glyoxylate shunt and gluconeogenic genes. Therefore this metabolic response is apparently responsible of a reduced TCA cycle. In agreement with this proposition, during the growth of the strain JM101 on glycerol it appears that relatively low “4 carbon (C4) metabolites” production through TCA cycle occurs since the μ of this strain is enhanced in cultures grown on glycerol when SUC or MAL are added to the cultures. The indole detection in the JM101 strain grown on glycerol indicates an important carbon flux through the aromatic pathway. Indole a product of tryptophane degradation is a signal molecule that activates Crl for modulating expression of certain RpoS-Crl regulons; however, a signaling role of this metabolite is no clear at this moment and it is not part of the objectives of this work. Nevertheless, it appears that when glycerol is used as a unique carbon source, a carbon stress recycling, preserving mechanism occurs. In addition RpoS regulons could be activated by indole, allowing a more adequate response to growth on carbon limited conditions.

Background

Escherichia coli cells are capable of utilize several compounds as carbon sources and its metabolism responds accordingly to the availability of those in order to metabolize them efficiently on different environments. Glucose is the preferred carbon source and its rapid utilization depends on the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS). PTS not only transports specific sugars but in their absence stimulates, through adenilate cyclase (Cya), the production of *c*AMP that activates the transcription of many *c*AMP-CRP dependant catabolic genes including those involved in glycerol utilization [1]. Glycerol, a relatively poor carbon source, has enhanced its biotechnology importance as carbon source since is a by-product of the renewable biodiesel synthesis, which production is expected to increase in the following years [2,3]. A balanced aerobic growth on glycerol depends on *c*AMP-Crp as the principal inducer of the glycerol catabolic operons (*glpF*, *glpK* and *glpD*); Cra (FruR) as a global regulator of some gluconeogenic genes and ArcA as regulator of several central metabolic genes including TCA cycle and others involved in respiration. *E. coli* cells grown aerobically on glycerol incorporate this molecule into the central metabolism as dihydroxyacetone phosphate (DHAP), a metabolite that can be utilized in both gluconeogenic and glycolytic processes (Figure 1) [4]. Studies of *E. coli* cells growing on glycerol have reported some features about the expression of metabolic genes, in particular the overexpression of the *pykA*, *pckA*, *gltA*, *fumABC*, *sdh*, *mdh*, *acnA* genes and the downregulation of the *ackA* gene [5]. Proteomic and enzymatic assays

studies in which the cells were grown on a complete medium (Luria broth) plus glycerol report the overexpression of the *fbp* gene and the overexpression at lower levels of *aceB* and *aceA* genes [6]. However, studies of the carbon stress response of *E. coli* growing on a poor carbon source as glycerol, being glucose a richer carbon source and acetate the poorest carbon source, are scarce. *E. coli* cells confront carbon stress when growing on carbon source limitation similar to that encountered during growth in stationary phase or glucose limited conditions. For instance carbon stress responses have been studied in strains growing in induced glucose-carbon limitation using chemostats [7] fed batch cultures [8] or with limited glucose transport [9,10]. In order to respond to carbon stress, *E. coli* utilizes mechanisms that are part of the general stress response which involves changes in cellular physiology of stressed cells. This response can be a fast emergency response or a long term program of adaptation to starvation [11]. The master regulator of the general stress response is the sigma factor RpoS, whose regulation is complex and involves transcriptional and posttranscriptional control mechanisms; for example the transcription of the *rpoS* gene is stimulated by controlled downshifts in the μ in a chemostat [7,12,13] as well as by continuous reduction in the μ which resulted in an inversely correlated increase in the transcription of the *rpoS* gene (5- to 10- fold). In contrast, abrupt growth cessation, as for example, in response to sudden glucose starvation, transcription of the *rpoS* gene is apparently induced weakly [14,15]. In strains lacking PTS that grown slowly on glucose as the only carbon source, the cells apparently sense low levels of carbon and induce the transcription of the *rpoS* gene and several others involved in carbon utilization and also a carbon recycling response [9,10,16,17]. Since the expression of this gene is induced by different stresses, genes whose transcription is regulated by this sigma factor can be modulated by various coregulators present or not in different stress conditions as Crl. Crl responds to indole as a signal molecule increasing gene transcription of some genes by binding to RpoS that in turn stimulates holoenzyme formation [18]. Carbon stress responses also involve conditions of amino acid starvation in which ppGpp concentration increases rapidly into the millimolar range. Some results indicate that in UDPglucose-free strains, the expression of the *rpoS* gene is stimulated at the posttranscriptional level [19]. When cells are growing under stress conditions, including growing slowly on glucose, central metabolic genes respond by altering the expression of genes that redirect metabolism [9-11,16,17]. In this report we present some features detected in the *E. coli* strain JM101 [20] grown in minimal medium on glycerol as the only carbon source. Gene transcription levels and protein production patterns that corresponded to a carbon stress response were detected. Overexpression of genes involved in the production and consumption of acetate that correlated with no detection of

acetate in cultures of strain JM101 grown on glycerol and the capability of acetate plus glycerol cointilization in mineral media cultures was detected in agreement with a carbon recycling response. Additionally, kinetic and stoichiometric parameters of some derivative strains carrying some important inactivated genes of the PEP-PYR node were evaluated in order to clear their role in glycerol metabolism.

Results and Discussions

1. Growth of strain JM01 on different carbon sources.

Strain JM101 was grown on different carbon sources to compare its metabolic capacities. As shown in figure 2A and table 1, when this strain was grown on glucose the highest μ was obtained (0.69 hr^{-1}) but acetate was produced. When glycerol was used as the only carbon source its μ decreased to 0.49 hr^{-1} ; as expected the genes involved in glycerol catabolism were overexpressed (Table 2) and the proteins coded by these genes were overproduced (Table 3) (see below). No acetate was detected in this fermentation (Table 1, Figure 2B). Low levels of acetate have been detected in other *Escherichia coli* strains grown on glycerol. It has been proposed for these other strains that the low acetate levels as compared to glucose are the result of *ackA* and *pta* downregulation, since these genes are involved in acetate production [5,6] (Figure 1). Our transcriptome data (Table 2) and the single complete inactivation of the *poxB* and *pckA* genes in isogenic mutants grown on glycerol (Table 4) (see below) suggest that in the JM101 strain the production and consumption of acetate apparently occurred simultaneously in cells growing on glycerol as the only carbon source (Figures 2A and 2B, Table 1) as already has been reported in strains growing slowly on glucose. In these strains and conditions, the gluconeogenic metabolism is induced and utilized simultaneously with the glycolytic pathway [9,10,16,21]. When both glucose and glycerol were present as carbon sources in the medium, as expected a diauxic response was obtained. Glucose was utilized first and glycerol after glucose was completely utilized. In agreement, less acetate was produced when strain JM101 was grown on both carbon sources (Figure 2B, Table 1) suggesting that part of the acetate produced when growing on glucose as the only carbon source was utilized when both glucose and glycerol were present in the medium. When the JM101 strain was grown with both glucose and acetate as carbon sources, the cell utilized glucose and accumulated acetate (Figure 3A). In contrast when glycerol and acetate were used, the JM101 strain cointilized the two carbon sources (Figure 3B, Table 1).

2. Differential transcription of genes and proteins production in the JM101 strain grown on glycerol.

2a Glycerol uptake

Glycerol is converted to DHAP by a process of uptake (GlpF), phosphorylation (GlpK) and dehydrogenation (GlpD). As expected the *glpF* and *glpK* genes involved in glycerol uptake and phosphorylation were overexpressed in the JM101 strain grown on glycerol (Table 2). In agreement the protein products of these genes, GlpK(16.18X) and GlpD(5.18X) that are involved in the transformation of glycerol into glycerol-3-phosphate (Gly3P) and this metabolite into DHAP respectively, were overproduced in this strain (Table 3). However, surprisingly the expression of the *glpD* gene was apparently not substantially modified (Table 2). The transcription of the *glpF* and *glpK* genes are regulated by CRP and GlpR while the expression of *glpD* is regulated by CRP, GlpR and ArcA [1,22].

2b Glucose and other carbohydrates scavengers

The JM101 strain grown on glycerol overexpressed, as compared to the expression values grown on glucose, several genes of the *mal/lam* and *mgl/gal* regulons: *lamB*, *malE*, *mglB*, *mglC*, *galP*, *glk*, *pgm* (Table 2). As shown in table 3, the products of some of these genes MglB (81.02X), LamB (6.94X) and MalE (7.06X) were produced at higher concentrations in the strain grown on glycerol. The *mal/lam* system in *Escherichia coli* contains genes involved in transport and catabolism of maltose or maltodextrins [23-25] and the *gal/mgl* system contains genes involved in the transport (*galP* and *mglBAC*) and amphibolic utilization (*galETKM*) of D-galactose [25-27]. In *E. coli* the induction of both regulons has been reported as a response to growth in low glucose-carbon conditions as those encounter in chemostats at low dilution rates or in starving cells [7,25-27]. Also, strains with limited glucose transport capacity growing slowly on this carbohydrate, as those lacking PTS, overexpressed the *mal/lam* and *mgl/gal* regulons [10,16]. In these scenarios, increased expression levels of those regulons have been reported since high levels of cAMP-CRP are detected and the synthesis of maltotriose (*mal/lam*) and D-galactose (*mgl/gal*) as autoinductors are produced [7,25,28]. In the strain JM101 grown on glycerol as the only carbon source, high levels of cAMP and glycogen synthesis and degradation to maltodextrins-glucose and D-galactose are expected. Noteworthy in this strain the *galT*, *galR*, *galS* genes were apparently slightly underexpressed while the *galP* gene was overexpressed (Table 2). Furthermore, the *gal* regulon genes are differentially regulated by cAMP-CRP and D-galactose. For instance, the *galR* gene expression which was present at lower levels in the JM101 strain grown on glycerol, is D-galactose dependent while the transcription of the *galS* gene is cAMP and D-galactose dependant. *mglABCD* expression can be activated by cAMP-CRP in absence of D-galactose and the expression of the *galP* gene is strongly repressed in the absence of D-galactose. The production of D-galactose as autoinductor is not clear in the JM101 grown on glycerol

