



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE UNA CEPA DE
ESCHERICHIA COLI (PTS⁻GLC⁺) PRODUCTORA DE
SHIKIMATO EN FERMENTADOR EN MEDIO
ENRIQUECIDO USADO PARA PRODUCCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

LARISA CORTÉS TOLALPA

Tutor: ADELFO ESCALANTE LOZADA

CUERNAVACA, MORELOS.

AGOSTO/2012



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 departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

Este proyecto fue financiado por los proyectos CONACyT FONSEC Salud Proyectos 44126, 126793, 12679, CONACyT Ciencia Básica 105782 y 106428, DGAPA-PAPIIT IN227409 PAPIIT IN224110, IN205811 y IN206812.

El CONACyT financio económicamente a Larisa Cortés Tolalpa a través de su programa de becas de posgrado.

Agradecimientos

Al Dr. Adelfo Escalante por permitirme participar en este proyecto.

A la Dra. Rosa M. Gutiérrez por el apoyo bioinformático en el análisis de datos.

A la Q.I. Luz María Martínez Mejía por el apoyo técnico recibido en la extracción de RNA total.

A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su apoyo en el desarrollo de métodos en HPLC.

Al M. C. Ramón de Anda por el apoyo técnico recibido en el uso de fermentadores.

Índice

Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
Nomenclatura y abreviaciones	viii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
3.1 Vía del shikimato	4
3.2 Ingeniería de vías metabólicas sobre <i>Escherichia coli</i> para la producción de shikimato.....	6
3.2.1 Obtención de la cepa PB12 (PTS ⁻ glc ⁺)	6
3.2.2 Generación y caracterización de las cepas sobreproductoras de shikimato	7
3.3 Análisis Transcriptómico	11
V. HIPÓTESIS	14
VI. OBJETIVO GENERAL.....	14
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
VIII. MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	15
8.1 Fermentación	15
8.2 Determinación de compuestos aromáticos y ácido acético	17
8.3 Cuantificación de glucosa	18
8.4 Determinación de 3-D- <i>arabino</i> heptulosonato-7P (DAHP)	18
8.5 Extracción de RNA en fase exponencial y estacionario en medio de producción de SHK	18
8.6 Obtención de las bases de datos (Realizado por la compañía Precision Biomaker)	21
8.7 Pre-procesamiento de microarreglos para la obtención de datos	23
8.8 Obtención de los genes con expresión diferencial	24
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
9.1 Caracterización fisiológica de la cepa, obtención de los parámetros cinéticos y determinación de metabolitos aromáticos.....	26
9.2 Extracción de RNA total.....	30
9.3 Resultados del análisis transcriptómico global de la PB12.SA22 en medio de producción	32
9.3.1 Genes diferencialmente expresados en exponencial, resultados y discusión	34
9.3.2 Genes diferencialmente expresados en estacionario, resultados y discusión	54
9.3.4 Metabolismo Central de Carbono y vía del shikimato.....	65
9.3.5 Participación del indol en el sistema de producción de SHK	69
9.3.6 Síntesis de glicógeno en el sistema de producción de SHK.....	72
X. CONCLUSIONES	72

XI. PROPUESTAS Y PERSPECTIVAS.....	74
XII. REFERENCIAS.....	76
XIII. ANEXOS.....	81

Índice de figuras

Figura 1. Vía del shikimato en <i>E. coli</i>	5
Figura 2. Genotipo de las cepas PB12.SA22	9
Figura 3. Hibridación, lavado y teñido de las sondas para hibridación.....	22
Figura 4 Cinética de crecimiento de la cepa PB12.SA22.....	26
Figura 5. Consumo de aminoácidos aromáticos de la cepa PB12.SA22.....	27
Figura 6. Producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA22.....	29
Figura 7. Electroforesis de agarosa de RNA.....	30
Figura 8. Niveles de expresión relativa de los genes del Metabolismo Central de carbono y vía de aromáticos.....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Producción de metabolitos aromáticos y rendimiento de aromáticos totales.....	10
Tabla 2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plásmidos usados en este trabajo.....	15
Tabla 3. Composición del medio mineral.....	16
Tabla 4. Suplementos y antibióticos utilizados.....	16
Tabla 5. Composición de la solución de metales traza.....	16
Tabla 6. Condiciones de operación de fermentación.....	17
Tabla 7. Velocidad específica del consumo de aminoácidos aromáticos.....	27
Tabla 8. Determinación de metabolitos aromáticos y rendimiento de compuestos aromáticos totales de la cepa PB12.SA22 en fermentador.....	29
Tabla 9. Extracción de RNA de PB12.SA22.....	31
Tabla 10. Número/categorías de genes diferencialmente expresados en la cepa PB12.SA22.....	33
Tabla 11. Genes sobre expresados en EXP respecto a STA1(30 genes con la mayor sobre expresión).....	42
Tabla 12 Genes subexpresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados).....	45
Tabla 13 Genes sobre expresados en EXP respecto a STA2 (30 genes con la mayor sobre expresión).....	48
Tabla 14 Genes subexpresados en EXP respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados).....	51
Tabla 15. Genes sobre expresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes con la mayor sobre expresión).....	59
Tabla 16. Genes subexpresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados).....	62

Nomenclatura y abreviaciones

Cepas

JM101 (<i>supE</i> , <i>thi</i> , δ (<i>lac-proAB</i>) ⁻ , F')	JM101
MG1655	Cepa de <i>Escherichia coli</i> K-12 no patógena
PB11 (PTS-glc ⁻)	PB11
PB12 (PTS-glc ⁺)	PB12
PB12.SA22 (PTS ⁻ glc ⁺ <i>aroL</i> ⁻ <i>aroK</i> <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i> <i>aroE</i>)	PB12.SA22

Vías metabólicas

MCC	Metabolismo central del carbono
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
PPP	Vía de las pentosas fosfato

Metabolitos intracelulares

SHK	Shikimato
DAHP	3-deoxy-D- <i>arabino</i> heptulosonato 7-fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
E4P	Eritrosa-4-fosfato
DHQ	Dehidroquinato
DHS	3-dehidroshikimato
S3P	Shikimato 3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
TRP	Triptófano
PHE	Fenilalanina
TYR	Tirosina
GA	Ácido gálico
AAc	Ácido acético
A5F	Adenosin-5-fosfosulfato
F5F	Fosfoadenosin-5-fosfosulfato
GMP	Guanosin 5'-monofosfato

ppGpp	Guanosin pentafofato
IMP	Inosin monofosfato
cAMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
G3P	Glicerol-3-fofato
LPS	Lipopolisacáridos
FBP	Fructosa 1,6-bisfofato
F6P	Fructosa-6-fofato
GAP	Gliceraldehído-3-fofato
1,3-BPG	1-3 bifosfoglicerato
3PG	3-fofoglicerato,
2PG	2-fofoglicerato
Ac-CoA	Acetil-CoA
Acetyl-P	Acetil fosfato
MAL	Malato
FUM	Fumarato
SUC	Succinato
SUC-CoA	Succinil-CoA
A-KG	Alfa cetoglutarato
ICT	Isocitrato
CIT	Citrato
OXA	Oxalacetato
6PGNL	Glucono- δ -lactona-6-fofato
6PGNT	6-fofo-D-gluconato
RU5P	D-ribulosa-5-fofato
X5P	D-xilulosa-5-fofato
R5P	D-ribosa-5-fofato
S7P	Septoheptolusonato

EPSP 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato

Fuentes de carbono

glc Glucosa

YE Extracto de levadura

Parámetros estequiométricos

μ Velocidad específica de crecimiento [h^{-1}]

$Y_{p/s}$ Rendimiento de producto [$\text{molSHK molglc}^{-1}$]

DWC Peso seco [g]

q_s Velocidad de consumo específico de glucosa [molglc DWC h^{-1}]

TA Compuestos aromáticos totales: ácido shikímico, 3-deoxy-D-*arabino*heptuloseonato 7-fosfato, ácido 3-dehidroshikímico, y ácido gálico [mol]

RTA Rendimiento total de aromáticos [molTA glc^{-1}]

Microarreglos

ATG Análisis Transcriptómico Global

PB Precision Biomaker

IVT Transcripción in vitro

cRNA RNA biotilado

cDNA Complementaria

pb Pares de bases

RMA Robust Multi-array Average

Cuantil Normalización por quantile

FDR False Discovery Rate

EXP Exponencial

STA1 Estacionaria temprana

STA2 Estacionaria tardía

RP Productos de Rankeo

NC Factor transcripcional no conocido

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

SE	Sobre expresado
RE	Reprimido
Otros	
DAHPS	DAHPS sintasa aspartato
ATCase	Carbamoiltransferasa
PAR	3-fosfo-adenililsulfato reductasa
PfkA	6-fosfofructosa cinasa 1
CRP	Proteína receptora de cAMP
sRNA	RNA pequeño
OSF	Oseltamivir fosfato
DO _{600nm}	Densidad óptica, absorbancia determinada a 600nm
IVM	Ingeniería de vías metabólicas
PTS	Sistema de fosfotransferasa
TFA	Trifloroacético
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
min	minutos
OD _{260/280nm}	Ratio de absorbancia a 260 nm y 280 nm, proporción entre ácidos nucleicos y proteínas, fenol o contaminantes
OD _{260/230nm}	Ratio de absorbancia a 260 nm y 280 nm, proporción entre ácidos nucleicos y proteínas
ABC	ATP-Binding Cassette
nt	Nucleótido
AR1	Sistema de ácido resistencia dependiente de glucosa
AR2	Sistema de ácido resistencia dependiente de glutamato
AR3	Sistema de ácido resistencia dependiente de L-arginina
SRP	Partícula de reconocimiento
QSS	Señales de quorum sensing
MDR	Sistema de exporte multidrogas

I. RESUMEN

El shikimato es un metabolito utilizado como materia prima para la producción de oseltamivir fosfato, un antiviral comercializado con el nombre de Tamiflu®. La producción de shikimato mediante vía microbiana ha cobrado importancia debido a que representa una forma de obtención mas económica y rápida, que con respecto a la extracción tradicional a partir de los frutos de anís estrella china, *Illicium verum*. La cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22 con genotipo $PTS^{-}glc^{+} aroL^{-} aroK^{-} aroG^{fbr} tktA aroB aroE$, es la mejor cepa sobreproductora de shikimato reportada hasta el momento. No existen reportes sobre estudios globales (genes, proteínas o metabolitos) de las cepas PTS^{-} productoras de SHK en medio enriquecido. El objetivo de este trabajo es realizar el primer análisis transcriptómico global de la cepa PB12.SA22 en medio de producción. La metodología consistió en lo siguiente: se extrajo el RNA total de células de un cultivo en lote de la cepa productora en la etapa exponencial, estacionaria temprana y estacionario tardía por triplicado. Mediante el uso de microarreglos de alta densidad, Affimetrix, se obtuvo el transcriptoma global de cada etapa y se realizaron comparaciones entre cada etapa. En estado exponencial el transcriptoma de la cepa PB12.SA22 está caracterizado por la expresión de genes que responden a un aumento en el nivel intracelular de cAMP, señal de estrés a limitación de carbono, así como la expresión de genes que responden a limitación de fierro y la subexpresión de genes en respuesta al aumento de indol, probablemente derivado del catabolismo del triptófano. La cepa PB12.SA22 no acumula acetato por lo que se propone que lo utiliza para sintetiza cAMP por medio de la acetil-CoA sintetasa codificada por el gen *acs*. Dado lo anterior se propone que la cepa presenta un metabolismo gluconeogénico. La baja actividad de RpoS parece favorecer la expresión de sistemas de transporte permitiéndole internalizar todo tipo de fuentes de carbono secundaria del extracto de levadura para el crecimiento, lo que coincide con un consumo bajo de glucosa durante esta etapa. cAMP junto con la proteína Cra podrían ser los principales coordinadores de la expresión durante esta etapa. En estado estacionario se sobre expresa genes característicos en respuesta a estrés derivado de la producción del metabolito, el medio de cultivo y el aumento de compuesto de desecho. También se observó la sobre expresión de todos los genes de la vía de síntesis de la arginina, lo que sugiere una alta demanda de nitrógeno. La cepa probablemente presenta un metabolismo mayormente glucolítico, por lo que se observa el consumo del 80% de la glucosa adicionada. Que coincide con el aumento de la expresión de los genes de la glucolisis. La respuesta transcriptómica en estado estado estacionario esta coordinada por GadE, ArgR y RpoS. Los genes de la vía de shikimato clonados en los plásmido permanecen con expresión alta y constante a lo largo de la fermentación, por lo que se propone que la limitante en la producción está relacionada con la actividad enzimática y no con la transcripción de dichos genes.

II. INTRODUCCIÓN

El shikimato (SHK) es una molécula de conformación cíclica con tres centros asimétricos, compuesta de 7 carbonos (Figura 1), por lo que puede considerarse un bloque de construcción enantioméricamente puro (Krämer *et al.*, 2003). La producción de SHK por vía microbiana ha cobrado importancia debido a que puede ser utilizado como materia prima para la producción de oseltamivir fosfato (OSF) producto comercializado por la farmacéutica Hoffman-La Roche con el nombre de Tamiflu® (Krämer *et al.*, 2003). El OSF es un selectivo y potente inhibidor de la enzima neuraminidasa localizadas en la superficie de los virus de la influenza. Su actividad evita la liberación de partículas virales recientemente formadas de los virus de tipo A y B, del virus de la influenza aviar H5N1 y recientemente del virus de influenza humana A/H1N1 (Huang *et al.*, 2008). La producción por vía microbiana es una alternativa que disminuye el tiempo de obtención y costo del SHK en comparación con el proceso tradicional, extracción a partir de frutos del anís estrella chino (*Illicium verum*).

A partir de 1999, Hoffman-La Roche incrementó la producción de SHK para asegurar una reserva importante en previsión de una posible pandemia de gripe aviar, sin embargo, se ha estimado que en caso de presentarse este escenario, la producción del antiviral sería insuficiente para atender los requerimientos de la población mundial, particularmente en países en vías de desarrollo como es el caso de México (Abbot, 2005; Luo, 2006). La pasada pandemia de la Influenza tipo A (subtipo H1N1) hizo evidente que la producción de OSF es insuficiente para abastecer las necesidades del compuesto. Ante esta situación, es importante contar con distintas capacidades locales y regionales para producir el antiviral por medio de aproximaciones biotecnológicas; una de ellas es la utilización de cepas bacterianas mejoradas genéticamente. Con este fin, se han aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) la cual se define como el mejoramiento de la capacidad de síntesis para formar un producto de interés a través de la modificación de reacciones metabólicas específicas, o de la introducción de nuevas, mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante (Stephanopoulos, 1999), sobre la bacteria *Escherichia coli*, para la producir SHK en cultivos en sistemas de fermentación utilizando glucosa como fuente de carbono.

Las principales aproximaciones utilizadas incluyen: la canalización del carbono a vías específicas para incrementar la disponibilidad de los intermediarios del metabolismo central de carbono (MCC), fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P), que son precursores del SHK; la interrupción de la

vía de compuestos aromáticos hasta el nodo de SHK, mediante la inactivación de los genes *aroK* y *aroL*, los cuales codifican a las shikimate cinasas I y II, respectivamente, para que se acumule SHK; así como la inactivación del gen *shiA*, que codifica para un transportador que internaliza SHK, con el objetivo de prevenir el reingreso del metabolito y su consumo una vez importado al interior de la célula (Draths, 1999, Krämer *et al.*, 2003; Adachi *et al.*, 2006).