since the expression of the *galP* gene was upregulated while the expression of the *galR* gene was underexpressed (Table 2). However, this behavior could be explained by the “timing of expression phenomena” described by Horváth., *et al.* [29]. They reported that the higher expression of the *galP* gene coincided with the expression lower levels of the *galS* and *galR* genes in cultures growing on galactose. Also, strains with inactivated *galR*, *galS* or *nagC* genes allowed the overexpression of the *galP* gene [30]; however none of these mutations are present in the strain JM101. The *galR* gene is underexpressed in cells growing in presence of indole-acetic acid [31]. Importantly, the inactivation of the *galP* gene did not modified the μ of the JM101*galP* strain grown on glycerol indicating that this protein apparently is not playing an important role in glycerol metabolism (Table 4). The *malE* gene and the *mglBAC* operon are also transcribed by RpoS. As previously mentioned, in *E. coli* the *rpoS* gene is induced when the cells are growing under stress conditions as carbon, phosphorus, nitrogen or amino acid starvation. Therefore RpoS apparently replaces at least partially the vegetative sigma factor RpoD when growing in glucose limited conditions [9,17,32]. It has been reported that the regulatory protein Crl increased RpoS activity by direct interaction with the RpoS holoenzyme [33]. In addition, the MalE protein is produced at low levels in *Escherichia coli* strains mutants in *crl* or *crl/rpoS* compared to the wild type strain [33]. Therefore it is possible that in the JM101 strain growing on glycerol, the RpoS-Crl could upregulate the expression of some gene members of these regulons. In strain JM101 grown on glycerol the porin OmpC, is produced at low levels as compared to glucose (Table 3). The *ompC* gene that was underexpressed (Table 2) has a complex regulation including protein regulators (OmpR, CpxR, Lrp, IHF, EnvY) and small regulatory RNA's (*micC*, *rseX*, *rybB*) which respond to different signals as osmolarity, pH, starvation, low availability of nutrients or envelope stress [34-38]. In the JM101 strain grown on glycerol the low expression of the *ompC* gene (Table 2) and low production of OmpC porin was coordinated to the high production of LamB, which appears to be the principal porin when JM101 is grown on this carbon source. Since the *lamB* gene expression levels are increased when nutrients are scarce, it has been proposed that this protein can transport a wide variety of sugars such as glucose, lactose, arabinose, and even glycerol [39]. During the growth of JM101 strain on glycerol it is possible that the sensing of low nutrients availability or low osmolarity compared to the growth on glucose could be the signals involved in the lower production of OmpC.

2C Central metabolism genes

Glycolysis

The *glk* gene that codes for glucokinase (Glk) was overexpressed in the strain JM101 grown on glycerol (Table 2). When glucose is transported from the periplasm to the cytoplasm by GalP or MlgABC, Glk phosphorylates this compound into G6P [4,9,10,40]. The *glk* gene carries a putative RpoS promoter [17] and is apparently repressed by Cra(FruR) [41]. Recently it has been demonstrated that Glk has structural similarity with Mlc (the repressor of MalT). Glk can apparently bind to the *ptsG* gene promoter, releasing Mlc and increasing the repression of *malT* gene [42]. Accordingly to this hypothesis, the expression of the *ptsG* gene should be underexpressed in the JM101 strain grown on glycerol as shown in table 2. Also, the overexpression of the *glk* gene during growth on glycerol could be explained by free glucose produced during the degradation of glycogen [23]. The *pgi* gene was also slightly overexpressed in the JM101 strain grown on glycerol (Table 2), this gene is also overexpressed in strains lacking PTS growing slowly on glucose as the only carbon source [10]. The Pgi protein is involved in the reversible transformation of G6P into fructose-6-phosphate (F6P) (Figure 1). In the upper part of the glycolytic pathway the *pfkA* and *pfkB* genes encoding for phosphofrukinase I and II respectively, were overexpressed (Table 2). PfkA and PfkB convert F6P to fructose-1,6P (F1,6P) expending one ATP molecule (Figure 1). These proteins perform an important control point of the glycolytic flux. For instance, the gluconeogenic transformation of F1,6P into F6P is performed by Fbp coded by the gene *fbp* (Figure 1). During the growth of *E. coli* strains on glycerol, the carbon flux through Fbp is expected in order to synthesize F6P. The gene *fbp* was apparently slightly overexpressed in JM101 strain growing on glycerol (Table 2). The *pfkA* gene is positively regulated by CsrA [41] and has a putative RpoS promoter [17,33]. Additionally, *E. coli* strains inactivated in the *crl* or *rpos* gene produced lower levels of PfkA as compared to the wild type strain suggesting that this gene is part of the RpoS regulon [33]. The expression of the gluconeogenic *pfkB* gene is repressed by CsrA [41] and has a promoter transcribed by RpoS [43,44]. PfkA and PfkB have different allosteric regulatory properties; PfkA is sigmoidal respect to F6P and it is activated by MgADP (or MgGDP) and it is inhibited by phosphoenolPyruvate (PEP). PfkB has a hyperbolic kinetics and it is allosterically inhibited by MgATP and F6P [41]. Also, PfkB can phosphorylate tagatose-6P into tagatose-1,6P during the catabolism of galactitol [4]. Interestingly, GatY a protein that is part of the galactitol degradation pathway, is produced at higher levels (55.83X) than those on glucose in the JM101 strain grown on glycerol (Table 3). GatY is a reversibly enzyme that catalyzes the synthesis of tagatose-1,6 phosphate from DHAP and GA3P and it is regulated by CRP, ArcA and GatR. GatY overproduction apparently occurred as a grow response on glucose-limited conditions such as those found in fed batch culture [45]. Additionally, GatY is one of the proteins induced in response to the

grown on acidic conditions [46]. However, it is known that Gly3P one of the products of glycerol catabolism, represses the expression of the *gatY* gene [47]. Therefore GatY overproduction in the JM101 strain was not expected. This result raises questions about the role of GatY in the metabolism of strain JM101 grown on glycerol. It is possible that GatY was overproduced as a response to growth on carbon limited conditions and in order to prepare *E. coli* cells for a transient increment in DAHP availability for induction of methylglyoxal pathway [45]. The transcripts of the gluconeogenic *fbaA* and *fbaB* genes whose proteins are involved in the reversible transformation of DHAP and glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) into F1,6P are overexpressed in the JM101 strain grown on glycerol (Table 2). This is an important gluconeogenic step for glycerol metabolism. DHAP can be transformed into G3P by TpiA (Figure 1). DAHP and G3P can be transformed into F1,6P through the FbaA and FbaB. Additionally, G3P is a key metabolite that can be utilized in several pathways including the glycolytic and pentose pathway (see below). This compound is transformed into G13P by GapA. This last metabolite in turn is transformed into PEP through the role of several glycolytic enzymes (Figure 1). Interestingly, the expression levels of the *tpiA*, *gapA*, *pgmA* and *pgk* genes were not substantially modified in the JM101 strain grown on glycerol as compared to the strain grown on glucose (Table 2). *E. coli* has two Pyruvate kinases for catalyzing the conversion of PEP to PYR coupled to the synthesis of ATP. These isoenzymes PykA and PykF are coded by the *pykA* and *pykF* genes, respectively. This reaction is the second point of flux control in the glycolytic pathway (Figure 1). The JM101 strain grown on glycerol slightly overexpressed the *pykA* gene (Table 2). This data is in agreement with previous reports of other *E. coli* strains grown on glycerol as the only carbon source [5,6]. The *pykA* and *pykF* genes have putative promoters transcribed by RpoS, and *pykF* is negatively regulated by Cra [17,48]. The allosteric properties of PykF and PykA are different; PykF is activated by F1,6P while PykA is activated by AMP and sugars of the pentose phosphate pathway. Consequently in conditions of low levels of F1,6P as expected in cells grown on glycerol, PykA is probably the enzyme utilized for growth [5]. Individual complete inactivation mutations were constructed in the genes coding for these Pyruvate kinases and their growth on glycerol was evaluated. No significant differences were found in the μ of the single *pykA* or *pykF* mutants as compared to the parental strain (Table 4). However, the specific activity of the Pyruvate kinase is lower in the strain carrying the *pykA* mutant as compared to strain with the *pykF* change and the parental strain (Figure 4). These results indicate that PykA could be preferentially produced when the strain JM101 was grown on glycerol and therefore is apparently responsible *in vivo* of the main Pyruvate kinase activity. Finally, PYR is utilized by the Pyruvate dehydrogenase (Pdh) protein for the synthesis of AcCoA. The glycolytic genes involved in this

transformation (*aceE*, *aceF* and *lpdA*) are slightly underexpressed in the JM101 strain grown on glycerol, as compared to the growth on glucose. This result is in agreement with the carbon flux deviation through PoxB for acetate production that has been proposed for *E. coli* strains growing slowly like the PB11 strain [9,10,16,17] and in agreement with the overexpression of the *poxB*, *acs* and the glyoxylate shunt genes in this strain in these growing conditions [9,10,16,17] (see below).

The penthose pathway, Entner-Duodoroff and gluconeogenic metabolism in the upper glycolytic metabolism

As mentioned, several gluconeogenic reactions are involved in the upper glucose metabolism pathway to allow gluconeogenic metabolism and the synthesis of G6P from glycerol (Figure 1). Glycerol is incorporated as DAHP and this metabolite and G3P are transformed in F1,6P. This compound is converted into F6P, and this metabolite is, in turn, transformed into G6P. As mentioned, the *fbaA*, *fbaB* and *fbp* genes involved in these gluconeogenic steps were overexpressed in the JM101 grown on glycerol (Table 2). Interestingly only *edd* y *eda* genes corresponding to Entner-Doudoroff pathway were overexpressed in the penthose pathway (Table 2). The products of these last genes are involved in the synthesis of G3P and PYR from 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate-6-phosphate (KDHPGNT) (Figure 1).