Ya que hasta este momento la cepa de *E. coli* PB12.SA22 presenta el mayor rendimiento de SHK reportado y que no existen reportes sobre estudios globales (genes, proteínas o metabolitos) de las cepas PTS⁻ productoras de SHK en medio enriquecido, el análisis transcriptómico global es una interesante aproximación de estudio que podría proporcionar información relevante acerca del metabolismo de la cepa en medio de producción, este conocimiento podría utilizarse para identificar genes relacionados directa o indirectamente en la síntesis de SHK y que pudieran ser blancos potenciales a modificación para mejorar la producción, tales como genes reguladores, genes relacionados al estrés provocado por el medio de producción, la auxotrofia de compuestos aromáticos provenientes de la vía del SHK, etcétera.

III. ANTECEDENTES

3.1 Vía del shikimato

En *E. coli*, la vía del SHK o vía común de compuestos aromáticos inicia con la condensación del PEP, proveniente de la glucólisis, y la E4P, proveniente de la vía de las pentosas fosfato, para generar 3-deoxy-D-*arabino* heptulosonato 7-fosfato (DAHP). Las isoenzimas DAHP sintasas (DAHPS) catalizan la reacción de condensación de PEP y E4P. La codensación de estos compuestos es el punto más importante de control del flujo de carbono en la síntesis de compuestos aromáticos. Las DAHPS son codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH*, su expresión es controlada por los represores TyrR, TrpR, mientras que la actividad de las enzimas está bajo el control de los efectores alostéricos: fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente (Herrman *et al.*, 1999). La DHQ sintasa (*aroB*) convierte el DAHP a 3-dehidroquinato (DHQ). Posteriormente, la DHQ deshidratasa (*aroD*) convierte el DHQ en 3-dehidroshikimato (DHS) y después a SHK por medio de SHK deshidrogenasa (*aroE*). La SHK deshidrogenasa es capaz de sintetizar ácido quínico (AQ) a partir de DHQ. Las shikimato cinasas I y II, codificadas por *aroK* y *aroL*, respectivamente, convierten el SHK en shikimato 3-fosfato (S3P) (Figura 1).

Mediante una serie de reacciones enzimáticas el SHK se convierte a corismato, este compuesto es el bloque de construcción para la formación de los aminoácidos aromáticos (AA), las quinonas, las menaquinonas y la enterobactina. Las quinonas y las menaquinonas son moléculas con una cadena lateral de isoprenos, con una estructura química similar a las vitaminas E y K, tienen la capacidad de alternar una forma oxidada a una reducida por lo que tienen la función de transportar electrones bajo condiciones aerobias. La enterobactina es un sideróforo de alta afinidad que le permite a *E. coli* atrapar y transportar hierro de ambiente (Pittard, 1996).

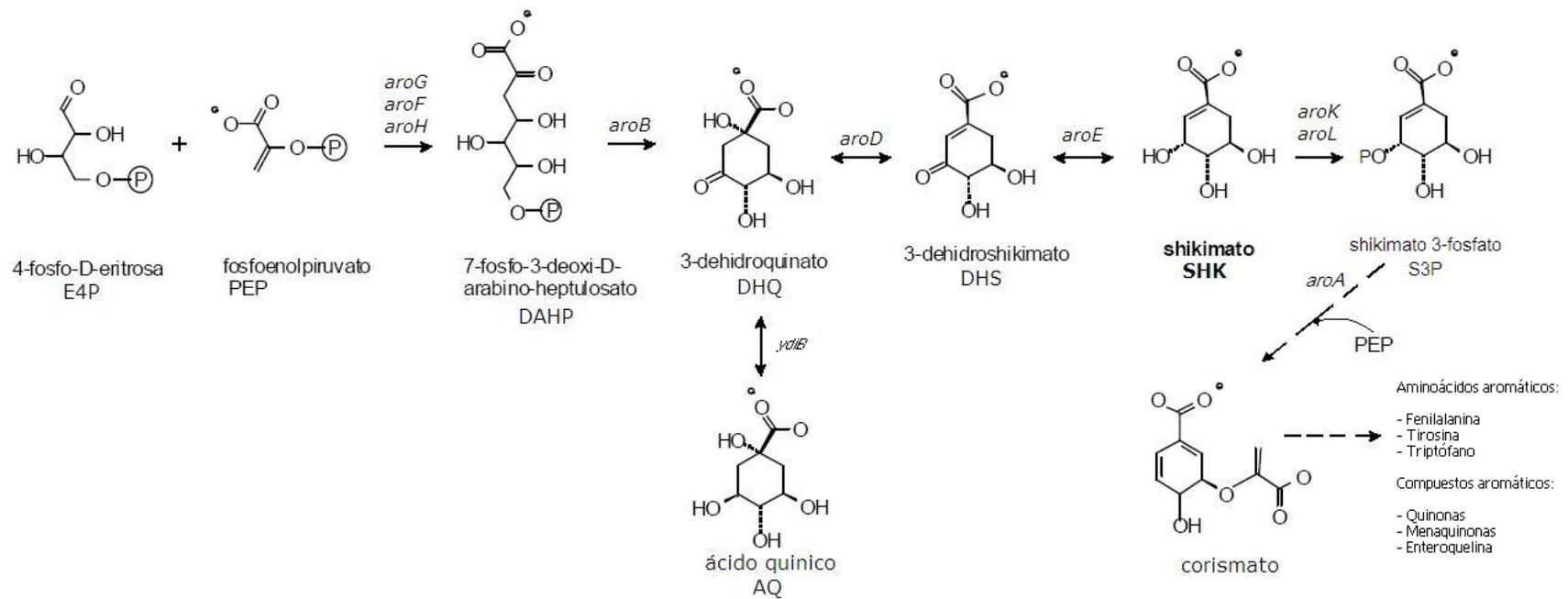


Figura 1. Vía del shikimato en *E. coli*.

Modificada de Calderón, 2011.

3.2 Ingeniería de vías metabólicas sobre *Escherichia coli* para la producción de shikimato.

En el grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se han aplicado diferentes estrategias de IVM, sobre el fondo genético de la cepa de *E. coli* PB12 (PTS⁻ glc⁺) (Flores *et al.*, 1996) para la obtención de cepas sobreproductoras de SHK. Las estrategias se presentan a continuación.

3.2.1 Obtención de la cepa PB12 (PTS⁻ glc⁺)

El sistema de fosfotransferasa (PTS) es el sistema de transporte de glucosa dependiente de PEP (PTS: glucosa: PEP) (Figura 2). Cuando *E. coli* crece en glucosa, el 50% del PEP generado en MCC se utiliza para internalizar glucosa mediante el sistema PTS. Como ya se mencionó, PEP es un intermediario importante en la síntesis de compuestos aromáticos, por lo que para evitar la pérdida de una molécula de PEP a la cepa JM101 se le inactivó el sistema PTS, lo que dio lugar a la cepa PB11 (PTS⁻ glc⁻) la cual presentó importantes afectaciones en su capacidad de crecimiento sobre glucosa (Flores N *et al.*, 1996).

La cepa PB11 se creció en un cultivo en quimiostato en medio mínimo y glucosa como única fuente de carbono. A través de un proceso de selección de variantes con crecimiento más rápido se obtuvo a la cepa PB12 (PTS⁻ glc⁺), la cual recuperó la capacidad de utilizar glucosa. En estudios iniciales se identificó que la cepa PB12 seleccionó el sistema de permesasa de galactosa (GalP) para internalizar la glucosa del periplasma y fosforilarla por medio de la enzima glucocinasa (Glc) codificada por el gen *glk* (Figura 2). Además la cepa PB12 presentó un flujo de carbono glucolítico y en TCA mayor que con respecto a las cepas PB11 y JM101 (Flores N *et al.*, 1996; Flores S *et al.*, 2002; Flores N *et al.*, 2007).

En un estudio reciente se analizó el genoma completo de la PB12 mediante la aplicación de dos metodologías de secuenciación, la técnica de secuenciación por comparación de genoma de NimbleGen y la secuenciación masiva de Illumina. La aplicación de estas técnicas permitió la identificación de importantes cambios genéticos ocurridos en la cepa PB12. Se encontró que la cepa presenta 23 mutaciones no sinónimas y 22 mutaciones sinónimas; además la cepa perdió 10328 pb de su genoma que corresponde a 12 genes, entre ellos *rppH*, *mutH*, y *galR*, los cuales se ha identificado son la principal razón de la recuperación en el crecimiento de la cepa evolucionada PB12. Como soporte a esta interpretación se inactivó el gen *rppH* en la cepa parental PB11 lo que provocó un aumento en su velocidad de crecimiento, probablemente debido al aumento de la estabilidad de los

mRNA de los genes glucolíticos. Mientras que la inactivación de *galR* permitió el transporte de glucosa mediante el transportador GalP al interior de la célula. Finalmente la inactivación de *mutH* es aparentemente la responsable de todas las mutaciones observadas. Dadas las características antes mencionadas a la PB12 se le ha considerado una cepa con una considerable plasticidad metabólica (Aguilar *et al.*, 2012).

Las características metabólicas de la PB12 la hacen una cepa con potencial para producir compuestos aromáticos, ya se ha utilizado para la producción de PHE (Báez-Viveros *et al.*, 2007)

3.2.2 Generación y caracterización de las cepas sobreproductoras de shikimato

Con el objetivo de incrementar el flujo de carbono hacia la síntesis de SHK en la cepa PB12 se realizaron las siguientes estrategias: se inactivaron los genes *aroL* y *aroK* que codifican para las shikimato cinasas I y II, respectivamente, con el objetivo de acumular el SHK y evitar su transformación a corismato. A continuación se inactivaron los genes *pykF* o *pykA*, que codifican para las piruvato cinasa Pyk I y Pyk II, respectivamente, con el fin de aumentar la disponibilidad de PEP, de esta manera se evita su transformación a piruvato (PYR). Posteriormente cada cepa derivada se transformo con los plásmidos pJLBaroG^{ibr}*tktA* y pTOPOaroBaroE. El gen *aroG^{ibr}* codifica para una DAHP sintetasa resistente a inhibición alostérica, la sobre expresión de este gen permite un importante incremento de flujo de carbono del MCC a la vía del SHK. El gen *tktA*, codifica para la transcetolasa I, la cual lleva acabo la transformación de la xilulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato a sedoheptulosa-7-fosfato o gliceraldehído-3-fosfato, la sobre expresión de este gen permite una mayor disponibilidad de E4P proveniente la vía de las pentosas fosfato. Por otro lado, la sobre expresión de los genes *aroB* y *aroE*, que codifican para las DHQ sintasa y SHK respectivamente, evitan la formación de compuestos aromáticos intermediarios, no deseados, como DHQ y DHS (Escalante *et al.*, 2010). Las cepas obtenidas y el rendimiento de SHK se encuentran en la Tabla 1.

Cada una de las cepas resultantes, descritas en el párrafo anterior, se caracterizó en cultivos de 50hr, en un sistema de fermentación en lote con un volumen de operación de 500 mL, a una temperatura de 37° y pH de 7, y se creció en un medio de producción con base mineral con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura (Escalante *et al.*, 2010). Los resultados de producción, el rendimiento de SHK y de otros intermediarios de la vía del SHK se muestran en la Tabla 1.

De las cepas obtenidas destacan la PB12.SA22 y PB12.SA31. La cepa PB12.SA22, bajo las condiciones de fermentación descritas anteriormente produce 7.05 g SHK/L, con un rendimiento de 28.2% el cual es ligeramente mayor a mejor valor reportado hasta el momento en la literatura (27%) (Chandran *et al.*, 2003). En el caso La cepa PB12.SA31 produce 4.83 g SHK/L con un rendimiento de 19.3%. Las cepas PB12.SA22 y PB12.SA31 alcanzaron un rendimiento de aromáticos totales de 37.5% y 40.9%, respectivamente, estos valores son superiores a el mejor rendimiento reportado en la literatura de 34% (Chandran *et al.*, 2003). Dados los rendimientos de compuestos aromáticos obtenidos por las cepas productoras PB12.SA22 y PB12.SA31 se considera que poseen características metabólicas que se pueden potenciar para la producción de SHK o sus intermediarios en sistemas de fermentación. Dado lo anterior se propone el estudio transcriptómico de la cepa PB12.SA22.

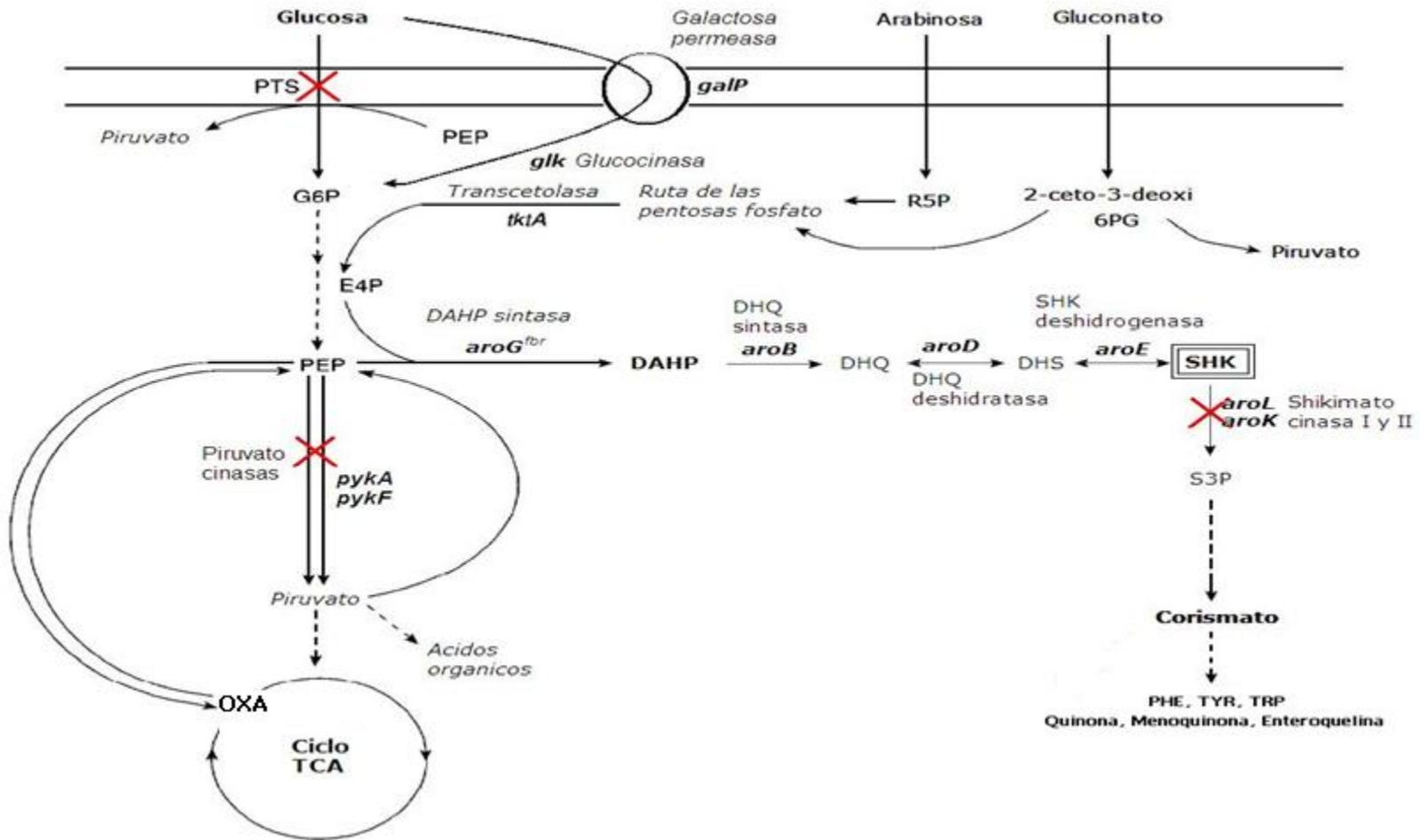


Figura 2. Genotipo de las cepas PB12.SA22

PB12.SA22 (*aroL⁻aroK⁻aroG^{obr}tktAaroBaroE*) PB12.SA31 (*aroL⁻aroK⁻pykFaroG^{obr}tktAaroBaroE*). PB12.SA41 (*aroL⁻aroK⁻pykA⁻aroG^{obr}tktAaroBaroE*). Plásmidos que aportan una copia adicional de genes: pJLB *aroG^{obr}/tktA* y TOPO *aroEaroB*. G6P (Glucosa-6-fosfato), PEP (fosfoenolpiruvato), TCA (Ciclo de los ácidos tricarbólicos), OXA (oxalacetato), S3P (shikimato 3 fosfato), TRP (triptófano), PHE (fenilalanina), TYR (tirosina).