Acetate pathways, anaplerotic and other gluconeogenic genes

The *poxB*, *acs* and *pta* genes are involved in the production and consumption of acetyl-phosphate (Ac-P) and acetate (Figure 1). The gene coding for the acetate permease (*actP*) is also highly upregulated during growth on glycerol (Table 2). The *poxB*, *acs* and *actP* genes are overexpressed in conditions of glucose starvation and are part of the RpoS regulon [9,49]. The *poxB*, *acs* and *actP* genes were also overexpressed in the JM101 grown on glycerol. Additionally, the overexpression of the *aceB*, *aceA* and *glcB* genes during the growth of strain on glycerol of this strain suggested the induction of the glyoxylate pathway (Table 2). Since no acetate was detected during the growth of strain JM101 on glycerol it could be possible that acetate is produced by PoxB and AckA-Pta and in turn, this acetate transformed into AcCoA by Acs. In agreement to this hypothesis, evaluation of the JM101 strain lacking the

poxB gene (JM101 Δ *poxB*) was grown on glycerol. This derivative accumulated acetate during fermentation and its μ is reduced 10% as compared to the parental JM101 strain (Table 4). Moreover, the specific activity of AceB was measured in strain JM101 grown on glucose and glycerol as the only carbon source. Specific activity for this enzyme was only detected in the glycerol condition (Figure 5). Moreover, the *actP* gene is positively regulated by CRP and it can be transcribed by 54, 70 and 38 (RpoS) sigma factors [9,17,50,51]. Therefore, it appears that since glycerol is a poor carbon source, part of the response involved in carbon scavenging including carbon recycling are present in this strain. In agreement as mentioned the genes involved in the synthesis of Pdh, are slightly underexpressed in these growing conditions indicating that part of the carbon flux is apparently directed and recycled by PoxB/Acs and the glyoxylate shunt [9,10,17,52]. The *pckA* gene was also highly overexpressed and its coded protein was highly produced in the JM101 strain grown on glycerol (Tables 2 and 3); consequently the specific activity of PckA was higher on glycerol as compared to glucose (Figure 5). The overexpression of this gene in other *E. coli* strains grown on glycerol has been previously reported [6,53]. The *pckA* gene is regulated by Cra. The PckA enzyme produces PEP from oxalacetate (OAA), with the synthesis of one molecule of ATP and CO₂. OAA is a metabolite indispensable for the regeneration of the TCA cycle and it is a precursor of aspartate (Figure 1). It appears that in an acetate-glyoxylate shunt consuming and carbon recycling program is running when glycerol is used as carbon source, PckA is indispensable for completing the gluconeogenic cycle since MaeB is an enzyme that utilizes NADPH₂ for converting MAL to PYR, *maeB* gene was not upregulated and the specific activity of this enzyme was lower on glycerol as compared to glucose (Figure 5). Interestingly, as mentioned when the JM101 strain was grown on glycerol plus 0.3 gr/L of acetate, the μ of this strain was not enhanced, but acetate was coutilized with glycerol after three hours of fermentation, contrary to the control grown on glucose plus acetate (Figures 2B, 3A, 3B and Table 1).

TCA cycle

The *acnA*, *acnB* genes were overexpressed in the strain JM101 grown on glycerol (Table 2). These genes code for the aconitases A and B involved in the synthesis of isocitrate (ICT) from citrate (CIT). The *acnA* gene is positively regulated by Crp, SoxRS, FNR and repressed by ArcA [54], while the *acnB* gene is positively regulated by CRP and negatively regulated by ArcA, FruR and Fis. AcnB appears to be the main catabolic enzyme in *E. coli* and AcnA is apparently used in nutritional or oxidative stress [55]. Moreover, overexpression of the *acnB* gene has been detected in strains growing on acetate as the only carbon source [55]. Importantly, the transcription of the *icd* gene transcript

was reduced in the strain JM101 grown on glycerol as compared to glucose (Table 2). Icd is regulated by phospho/dephosphorylation. Icd synthesizes α -ketoglutarate (α -KG) and NADPH₂ from ICT. α -KG is an important metabolite for glutamate and NADPH₂ biosynthesis. Therefore the reduction of the flux through Icd apparently is in agreement with the reduction of the flux in the lower part of TCA cycle. However, this is not consistent with previous reports of fluxes in other *E. coli* strain grown on glycerol where apparently the carbon flux through Icd is slightly enhanced when glycerol is used as carbon source as compared to glucose [5]. In the JM101 strain grown on glycerol the *fumA* and *fumB* genes were highly overexpressed whereas the *fumC* gene was underexpressed (Table 2). In agreement, the FumA protein is produced at higher levels in this strain grown on glycerol (Table 3). The *fumA* gene expression is positively regulated by Crp and repressed by ArcA and its expression is predominant under aerobic conditions. The *fumB* gene overexpression was unexpected since this gene is synthesized preferentially on anaerobic conditions. Fumarase B has a higher affinity for MAL than fumarate (FUM); therefore this protein apparently functions as an alternative enzyme during anaerobiosis. Interestingly, in the JM101 strain grown on glycerol the *frdABCD* operon (encoding the anaerobic fumarate reductase complex) was also overexpressed (Table 2). The *fumB* gene is positively regulated by FNR, ArcA, Crp and Fur and negatively by Fis and NarL. The *frdABC* operon is also positively regulated by FNR and negatively by NarL. Remarkable, the two component signal system DcuS-DcuR induces transcription of the *dcuB-fumB* operon, the *frdABCD* operon, and the *dctA* gene (transporter of C₄ compounds) in response to external C₄ (SUC, FUM, MAL, and aspartate) [56,57]. Importantly the JM101 strain grown on glycerol enhances its μ when small quantities of SUC or MAL are included in the medium, suggesting a low C₄ carbons production (Table 6). From this result it can be concluded that at least other signal is apparently involved in the overexpression of the *frd* operon and the *fumB* gene in the JM101 strain grown on glycerol. Fumarase C is highly active under aerobic growth (>21% oxygen) and in high oxidative conditions. The underexpression of the *fumC* gene indicates a low oxygen stress in the JM101 strain grown on glycerol even when this strain was grown with no oxygen limitation (>20%). This result is different to that reported by Oh, M-K *et al.*, in other *E. coli* strains. There was not substantially difference in the expression of the *sdhABCD* and *sucABCD* operons in the JM101 strain grown on glycerol as compared to glucose (Table 2). However the transcription of the *lpdA* gene is underexpressed. The product of this gene is involved with the other components of the SucABCD proteins, in the transformation of α -KG into SUC. These results suggest that a lower carbon flux is probably presented in this lower section of the TCA cycle including the Icd and SucA enzymes. These observations are in agreement with the proposal that a

gluconeogenic carbon recycle and preserving process is occurring at some degree, since reducing the transformation of ICT into α -KG and the conversion of this metabolite into SUC, induces carbon diversion through the glyoxylate pathway, whose genes are overexpressed. This in turn allows the conservation of carbon atoms that are not lost as CO₂ in the lower step of TCA cycle (Figure 1, Table 2).

3. Indole production and ribonucleosides metabolism in the JM101 strain grown on glycerol.

One of the proteins highly overproduced in during the JM101 strain grown on glycerol was TnaA (17.03 X) (Table 3). TnaA (tryptophan indole-lyase) converts tryptophan into indole, PYR and ammonia. TnaA specific activity was measured at 1 DO and an increment of 400% was found in the JM101 strain grown on glycerol, as compared to the same strain grown on glucose at the same optical density (Figure 5). Importantly, micromolar concentrations of indole were detected only in the culture of JM101 grown on glycerol (Figure 6). The production of indole was monitored during the culture, and indole was detected when the growth of the JM101 strain was around 0.3 OD. The indole production had two peaks, one at 0.83 OD and other in the onset of the stationary phase (Figure 6). A derivative of the JM101 strain with a completely inactivated *tnaA* gene was constructed. This JM101 Δ *tnaA* strain was evaluated in its performance in bioreactors and compared to the parental strain JM101 during their grown on glycerol. No differences in the μ were detected between the two strains. However, when a threshold of 0.83 OD was reached the kinetic curve of the strain carrying the inactivated *tnaA* gene was scattered as compared to the parental strain (Figure 7). In addition, in the strain carrying the inactivated *tnaA* gene, the final biomass was lower as compared to the parental strain JM101 (Figure 7). In order to explain this lower biomass production, the production of indole and organic acids was measured in the JM101 and in the JM101 Δ *tnaA* strains. Surprisingly, the JM101 Δ *tnaA* strain produced acetic acid (0.37 gr/L) and small amounts of lactic acid (0.037 gr/L), but no indole was detected. Therefore, the question is what could be the role of indole during the growth of JM101 on glycerol? Interestingly, when the first peak of indole was reached, the extracellular concentration of glycerol was about 3 gr/L; consequently the signal appeared early in the fermentation. The second signal appeared when glycerol was almost exhausted in the media. Therefore, this signal should be important for continuing exponential growth and to reach a higher biomass at the end of fermentation. Maybe the synthesis of indole involves an adaptive response during the entire growth on glycerol. One scenario includes the direction of the carbon flux into DAHP as a result of the glycerol gluconeogenic metabolism. The synthesis of tryptophan, histidine, NAD and nucleotides (purine and

pyrimidine) uses the PRPP (5-phospho-D-ribosyl-a-1-PYRophosphate) metabolite as a precursor and about 30-40% of the PRPP synthesized is apparently used for nucleotides synthesis and about 15% to produce tryptophane [58]. Probably the continuous indole production from tryptophane enhances PRPP demand and this increases the incoming flux of DHAP that is diverted through the pentose-phosphate pathway. If the demand of tryptophane (PRPP) is blocked, the flux previously diverted to the pentose pathway could be canalized through glycolysis; therefore, TCA cycle is incapable of cope with this extra flux of AcCoA from PYR and this metabolite is converted to acetic acid and lactate. The second scenario is in agreement to the known signal role of indole. It is known that indole prematurely induces the expression of the Crl protein at both transcriptional and translational level. In turn Crl stimulates the activity of RpoS, leading to an increased transcription rates of the RpoS regulon in stationary phase [33]. Mutants in the *crl* or *rpos* genes had low production levels of the FbaB, TalA, PykF, PfkA, GltA and PoxB proteins [33]. Therefore, maybe the role of indole is to activate through Crl the RpoS activity and finally the genes implied in the balanced distribution of the carbon flux. In this condition, a lower production of PoxB and TalA in the JM101 Δ *tnaA* strain could explain the high glycolytic flux, while a lower production of GltA could explain the incapability of managing the AcCoA flux (Figure 1). One clue about the distribution of the carbon flux in the pentose phosphate pathway is the overproduction of Cdd(6.97X), Udp(7.41X) and DeoD(2.08X) proteins in the JM101 strain grown on glycerol (Table 3). These proteins are involved in the degradation of nucleobases to bases and pentose. In conditions of deficient production of PRPP the degradation of ribonucleosides is apparently more important than their phosphorylation to nucleotides [58]. Therefore, these data suggest that in the JM101 grown on glycerol the levels of PRP5 (Ribose 5-P) are low as compared to the strain grown on glucose. In fact, the presence of indole at 30C compared to growth at 37C most significantly represses genes involved in uridine monophosphate (UMP) biosynthesis (*carAB*, *PYRLBI*, *PYRC*, *PYRD*, *PYRF* and *upp*) and uracil transport (*uraA*) [59]. The *cdd*, *udp* and *deoD* genes that code for Cdd, Udp and DeoD are regulated by CytR and DeoR (cytidine regulator). CytR and DeoR transcription factors are involved in the transport and utilization of ribonucleosides and deoxyribonucleotides [60]. The *cytR* gene product controls the synthesis of all six enzymes with cytidine as the low-molecular-weight effector, while the *deoR* gene product seems to control only the synthesis of the Deo enzymes. Deoxyribose-5 phosphate acts as low-molecular-weight effector for the *deoR* gene product. In addition to this double regulation, the six enzymes are subject to control by the cyclic AMP/cyclic AMP receptor protein system. Joloba and Rater [61] have reported that mutants deficient in indole production (Δ *tnaA*) required to enhance the production of another

signal (signal-2) that in turn, permitted higher expression of some genes cooperatively regulated by indole and signal-2 [61]. The increment of the signal 2 is produced by a mutation in the *thyA* gene; this gene is involved in the novo synthesis of dTMP. Interestingly, the depletion of signal-2 and survival of mutants in mineral media was selected by losing functions of the *deoB* and *deoD* genes [61]. As mentioned, probably during growth of the strain JM101 on glycerol the flux through pentose phosphate pathway is restricted as compared to glucose and the synthesis of R5P and PRPP is lower and the recycling of nucleosides is necessary. However, indole can also cause a slightly downregulation of UMP synthesis pathways performing an efficient use of R5P [59].