Tabla 1. Producción de metabolitos aromáticos y rendimiento de aromáticos totales.

Cepa	SHK (g/L)	$Y_{p/s}$ (molSHK/molglc)	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	GA (g/L)	RTA (mol AT/ mol glc)
PB12 (PTS ⁻ glc ⁺)	ND	----	0.044±0.07	ND	ND	0.00
PB12.SA11 (PB12 <i>aroL</i> ⁻ <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i>)	2.82±0.01	0.11 ±0.00	1.71 ±0.07	2.79±0.21	0.21±0.06	0.28
PB12.SA21 (PB12 <i>aroL</i> ⁻ <i>aroK</i> <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i>)	5.07±0.00	0.21 ±0.00	0.52 ±0.00	2.49±0.06	0.14±0.00	0.33
PB12.SA22 (PB12 <i>aroL</i> ⁻ <i>aroK</i> <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i> <i>aroE</i>)	7.05±0.06	0.29 ±0.04	0.81 ±0.04	1.46±0.14	0.08±0.01	0.37
PB12.SA31 (PB12 <i>aroL</i> ⁻ <i>aroK</i> <i>pykF</i> <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i> <i>aroE</i>)	4.35±0.57	0.22 ±0.04	3.03±0.00	2.12±0.02	0.23 ±0.04	0.50
PB12.SA41 (PB12 <i>aroL</i> ⁻ <i>aroK</i> <i>pykA</i> ⁻ <i>aroG</i> ^{fbr} <i>tktA</i> <i>aroB</i> <i>aroE</i>)	1.00±0.36	0.03±0.02	0.14±0.00	0.79±0.01	ND	0.07

Los valores son la media de 2 experimentos independientes. Rendimiento total de aromáticos (RTA) incluye: Compuestos aromáticos totales (AT), ácido shikímico (SHK); glucosa (glc), 3-deoxy-D-arabinoheptuloseonato 7-fosfato (DAHP), ácido 3-dehidroshikímico (DHS) y ácido gálico (GA), no se detectó (ND). Tomada de Escalante *et al.* (2010).

3.3 Análisis Transcriptómico

Las aproximaciones tradicionales de la optimización de la biocatálisis para la producción de metabolitos de interés incluyen la obtención de cepas mutantes. Las mutaciones pueden ser sitio dirigidas o al azar modificando la vía de interés, MCC o cualquier otra. Dada la conectividad del metabolismo y intrincadas redes regulatorias, los cambios ocasionados por mutaciones pueden desencadenar directa o indirectamente respuestas transcripcionales diversas (Báez-Viveros *et al.*, 2007). En ocasiones estos cambios generan cepas con fenotipos inesperados, que no cumplen con los propósitos planteados en cuanto a la producción del metabolito, esto trae como consecuencia retrasos considerables en la obtención de la cepa sobreproductora. Actualmente se puede recurrir a la aplicación de herramientas *omicas*, las cuales permiten el análisis de la genética, el metabolismo y la fisiología de los microorganismos de forma global. Generalmente la primera aproximación global que se aplica sobre una cepa a modificar o una cepa modificada es el análisis transcriptómico global (ATG), debido a que la transcripción es el mayor determinante de las funciones y características fisiológicas celulares, ya que las bacterias regulan su expresión génica mayormente a nivel del inicio de la transcripción (Lockhart *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2001).

El análisis transcriptómico por microarreglos de alta densidad es una herramienta *omica* cuya información se puede utilizar para generar propuestas de mejora genética integrales, que tomen en cuenta la vía de interés, la regulación, etcétera. La aplicación de esta herramienta ha permitido puntualizar las estrategias de modificación genética minimizando el tiempo de obtención de las cepas genéticamente mejoradas y maximizando el rendimiento de diversos compuestos de interés. Por ejemplo la formación obtenida a partir de microarreglos de laminilla sobre una cepa *Corynebacterium glutamicum B6* productora de L-lisina permitió un incremento del 40% en la producción de L-lisina (Park *et al.*, 2008).

En relación a compuestos aromáticos, el análisis transcriptómico ha sido utilizado para estudiar la respuesta transcripcional de cepas sobreproductoras de metabolitos aromáticos como SHK y PHE, Johansson *et al.*, (2006) y Báez-Viveros *et al.*, (2007), respectivamente. Johansson *et al.*, (2006) realizó un ATG mediante microarreglos de alta densidad (Affimetrix) para elucidar la formación de productos intermediarios no deseados de la vía de SHK. En este trabajo la expresión de genes de la cepa sobre productora W3110.shik1 se comparó con la cepa control W3110 bajo una condición de limitación de carbono y fosfato. El análisis de las diferencias del nivel transcripción entre las dos cepas

se enfocó en el MCC y metabolismo de aminoácidos. Los resultados sugieren que la formación de compuestos intermediarios, bajo limitación de carbono, se explica por la sobre expresión de genes acoplados a la vía del SHK, *ydiB*, *aroF*, y *ydiN*. La información obtenida en este estudio se utilizó para proponer nuevas hipótesis acerca de la formación de intermediarios aromáticos no deseados en la producción de SHK en la cepa W3110.shik1 en medio limitado en carbono y fosfato.

Por otra parte Báez-Viveros *et al.*, (2007) realizó un estudio transcriptómico mediante PCR en Tiempo Real de cepas control, JM101, PB12 (PTS-glc+), PB13 (PTS-glc+) y cepas sobre productoras de PHE, JM101-ev2, PB12-ev2, PB13-ev2, las cuales se obtuvieron al clonar 3 plásmidos que contienen genes clave de la vía de biosíntesis de PHE (pJLBaroG^{fbr}, pCLtkt y pTrcpheA^{ev2}, el gen *pheA*^{ev2} codifica para una versión insensible de corismato mutasa/ pfenato deshidratasa) en el fondo genético de las cepas control con el objetivo de determinar la respuesta transcripcional a la ausencia del sistema PTS y la sobre expresión de los genes clonados en los plásmidos multicopia.

En el trabajo de Báez-Viveros *et al.*, (2007) se identificaron pasos potencialmente limitantes en la biosíntesis de PHE, por ejemplo se encontró que en las cepas PB12 y PB13 los genes *aroB*, *aroE* y *aroA*, gen que codifica para 3-fosfoshikimato-1-carboxiviniltransferasa, de la vía del SHK estaban subexpresados, mientras que en presencia de plásmido, solo la cepa PB13-ev2 presentó este resultado, dado lo anterior Báez-Viveros *et al.*, (2007) sugiere que estos pasos podrían ser limitantes en la síntesis de PHE. Este trabajo también proporcionó información básica para el diseño de nuevas hipótesis y estrategias genéticas sobre las cepas sobreproductoras JM101-ev2, PB12-ev2, PB13-ev2. Por ejemplo se encontró la sobre expresión del operón *acs-actP* en las cepas, PB12-ev2, PB13-ev2, como resultado de la eliminación de PTS y la presencia de plásmidos. Esta respuesta sugiere que las cepas PTS- tienen incrementada la capacidad de transportar y metabolizar acetato, lo cual concuerda con la baja capacidad de las cepas mutantes de acumularlo. Dado los resultados de expresión de *acs-actP* Báez-Viveros *et al.*, (2007) propone la sobre expresión simultánea de estos genes con el objetivo de incrementar la capacidad de reincorporar el acetato al MCC y de esta forma disminuir la pérdida de carbono en forma de intermediarios metabólicos así como la toxicidad del acetato. Otro hallazgo fue que las cepas PTS-glc+ (PB12, PB12-ev2), sobre expresan genes exclusivamente gluconeogénicos, *fbp*, *ppsA*, *pckA*, *maeB* y genes del ciclo del glioxilato, por lo que Báez-Viveros *et al.*, (2007) propone la expresión coordinada de estos genes con el objetivo de incrementar la NADPH, cofactor indispensable en la biosíntesis de PHE, proveniente de la vía de las PPP y de esta forma incrementar la producción del aminoácido.

Otro resultado del trabajo de Báez-Viveros *et al.*, (2007) fue que la sobre expresión de los genes clonados en los plásmidos codificados incrementa la expresión de genes con diversas funciones incluyendo los genes que codifican para la enzimas de TCA, propone que esta situación se debe al incremento de la demanda de energía y/o de moléculas biosintéticas o carga metabólica que el plásmido genera sobre la cepa. Encontró, además, que la inactivación del sistema PTS desencadena la sobre expresión de genes relacionados al transporte de carbohidratos (*galP*, *mglB*), genes gluconeogénicos (*ppsA*, *pckA*) y enzimas fermentativas (*ldhA*).

IV. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la cepa productora de SHK PB12.SA22 en sistemas de fermentación en lote en medio de producción permite observar una etapa de crecimiento exponencial (hasta 8 hr) en donde se observa el crecimiento de ésta cepa a expensas del extracto de levadura presente en el medio de cultivo, debido a que durante ésta etapa solo consume 4.9 g de glucosa adicionada al medio, mientras que en la etapa estacionaria la cepa consume totalmente la glucosa residual (26 hr) y la cepa continua produciendo SHK y otros intermediarios aromáticos. Estas observaciones sugieren que en estas dos etapas de crecimiento, se presentan cambios importantes en la transcripción de diversos genes que codifican aquellas enzimas involucradas en estas etapas.

Por lo anterior, se propone que el análisis transcriptómico global (ATG) por microarreglos de la de cepa de *E. coli* PB12.SA22 en cultivos en sistemas de fermentador en lote para la producción de SHK empleando un medio de producción, permitirá conocer aquellos genes diferencialmente expresados durante la fase exponencial y la fase estacionara de crecimiento.

V. HIPÓTESIS

El ATG de la cepa de *E. coli* PB12.SA22 sobreproductora de SHK (*aroL*⁻ *aroK* *aroG*^{fbr} *tktA* *aroB* *aroE*) permitirá identificar por primera vez aquellos genes diferencialmente expresados en las etapas estacionaria y exponencial de crecimiento durante un cultivo en lote para la producción de SHK empleando un medio de cultivo complejo.

VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta transcriptómica global de la cepa PB12.SA22 (*aroL*⁻ *aroK* *aroG*^{fbr} *tktA* *aroB* *aroE*) en el medio de producción en las etapas en la fase exponencial (hora 5), fase estacionaria temprana (hora 10) y fase estacionaria tardía (hora 44), durante una fermentación en lote en medio de producción con la finalidad de identificar posibles genes diferencialmente expresados en estas etapas. De acuerdo a los resultados que se obtengan, será posible proponer nuevas estrategias de modificaciones genéticas que permitan incrementar la producción y rendimiento de SHK en la cepa sobreproductora PB12.SA22.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a la cepa PB12.SA22 en el medio de cultivo suplementada con la sal K_2HPO_4 , en fermentador.
- Optimizar el protocolo de extracción de RNA total de la cepa *E. coli* PB12.SA22 en medio de producción en fase exponencial (hora 5), fase estacionaria temprana (hora 10) y fase estacionaria tardía (hora 44).
- Realizar el ATG de la cepa PB12.SA22 en medio de producción en la fase exponencial, fase estacionaria temprana, fase estacionaria tardía (definida en el punto anterior).
- Identificar los genes diferencialmente expresados en la cepa PB12.SA22 entre la etapa exponencial y las etapas estacionarias (definidas en el segundo).
- Clasificar los genes que se expresan diferencialmente por categoría funcional.
- Integración de resultados y proponer una o varias estrategias de modificaciones genéticas que permitan incrementar la producción y rendimiento de SHK en la cepa sobreproductora de SHK PB12.SA22.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOLÓGÍA EXPERIMENTAL

8.1 Fermentación

Se realizaron tres fermentaciones independientes de las cepas de *E. coli* PB12.SA22 y PB12 (Tabla 2), utilizando un medio mineral (Tabla 3), suplementado con 20 g/L de glucosa (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y 15 g/L de extracto de levadura (DIFCO, Lawrence, USA). Para la inducción de los plásmidos se utilizó isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración de 0.1 mM, así como antibióticos de acuerdo a la cepa (Tabla 2 y 4).

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos usados en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> PB12	JM101 Δ (<i>ptsH-I-crr</i>):: <i>kan glc+</i>	Flores <i>et al.</i> , 1996; 2007
Plásmido		
pJLBaroG ^{<i>fbr</i>} <i>tkkA</i>	<i>aroG</i> ^{<i>fbr</i>} expresa del promotor lacUV5, lacIq y los genes de resistencia a tetraciclina, origen de replicación de pACYC184, contiene el gen <i>tkkA</i> con su promotor nativo.	Balderas-Hernández <i>et al.</i> , 2009
pTOPOaroBaroE	Derivado de pCR®-Blunt II-TOPO® pero que contiene <i>aroBaroE</i> , resistente a kanamicina y zeocina	Escalante <i>et al.</i> , 2010
Cepa de producción		
<i>E. coli</i> PB12.SA22	PB12 <i>aroK</i> ⁻ , <i>aroL</i> ⁻ transformada con pJLBaroG ^{<i>fbr</i>} <i>tkkA</i> y pTOPOaroBaroE.	Escalante <i>et al.</i> , 2010

Tabla 3. Composición del medio mineral

Compuesto	Concentración (g/L)
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)	7.5
KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker)	7.5
ácido cítrico (Sigma Aldrich)	2.1
citrato amonio Fe III (Merck, Nueva Jersey, USA)	0.3
H ₂ SO ₄ (J.T. Baker)	1.2 (mL)

El medio se suplementó con MgSO₄ (Sigma Aldrich), CaCl₂ (Sigma Aldrich) y vitamina B1 (Tabla 4) además de una solución de metales traza (Tabla 5).

Tabla 4. Suplementos y antibióticos utilizados

Compuesto	Concentración
CaCl ₂ (Sigma Aldrich)	0.0142 g/L
MgSO ₄ (Sigma Aldrich)	0.2465 g/L
Vitamina B1 (Sigma Aldrich)	0.001 g/L
Kanamicina (Sigma Aldrich)	30 µg/mL
Tetraciclina (RO-Bârlad, Bârlad, Rumania)	30 µg/mL
Cloranfenicol (Sigma Aldrich)	20 µg/mL

Tabla 5. Composición de la solución de metales traza

Compuesto	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O (J.T. Baker)	0.0037
ZnSO ₄ 7H ₂ O (J.T. Baker)	0.0029
CuSO ₄ 5H ₂ O (J.T. Baker)	0.0247
MnCl ₂ 4H ₂ O (Sigma Aldrich)	0.0025
H ₃ BO ₃ (J.T. Baker)	0.0247

Las condiciones de fermentación que se utilizaron para ambas cepas se muestran en la Tabla 6. Para iniciar las fermentaciones se preparó un precultivo de cada cepa (Anexo 1) a partir del cual se tomó un inóculo con una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.3 para iniciar el cultivo en lote en reactores de 1 L (Autoclavable BioReactor, Applikon, Schiedam, Países Bajos) con un volumen de operación de 500 mL equipados con las consolas ADI 1010 BioControler y ADI 1025 (Applikon, Schiedam, Holanda) para control de temperatura, pH, agitación y aireación (Anexo 2). Durante la fermentación se midió la densidad óptica (DO_{600nm}) cada hora durante las primeras 8 horas y cada seis hasta las 50 horas de cultivo. A partir de una alícuota de 1.5 mL se determinaron los parámetros cinéticos de cada cepa (Anexo 3), los metabolitos aromáticos SHK, DHS, DHQ y GA y el consumo de glucosa; también se cosecharon 5mL de cultivo para la extracción del RNA total.

Tabla 6. Condiciones de operación de fermentación

Volumen de operación	500 mL
Tiempo de cultivo	50 hr
Temperatura	37°C
pH	7
Agitación	500—700 rpm

8.2 Determinación de compuestos aromáticos y ácido acético

Las concentraciones de SHK, DHS, DHQ, ácido acético (AAc) se determinaron con un sistema de HPLC (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refraction index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, MA). Las condiciones de operación que se utilizaron fueron las siguientes: columna Aminex HPX-87H (300x7.8mm; 9mm) (Bio-Rad, Hércules, CA), fase móvil de 5 mM H_2SO_4 ; flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50 °C, se utilizó el fotodiodo a 210nm. Se realizaron diluciones de cada una de las muestras utilizando fase móvil como disolvente y posteriormente se filtraron con filtros Millex de 0.45 μ m (Millipore).

La concentraciones de fenilalanina, tirosina (TYR) y triptófano (TRP) se determinaron en un sistema de columna Synergi Hydro RP (150 X 4.6mm, 40mm) de Phenomenex (CA, USA). Las fases móviles

utilizadas fueron a: 0.1% ácido trifloroacético (TFA) en agua; B: 0.1% TFA en metanol. Se corrió un gradiente a 1ml/min de la siguiente manera: 0', 5%B; 8', 80%B; 10', 80%B; 11', 5%B.

La detección se hizo por arreglo de diodos, a Abs_{220nm} para la Phe y Abs_{280nm} para los demás analitos. En esas condiciones, se detectaron TYR a 4.40'; PHE a 5.57' y TRP a 6.51'.

8.3 Cuantificación de glucosa

El consumo de glucosa (glc) se midió en un equipo Biochemistry Analyser YSI 2700 (Select, Yellow Springs, USA), utilizando un estándar de glc de 10 g/L preparado el mismo día. El estándar y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por al menos 1 hora antes de ser procesadas en el equipo para lograr el equilibrio mutarrotacional. El cual es un fenómeno de isomerización que ocurre en monosacáridos se refiere a la rotación que sufre el carbono anomérico de un enlace de carbono alfa a uno beta, o viceversa.

8.4 Determinación de 3-D-*arabino*heptulosonato-7P (DAHP)

La concentración de DAHP se realizó mediante el método del ácido tiobarbitúrico (Stathopoulos *et al.*, 1959) y la preparación de los reactivos se encuentra en el Anexo 4.

8.5 Extracción de RNA en fase exponencial y estacionario en medio de producción de SHK

En aislamiento de la muestra de RNA a procesar es el paso más importante para un análisis transcriptómico por microarreglos. Una muestra de RNA limpia e intacta generalmente asegura la obtención de datos de buena calidad. A continuación se describe el protocolo de extracción de RNA total optimizado y utilizado en este trabajo.

A partir de cada cultivo de la cepa PB12.SA22 en medio de producción (como se describió previamente), se colectaron 5 mL de medio de cultivo con 500 de RNA later μ L en un tubo cónico Falcón de 15 mL (Ambion-7021, Foster City, USA) por triplicado y para cada una de las etapas. Para obtener la pastilla celular se centrifugó (Sorvall Legend Mach 1.6R, Saint Herblain, USA) a 10000 rpm por 5 min a una temperatura de 4 °C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 5 mL de SOL I (composición en Anexo 5) en vortex. Inmediatamente después la pastilla disuelta se alicuotó en tubos eppendorf libre de RNasa y se congeló en hielo seco, para después ser almacenado a -70°C.

Protocolo de extracción a partir de un alícuota de 500µL de células en SOL I (fresca):

1. Se adicionaron 250 µL de cristal molido (150-120 microns, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) libres de RNasa y se procedió a alternar el mezclado en vortex a máxima velocidad por 1 min e incubación en hielo por 1 min durante 10 min.
2. Se adicionaron 2 mL de SOL I con lisozima (Anexo 5) y se incubó 16 min a temperatura ambiente.
3. Se adicionaron 2 mL de SOL II (Anexo 5) y se mezcló en vortex por 30 s a velocidad máxima.
4. Posteriormente se calentó la muestra a 70°C por 15 min hasta que se observó que la solución se tornó transparente, lo cual indica que la lisis fue óptima.
5. Se adicionaron 2 mL de fenol caliente equilibrado con agua y pH ácido (Invitrogen, Van Allen Way, USA) a una temperatura de 70°C y se mezcló por vortex durante 30 s a velocidad máxima.
6. La muestra se incubó a una temperatura de 70°C durante 3 min.
7. Se centrifugó a una velocidad de 10 000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C para separar las fases.
8. Se recuperó la fase acuosa superior por arriba de la línea de interfase (0.5 mL) y se transfirió a un tubo Falcón de 15 mL libre de RNasa.
9. Se repiten los pasos 5, 6, 7 y 8.
10. Se adicionaron 2 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (J.T. Baker)(25:24:1 Anexo 5) y se mezcló por vortex durante 30 s a velocidad máxima.
11. Se centrifugó a una velocidad de 10 000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C, con el objetivo de separar las fases acuosa y orgánica, se recuperó toda fase acuosa superior cuidando de no tomar interfase.
12. Se adicionaron 2 mL cloroformo y se mezcló utilizando vortex por 30 s a velocidad máxima.
13. Se centrifugó a una velocidad de 10 000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C y después se recuperó toda fase acuosa superior cuidando de no tomar interfase y se transfirió a un tubo Falcón de 15 mL libre de RNAsas.
14. Para precipitar la solución se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (Fermont, Monterrey, México) y se mezcló utilizando vortex durante 10s a velocidad baja.
15. Se agregaron 2.5 volumen de etanol al 100% (J.T. Baker) y se mezcló por inversión.
16. Se obtuvo el pellet de RNA centrifugando a una velocidad de 10 000 rpm durante 5 min a una temperatura de 4 °C.

17. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de RNA se resuspendió en 300µL H₂O libre de nucleasas (Ambion).

Para asegurar la ausencia de DNA, la muestra se somete a un tratamiento con DNasa, se utilizó el kit DNase I (Fermentas, Burlington, Canadá):

1. En un tubo eppendorf libre de RNasa se adicionaron los 300µL de RNA obtenidos, 35 µL buffer 10x, 12 µL de H₂O libre de nucleasas y 8 µL de enzima.
2. La muestra se incubó durante 30 min a una temperatura de 37°C.
3. Se adicionaron 150 µL de H₂O libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 500 µL.
4. Se adicionó 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y se mezcló en vortex durante 30 s a velocidad máxima.
5. Para separar las fases se centrifugó (Eppendorf 5415R, Hauppauge, USA) a una velocidad de 13 400 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C.
6. Se recuperó la fase acuosa superior y se calcula el volumen aproximado de fase acuosa extraído.

Se realizaron 3 extracciones consecutivas con cloroformo como se indica a continuación:

7. Se adicionó 1 volumen de cloroformo y se mezcló usando vortex durante 1min a velocidad máxima.
8. Se centrifugó a una velocidad de 13 400 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C.
9. Se recuperó la fase acuosa superior y se calcula el volumen aproximado de fase acuosa extraído.
10. Para precipitar se adicionaron 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y se mezcló utilizando vortex a velocidad baja durante 10s.
11. Se agrego 2.5 volumen de etanol al 100% y se mezcló por inversión.
12. Se centrifugó a una velocidad de 13 400 rpm durante 10 min a una temperatura de 4 °C
13. Por último se resuspendió en 25 µL de RNA Storage Solution (Ambion).

Utilizando guantes y cubrebocas en todo momento se midió la concentración de RNA y se obtuvieron las relaciones $DO_{260/280nm}$ y $ODO_{260/230nm}$ utilizando el un espectrofotómetro de UV-Vis (Nanodrop-2000c, Thermo Scientific, Wilmington, USA) y si es necesario se realizaron diluciones de la muestras utilizando de disolvente, la solución de RNA Storage Solution, con un volumen mínimo de 20 µL a una concentración de 1 µg/µL.

La muestra se dividió en 5 μL empleados para medir concentración de RNA, analizar la integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) (Anexo 5). En el gel se observaron dos bandas bien definidas las cuales corresponden a la subunidad ribosomal mayor 23S y la subunidad ribosomal menor 16S, la intensidad de la banda superior fue mayor que la banda inferior indicando que el RNA no presentó degradación.

Para determinar la concentración de RNA primero se lavo tres veces el pedestal del espectrofotómetro de UV-Vis con 1 μL de agua libre de RNasa por cada lavado, después se colocó 1 μL de RNA Storage Solution (Ambion) como solución blanco, a continuación se colocó 1 μL de muestra y se realizó la lectura.

Finalmente las muestras fueron enviadas a la compañía Precision Biomaker (PB) (<http://www.precisionbiomarker.com/>) para su análisis.

Los reactivos y soluciones utilizados en la extracción y purificación de RNA se muestran en el Anexo 5.

8.6 Obtención de las bases de datos (Realizado por la compañía Precision Biomaker)

Un microarreglo de ADN se define como una serie de sondas de ADN unidas a una superficie sólida en una disposición regular y prefijada. El fundamento de esta tecnología es la propiedad de hibridación entre moléculas de ácidos nucleicos (RNA, DNA). Los microarreglos de Affimetrix son construidos con oligonucleótidos cortos de DNA, los cuales son sintetizados directamente en la superficie del arreglo, lo que permite la síntesis de una gran cantidad de sondas en un solo *chip* (*GeneChip*). Cada sonda tiene una longitud de 25 nucleótidos, para completar un gen se agrupan varias sondas, lo que se denomina *group set* o grupo de sondas. Dentro de un *group set*, cada sonda de 25 oligonucleótidos con la secuencia perfecta (*perfectmatch probe*), va acompañada de un control negativo, que es la misma secuencia con un cambio de base en el centro de la sonda (*missmatch probe*), de esta manera se puede detectar y eliminar las hibridaciones inespecíficas. En la tecnología *GeneChip* se hibrida una sola muestra por *chip* por lo que se considera que la expresión obtenida es absoluta a diferencia de los arreglos de laminilla en el cual en un mismo arreglo se hibrida la muestra control y la muestra problema, porque se considera una expresión relativa (Aguado *et al.*, 2007).

El servicio de microarreglos se solicitó a la compañía PB. El servicio incluye: revisión de la calidad de las muestras de RNA total, marcado de la muestra, hibridación, lavado y tinción, escaneo, adquisición

de datos o análisis de imágenes, ajuste de fondo, normalización, resumen además de la evaluación de la calidad de los resultados del arreglo (Anexo 7). A continuación se describe el procedimiento realizado por la empresa:

Primero se determina la calidad de las muestras de RNA total, primero se mide la concentración de RNA y las relaciones $DO_{260/280nm}$, $DO_{260/230nm}$, posteriormente se evalúa la integridad del RNA utilizando el Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), el cual es una plataforma basada en microfluidos, que permite determinar la calidad, tamaño, cuantificación de RNA, DNA y proteínas.

En el siguiente paso se amplifica y se marca la muestra. Se utiliza la transcriptasa reversa y ligos-dT como primers para obtener DNA complementario (cDNA) a partir del RNA problema. Posteriormente se obtiene mRNA antisentido marcado con biotina (cRNA) mediante una reacción de transcripción *in vitro* (IVT). A continuación cRNA se fragmenta con calor y magnesio, la molécula se reduce a fragmentos de entre 25 y 2000 pb. La fragmentación es importante porque facilita la eficiencia y reproducibilidad de la hibridación. Una vez fragmentado, el cRNA se agrega a una mezcla de hibridación que contiene sales y agentes bloqueadores. Posteriormente se realiza la hibridación, la mezcla de hibridación descrita en el párrafo anterior, se inyecta en la cámara del GeneChip y se incuba durante 18 horas a una temperatura de 45°C. A continuación se realiza el lavado y la tinción. El chip se tiñe con una molécula fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) que se une a la biotina. Para amplificar la señal se emplea un anticuerpo anti-estreptavidina (cabra) y anticuerpos IgG biotinilado de cabra (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006) tal como se muestra en la Figura 3.

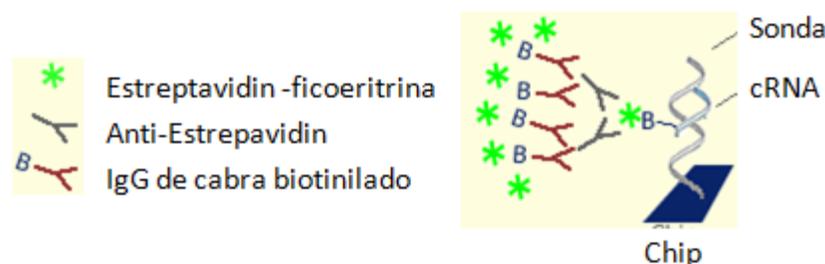


Figura 3. Hibridación, lavado y teñido de las sondas para hibridación.

Modificado de Affimetrix-Overview of Genechip© Technology (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

Después de la amplificación de la señal, el GeneChip se escanea con un láser epifluorescente con focal, durante este proceso un tubo fotomultiplicador colecta y convierte los valores de fluorescencia en una señal electrónica que se convierte a valores numéricos. Estos valores numéricos representan las

intensidades de fluorescencia de cada sonda, los cuales son almacenados como píxeles que se guardan como un archivo de imagen (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

Finalmente se obtienen los datos y se realiza un análisis de imagen. En este paso las intensidades de los píxeles de la imagen escaneada se convierten en datos a nivel de expresión de cada gen. Los siguientes pasos para la obtención de los datos son ajuste de fondo, normalización y resumen que se llevan a cabo en el pre-procesamiento como se indica a continuación (Huber *et al.*, 2005; Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

8.7 Pre-procesamiento de microarreglos para la obtención de datos

Los pasos de ajuste de fondo, normalización y resumen, se realizaron con la aplicación del lenguaje de programación estadístico, R, el cual incluye la herramienta RMA (Robust Multi-array Average) que permite el pre-procesamiento de los datos y consiste en tres pasos: corrección de fondo (RMA convolution), la normalización se hace por cuantil (quantile normalization) y la síntesis o resumen basado en un modelo robusto multiarreglo que usa un algoritmo de pulido mediano.