4. Performance of different JM101 mutants grown on glycerol.

Mutants of the PEP-PYR node and of the master regulator of stress response RpoS were constructed and evaluated, testing the effects on the μ , q_s and $Y_{x/s}$ when growing in mineral medium with glycerol or glucose as the only carbon sources. The JM101 Δ *rpoS* mutant had two hours delay for growing in mineral media and once adapted, the μ was 10% slower than the wild type. The strain carrying the *rpoS* mutant had a glycerol lower specific consume as compared to the wild type (28%) and a higher $Y_{x/s}$ (23%) (Table 4). RpoS is not directly involved in the expression of the genes that incorporate glycerol in the central metabolism (*glpF*, *glpD* and *glpK*), however its relation with *glpD* is indirect through ArcAB. Some reports argue a feedback loop, RpoS-mediated stationary phase induction of the *arcA* gene [62]. Therefore it appears that RpoS is fundamental for adapting and maintaining an adequate balanced grown on glycerol as the only carbon source in mineral media as compared to the strain grown on glucose as the only carbon source (Tables 4 and 5). In addition RpoS regulates the expression of the *poxB* gene [9,17,63]. Further studies have to be performed to clear the role of RpoS in the growth of the JM101 strain on glycerol. The JM101 Δ *poxB* mutant had the same μ , q_s and $Y_{x/s}$ but accumulated acetate early in the culture (Table 4). This result can be explained in two ways: the *poxB* inactivation could be responsible of the *acs* gene underexpression or indicates that the utilization of PYR through PoxB to produce acetate is necessary for the complete induction of the glyoxylate shunt. The strain carrying the *pckA* mutant gene had an adaptation time of 2 hr in the mineral media as compared to the parental JM101 strain and also accumulated acetate during fermentation. However the μ and q_s were not affected in the strain carrying the *pckA* mutation (Table 4). PckA appears to be important for glycerol adaption and also for completing a gluconeogenic cycle preparing JM101 strain for growing in a gluconeogenic substrate as acetate. The production of acetate also indicates that probably the flux through PckA is important to maintain the

ATP/ADP levels. The same mutant grown on glucose is not affected in the stoichiometric parameters. The derivative strain carrying the inactivated *ppc* gene was incapable of growing on glycerol or glucose as the only carbon sources.

Conclusions

- The overexpression of genes and overproduction of proteins of the *mal/lam*, *mgl/gal* regulons and some genes regulated by RpoS indicated that the JM101 strain grown on glycerol induced a stress carbon response suggesting that this carbohydrate is a poor carbon source. Overexpression of the genes and overproduction of their coded proteins, involved in glycerol uptake and metabolism are responsible of transport and incorporation of this carbon source as DHAP one of the metabolites of the glycolytic pathway. Overexpression of several genes including glycolytic and gluconeogenic genes in the upper part of the glycolytic pathway, specially *fbaA*, *fbaB*, *fbp* and *pgi* are responsible of the production of G6P from DHAP. F1,6P/F6P low levels could be the signal for the induction of some of these regulons when JM101 strain is growing on glycerol. This phenomena is reinforced by the differential expression of some genes regulated by Cra which responds to the low concentrations of F1,6BP/F6P.
- The overexpression of the *poxB*, *acs*, *pta*, *actP*, *acnB* and the glyoxylate shunt genes indicates that the strain is producing and simultaneously consuming acetate when growing on glycerol as the only carbon source. It has been proposed that when *E. coli* cells are growing slowly on glucose apparently reduce their carbon flux through the Pdh system which yields AcCoA from PYR and increase their carbon flux through PoxB enzyme that produces acetate and reducing power at the membrane from PYR. Acetate as part of the gluconeogenic metabolism is consumed by Acs and transformed into AcCoA in a “carbon preserving” recycling mechanism that is present in strain PB11, a derivative of JM101 lacking PTS, which grows slowly on glucose [10,16,17,64]. Therefore it appears that part of these responses is also observed in the JM101 strain when this strain grows slowly on a relatively poor carbon source as glycerol. In agreement with this proposal, the genes that code for Pdh (*aceE*, *aceF* and *lpdA*) are slightly underexpressed in this strain growing in glycerol. Consistent with this metabolic capacity, in the cultures of the JM101 strain grown on glycerol no acetate was detected, probably because this strain recycles acetate through the PoxB-Acs-glyoxylate shunt and it is capable of coutilizing glycerol plus acetate. In accord the JM101 derivative mutants with inactive *poxB* and *pckA* genes accumulate acetate and their μ are affected. The induction of

these genes apparently permitted the efficient utilization and recycling of carbon. In agreement, the downregulation of the *icd* and *lpdA* genes that code for IcdA and SucA, allows the proposition that part of the carbon flux is reduced through the lower part of the TCA cycle, allowing carbon recycling through the glyoxylate shunt since the expression of the *aceBA* and *glcB* genes are overexpressed. As a result, less carbon is lost as CO₂ in the lower part of the TCA cycle (Figure 1) and carbon is recycled through the glyoxylate and gluconeogenic genes. Therefore this metabolic response is apparently responsible of a reduced TCA cycle (see below).

- In agreement with a reduced TCA cycle, during the growth of the strain JM101 on glycerol it appears that relatively low C₄ carbon metabolites production occurred since the μ of this strain is enhanced in cultures grown on glycerol when SUC or MAL and aminoacids, derived from 2-oxoglutarate, are added. These results are in agreement with the proposal that when *E. coli* is growing slowly part of the carbon is recycled and preserved, not lost as to CO₂ in the TCA cycle.
- The indole detection in the JM101 strain grown on glycerol indicates an important flux through the aromatic pathway. Indole is a signal molecule that activates Crl for modulating expression of certain RpoS-Crl regulons; however, a signaling role of this metabolite is no clear at this moment. Additional studies should be conducted to understand better the role of this signal. Nevertheless, the overproduction of Cdd, DeoD, and Upp indicates that the carbon flux through the pentose phosphate pathway is lower than the flux on glucose when glycerol is used as the only carbon source. It appears as mentioned that when glycerol is used as a unique carbon source, a carbon recycling, preserving mechanism occurs. In addition RpoS regulons could be activated by indole, allowing a more adequately response to growth on carbon limited conditions.
- The transcription levels of most of the measured genes correlated with the detected values for the proteins produced in the analyzed growth conditions using glycerol as the only carbon source. Also, the specific activities of various measured proteins correlated with these values.

Methods

1. Bacterial strains.

The *E. coli* JM101 strain [65] and isogenic derivatives used in this work are listed in table 8.

2. Genetic procedures and recombinant DNA techniques.

PCR reactions were performed using Platinum Taq polymerase accordingly to the manufacturer recommendations (Invitrogen, Ca., USA). Complete inactivation of the *pck*, *tnaA*, *pykA*, *pykF* and *ppc* genes was performed by transduction using P1 *vir* phage grown on strains carrying these genes inactivated by the Datsenko method [66] from the Keio collection [67]. Gene inactivations were confirmed using PCR reactions with specific oligonucleotides. Table 9 includes the oligonucleotides utilized in this report.

3. Growth conditions.

- Batch cultures

M9 medium, consisting per liter of: Na₂HPO₄, 6 g; KH₂PO₄, 3 g; NaCl, 0.5 g; NH₄Cl, 1 g; MgSO₄, 2 mM; CaCl₂, 0.1 mM; Vit B1, 0.01 g, and glucose, 2 g/L, was utilized for growing the fermentor inocula. A higher concentration of glucose or glycerol (4 g/L, approximately 130.00 mmolC/L, depending of the molecular weight of the carbon source), was utilized in the bioreactors or in 500 ml shake flasks studies when only one carbon source was employed. When two carbon sources were used, the same amount of each (2 g/L, approximately 65 mmolC/L) was employed. When acetate was added as carbon source the concentration employed for this carbon source was 0.33 g/L (approximately 11 mmolC/L).

- Bioreactors conditions

JM101 strains were cultivated in a 1 L bioreactors (Applikon Biotechnology, Netherlands) with a working volume of 0.75L, 600 rpm controlling pH at 7 with NH₄OH (2.0%) and air flow rate of 1 vvm, starting at an OD₆₀₀ of 0.10 and collected when growing in the log phase at an OD₆₀₀ of 1.

4. Kinetic and stoichiometric parameters.

Batch cultures

Data represents the average of at least three different cultures. Cell growth was measured by monitoring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) in a spectrophotometer (Beckman DU700). OD₆₀₀ was converted into dry cellular weight (biomass concentration) using a standard curve (1 OD₆₀₀ = 0.37 g/L of dry cellular weight). Specific growth rates (μ) were determined by fitting the biomass data versus time to exponential regressions. The biomass yield ($Y_{x/s}$) was estimated as the coefficient of linear regression of biomass concentration versus substrate concentration of glucose and glycerol, in grams of biomass/mmolC of substrate. The specific carbon consumption rate (q_s) was determined according to Monod's model as the ratio of μ to $Y_{x/s}$ (reported elsewhere) [16,68].

5. Analytical methods.

Metabolites concentrations were determined with an HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refractometer, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, MA). For D-glucose, D-glycerol and acetic acid determinations an Aminex HPX-87H column (300 7.8 mm; 9 Å) (Bio-Rad, Hercules, CA) was used. Running conditions were: mobile phase, 5 mM H₂SO₄; flow, 0.5 mL/min, and temperature, 50°C. Under these conditions glucose and acetic acid were detected by refractometer [68].

Indole in culture supernatants were quantified using an Agilent 1100 high-performance liquid chromatography system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a Phenomenex Synergy Hydro RP18 column (150 by 4.6 mm; 4 μ m) attached to an Agilent 1100 electrospray mass spectrometry detection system [69]. Samples were eluted with 10% methanol in 0.1% acetic acid in water at an isocratic flow rate of 0.5 ml/min. UV quantitation was performed at 220 nm. A dual solvent system, at a column flow rate of 1.0 ml/min, was used for separation [70]. Solvent A consisted of 0.1% tri-fluoroacetic acid in water while solvent B was 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile. Starting at 95% solvent A and 5% solvent B, the solvent gradient was run for 8 min and ended at 20%

solvent A and 80% solvent B. From 8–10 min, the ratio was maintained at 20% solvent A and 80% solvent B. From 10 to 15 min the ratio was 95% solvent A and 5% solvent B.

6. RNA extraction, DNase treatment of RNA and cDNA synthesis for qPCR analysis.

a) Samples management and treatment

As mentioned, the JM101 strain was grown in bioreactors using glucose as the control or glycerol as carbon source. Once the bioreactor was inoculated at the same optical density (0.1), the culture was monitored in order to verify the reproducibility of the μ , q_s and $Y_{x/s}$ values. When the fermentation reached 1 OD, samples of 7 ml were taken directly from the bioreactor using 1mm diameter pipe and collected in cap tubes of 15ml containing 2ml of RNA protect Bacteria Reagent (QuiagenTM) and mixed carefully. After 1 min, the samples were centrifuged at 8,000 rpm by 8 min. The pellet was immediately frozen at -70°C until the RNA extraction.

b) Nucleic Acid extraction

Total RNA was isolated and purified using the hot-phenol method, with some modifications: samples containing 7 ml of the collected frozen cells were resuspended in 1 ml of buffer I (0.3M sucrose, 0.1 M sodium acetate), samples were treated with 20 μ l of lysozyme (10mg/ml in TE buffer) and incubated by 10 min at room temperature. 2ml of buffer II (0.01 M sodium acetate, 2% SDS) was added and the mixture was incubated for 3 min at 65°C. The lysate was extracted with 2 ml of hot phenol and heated for 3 min at 65°C. A second extraction with hot phenol was performed without heating the mixtures. Samples were then extracted with 2 ml of phenol:chloroform (1:1), precipitated with 0.1 volume of 3 M sodium acetate pH 5.2 and 2.5 volume of ethanol and centrifuged 15 min/4°C/10000rpm. Samples were then suspended in 300 μ l of DNase and RNase-free water (Ambion Inc, TX, USA) with RNase inhibitor (Fermentas Life Sciences, USA) and extracted 2 times with 1 volume of chloroform. Finally, samples were precipitated as before and suspended with 300 μ l of TE buffer (Ambion Inc, TX, USA). RNA was analyzed by formaldehyde agarose gel for integrity. RNA concentrations were quantified using Nanodrop 2000c (Thermo Scientific), and the 260/280 and 260/230 ratios were examined for protein and solvent contamination. The absorbances for 260/280nm were between 1.9- 2.0 and 2.0-2.3 for 260/230nm for all samples. RNAs were stored at -70°C. For DNase treatment total RNA samples were treated with TURBO DNA-free kit (Ambion Inc, TX, USA) at

37°C for 30 min, following manufacturer's instructions. To determine if the RNA samples were significantly contaminated with genomic DNA, samples were subjected to conventional PCR with primers for the *arcA* gene (Table 9). Since these primers were designed to recognize genomic DNA, the presence of a detectable PCR product on an ethidium bromide-stained agarose gel confirmed that the specific RNA sample was contaminated with genomic DNA. PCR reactions were performed with Taq polymerase (Fermentas Life Sciences, USA). The cycling parameters were: 95°C for 5 min; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min; 72°C for 5 min. Additionally, the RNA samples DNase-treated were used for RT-qPCR analysis of the same *arcA* gene using the appropriate oligos [*arcAa* (forward) and *arcAb* (reverse)] (Table 9). As in the PCR case, all utilized samples did not produce a 101bp amplicon, indicating that no small fragments of genomic DNA were present, contaminating the samples. cDNA was synthesized using RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis kit utilizing the manufacturer conditions (Fermentas, Inc.). Approximately 5µg of RNA for each reaction and a mixture of 10 pmol/µl of specific DNA reverse (b) primers for the utilized genes, whose nucleotide sequences were previously published [9,10,50] or are listed in table 9. cDNA was used as template for RT-qPCR assays.

c) RT-qPCR

RT-qPCR was performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System and 7300 Real Time PCR System (PerkinElmer/Applied Biosystems) using the Maxima^R SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kit (Fermentas Life Sciences, USA). MicroAmp optica 96-well Reaction Plates (Applied Biosystems, Ca, USA) and Plate Max ultraclear sealing films (AXYGEN INC, CA, USA) were used in these experiments. Amplification conditions were 10 min at 95 °C, and a two-step cycle at 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec for a total of 40 cycles and a dissociation protocol (95°C for 15sec, 60°C for 1 min, 95°C for 15sec and 60°C for 15sec). The DNA sequences of the primers for specific amplifications were designed using the Primer Express software (PE/Applied Biosystems). Some of them have been published previously ([9,10,50]) and some others are included in table 9. All the RT-qPCR experiments complied with the MIQE guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) [71,72]. The length of all the utilized oligonucleotides (forward and reverse), was between 18 and 21 nucleotides, with a % of GC between 45 to 60 and a T_m between 58 to 60°C. The size of all amplicons was 101 bp. The final primer concentration, in a total volume of 12µl, was 0.2 µM. 5 ng of target cDNA for each gene were added to the reaction mixture since higher concentrations (>10 ng) of cDNA are not in the dynamic range for the reference *ihfB* gene (see below), and the obtained values are not correctly normalized for this higher cDNA

concentration. All experiments were performed at least in triplicate for each gene of each strain, obtaining very similar values (differences of <0.3 SD). A non-template control reaction mixture was included for each gene and values appeared for all genes after the 31 cycle. Standard curves were performed to evaluate PCR efficiency and all the genes had R^2 values above 0.9976 with slopes between -3.4 to -3.7. The quantification technique used to analyze data was the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method described by Livak and Shmittgen [73]. The data were normalized using the *ihfB* gene as an internal control (reference gene). The same reproducible expression level of this gene was detected in all the strains in the conditions in which bacteria were grown and analyzed, since this is the most important characteristic that a reference gene should have according to the MIQE guidelines. Supporting information (additional file) carries the *ihfB* gene values detected for the utilized strains. These results demonstrate the stability of the expression of this reference gene in all the analyzed derivatives for the conditions utilized in this report and also on previous reports utilizing these strains and others derivatives [9,10,50,71]. For each analyzed gene in all strains the transcription level of the parental strain JM101 was considered as one, was used as the control to normalize the data. Therefore, data are reported as relative expression levels, compared to the expression level of the same gene in strain JM101. The results presented in table 2 are the averages of at least three independent measurements of the RT-qPCR expression values for each gene. Values were obtained from different cDNAs generated from at least five independent bioreactor samples [10].

7. Enzymatic assays

For each enzymatic assay, approximately 15 ml of culture were harvested and centrifuged at 10,000 rpm, 4°C for 1 min. The pellets were stored at -20°C until the enzymatic assay was performed (no more than two days). Before each assay the pellets were dissolved in their enzyme specific buffers (see below). The dissolved cells were disrupted by three sonication steps with intervals of 20 sec at 14 milliohms. The cell debris were removed by centrifugation at 10,000 rpm, 4°C for 10 min. Enzymatic assays were performed at 30°C using a Thermo Spectronic-Biomate spectrophotometer. The buffer and substrates were mixed in the spectrophotometric cuvette to a final reaction volume of 1 ml. The wavelength and the milimolar extinction coefficients for NADH₂, NADP⁺ y NADPH₂ were 340 nm y 6.22 cm⁻¹ mM⁻¹ respectively. For phenylhydrazine-HCl, the wavelength and the milimolar extinction coefficients were 324 nm 16.8 cm⁻¹ mM⁻¹ respectively. One unit of specific enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to convert 1 mole of substrate into the specific product per minute per milligram of protein. The amount of protein was measured by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard

[74]. Utilized buffers: Pyruvate Kinase (Pyk): 100mM Tris-HCl pH: 7.5, 5mM ADP, 1mM DTT, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.5 phosphoenolpyruvate (PEP), 0.25mM NADH, 10 U Lactate dehydrogenase (LDH) [75]. PEP carboxylase (Ppc): 60mM Tris-HCl pH: 9.0, 10mM MgCl₂, 10mM NaHCO₃, 0.15mM NADH, 5mM PEP y 2U Malate dehydrogenase (MDH), [76]. PEP carboxykinase (PckA): 10mM Buffer TES pH: 6.6, 10mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1mM DTT, 10mM ADP, 75mM NaHCO₃, 0.3mM NADH, 20U Malate dehydrogenase (MDH); add cell extract, incubate at 37°C for 15 min, then add 10mM PEP for start the reaction [76]. Malic enzyme (MEZ): 100mM Tris-HCl pH: 7.8, 5mM MgCl₂, 0.6 NADP⁺, 40mM malate [76]. Isocitrate lyase (ICL): 50mM morpholipepropanesulfonic acid (MOPS) pH: 7.3, 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 4mM fenyhydrazine HCl (FH) and 12.5mM L isocitrate (IC) [77]. Isocitrate dehydrogenase (ICDH): 50mM phosphate buffer pH: 7.5, 5mM MgCl₂, 2mM NADP⁺, 2.5mM D,L isocitrate (IC) [78].