El ajuste de fondo o *background adjustment* es esencial las intensidades observadas necesitan ajustarse para dar una medida adecuada a la hibridación específica ya que parte de las medidas de intensidad de la sonda se deben a la hibridación no específica y al ruido en el sistema óptico de detección (Huber *et al.*, 2005).

La Normalización (*normalization*) es un ajuste que se le hace a los datos para poder realizar comparaciones entre arreglos de un mismo experimento, debido a que existen dos fuentes de variación experimental, variaciones interesantes, son las diferencias biológicas por ejemplo las diferencias de expresión de genes entre dos condiciones, y las variaciones oscuras, son las variaciones introducidas durante el experimento, por ejemplo las diferencias entre la preparación de la muestra, la extracción del RNA, la eficiencia de la hibridación y la concentración de la muestra (Boes *et al.*, 2005). La normalización es importante porque reduce las diferencias no biológicas indeseables entre chips así como la señal de intensidad de los arreglos (Hochreiter *et al.*, 2006).

El Resumen o *summarization* es el paso final del pre-procesamiento de los datos del GeneChip y resulta de combinar la intensidad de las sondas de cada una de los grupos de sondas para producir un valor de expresión. La etapa de síntesis resume en una sola cifra en el ajuste de fondo y las

intensidades normalizadas de cada uno de los genes y sus múltiples sondas. Esta cifra es un estimado de la cantidad proporcional del RNA transcrito (Huber *et al.*, 2005).

La evaluación de la calidad es un procedimiento que detecta las medidas divergentes por encima del nivel aceptable de las fluctuaciones al azar. Se utilizan algunas herramientas gráficas para visualizar diferencias importantes entre microarreglos pertenecientes al mismo experimento (Huber *et al.*, 2005).

Para sintetizar la información obtenida en el pre-procesamiento se utilizan herramientas gráficas mostradas en el Anexo 6.

8.8 Obtención de los genes con expresión diferencial

Debido a la gran cantidad de información obtenida a partir de los microarreglos primero fue necesario desarrollar herramientas bioinformáticas para el manejo y edición de las bases de datos proporcionadas por la empresa PB (Anexo 8). Los programas desarrollados se elaboraron en lenguaje de programación Perl. Posteriormente la identificación de los genes diferencialmente expresados se obtuvo utilizando el método de Productos de Ranqueo desarrollado por Breitling *et al.* (2005). Este método es un algoritmo en lenguaje Perl que utiliza técnicas estadísticas y se puede obtener libremente en la liga <http://www.brc.dcs.gla.ac.uk/systems/glama/#RP>.

A continuación se describe el procedimiento que se llevo a cabo para obtención de los genes diferencialmente expresados. Cabe mencionar que los datos de expresión del microarreglos GeneChip de Affimetrix® incluyen los niveles de expresión de genes de cuatro cepas de *E.coli*: CFT073, MG1655, EDL933, SAKAI. Lo primero que se hizo fue seleccionar los datos provenientes de cada una de las cepas del arreglo. La información obtenida se utilizó para desarrollar mapas transcriptómicos globales mediante la herramienta Pathway Tools Omics Viewers de Ecocyc (ecocy.org). En estos mapas se observó que la cepa MG1655 presentaba el mayor número de datos de expresión (4070) que con respecto a otras cepas, esto significa que en el arreglo se presento un mayor número de hibridaciones los genes de la cepa PB12.SA22 y las sondas de la cepa MG1655. Debido a este resultado, se seleccionaron los datos de expresión de la cepa MG1655 de cada etapa, para ser utilizada en el análisis transcriptómico.

1. Se seleccionaron lo datos de expresión de las etapas EXP, STA1 y STA2 de la base de datos de la cepa MG1655 por triplicado.

2. A continuación se calculó el cambio de valor de expresión de un gen entre dos etapas:
 - Cuando se comparó el estado EXP con respecto a STA1 se utilizó la expresión $2^{(exp-sta1)}$.
 - Cuando se comparó el estado STA1/STA2 con respecto a STA1 se utilizó la expresión $2^{(sta1-sta2)}$.
 - Cuando se comparó el estado EXP con respecto a STA2 se utilizó la expresión $2^{(exp-sta2)}$.

Donde exp, sta1, sta2 corresponde al valor de expresión del gen en la etapa exponencial (EXP), estacionaria temprana (STA1) y estacionaria tardía (STA2), respectivamente.

3. Se editó el formato de las bases de datos para poder aplicar el método de Productos de Ranqueo (RP).
4. Finalmente se utilizó el método de RP en las bases de datos obtenidas en el Inciso 2. Para cada gen el programa calcula un valor de False Discovery Rate (FDR), se considera que los genes que presenten un valor de FDR igual a 0 aquellos que presentan la mayor probabilidad de relevancia biológica (Breitling *et al.*, 2005). En este trabajo se utilizó un FDR igual o menor de 0.05 para seleccionar los genes sobre expresados y subexpresados.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Caracterización fisiológica de la cepa, obtención de los parámetros cinéticos y determinación de metabolitos aromáticos

La primera caracterización de la cepa PB12.SA22 se realizó en un medio de producción que no contenía K_2HPO_4 , (Escalante *et al.*, 2010), pero debido a la propuesta y los resultados positivos de Zuluaga, 2009, se decidió adicionar el medio de cultivo con la sal.

El crecimiento de la cepa PB12.SA22 se registró con la densidad óptica DO_{600nm} (Anexo 3). La curva de crecimiento de la cepa presentó dos etapas, Figura 4. La primera se trata de un crecimiento tipo exponencial, la hora 5 corresponde a la mitad de dicha fase y la cepa alcanza una biomasa de 5.9 DO_{600nm} . La segunda etapa es estacionaria donde no existe aumento neto de biomasa. Alrededor de la hora 8 de fermentación la cepa comienza a desacelerar su crecimiento hasta que entra al estado estacionario al rededor de la hora 9 y alcanza una biomasa máxima de 17.02 DO_{600nm} , la cual permanece constante hasta el final de la fermentación. La adición del K_2HPO_4 no tuvo efecto sobre la biomasa final, sin embargo, si se observó un aumento en la velocidad específica de crecimiento y en la velocidad específica de consumo de glucosa de 11.9% y 72%, respectivamente.

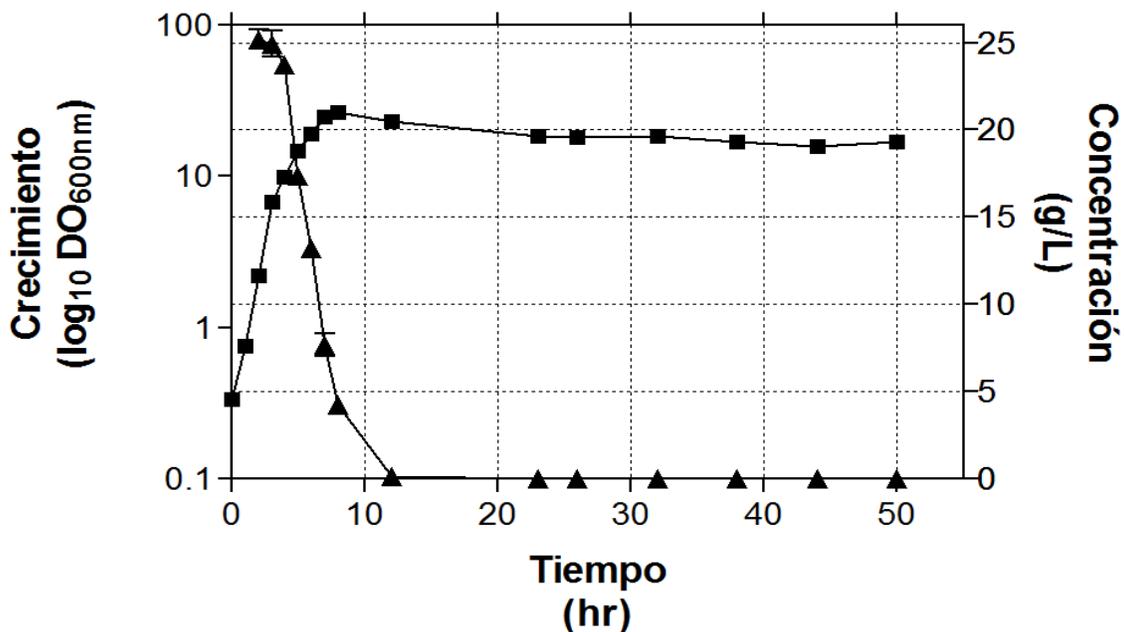


Figura 4 Cinética de crecimiento de la cepa PB12.SA22.

Crecimiento (cuadrado), consumo de glucosa (triángulo).

Es interesante notar que durante la etapa exponencial se observa la mayor formación de biomasa pero la cepa solo consume el 19% de total glucosa, el 81% restante es consumido en la etapa estacionaria. La cepa consume a la glucosa por completo en la hora 26 de fermentación (Figura 4).

Se determinó el consumo los aminoácidos aromáticos (AA), TYR, PHE y TRP, Figura 5 y Tabla 7. La cepa consume más rápidamente a la PHE, lo que podría indicar que presenta una mayor demanda de dicho AA. Los resultados sugieren que existe una relación entre la entrada al estado estacionario y el agotamiento de los AA, ya que el punto en donde la cepa agota los AA coincide con la detención del crecimiento. Lo anterior hace sentido con el hecho de que la cepa tiene disminuida la capacidad de sintetizar compuestos aromáticos debido al bloqueo del flujo de carbono en la vía del SHK, debido a la inactivación de los genes *aroK* y *aroL* (Tabla 2).

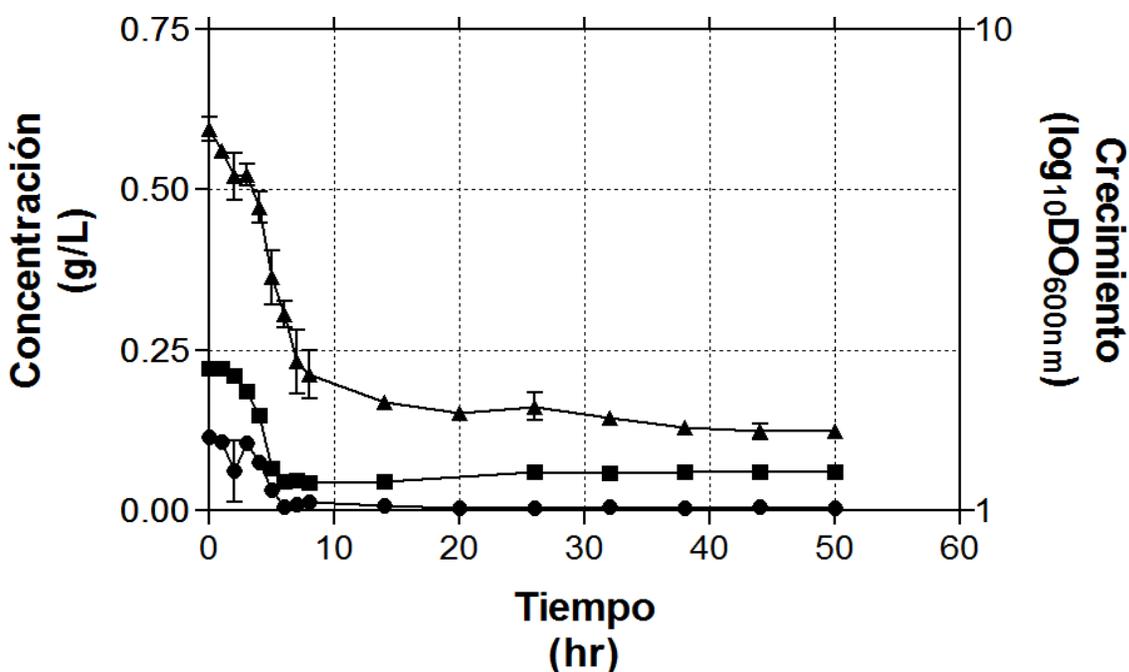


Figura 5. Consumo de aminoácidos aromáticos de la cepa PB12.SA22.

PHE (triángulo), TYR (cuadrado, TRP (círculo).

Tabla 7. Velocidad específica del consumo de aminoácidos aromáticos

Cepa	q_a TYR (mol TYR/g dcw h)	q_a PHE (mol PHE/g dcw h)	q_a TRP (mol TRP/g dcw h)
SA22	$13.7 \times 10^{-5} \pm 0.002$	$26.6 \times 10^{-5} \pm 0.003$	$6.36 \times 10^{-5} \pm 0.000$

Los resultados de esta tabla corresponden a tres experimentos independientes. c_{dcw} (dry weight cell) se obtuvo utilizando un factor de proporcional 0.37 que se multiplica por el de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. La memoria de cálculo puede encontrarse en el Anexo 6.

Puesto que se observa que el crecimiento de la cepa PB12.SA22 no está asociado al consumo de glucosa y que este proceso parece depender de los AA, entonces se propone que el crecimiento de la cepa en medio de producción es soportado principalmente por los nutrientes contenidos en el extracto de levadura (YE). De manera particular el YE marca DIFCO, que se utilizó en este estudio, contiene todos los aminoácidos excepto asparagina y glutamina; 11 vitaminas o precursores (biotina, colina, cianocobalamina, ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantotéico, piridoxina, rosoflavina, tiamina y timidina); compuestos inorgánicos (calcio, cloro, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fosfato potasio, sodio, sulfato, sulfuro, zinc y estaño) (Manual DIFCO del laboratorio, 1985).

La cepa PB12.SA22 acumula en el medio de cultivo 7.63g/L de SHK con un rendimiento de 31% (Figura 6 y Tabla 8). La adición de la sal K_2HPO_4 parece tener un efecto sobre la producción de compuestos aromáticos intermediarios de la vía de SHK (determinados en este trabajo) debido a que se observó la reducción de la concentración de DAHP, DHS, GA del 85%, 10% y 100%, respectivamente, con respecto al medio no suplementado (Tabla 8). En cuanto a la producción y rendimiento de SHK se observó un incremento 6.8% (2 g/L), respectivamente. El rendimiento de compuestos aromáticos totales fue de 36% lo que representa la disminución del 1% con respecto a lo reportado por Escalante *et al.* (2010).

Por otra parte, la producción de SHK en la cepa PB12.SA22 no está relacionada con el crecimiento como se observa en la Figura 5, pero sí parece estar relacionada con el estado estacionario, pues es en esta etapa donde se presenta la mayor producción (hora 32 de fermentación). La formación de los compuestos aromáticos cuantificados en este estudio (DHS, DHQ y DAHP) parece estar relacionada con el crecimiento (Figura 6). Ya que el aumento de estos compuestos correlaciona con el aumento del crecimiento durante la etapa EXP (desde la hora 1 hasta la hora 9 de cultivo). Una vez que la cepa entra a fase estacionaria, las concentraciones de los compuestos aromáticos permanecen constantes hasta el final del cultivo (50 horas).