8. Proteomic Analysis

Protein extraction and two dimensional gel electrophoresis were done as previously described [79]. Gels were dyed in colloidal coomasie [80] and scanned in a GS-800 densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA). Digital images were analyzed and compared using the PDQuest 8.0.1 software (Bio-Rad). Each experiment was done in triplicate. Once the digital image of each gel was compared against the rest, the electrophoretic entities of interest were cut, alkylated, reduced, digested and automatically transferred to a MALDI analysis target by a Proteineer SP II and SP robot using the SPcontrol 3.1.48.0 v software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), with the aid of a DP Chemicals 96 gel digestion kit (Bruker Daltonics) and processed in a MALDI-TOF Autoflex (Bruker Daltonics) to obtain a mass fingerprint. 100 satisfactory shots were performed in 20 shotsteps; the peak resolution threshold was set at 1500, the signal/noise ratio of tolerance was 6, and contaminants were not excluded. The spectrum was annotated by the flexAnalysis 1.2 v SD1 Patch 2 (Bruker Daltonics). The search engine MASCOT [81] was used to compare the fingerprints against the UNIPROT [82] release 2011-01 database with the following parameters: Taxon- *Escherichia coli*, mass tolerance of up to 200 ppm, one miss-cleavage allowed, and as the fixed modification carbamidomethyl and oxidation of methionine as the variable modification.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KM and FB designed experiments, analyzed the results and wrote the manuscript. KM carried out all the fermentations, inactivations of genes, RNA extraction and samples for proteomic experiments. HMCA carried out Pyk fermentations and the enzymatic assays except TnaA assay (KM). NF performed the cDNA synthesis and RT-qPCR experiments. GMB performed the 2D electrophoresis gel and MALDI-TOF analyses of proteins. SE, GG and OTR critically revised the results and the manuscript. All the authors have read and approved the publication of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Magdalena Hernandez Ortiz, Georgina Hernández and M. Enzaldo for their technical assistance. We are also grateful to Paul Gaytán, Jorge Yáñez and Eugenio López for the synthesis of oligonucleotides. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), Mexico grants 105782, 83039, FONSEC/SSA/IMSS/ISSSTE/CONACYT Grants 44126, 126793 and DGAPA-PAPIIT, UNAM Grants IN213508, IN224709, IN221106. Grants GAPA-UNAM No. IN216210-3 y CONACYT 167756

References

1. Weissenborn DL, Wittekindt N, Larson TJ: **Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12.** *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**: 6122-6131.
2. Bisen P, Sanodiya B, Thakur G, Baghel R, Prasad G: **Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification.** *Biotechnology Letters* 2010, **32**: 1019-1030.
3. Vasudevan P, Briggs M: **Biodiesel production—current state of the art and challenges.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2008, **35**: 421-430.
4. Frankel DG: **Glycolysis: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology.** 2n edition. Edited by Neidhardt. ASM Press; 1996:189-196.
5. Oh MK, Liao JC: **Gene expression profiling by DNA microarrays and metabolic fluxes in *Escherichia coli*.** *Biotechnology Progress* 2000, **16**: 278-286.

6. Peng L, Shimizu K: **Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **61**: 163-178.
7. Notley L, Ferenci T: **Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*?** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**: 1465-1468.
8. Hardiman T, Lemuth K, Keller MA, Reuss M, Siemann-Herzberg M: **Topology of the global regulatory network of carbon limitation in *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology* 2007, **132**: 359-374.
9. Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B *et al.*: **New insights into the role of sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2008, **14**: 176-192.
10. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R *et al.*: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Metabolic Engineering* 2005, **7**: 70-87.
11. Storz G, Hengge-Aronis R: **Bacterial stress responses**, First edn. ASM Press; 2000.
12. Teich A, Meyer S, Lin HY, Andersson L, Enfors SO, Neubauer P: **Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators RpoS and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*.** *Biotechnology Progress* 1999, **15**: 123-129.
13. Kayser A, Weber J, Hecht V, Rinas U: **Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate-dependent metabolic efficiency at steady state.** *Microbiology* 2005, **151**: 693-706.
14. Lange R, Hengge-Aronis R: **Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 1991, **5**: 49-59.
15. Lange R, Hengge-Aronis R: **The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability.** *Genes & Development* 1994, **8**: 1600-1612.
16. Flores N, de Anda R, Flores S, Escalante A, Hernández G, Martínez A, Bolivar F: **Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2004, **8**: 209-221.
17. Olvera L, Mendoza-Vargas A, Flores N, Olvera M, Sigala JC, Gosset G, Bolivar F: **Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of sigma38 in their expression, as a response to carbon limitation.** *PLoS ONE* 2009, **4**: e(10):7466.
18. Gaal T, Mandel MJ, Silhavy TJ, Gourse RL: **Crl facilitates RNA polymerase holoenzyme formation.** *Journal of Bacteriology* 2006, **188**: 7966-7970.
19. Bohringer J, Fischer D, Mosler G, Hengge-Aronis R: **UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma S and sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1995, **177**: 413-422.
20. Messing J: **A multi-purpose cloning system based on a single-stranded DNA bacteriophage M13.** *Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publ* 1979, **99**: 43-48.

21. Hua Q, Yang C, Oshima T, Mori H, Shimizu K: **Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures.** *Applied Environmental Microbiology* 2004, **70**: 2354-2366.
22. Iuchi S, Cole ST, Lin EC: **Multiple regulatory elements for the *glpA* operon encoding anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the *glpD* operon encoding aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: further characterization of respiratory control.** *Journal of Bacteriology* 1990, **172**: 179-184.
23. Boos W, Shuman H: **Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation.** *Microbiology Molecular Biology Reviews* 1998, **62**: 204-229.
24. Dippel R, Bergmiller T, Bohm A, Boos W: **The maltodextrin system of *Escherichia coli*: glycogen-derived endogenous induction and osmoregulation.** *Journal of Bacteriology* 2005, **187**: 8332-8339.
25. Ferenci T: **Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP.** *FEMS Microbiology Reviews* 1996, **18**: 301-317.
26. Death A, Ferenci T: **Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176**: 5101-5107.
27. Ferenci T: **Hungry bacteria. Definition and properties of a nutritional state.** *Environmental Microbiology* 2001, **3**: 605-609.
28. Geanacopoulos M, Adhya S: **Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the gal regulon.** *J Bacteriol* 1997, **179**: 228-234.
29. Horváth P, Hunziker A, Erdossy J, Krishna S, Semsey S: **Timing of gene transcription in the galactose utilization system of *Escherichia coli*.** *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**: 38062-38068.
30. El Qaidi S, Plumbridge J: **Switching control of expression of *ptsG* from the Mlc regulon to the NagC regulon.** *Journal of Bacteriology* 2008, **190**: 4677-4686.
31. Bianco C, Imperlini E, Calogero R, Senatore B, Pucci P, Defez R: **Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2006, **152**: 2421-2431.
32. Hengge-Aronis R: **Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigmaS (RpoS) subunit of RNA polymerase.** *Microbiology Molecular Biology Reviews* 2002, **66**: 373-395.
33. Lelong C, Aguiluz K, Luche S, Kuhn L, Garin J, Rabilloud T: **The *crl-rpoS* regulon of *Escherichia coli*.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2007, **6**: 648-659.
34. Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ: **From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*.** *Molecular Microbiology* 1996, **20**: 911-917.
35. Ferrario M, Ernsting BR, Borst DW, Wiese DE, Blumenthal RM, Matthews RG: **The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177**: 103-113.
36. Chen S, Zhang A, Blyn LB, Storz G: ***micC*, a Second Small-RNA Regulator of Omp Protein Expression in *Escherichia coli*.** *Jorunal of Bacteriology* 2004, **186**: 6689-6697.
37. Yoshida T, Qin L, Egger LA, Inouye M: **Transcription Regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, OmpR.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**: 17114-17123.

38. De la Cruz CE: **The complexities of porin genetic regulation.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2010, **18**: 24-36.
39. Death A, Notley L, Ferenci T: **Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress.** *Journal of Bacteriology* 1993, **175**: 1475-1483.
40. Gosset G: **Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2005, **4**: 14.
41. Tony Romeo and Jacky L.Snoep. **Glycolysis and Flux Control.** Edited by Bock,A.,Curtiss,R.,3rd,Kaper,J.B.,Karp,P.D.,Neidhardt,F.C.,Nystrom,T.,Slauch,J.M.,Squires,C.L.,and Ussery,D. *EcoSal-*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology* . 2005. American Society for Microbiology, Washington, D. C. www.ecosal.org/index.php?option=com_content&view=article&id=626&catid=43&Itemid=139.
42. Lengsfeld C, Schonert S, Dippel R, Boos W: **Glucose- and glucokinase-controlled *mal* gene expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 2009, **191**: 701-712.
43. Lacour S, Landini P: **SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of S-dependent genes and identification of their promoter sequences.** *Journal of Bacteriology* 2004, **186**: 7186-7195.
44. Mendoza-Vargas A, Olvera L, Olvera M, Grande R, Vega-Alvarado L, Taboada B, Collado-Vides J, Morett E: **Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*.** *PLoS ONE* 2009, **4(10)**: e7526.
45. Raman B, Nandakumar MP, Muthuvijayan V, Marten MR: **Proteome analysis to assess physiological changes in *Escherichia coli* grown under glucose-limited fed-batch conditions.** *Biotechnology and Bioengineering* 2005, **92**: 384-392.
46. Yohannes E, Thurber A, Wilks J, Tate D, Slonczewski J: **Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli* K-12.** *BMC Microbiology* 2005, **5**: 59.
47. Eppler T, Postma P, Schutz A, Volker U, Boos W: **Glycerol-3-phosphate-induced catabolite repression in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 2002, **184**: 3044-3052.
48. Bledig SA, Ramseier TM, Saier MH, Jr.: **FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (*pykF*) gene expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**: 280-283.
49. Weber J, Kayser A, Rinas U: **Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. II. Dynamic response to famine and feast, activation of the methylglyoxal pathway and oscillatory behaviour.** *Microbiology* 2005, **151**: 707-716.
50. Sigala J, Flores SFN, Aguilar C, de Anda R, Gosset G, Bolívar F: **Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles.** *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology* 2008, **16**: 224-235.
51. Gimenez R, Nunez MF, Badia J, Aguilar J, Baldoma L: **The Gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 2003, **185**: 6448-6455.
52. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: **Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy.** *Metabolic Engineering* 2002, **4**: 124-137.

53. Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC: **Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**: 13175-13183.
54. Cronan J, Subrahmanyam S: **FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency.** *Molecular Microbiology* 1998, **29**: 937-943.
55. Cunningham L, Gruer MJ, Guest JR: **Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*.** *Microbiology* 1997, **143**: 3795-3805.
56. Zientz E, Bongaerts J, Unden G: **Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR Genes) two-component regulatory system.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180**: 5421-5425.
57. Davies SJ, Golby P, Omrani D, Broad SA, Harrington VL, Guest JR *et al.*: **Inactivation and regulation of the aerobic C4-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1999, **181**: 5624-5635.
58. Hove-Jensen B: **Mutation in the phosphoribosylpyrophosphate synthetase gene (*prs*) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine, and tryptophan in *Escherichia coli*.** *Journal of Bacteriology* 1988, **170**: 1148-1152.
59. Lee J, Zhang XS, Hegde M, Bentley WE, Jayaraman A, Wood TK: **Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*.** *ISME Journal* 2008, **2**: 1007-1023.
60. Hochstadt-Ozer J, Stadtman ER: **The Regulation of purine utilization in bacteria.** *Journal of Biological Chemistry* 1971, **246**: 5294-5303.
61. Joloba ML, Rather PN: **Mutations in *deoB* and *deoC* alter an extracellular signaling pathway required for activation of the *gab* operon in *Escherichia coli*.** *FEMS Microbiology Letters* 2003, **228**: 151-157.
62. Hengge R: **The two-component network and the general stress sigma factor RpoS in *Escherichia coli*.** In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. 631 edition. Edited by Utsumi R. Springer New York; 2008:40-53.
63. Hengge AR: **Regulatory gene expression during entry into stationary phase.** *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* 1996, **2**: 1497-1512.
64. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda Ramon, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system.** *Metabolic Engineering* 2005, **7**: 70-87.
65. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynker HL, Boyer HW *et al.*: **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.** *Gene* 1977, **2**: 95-113.
66. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**: 6640-6645.
67. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M *et al.*: **Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.** *Molecular Systems Biology* 2006, **2**.
68. Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez O, Bolivar F: **Coutilization of glucose and glycerol enhances the production of aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system.** *Microbial Cell Factories* 2008, **7**: 1.