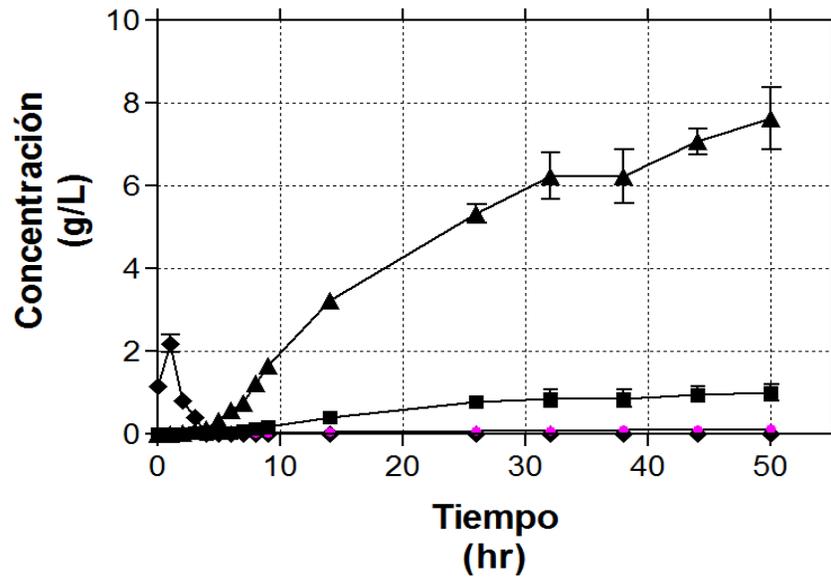


Figura 6. Producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA22.

SHK (triángulo), DHS (cuadro), DAHP (circulo), GA (rombo). Los resultados de esta figura corresponden a tres experimentos independientes.

Tabla 8. Determinación de metabolitos aromáticos y rendimiento de compuestos aromáticos totales de la cepa PB12.SA22 en fermentador

Cepa	SHK (g/ L)	$Y_{p/s}$ (molSHK/ molglc)	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	GA (g/L)	aRAT (molIAT/ molglc)	$^b\mu$ (h ⁻¹)	$^c q_s$ (milimol glc/ g ^d dwc h)
$^ePB12.SA22$	7.05±0.06	0.29±0.00	0.81±0.04	1.46±0.14	0.08±0.01	0.37	0.42±0.01	1.93 ± 0.59
$^fPB12.SA22$	7.63± 1.3	0.31 ±0.48	0.12±0.03	1.00±0.36	0.0±0.0	0.36	0.47±0.00	3.33 ± 0.28

^aRAT (Rendimiento de compuestos aromáticos totales), ^b μ velocidad específica de crecimiento, ^c q_s velocidad específica de consumo de glucosa ^ddcw (dry weight cell) se obtuvo utilizando un factor de proporcional 0.37 que se multiplica por el de DO_{600nm} . ^eResultados de Escalante *et al.*, 2010. ^fResultados obtenidos en este trabajo, utilizando un medio suplementado con K_2HPO_4 , corresponden a tres experimentos independientes. La memoria de cálculo para la obtención de μ y q_s se encuentra en el Anexo 7.

9.2 Extracción de RNA total

Aplicando los cambios al protocolo, mencionados en Material y Metodología experimental, se extrajo RNA total de la cepa PB12 y se logró obtener los resultados mostrados en la Tabla 10 y Figura 9, se logró cumplir con los requerimientos de RNA total solicitados por la empresa PB para las muestras de la cepas PB12.SA22 y PB12: concentración de RNA de $1 \mu g/\mu L$, un volumen mínimo de $15 \mu L$ y las relación de $OD_{260/230nm}$ mayores o iguales de 1.80 y para la relación $OD_{260/280nm}$ mayores o iguales a valores de 1.80.

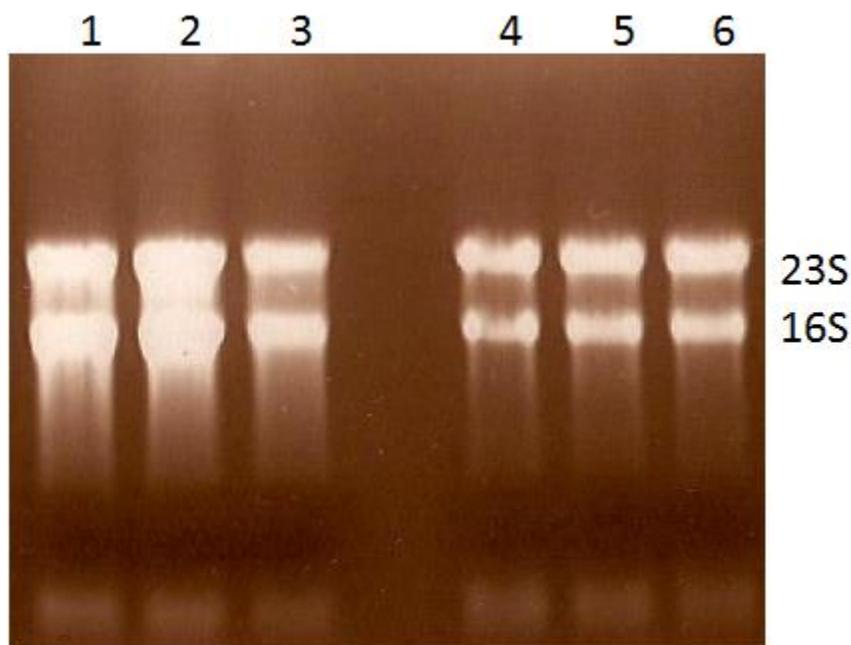


Figura 7. Electroforesis de agarosa de RNA.

Esta figura muestra la fotografía de una electroforesis de RNA total de la cepa PB12.SA22, provenientes de tres experimentos independientes, los carriles del 1 al 3 corresponden al RNA total obtenido en etapa exponencial (hora 5), los carriles del 4 al 6 corresponden al RNA total obtenido en etapa estacionaria (hora 44).

Tabla 9. Extracción de RNA de PB12.SA22

Fermentador	Toma de muestra (hr)	Fase de crecimiento	Concentración (µg/µL)	Relación OD	Relación OD	Volumen de muestra (µL)
				_{260/280}	_{260/230}	
F1	5	Exponencial	1.727	1.97	2.39	35
F2	5		1.774	1.85	2.21	35
F3	5		1.410	1.96	2.45	35
F1	10	Estacionario temprano	1.101	2.04	2.23	25
F2	10		1.262	2.04	2.28	25
F3	10		1.499	2.06	2.30	25
F1	44	Estacionario tardío	1.459	1.91	2.47	25
F2	44		1.334	1.91	2.50	25
F3	44		1.497	1.91	2.46	25

Esta tabla muestra los valores de concentración de RNA extraído en este trabajo. Para la extracción se utilizó el protocolo optimizado desarrollado en este trabajo. OD_{260/280nm}, radio de absorbancia a 260 nm y 280 nm, proporción entre ácidos nucleicos y proteínas, fenol o contaminantes; OD_{260/230nm}, radio de absorbancia a 260 nm y 280 nm, proporción entre ácidos nucleicos y proteínas.

9.3 Resultados del análisis transcriptómico global de la PB12.SA22 en medio de producción

En este trabajo se estudió la respuesta transcripcional global de la cepa de *E. coli* PB12.SA22 sobreproductora de SHK en cultivo en fermentador en medio de producción en tres etapas: exponencial (EXP, 5 hr), estacionaria temprana (STA1, 10 hr) y la etapa estacionaria tardía (STA2, 44 hr).

El análisis de los valores de expresión se realizó a través de comparaciones de la expresión relativa entre las etapas EXP/STA1, EXP/STA2, STA1/STA2 para la cepa PB12.SA22. Para cada una de las comparaciones realizadas, primero se presenta un resumen las categorías funcionales en las que se ubican aquellos número de genes diferencialmente expresados (sobre expresión/represión) en la cepa PB12.SA22 en la fase EXP/STA1, EXP/STA2 y STA1/STA2 (Tabla 10). Con base en la selección hecha a partir del análisis de RP considerando un valor de FDR igual o menor a 0.05 se presentan las Tablas 12-17, las cuales contienen el top 30 de genes diferencialmente expresados (sobre expresión/represión), su clasificación funcional y el activador o represor, según corresponda. Esta clasificación por función se hace con base en el esquema de clases de términos de genes ontológicos utilizada en la base de datos de Ecocyc (ecocyc.org). Para los casos en los que esta clasificación no correspondía a la función asignada para el gen en cuestión se decidió asignar la que mejor se ajustó de acuerdo a la función e información disponible en Ecocyc.

Tabla 10. Número/categorías de genes diferencialmente expresados en la cepa PB12.SA22

Categoría ^a	Condición analizada					
	EXP/STA1		EXP/STA2		STA1/STA2	
	SE ^b	RE ^b	SE ^b	RE ^b	SE ^b	RE ^b
Adaptación		5	4		13	
Metabolismo de compuestos azufrados	2		3		2	
Metabolismo energético/transporte, aceptor de electrones	4	9	2			
Metabolismo, biosíntesis de otros compuestos		2				1
Metabolismo, degradación de macromoléculas	1					
Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	8	13	8		13	4
Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos/nucleótidos		2				
Metabolismo, utilización de carbono, carbohidratos				1		2
Metabolismo, utilización de carbono, nucleósidos/nucleótidos	5	1	1		2	2
Otros		1		1		
Procesos celulares	2	15	4	13	5	10
Proteínas conservadas sin función definida o por predicción	3	18	4	9	2	11
Reguladores	2	14		9		2
Transportadores	16		10	5	7	11
Total	43	80	37	38	50	47

^a Basado en la clasificación de clases de genes ontológicos usada en la base de datos Ecocyc (ecocyc.org); ^b Con base en el valor de FDR del RP igual o menor a 0.05 (Breitling *et al.*, 2005). SE, sobre expresado; RE, reprimido.

9.3.1 Genes diferencialmente expresados en exponencial, resultados y discusión

El estado exponencial está caracterizado por un crecimiento acelerado a pesar del bajo consumo de glucosa y de SHK, de allí que se ha propuesto que el crecimiento está sustentado en los componentes nutritivos del YE. Los resultados de transcripción hacen sentido con esta propuesta, puesto que se encontró que una gran parte de los genes con expresión diferencial están relacionados al catabolismo y transporte de aminoácidos y carbohidratos. También se encontró la expresión de genes relacionados al metabolismo de nucleósidos y nucleótidos, metabolismo de compuestos azufrados, así como de transportadores de iones y compuestos osmoprotectores (Tablas 11 y 13).

Los resultados de transcripción (Tabla 11, 13) indican que los reguladores CRP y FNR presentan una participación importante en el control de la expresión durante la etapa EXP. Debido a que se encontró la sobre expresión de los genes *cyoABCD*, *tnaLAB*, *malEFK*, *fecBCDE*, *glpT*, *nmpC*, *cirA* (Tabla 11), los cuales son controlados por CRP. Así mismo, se encontró la sobre expresión de los genes *gcvPT*, *sdaB*, *gcvH* activados por FNR. La actividad de la CRP es activada mediante unión a cAMP, estos resultados sugieren que probablemente la cepa sobreproductora podría presentar un aumento de la concentración intracelular de cAMP. Mientras Fnr es el principal regulador transcripcional que media la expresión de genes para la transición de crecimiento aerobio a anaerobio, también regula la transcripción de genes con funciones diversas, ácido resistencia, quimotaxis, estructura celular y biosíntesis (ecocyc.org).

Se encontró la sobre expresión de los genes *gcvPTH*, *tnaLAB*, *asnA* y *sdaB* (Tabla 11), los cuales están relacionados con el catabolismo de aminoácidos como fuentes de carbono. Por su parte los genes *gcvPTH* codifican para las enzimas glicina descarboxilasa, aminometiltransferasa y el péptido del sistema de lisis de glicina, respectivamente, que junto con Lpd forman el complejo de degradación de lisina. La expresión de estos genes se activa por los reguladores Fnr, Lrp unido a leucina y se reprime por el regulador PurR unido a hipoxantina (Stauffer *et al.*, 1994). Los genes *tnaAB*, *tnaL* codifican para la enzima L-cisteína desulfidrasa/triptofanasa, el transportador TnaB de triptófano y el péptido líder del operón de triptófano, respectivamente. El operón *tnaAB* se regula por antiterminación transcripcional inducida por TRP. *E. coli* es capaz de transportar TRP del exterior para lo cual utiliza tres permeasas Mtr, TnaB AroP, sin embargo, se ha demostrado que la principal función de TnaB es la toma de TRP con propósitos catabólicos. El TRP es tomado del exterior y puede ser utilizado como única fuente de carbono o nitrógeno, mediante la acción de la enzima inducible triptofanasa (*tnaA*), la cual degrada TRP a PYR, indol y amonio (Yanofsky *et al.*, 1991). El gen *sdaB* codifica para la enzima

L-serina deaminasa II, la cual es una de tres enzimas que llevan a cabo el único paso de degradación de serina. SdaB cataliza la conversión de L-serina a PYR y amonio. El gen *sdaB* es transcrito en medio rico particularmente en ausencia de glucosa (Shao *et al.*, 1993). Lo cual coincide muy bien con las condiciones de cultivo de la cepa PB12.SA22. El gen *asnA* codifica para la asparagina sintetasa A (AsnA), esta enzima es la más activa de las dos existentes en *E. coli*, cataliza la conversión de asparato a asparagina dependiente de amonio (Humbert *et al.*, 1980).

Los resultados de transcripción de *gcvPTH*, *tnaLAB*, *asnA* y *sdaB* (Tabla 11) su activación por CRP-cAMP sugieren que este complejo probablemente le permite a la cepa PB12.SA22 explotar una gran variedad de compuestos nutritivos que están sujetos a represión catabólica. Los resultados indican que en EXP la cepa podría presentar una importante actividad catabólica de los aminoácidos del medio de cultivo, siendo estos las principales fuentes de carbono para crecimiento y división celular en lugar de la glucosa. Estos resultados concuerdan con el rápido crecimiento de la cepa durante EXP y el bajo consumo de glucosa observado (Figura 4). Lo que da pie a proponer que la cepa podría presentar una baja actividad de la vía de la glucólisis. Se ha reportado que la expresión del gen *sdaB* se observa exclusivamente cuando existe un aumento de la concentración intracelular de cAMP. La expresión de *sdaB* se observó alta en EXP y muy baja en STA, lo que sugiere que el aumento de la concentración de CRP-cAMP en la cepa PB12.SA22 es exclusivo del estado EXP.

Se encontró la expresión diferencial de genes relacionados a la toma de iones metálicos, *fecABCDE*, *cirA* (Tabla 11). El gen *fecA* codifica para el receptor de citrato de hierro de membrana externa, mientras que *fecBCDE* codifica para los componentes de transportador ABC de citrato de hierro. Separados del operón, los genes, *fecIR*, codifican para el factor sigma alternativo, FecI y un factor antisigma FecR. Cuando las concentraciones intracelulares de hierro son bajas y el citrato de hierro está presente en el medio, la proteína receptora FecA transmite una señal a la proteína transmembranal FecR lo que causa que FecI se active y promueva la transcripción de *fecA*. (Zhang Z *et al.*, 2005; Earhart *et al.*, 1996). La expresión de estos genes es posible solo cuando la concentración de hierro intracelular es suficientemente alta para unirse al represor Fur lo que libera la expresión de los genes. El medio de cultivo se suplementa con citrato de amonio de hierro III por lo que la sobreexpresión de los genes *fecABCDE*, *cirA*, podría indicar que en estado EXP la cepa podría presentar una concentración intracelular de hierro insuficiente como activar la expresión de dichos genes y la activación de la expresión del sistema de transporte de citrato-hierro. La disminución del nivel de hierro intracelular puede deberse a la poca o nula capacidad de la cepa PB12.SA22 de sintetizar enteroquelina, el principal transportador de hierro en *E. coli*. Estos resultados hacen sentido con el hecho de que la cepa

PB12.SA22 tiene el flujo de carbono truncado hacia la formación de corismato (*aroK*, *aroL*), compuesto a partir del cual se sintetiza la enteroquelina, el principal sideróforo en *E. coli*. El gen *cirA* se encontró con sobre expresión, el gen codifica para el receptor de membrana involucrado en la toma de dihidroxibezoilserina férrico, CirA. Este es un sideróforo de hierro dependiente del sistema TonB y su expresión es activada por CRP (McIntosh *et al.*, 1977), por lo que es probable que CirA sea quien lleva a cabo la internalización de hierro en la cepa PB12.SA22 durante la etapa EXP.