69. Chavez-Bejar MI, Lara AR, Lopez H, Hernandez-Chavez G, Martinez A, Ramirez OT, Bolivar F, Gosset G.: **Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*.** *Applied Environmental Microbiology* 2008, **74**: 3284-3290.
70. Xue Z, McCluskey M, Cantera K, Ben-Bassat A, Sariaslani FS, Huang L: **Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme.** *Enzyme and Microbial Technology* 2007, **42**: 58-64.
71. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M *et al.*: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical Chemistry* 2009, **55**: 611-622.
72. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M: **A practical approach to RT-qPCR publishing data that conform to the MIQE guidelines.** *Methods* 2010, **50**: S1-S5.
73. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-[\Delta\Delta]CT}$ method.** *Methods* 2001, **25**: 402-408.
74. Kruger NJ: **The Bradford method for protein quantitation.** In *Basic Protein and Peptide Protocols*. 32 edition 1994:9-15.
75. Sridhar J, Eiteman MA, Wiegel JW: **Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin.** *Applied Environmental Microbiology* 2000, **66**: 246-251.
76. der Werf MJV, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG: **Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp.* 130Z.** *Archives of Microbiology* 1997, **167**: 332-342.
77. Ramirez-Trujillo JA, Encarnacion S, Salazar E, de los Santos AG, Dunn MF, Emerich DW *et al.*: **Functional characterization of the *Sinorhizobium meliloti* acetate metabolism genes *aceA*, *SMc00767*, and *glcB*.** *Journal of Bacteriology* 2007, **189**: 5875-5884.
78. Aoshima M, Ishii M, Yamagishi A, Oshima T, Igarashi Y: **Metabolic characteristics of an isocitrate dehydrogenase defective derivative of *Escherichia coli* BL21(DE3).** *Biotechnology and Bioengineering* 2003, **84**: 732-737.
79. Salazar E, Diaz-Mejia JJ, Moreno-Hagelsieb G, Martinez-Batallar G, Mora Y, Mora J *et al.*: **Characterization of the NifA-RpoN regulon in *Rhizobium etli* in free life and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*.** *Applied Environmental Microbiology* 2010, **76**: 4510-4520.
80. Higareda-Almaraz J, Enriquez-Gasca M, Hernandez-Ortiz M, Resendis-Antonio O, Encarnacion-Guevara S: **Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective.** *BMC Systems Biology* 2011, **5**: 96.
81. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: **Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.** *Electrophoresis* 1999, **20**: 3551-3567.
82. The UniProt Consortium: **The universal protein resource (UniProt).** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**: D190-D195.

Figures Legends

Figure 1- Central metabolic reactions of strain JM101 growing on glycerol and relative gene transcription values as compared to the same strain grown on glucose.

Metabolites abbreviations: Gly, glycerol, Gly3P glycerol-3-phosphate, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; F1,6P, fructose-1,6-biphosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; G1,3P, 1,3 biphosphoglycerate; 1,3-BGP, 1,3-biphosphoglycerate; 3PG, 3-phosphoglycerate; 2PG, 2-phosphoglycerate; PEP, phosphoenolPyruvate; PYR, Pyruvate; 6PGLN, 6-phosphoglucono- δ -lactone; 6PGNT, 6-phosphogluconate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; Xu5P, xylulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; E4P, erythrose-4-phosphate; Ac-CoA, acetyl coenzyme A; Ac-P, acetyl phosphate; A-AMP, acetyl-AMP; CIT, citrate; ICT, isocitrate; GOX, glyoxylate; α -KG, α -ketoglutarate; SUC-CoA, succinyl-coenzyme A, SUC, succinate; FUM, fumarate; MAL, malate; OAA, oxaloacetate; KDPGNT, 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate-6-phosphate.

Genes in red: upregulated.

Genes in green: underexpressed.

Figure 2A- Growth profiles and substrate utilization of the JM101 strain on glucose or glycerol and the mixture glucose-glycerol.

Figure 2B- Acetate production profiles of the JM101 strain on glucose or glycerol and the mixture glucose-glycerol.

Figure 3- Biomass kinetic and acetate consumption profiles in the JM101 strain grown on the mixture of glucose plus acetate (A) and glycerol plus acetate (B).

Figure 4- Specific activities of the piruvate kinases in strains carrying single inactivated *pykA* and *pykF* genes grown on glycerol as compared to the parental JM101 strain grown on glycerol.

Figure 5- Specific activities of some central metabolic enzymes of the JM101 strain grown on glycerol as compared to the specific activities of the same strain grown on glucose.

Figure 6- Biomass kinetic and indole production in the JM101 strain grown on glucose and glycerol.

Figure 7- Glycerol consumption patterns consumed and biomass, indole, acetic and lactic acid production in the strains JM101 and JM101 Δ *tnaA*.

Tables

Table 1 Specific growth rates (μ) and stoichiometric parameters of the JM101 strain grown on single and mixtures of carbon sources.

Condition	μ hr^{-1}	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	q_s (mmolC /g _{dcw} *hr)	mmolC of acetate produced(+) or consumed (-)
JM101 glucose	0.69 (+/- 0.03)	0.013(+/-0.001)	51.831 (+/-) 2.22	+28.166

JM101 glycerol	0.49 (+/- 0.03)	0.014(+/-0.001)	34.262 (+/-) 2.22	No detected
JM101 glucose-glycerol	0.72 (0.45)	0.0171 (0.006)	43.11 (8.55)	+4.14
JM101 glycerol-acetate	0.43 (+/- 0.06)	0.011(+/-0.002)	39.49 (+/-) 2.22	-11.00
JM101 glucose-acetate	0.72(+/-).01, 0.1(+/-)0.01	0.013(+/-0.001)	55.38(+/-)4.13	+6.00

Table 2. Relative transcription levels determined by RT-qPCR of several group of genes from strain JM101 grown on glycerol.

For each gene in all strains, the transcription level of the gene for the parental JM101 strain grown on glucose was used as the control to normalize the data using the wild-type RT-qPCR value for that gene as one. Results presented are the averages of three independent measurements of the RT-qPCR expression values for each gene. Expression levels as $2^{-\Delta\Delta CT}$, see materials and methods. Relative mRNA concentrations of central metabolism and regulatory genes of JM101, PB11 and PB12 strains, and their derivatives grown in glycerol as the only carbon source, determined by RT-qPCR.

Glycolysis

aceE 0.67 + 0.17
aceF 0.80 + 0.22
eno 0.86 + 0.12
fbaA 1.52 + 0.09

Gluconeogenic, anaplerotic glyoxylate shunt

aceA 1.97 + 0.39
aceB 1.95 + 0.06
ackA 1.49 + 0.28
acs 4.16 + 0.34

TCA cycle

acnA 1.58+0.26
acnB 4.71+0.47
fumA 2.44+0.45
fumB 7.49+0.40

fbxB 2.76 + 0.22
gapA 0.72 + 0.06
gapC-1 1.31 + 0.10
gapC-2 3.19 + 0.67
glk 3.81 + 0.14
gpmA 0.90 + 0.09
lpdA 0.56 + 0.05
pfkA 1.91 + 0.22
pfkB 2.15 + 0.01
pgi 1.58 + 0.37
pgk 1.08 + 0.13
pykA 1.77 + 0.10
pykF 0.98 + 0.09
tpi 1.36 + 0.10

fbp 1.51 + 0.10
glcB 1.81 + 0.56
glcC 1.81 + 0.28
maeB 1.23 + 0.01
pckA 5.56 + 1.77
poxB 7.33 + 0.56
ppc 1.11 + 0.14
pta 2.10 + 0.23
ppsA 1.26 + 0.22
sfcA 2.05 + 0.34

fumC 0.34+0.10
gltA 0.76+0.02
icd 0.47+0.1
mdh 0.65+0.10
sdhA 1.04+0.01
sdhB 1.37+0.42
sdhC 0.92+0.05
sdhD 1.13+0.21
sucA 0.81+0.13
sucB 0.80+0.23
sucC 0.79+0.07
sucD 1.36+0.13

Regulators

arcA 1.25+0.29
arcB 4.45+0.56
creB 3.19+0.55

Perthrose phosphate Entner- Doudoroff

cpdA 1.71+0.12
csrA 1.03+0.14
csrB 0.48+0.10
edaA 1.83+0.39
eddA 4.45+0.39
eddB 3.80+0.90
ielA 0.59+0.17
ielB 0.69+0.25
hitA 1.78+0.95
katR 0.59+0.16
pntG 0.84+0.06
rpoS 1.04+0.22

Transporters/porine

actP 13.49+1.31
aroP 1.61+0.00
shiA 0.75+0.02
ompC 0.17 + 0.01
ompL 2.17 + 0.21

Gal/Lam-Regulon

galP 5.05+0.26
galR 0.38+0.13
galS 0.57+0.01
galT 0.49+0.00
lamB 1.36+0.30
mglB 5.05+0.58
mglC 2.28+0.12
malE 1.77 + 0.20
pgm 2.37+0.62

Others

cpdA 1.64 + 0.32
gdhA 1.13 + 0.00

Respiration, transhydrogenases

frdA 1.58+0.15
frdB 1.73+0.11
frdC 4.68+0.21
frdD 2.01+0.34
pntA 0.69+0.03
udhA 4.89+0.88

Glycerol uptake

glpF 7.16 + 0.15
glpK 5.60 + 0.87
glpD 1.26 + 0.25
glpR 2.40 + 0.06

Aromatic pathway

aroA 0.81 + 0.03
aroB 1.98 + 0.59
aroC 1.34 + 0.02
aroD 3.29 + 0.07
aroE 5.47 + 0.16
aroF 1.32 + 0.08
aroG 0.50 + 0.13
aroH 1.36 + 0.13
aroK 1.01 + 0.07
aroL 2.48 + 0.09

Table 3. Proteins differentially produced in the JM101 strain grown on glycerol as compared to its grown on glucose.

Spots intensities were quantified using ProQuest software on three experiments. Only reproducible phenotypes, with a Student's t test value of $p \leq 0.05$, are shown. The additional files contains other important proteomic parameters.