El operón *malEFKG* y los genes *malk lamB malM* (Tabla 11) codifican para el sistema de transporte de maltosa, el cual es miembro de la superfamilia de transportadores ABC. MalE es la proteína periplásmica de unión a maltosa, MalF y MalG son los componentes integrales de membrana y Malk es el componente de unión a ATP, el cual está asociado con el interior de la membrana a través de sus interacciones con MalF y MalG. Este sistema es capaz de transportar malto-oligosacáridos de hasta siete unidades (Boos *et al.*, 1998). La proteína reguladora MalT, cAMP-CRP y el regulador Fis activan la expresión del operón. MalT requiere la presencia de maltotriosa intracelular para iniciar la activación de la transcripción (Notley *et al.*, 1995). El gen *lamB* codifica para una maltoporina que facilita la difusión de maltosa y de glucosa a través de la membrana exterior y actúa como una porina general de solutos pequeños (Hua *et al.*, 2004). La expresión de este gen está coordinada con la del regulón *mal*. Sin embargo, la expresión de *lamB* puede ser liberada de la represión, en condiciones de limitación de glucosa (2 μ M) en quimiostato (Death *et al.*, 1993). Notley *et al.* (1995) reportan el fenómeno de autoinducción de sistemas de transporte de nutrientes bajo condiciones de limitación de glucosa, en dicho trabajo se detectó la presencia de maltotriosa, el inductor de operón *mal*, sin que haya sido adicionada al medio. Basado en sus resultado, propone que algunas cepas de *E. coli*, en una condición de baja concentración de glucosa, promueven la formación de inductores como galactosa y maltotriosa, que en asociación con un nivel elevado de cAMP, son capaces de optimizar la expresión de sistemas de transporte para la internalización de glucosa. Por lo tanto los patrones transcriptómicos de la *E. coli* bajo condición de limitación de carbono están caracterizados por la optimización de las capacidades de "scavenging". Los resultados indican que la cepa PB12.SA22, en estado EXP, sobre expresa sistemas de transporte afines a glucosa con el objetivo de optimizar la toma de este compuesto, lo que se puede explicar como una estrategia para contrarrestar la condición PTS⁻. Los sistemas de transporte de maltosa y de galactosa típicamente se reprimen por la presencia de un catabolito, sin embargo, la cepa podría estar promoviendo la autoinducción, de maltotriosa, en el caso particular del regulón *mal*, permitiendo así la eliminación de la represión de dichos sistemas de transporte, por lo que se vería favorecida la entrada de glucosa a la célula. De allí que se observe la expresión del MalE y LamB, tal como lo reporta Death *et al.*, (1993).

La autoinducción también se ha reportada en cepas carentes del sistema PTS creciendo en glucosa como única fuente de carbono. Flores N *et al.*, (2005), encontró la sobre expresión del *galP* que a cepa es capaz de sintetizar galactosa como autoinductor del regulón *gal*, con lo que se inactiva a los represores del sistema, GalR y GalS. Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con lo reportado por Báez-Viveros *et al.*, 2007 y Flores S *et al.*, en donde se observó la sobre expresión los genes *malEFK* y *lamB* en tanto que cuando la cepa PB12 se creció en glucosa, *lamB* sólo se encontró sobre expresado cuando la cepa contenía plásmidos, como es el caso de la cepa PB12.SA22.

Se encontró la sobre expresión de genes involucrados en la toma de prolina, *putA*, *proXVW* (Tabla 11). El gen *putA* codifica para la proteína PutA, flavoproteína asociada a membrana con funciones de represor transcripcional de los genes involucrados en la utilización de prolina (*putP*, *putA*). PutA funciona como enzima cuando está asociada a membrana y como represor cuando está en el citosol. El cambio de actividad depende de los niveles de prolina. En ausencia del aminoácido, PutA, se acumula en el citoplasma y reprime la transcripción de los genes *put*. En presencia de prolina, la proteína se une a la membrana citoplasmática interna, donde cataliza la oxidación de L-prolina a L-glutamato. PutA reprime la expresión de su gen *putA* y el regulador MarA activa su expresión. La expresión de *marA* aumenta y responde la internalización de compuestos fenólicos, agentes de estrés oxidativo así como antibióticos a través de porinas o por difusión, (tetraciclina y cloramfenicol) (Zhou *et al.*, 2008). El operón *proXVW* codifica para el sistema de transporte de alta afinidad de prolina, ProU. ProV es el componente de unión ATP, ProW es el componente integral de membrana y ProX es el componente periplásmico. *E. coli* posee tres transportadores de prolina: PutP, ProP y ProU. PutP funciona cuando la prolina se utiliza como fuente de carbono y no juega un papel en la toma del aminoácido en condición de alta osmolaridad porque su actividad se inhibe por estrés osmótico. En contraste la función de los transportadores ProP y ProU es la toma de aminoácido que permita incremento de su concentración intracelular como compuesto osmoprotector. ProP y ProU son capaces de transportar otros osmoprotectores: glicin-betaína, taurina, ectoína y carnitina, por lo que aparentemente presentan una importante función fisiológica de transportar una gran variedad de osmoprotectores del ambiente cuando *E. coli* se enfrenta a condiciones de alta osmolaridad (Lucht *et al.*, 1994).

La sobre expresión de los genes *proXVW* que codifican para el transportador de prolina como osmoprotector, PutU, así como la del gen del regulador PutA, sugieren que probablemente la cepa utiliza a la prolina tanto como fuente de carbono como para regular la osmolaridad intracelular. El incremento de la osmolaridad conlleva la pérdida del turgor, pérdida del agua del citoplasma, lo cual

tiene un efecto negativo sobre la replicación del DNA, síntesis de proteínas y crecimiento celular. La primera osmoadaptación ocurre en dos etapas: la primera es el aumento de la concentración intracelular de K⁺-glutamato, la segunda es la acumulación de compuestos osmoprotectores como trehalosa, glicin-betaína, prolina etcétera. Al revisar la expresión de los genes que codifican para el transporte y/o síntesis de los osmoprotectores, K⁺ (*trkA*, *kup*, *kdpABC*), trehalosa (*treA*, *ostAB*), glicin-betaína (*betT*, *betAB*, *betI*), se encontró que no presentaron sobre expresión, al igual de la expresión del gen que codifica para ProP. En contraste se encontró que PutP presenta una sobre expresión de 6.25, EXP/STA, estos resultados sugieren que la cepa podría estar teniendo una respuesta transcripcional a un medio con alta osmolaridad, debido a la alta concentración de nutrientes, antibióticos, IPTG y sales. Además de que es probable que la cepa sobre productora presente el segundo tipo de osmoadaptación. El osmoprotector mas importante en *E. coli* es la glicin-bataina, sin embargo, probablemente la cepa utiliza la prolina debido a la disponibilidad y abundancia del aminoácido en el medio de cultivo.

En el grupo de trabajo Ania Cervantes, estudiante de maestría, creció a la cepa productora bajo las mismas condiciones de cultivo usadas en este trabajo y adicionó 1mM de betaína al medio de cultivo. Los resultados no mostraron cambios importantes en cuanto al crecimiento y la producción. Este resultado sugiere que probablemente la prolina del medio de cultivo es suficiente para contrarrestar los efectos de la osmolaridad del medio. Adicionalmente la sobre expresión de *putA* podría estar asociada a la presencia tetraciclina y cloramfenicol el medio de cultivo.

Se encontraron altamente subexpresados los genes *argABCDEFGHI* y *artJ* (Tabla 11), los cuales codifican para las enzimas de la biosíntesis y del transportador de L-arginina, respectivamente. También se encontró la subexpresión de los genes *carA* y *carB* que codifican para la carbamoil fosfato sintetasa, enzima que cataliza la primera reacción de las vías biosintéticas de L-arginina y de los nucleótidos de pirimidina (ecocyc.org; regulondb.ccg.unam.mx). Además de la subexpresión de *glmY* codifica para el sRNA GImY. La represión de los genes anteriores la lleva acabo el regulador ArgR cuando la L-arginina está disponible en el medio de cultivo. Por lo que la subexpresión de los genes *argABCDEFGHI*, *artJ*, *glmY*, *hisL* probablemente se debe a la presencia de la L-arginina en el medio de cultivo. La subexpresión de gen *hisL* que codifica para el péptido líder del operón de la biosíntesis de la histidina, controla, mediante atenuación, la transcripción del operón (*hisLGDCBHAF*). La subexpresión de este gen podría sugerir que durante EXP tal vez esta favorecida la biosíntesis del histidina sobre su catabolismo.

Se observó la subexpresión de los genes del operón *psp* (*pspABCD*) (Tabla 12). La proteína PspA es el principal componente en el estado estacionario tardío, se trata de una proteína de membrana periférica con el 50% en el interior de la membrana mientras que PspB, PspC y PspD son proteínas de membrana interna. La expresión de estos genes responde a diversos factores que provocan estrés entre ellos la presencia de porinas mutantes que no están localizadas apropiadamente en la membrana, exposición a etanol, choque osmótico disminución de energía y en respuesta al aumento de acidez. Las proteínas PspA, PspB, PspC ayudan a la supervivencia de *E. coli* protegiéndola contra la disipación de la fuerza protón motriz en STA, estado donde se ha alcalinizado el pH debido a la lisis celular (Model *et al.*, 1997). La subexpresión del operón *psp* se observó en la comparación del EXP con STA1 como STA2, estos resultados podrían sugerir que en EXP no existe un nivel de estrés suficientemente alto para activar este sistema de protección de membrana a diferencia de lo que ocurre en STA2.

Cuando se compararon los valores de expresión entre el estado EXP y STA2 se encontró que los al igual que en EXP/ STA1 se sobre expresaron los genes

Mientras que la diferencia principal entre estas dos comparaciones fue la alta subexpresión de genes relacionados a la formación de biopelícula, *ymgA*, *ymgB*, *ymgC*, *ycfR* (*bhsA*), *ybiM*, *bssR*, *bssS* (Tabla 12, 14). Se ha reportado que la expresión de estos genes se reprime cuando aumenta la concentración de indol intracelular (Lee *et al.*, 2007b; Ren *et al.*, 2004; Zhang X *et al.*, 2007; Zhang X *et al.*, 2008). Los genes *ymgABC* los cuales codifica para las proteínas YmgAC y AriR. Se ha propuesto que estos proteínas son el cuarto sistema de ácido resistencia (Lee *et al.*, 2007b). Se ha reportado que la eliminación el gen *ymgA* provoca un incremento en la formación de biopelícula y motilidad, mientras que su expresión se reprime en presencia de la molécula AI2 o indol (Ren *et al.*, 2004). El gen *bhsA* codifica para la proteína que inhibe la formación de biopelícula y presenta actividad de regulación de genes en respuesta a estrés y su la inactivación induce 5 veces la formación de biopelícula (Zhang X *et al.*, 2007). Zhang X *et al.*, 2007 propone que BhsA está involucrada en la regulación de biopelícula mediante la disminución de la agregación celular por medio de la reducción de la hidrofobicidad de la membrana por medio de la variación de la concentración de indol. (Zhang X *et al.*, 2007). El gen *ybiM* codifica para una proteína periplásmica por predicción, YbiM, la cual tiene un importante rol en la señalización intercelular. YbiM previene la sobreproducción de ácido colánico. El aumento de la concentración de este polisacárido genera un incremento de la mucosidad promoviendo la formación de biopelícula (Zhang X *et al.*, 2008).

Los genes *bssR* y *bssS* codifican para las proteínas BssR y BssS, respectivamente. La expresión de BssR disminuye la formación de biopelícula en cepas de *E. coli*, exclusivamente es presencia de glucosa. (Domka *et al.*, 2006; Zhang X *et al.*, 2007). Adicionalmente a los resultados anteriores, también se encontró la sobre expresión de los genes *fim*, Tabla 14, involucrados en la síntesis de fimbria, compuesto indispensable para la síntesis de biopelícula. La síntesis de biopelícula se ha asociado al aumento de diversos tipos de estrés particularmente el aumento de acidez (Blumer *et al.*, 2005), por lo que estos resultados podrían sugerir que la cepa productora podría estar produciendo biopelícula derivado del estrés por la osmolaridad, el aumento de acidez intracelular por la producción de SHK, la presencia de plásmidos y antibióticos. Sin embargo, el probable aumento intracelular de indol, derivado del catabolismo del TRP, es poco probable la síntesis de biopelícula. Sin embargo, la síntesis de biopelícula significaría una importante pérdida de carbono en el sistema de producción.

Se encontró la sub expresión de los genes *csrC* y *dsrA* (Tabla 12, 14), que codifican para los sRNA, CsrC y DsrA, respectivamente. El gen *csrC* codifica para el regulador C de almacenamiento de carbono, CsrA, controla procesos como síntesis de glucógeno, glucólisis, motilidad, síntesis de di-GMP cíclico y formación de biopelícula. Los sRNAs, CsrB y CsrC regulan la expresión CsrA y su actividad enzimática mediante el secuestro de la proteína (Timmermans *et al.*, 2010). La subexpresión de *csrC* podría indicar un aumento en la expresión y actividad de CsrA lo que favorecería la síntesis de glucógeno, en estado EXP. El riboregulator DsrA controla la producción de RpoS y H-NS. DsrA cambia de conformación para unirse a dos diferentes RNA mensajeros, *hns* y *rpoS*, inhibe la traducción de H-NS y estimula producción de RpoS. Se ha observado que *dsrA* se expresa principalmente en bajas temperaturas (Lease *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2010).

Los resultados de transcripción de la cepa PB12.SA22 en medio de producción indican un probable aumento de la concentración intracelular de cAMP como respuesta a estado permanente de limitación de glucosa, lo que favorece la expresión de transportadores y enzimas catabólicas y que le permite a la cepa explotar las diversas fuentes de carbono presentes en el YE. Por otra parte los resultados sugieren que cepa PB12.SA22 en EXP podría presentar baja concentración de hierro intracelular probablemente derivado de disminuida capacidad de sintetizar enterobactina, el sideróforo moléculas que internaliza hierro. Así también, los resultados indican que la cepa probablemente contrarreste los efectos de la osmolaridad del medio, mediante la internalización y acumulación de prolina. Se observó que en EXP hay un fuerte control de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de L-arginina. Así mismo, existe una respuesta transcriptómica al aumento de la concentración intracelular

de indol. Los resultados encontrados en este trabajo también concuerdan y son soportados por lo reportado por Flores S *et al.*, (2005), en donde indica que la condición PTS- en las cepa PB12 induce una respuesta general de scavenging de nutrientes que le permite la utilización de fuentes secundarias de carbono a un en medio con glucosa.