Protein Name	Ratio
Argininosuccinate synthase (ArgG)	0.37
Cytidine diaminase (Cdd)	6.97
Fumarate hydratase classI (FumA)	2.38
Galactose-Glucose binding protein (MglB)	81.02
Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GlpD)	5.18
Glycerol kinase (GlpK)	16.18
Glutamina sintetasa (GlnA)	0.31
GTP-binding protein (TypA)	0.44
Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein (ArgT)	2.57
Outer membrane porin C (OmpC)	0.32
Malate dehydrogenase (Mdh)	2.00
Periplasmic maltosa binding protein (MalE)	7.06
Phage lambda receptor protein (LamB)	6.94
PhosphoenolPyruvate carboxykinase (Pck)	9.17
Phosphotransferase system enzyme I (Pts I)	0.23
Purine nucleotide phosphorylase (DeoD)	2.08
Tagatose-bisphosphate aldolase (GatY)	55.83
Talosa B (TalB)	1.63
Tryptophanase (TnaA)	17.03
Uridine phosphorylase (Udp)	7.41

Table 4. Specific growth rates (μ) and stoichiometric parameters of the JM101 strain and derivative mutants grown on glycerol.

Strain	μ hr^{-1}	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	q_s (mmolC /g _{dcw} *hr)	gr/L acetate-time of fermentation detected
JM101	0.47 (+/- 0.03)	0.014(+/-0.001)	34.262 (+/-) 2.22	No detected

JM101 <i>rpoS</i> -	0.44 (+/- 0.02)	0.018 (+/- 0.002)	24.790 (+/-)2.57	No detected
JM101 <i>pykA</i> -	0.46 (+/-0.02)	0.015 (+/-0.001)	30.33(+/-)0.120	No detected
JM101 <i>pykF</i> -	0.46(+/-0.02)	0.014(+/- 0.002)	31.42(+/-)1.00	No detected
JM101 <i>poxB</i> -	0.44 (+/- 0.01)	0.012 (+/- 0.001)	35.499 (+/- 2.13)	0.14-(3)
JM101 <i>pckA</i> -	0.45(+/-0.03)	0.014(+/-0.001)	33.32 (+/-4.55)	0.12-(3)
JM101 <i>galP</i> -	0.49 (+/-0.01)	ND	ND	ND
JM101 <i>tnaA</i> -	0.48(+/-0.02)	0.012 (+/- 0.001)	33.333 (+/-) 3.3	0.37
JM101 <i>ppc</i> -	No growth			

Table 5. Specific growth rates (μ) and stoichiometric parameters of the JM101 strain and derivative mutants grown on glucose.

Strain	μ hr ⁻¹	$Y_{x/s}$ (g/mmolC)	Q_s (mmolC /g _{dcw} *hr)	gr/L acetate-time of fermentation detected
JM101	0.69 (+/- 0.03)	0.013(+/-0.001)	51.831 (+/-) 2.22	0.5-1
JM101 <i>rpoS</i> -	0.71 (+/- 0.01)	0.013 (+/- 0.004)	54.54 (+/- 8.34)	0.5-1
JM101 <i>poxB</i> -	0.68 (+/-0.04)	0.014 (+/-0.002)	50.712(+/- 2.50)	0.4-1
JM101 <i>pykF</i> -	ND	ND	ND	
JM101 <i>pykA</i> -	ND	ND	ND	
JM101 <i>pckA</i> -	0.62(+/-0.09)	0.023(+/-0.011)	50.66(+/-16.82)	0.7-1
JM101 <i>galP</i> -	0.69 (+/-0.03)	ND	ND	
JM101 <i>tnaA</i> -	ND	ND	ND	
JM101 <i>pckA</i> -	0.49	ND	ND	
JM101 <i>ppc</i> -	No growth			

Table 6. Specific growth rates (μ) of the JM101 strain cultures grown on glycerol when C4 compounds and aminoacids were included in the cultures.

Condition	μ hr ⁻¹
JM101	0.49
JM101+glutamine	0.54
JM101+glutamate	0.48
JM101+malate	0.56
JM101+succinate	0.54
JM101+arginine	0.50
JM101+aspartate	0.52
JM101+lysine	0.44
JM101+asparagine	0.50
JM101+citrate	0.45

Table 7. Central metabolic genes overexpressed or underexpressed during grown on glycerol. Certain regulators which are involved in the expression of these genes are also included.

Gene name	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Rpos	FruR	Crp	ArcA	FNR
<i>aceA</i>	1.97+0.39		(+)	(-)	(-)	
<i>aceB</i>	1.95+0.06		(+)	(-)	(-)	
<i>aceE</i>	0.67+0.17	(-)		(+)	(-)	
<i>acnA</i>	1.58+0.26	(+)	(+)	(+)	(-)	
<i>acnB</i>	4.71+0.47		(-)	(+)	(-)	
<i>acs</i>	4.16+0.34	(+)		(+)		
<i>actP</i>	13.49+1.31	(+)		(+)		
<i>aroG</i>	0.50+0.13					
<i>eda</i>	1.83+0.29		(-)			
<i>edd</i>	4.45+0.29		(-)			
<i>fbaA</i>	1.52+0.09	(+)	(-)	(+)		
<i>fbaB</i>	2.76+0.22	(+)				
<i>frdA</i>						(+)
<i>frdB</i>						(+)
<i>frdC</i>						(+)
<i>frdD</i>						(+)
<i>fumA</i>	2.44+0.45		(-)	(+)		
<i>fumB</i>	7.49+0.40			(+)	(+)	
<i>gapC-2</i>	3.19+0.67					(+)
<i>glcB</i>	1.81+0.56				(-)	
<i>glk</i>	3.81+0.14	(+)	(-)			
<i>glpF</i>				(+)		
<i>glpK</i>				(+)		
<i>glpD</i>				(+)	(-)	
<i>lpdA</i>	0.56+0.05	(+)		dual	(-)	
<i>mdh</i>				(+)	(-)	
<i>ompC</i>			(+)			
<i>pckA</i>	5.56+1.77	(+)	(-)			
<i>pfkA</i>	1.91+0.22	(+)				
<i>pfkB</i>	2.15+0.01	(+)				
<i>pgi</i>	1.58+0.37	(+)				
<i>poxB</i>	7.33+0.56	(+)				
<i>pta</i>	2.10+0.23					Not know
<i>talA</i>		(+)				

Table 8 - Strains used in this report.

Strains	Relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i> JM101	F' <i>traD36 proA+ proB+ lacIq lacZ_M15/supE thi_(lac-proAB)</i>	[20,65]
<i>E. coli</i> JM101 <pck<sup>-</pck<sup>	JM101 <pck::cat< td=""> <td>This work</td> </pck::cat<>	This work
<i>E. coli</i> JM101ppc ⁻	JM101ppc::cat	This work
<i>E. coli</i> JM101pykA ⁻	JM101pykA::cat	This work
<i>E. coli</i> JM101pykF ⁻	JM101pykF::cat	This work
<i>E. coli</i> JM101tnaA ⁻	JM101tnaA::cat	This work
<i>E. coli</i> JM101poxB ⁻	JM101poxB::cat	[16]
<i>E. coli</i> JM101rpoS ⁻	JM101rpoS::tc	[83]

Table 9 - Oligonucleotides utilized in this report (gene inactivations and RT-qPCR)

A. Oligonucleotides used for comprobe gene inactivations.		
<i>pckA</i>	pckAFw	CAG GAA TGC GAT TCC ACT CA
	pckARv	GTG CAG CGT ATC GTG GAT AA
<i>ppc</i>	ppcFw	GCA TCT TAT CCG ACC TAC AC
	ppcRv	GCC TGT AGC AGA GTA GAG AA
<i>pykA</i>	pykAFw	CTG AAG GAA TCG CGT CGT TTT GA
	pykARv	CGG CGG ATG AAT GAA GAA
<i>pykF</i>	pykFor	ACA AGC ACA CAT TCC TCT GCA
	pykRev	AAA ACA GGA TGC TTC CAT CG
<i>tnaA</i>	tnaAFw	TTC TGT AGC CAT CAC CAG AG
	tnaARv	CCG GCA AGA TCA ACA GGT AA
<i>galP</i>		

B. Oligonucleotides used for RT-qPCR assays*		
<i>udhA</i>		
<i>pntA</i>		
<i>cpdA</i>		
<i>glpD</i>		
<i>glpF</i>		
<i>glpK</i>		
<i>spot</i>	spoTa	ATCCGATCTCTCCCGGATG
	spoTb	GCACTGCATAAGCGAAGTCG
*The sequences of the oligonucleotides of the remaining utilized genes in table 2, have been published previously [10].		

Additional file 1. This figure includes the positions of the amplification curves for the *ihfB* gene and the Ct values of this gene (Materials and methods), in the different strains employed in this study. As can be seen, all the amplification curves of the *ihfB* gene that have been used as the reference gene, have very similar values. The values presented in the table are from five different fermentations of each strain. These results demonstrate that the same reproducible expression levels are obtained for the *ihfB* gene in all strains. This is the most Important characteristic that a reference gene should have, accordingly to the MIQE guidelines [71]. These results corroborate the stability of the expression of the reference *ihfB* gene in these strains in the utilized conditions.

Additional file 2.

This file contains important proteomic parameters for identified the proteins (Gi, Score, Mw, pI, %cov, EC number, gene ID).

Extracción-purificación de DAHP y condiciones cromatográficas de HPLC

La cepa PB12 $aroB$ /pRW300 $aroG^{fbr}$, pCL $tktA$ proveniente de un preinóculo en LB, se cultivó por 12 horas a 37°C en medio ARO (o M9 modificado) con 10gr/l de glucosa. El cultivo se centrifuga a 8,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se colecta y se liofiliza de inmediato (se puede guardar a -20°C por periodos no más largos de un mes).

El liofilizado se guarda en ausencia de humedad a -20°C y en ausencia de luz. El polvo se resuspende en metanol, en un tratamiento fraccionado de cuatro partes iguales del solvente con un volumen final de la mitad del volumen original del crudo. Después de una agitación vigorosa la fracción soluble se filtra en membrana de 0.22 micras por vacío, el líquido de color ocre se deja secando al vacío a no más de 40°C y en ausencia de luz.

Por último los restos secados son resuspendidos en fase móvil de HPLC (ácido sulfúrico 5 mM). En las condiciones de HPLC mencionadas en materiales y métodos, se obtuvo y aisló un pico a 9.17 minutos, cuyo patrón de absorción en UV presenta dos picos: uno a 212.4 nm y otro a 316.1 nm.

El pico dió positivo a ácido tiobarbitúrico medido por ensayo colorimétrico. Se hicieron curvas estándar a partir de este pico aislado.