Tabla 11. Genes sobre expresados en EXP respecto a STA1(30 genes con la mayor sobre expresión)

Gen/ bnumber	Expresión promedio ^a	FDR ^a	Producto ^b	Categoría funcional ^b	Factor transcripcional (activador) ^b
<i>cysH</i>	11.2772	0.0167	Enzima: 3'-fosfo-adenililsulfato reductase	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB O-Acetilserina, IhfB, IhfA
<i>cysC</i>	7.0141	0.0476	Enzima: adenililsulfato cinasa	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB, O-Acetilserina
<i>pyrB</i>	10.8487	0.0000	Proteína: aspartato carbamoiltransferasa, subunidad catalítica	Metabolismo, metabolismo central intermediario, nucleótidos y nucleósidos	NCo
<i>guaC</i>	6.7694	0.0200	Enzima: GMP reductasa	Metabolismo, metabolismo central intermediario, nucleótidos y nucleósidos	NC
<i>gpt</i>	6.4026	0.0222	Enzima: xantina-guanina fosforibosiltransferasa	Metabolismo, metabolismo central intermediario, nucleótidos y nucleósidos	NC
<i>cyoD</i>	6.6316	0.0208	Polipéptido: citocromo bo terminal oxidasa subunidad IV	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de electrones	CRP, GadE
<i>tnaL</i>	91.7140	0.0000	Péptido líder del operón <i>tna</i>	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	CRP, TorR-P
<i>tnaA</i>	60.3464	0.0000	L-cisteína desulfhidrasa / triptofanasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	CRP, TorR-P
<i>asnA</i>	28.5470	0.0125	Enzima: asparagina sintetasa A	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	AsnC

<i>gcvP</i>	12.2509	0.0000	Enzima: glicina descarboxilasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	FNR, Lrp
<i>gcvT</i>	12.0966	0.0000	Enzima: aminometiltransferasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	FNR, Lrp
<i>sdaB</i>	8.2308	0.0067	Enzima: L-serina deaminasa II	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>gcvH</i>	7.2457	0.0211	Polipéptido: glicina escisión sistema H Proteína	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Fnr, Lpr
<i>nlpA</i>	7.2359	0.0465	Polipéptido: lipoproteína-28	Proteína de membrana, lipoproteína	CsgD
<i>yiel</i>	6.6363	0.0217	(cbrB) Polipéptido: predicha membrana interna	Proteína por predicción	CreB
<i>gcvB</i>	7.4984	0.0118	RNA: GcvB pequeño RNA regulatorio	Regulador negativo de la transcripción, RNA pequeño	GcvA
<i>putA</i>	11.8149	0.0000	Enzima: fused PutA transcripcional represor con unión a DNA / prolina deshidrogenasa/ 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	Regulador transcripcional	MarA
<i>tnaB</i>	9.9672	0.0000	Transportador: TnaB transportador de triptófano ArAAP	Transporte de aminoácidos	CRP, TorR-P
<i>malE</i>	174.0512	0.0000	Transportador: transportador maltosa ABC – Proteína periplásmica de unión	Transporte de azúcares	CRP, FIS, MalT
<i>malF</i>	19.1719	0.0000	Polipéptido: maltosa ABC transportador - subunidad membrana	Transporte de azúcares	CRP, FIS, MalT
<i>lamB</i>	18.0411	0.0000	Transportador: fago lambda receptor Proteína; receptor maltosa de alta afinidad	Transporte de azúcares	CRP, MalT
<i>malK</i>	14.8026	0.0000	Polipéptido: maltosa ABC transportador -	Transporte de azúcares	CRP, MalT

			ATP unión subunidad		
<i>glpT_</i>	8.6190	0.0190	Transportador: GlpT glycerol-3-P MFS transportador	Transporte de azúcares, glicerol	Crp, Fis, Fnr
<i>fecA</i>	19.9369	0.0000	Polipéptido: porina interna de citrato fierro FecA	Transporte de iones	CRP, PdhR
<i>nmpC</i>	11.7561	0.0000	Polipéptido: porina de membrana externa ; locus de <i>qsr</i> profago	Transporte de iones	Crp
<i>fecB</i>	14.5864	0.0000	Polipéptido: dicitrato férrico ABC transportador – periplasmica unión	Transporte de iones, fierro	CRP, PdhR
<i>fecE</i>	7.0184	0.0324	Polipéptido: dicitrato férrico ABC transportador – subunidad unión ATP	Transporte de iones, fierro	CRP, PdhR
<i>cirA</i>	9.4700	0.0182	Transportador: receptor exterior de membrana involucrado en toma de dihidroxibenzoilserina férrica	Transporte de iones, fierro (sideróforos)	CRP
<i>proX</i>	7.3363	0.0231	Polipéptido: glicina betaína / prolina ABC transportador – Proteína periplasmica unión	Transporte, adaptación, presión osmótica,	NC
<i>sbp</i>	11.2712	0.0194	Polipéptido: sulfato / thiosulfato ABC transportador – Proteína periplasmica unión Sbp	Transporte, metabolismo, compuestos azufrados	NC

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc; NC, Factor transcripcional no conocido.

Tabla 12 Genes subexpresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados)

Gen/ b number	Expresión promedio ^a	FDR ^a	Producto ^b	Categoría funcional ^b	Factor transcripcional (represor) ^b
b1748	0.1561	0.0000	(<i>astC</i>) Enzima: succinilornitina transaminasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
b1746	0.5891	0.0043	(<i>astD</i>) Enzima: aldehído deshidrogenasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>rhaD</i>	0.2643	0.0000	Enzima: rhamnulosa-1-fosfate aldolasa	Metabolismo, utilización de carbono, carbohidratos	NC
<i>cdd</i>	0.1256	0.0000	Enzima: citidin deaminasa	Metabolismo, utilización de carbono, nucleótidos	CytR, NsrR, Crp(dual)
<i>trxC</i>	0.0985	0.0000	Polipéptido: thioredoxina reducida 2	Procesos celulares, crecimiento aerobio	NC
<i>ffs</i>	0.2415	0.0000	RNA: 4.5S RNA componente de la señal de partícula de reconocimiento (SRP)	Procesos celulares, mecanismo de integración en proteínas en membrana	NC
<i>b4140</i>	0.0704	0.0000	(<i>fxsA</i>) Polipéptido: proteína interna de membrana; su sobre producción inhibe la exclusión de bacteriófago T7	Procesos celulares, procesos asociados a infección de fagos	NC
<i>grxA</i>	0.1283	0.0000	Polipéptido: glutaredoxin reducida 1	Procesos celulares, procesos de oxidorreducción	NC
<i>hokB</i>	0.1094	0.0000	Polipéptido: pequeño polipéptido de membrana tóxico	Procesos celulares, proteína tóxica	NC
<i>ytfE</i>	0.1249	0.0000	Polipéptido: proteína involucrada en la reparación de clústeres de hierro sulfuro	Procesos celulares, respuesta a estrés por daño de clústeres hierro-azufre	Fnr, NsrR

<i>yhfY</i>	0.1400	0.0045	Polipéptido: proteína conservada	Proteína conservada	NC
<i>ygbA</i>	0.0794	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	Fnr, NsrR
<i>yjfY</i>	0.1045	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ydchH</i>	0.1595	0.0040	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ycdZ</i>	0.0927	0.0000	Polipéptido: proteína interna de membrana predicha	Proteína por predicción asociada a membrana	NC
<i>ybjM</i>	0.1855	0.0042	Polipéptido: proteína interna de membrana predicha	Proteína por predicción asociada a membrana	NC
<i>tpr</i>	0.1665	0.0000	Polipéptido: proteína parecida a protamina predicha	Proteína por predicción asociada a protaminas	NC
<i>b1649</i>	0.1554	0.0103	(<i>nemR</i>) Polipéptido: NemR represor transcripcional con unión a DNA	Regulador, regulador transcripcional negativo	NemR, RutR
<i>galS</i>	0.2031	0.0071	Polipéptido: GalS regulador transcripcional dual con unión a DNA	Regulador, represor transcripcional, operón gal	GalR, GalS
<i>ryjA</i>	0.0865	0.0000	RNA: RyjA pequeño RNA	RNA pequeño	NC
<i>rttR</i>	6.5303	0.0074	(<i>rttR</i>) RNA: RttR pequeño RNA	RNA pequeño procesado del transcrito de <i>tyrT</i>	NC
<i>ytfQ</i>	0.1118	0.0000	Polipéptido: proteína con unión a periplasma transportador ABC – galactofuranosa /galactopiranososa	Transportador de azúcares, galactosa	NC
<i>yjfF</i>	0.1879	0.0000	Polipéptido: transportador ABC galactofuranosa /galactopiranososa putativo	Transportador de azúcares, galactosa	NC
<i>ytfR</i>	0.1834	0.0156	Polipéptido: transportador ABC, subunidad con unión a ATP galactofuranosa /galactopiranososa putativo	Transportador de azúcares, galactosa	NC

<i>rbsA</i>	0.1571	0.0077	Polipéptido: transportador ABC, ribosa, subunidad con unión a ATP putativo	Transportador de azúcares, ribosa	RbsR
<i>ynfM</i>	0.0300	0.0000	Polipéptido: YnfM MFS transportador	Transportador de función desconocida	NC
<i>wzxC</i>	0.5568	0.0000	Polipéptido: WzxC	Transportador de función desconocida	NC
<i>gntP</i>	0.1055	0.0000	Transporter: transportador GntP gluconato/fructuronato	Transportador, gluconato/fructonato	OxyR, UxuR
<i>ytfS</i>	0.1213	0.0000	(<i>ytfR</i>) Polipéptido: transportador ABC galactofuranosa / galactospiranosa putativo	Transporte de azúcares	NC
<i>yfiK</i>	0.1292	0.0000	(<i>eamB</i>) Transportador: O-Acetilserina/Cisteína Permeasa	Transporte de proteínas	NC

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc; NC, Factor transcripcional no conocido.

Tabla 13 Genes sobre expresados en EXP respecto a STA2 (30 genes con la mayor sobre expresión)

Gen/ b number	Expresión promedio^a	FDR^a	Producto^b	Categoría funcional^b	Factor transcripcional (activador)^b
<i>hdeB</i>	56.2185	0	Polipéptido: chaperona de estrés por acidez	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, PhoP, RcsB, TorR, TorI
<i>yhiE</i>	46.2077	0.045	(gadE) Polipéptido: GadE activador transcripcional con unión a DNA	Adaptación, resistencia a pH ácido	EvgA, GadE, GadW, GadX, PhoP, YdeO
<i>yhiW</i>	37.7545	0.0406	(gadW) Polipéptido: GadW transcripcional regulador dual con unión a DNA	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, PhoP, SdiA
<i>hdeA</i>	32.4174	0.0470	Proteína: HdeA dímero, proteína ácido resistencia	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, PhoP, RcsB, TorR, TorI
<i>nrdA</i>	37.6063	0.0391	Proteína: ribonucleosido difosfato reductasa 1, α subunidad dímero	Metabolismo, metabolismo central intermediario, nucleótidos y nucleósidos	ArgP, Crp, Fis
<i>cysD</i>	236.2573	0	Polipéptido: CysD	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB, O-acetilserina
<i>cysH</i>	194.5029	0	Enzima: 3'-fosfo-adenililsulfato reductasa	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB, O-acetilserina
<i>cysC</i>	52.8463	0.0222	Enzima: adenililsulfato cinasa	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB, O-acetilserina
<i>ompT</i>	35.7201	0.0428	Enzima: proteasa membrana externa VII (Proteína 3b)	Metabolismo, degradación de macromoléculas, Proteínas/péptidos/glicoproteínas	PhoP
<i>cysJ</i>	62.3545	0.0419	Enzima: subunidad sulfito reductasa,	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de	CysB, IhfB, IhfA

			complejo flavoproteína	electrones	
<i>ydiQ</i>	29.9949	0.0428	Polipéptido: subunidad de YdiQ-YdiR flavoproteína	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de electrones	NC
<i>tnaA</i>	139.612	0	L-cisteína desulfhidrasa / triptofanasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Crp, Tor-P
<i>cysK</i>	83.0795	0.0444	Enzima: cisteína sintasa A	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	CysB, O-acetilserina
<i>tnaL</i>	62.9786	0	tna operón péptido líder	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Crp, Tor-P
<i>gcvT</i>	38.3508	0.0333	Enzima: aminometil transferasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Fnr, Lrp
<i>gcvP</i>	33.3045	0.0411	Enzima: glicina descarboxilasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Fnr, Lrp
<i>gcvH</i>	30.4954	0.0421	Polipéptido: glicina escisión sistema H	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Fnr, Lrp
<i>fimC</i>	63.3469	0	Polipéptido: chaperona periplásmica, requerido para fimbria del tipo 1	Procesos celulares, formación de fimbrias	IhffB, IhfA, H-SN, Lrp
<i>rpsT</i>	45.8727	0.0333	Polipéptido: 30S ribosomal subunidad proteína S20	Procesos celulares, traducción, Componente de subunidad ribosomal 30S	NC
<i>nlpA</i>	48.3193	0.0466	Polipéptido: lipoproteína-28	Proteína de membrana, lipoproteína	CsgD
<i>yciW</i>	116.143	0.02	Polipéptido: oxidoreductasa predicha	Proteína por predicción	No conocido
<i>yieI</i>	31.9089	0.0375	(cbrB) Polipéptido: proteína predicha de membrana interna	Proteína por predicción, proteína de membrana	CreB

<i>malE</i>	230.465	0	maltosa ABC transportador - Proteína periplásmica de unión	Transporte de azúcares	Crp, Fis, MalT
<i>proX</i>	48.2956	0.025	Polipéptido: glicina betaína/prolina ABC transportador - periplásmica de unión	Transporte, adaptación, presión osmótica,	NC
<i>proW</i>	35.6682	0.0461	Polipéptido: subunidad glicina betaína/prolina ABC transportador-membrana	Transporte, adaptación, presión osmótica,	NC
<i>proV</i>	34.7487	0.0409	Polipéptido: subunidad glicina betaína/prolina ABC transportador-ATP unión	Transporte, adaptación, presión osmótica,	NC
<i>oppB</i>	44.3550	0.0321	Polipéptido: subunidad mureína tripéptido ABC transportador / putativo membrana	Transporte, péptidos	NC
<i>ompC</i>	61.2831	0.0181	Transportador: porina C membrana externa	Transporte, porinas	CpxR, EnvY, OmpR
<i>dppF</i>	32.6107	0.0437	Polipéptido: subunidad dipéptido ABC transportador - putativo ABC unión	Transporte, transportador ABC	IhfB, IhfA
b1729	43.4943	0.0346	(yjdN) Polipéptido: transportador	Transporte, transportador putativo	NC

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc; NC, Factor transcripcional no conocido.

Tabla 14 Genes subexpresados en EXP respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados)

Gen/ bnumber	Expresión promedio ^a	FDR ^a	Producto ^b	Categoría funcional ^b	Factor transcripcional (represor) ^b
<i>trxC</i>	0.0901	0.0105	Polipéptido: tioredoxina 2	Procesos celulares, crecimiento aerobio	NC
<i>hokD</i>	0.1000	0.0346	Polipéptido: profago; polipéptido toxina pequeña	Procesos celulares, estabilización de DNA plasmídico	RelB, RelE
b0836	0.0482	0.0000	(bssR) Polipéptido: regulador de formación biopelícula	Procesos celulares, formación de biopelícula	NC
<i>ymgC</i>	0.0325	0.0000	Polipéptido: proteína involucrada en formación de biopelícula	Procesos celulares, movilidad y formación de biopelícula	YcgE
<i>ymgA</i>	0.0457	0.0000	Polipéptido: proteína involucrada en formación de biopelícula	Procesos celulares, movilidad y formación de biopelícula	YcgE
<i>grxA</i>	0.1228	0.0333	Polipéptido: glutaredoxina 1	Procesos celulares, procesos de oxidorreducción	NC
<i>pspD</i>	0.0396	0.0000	Polipéptido: membrana periférica interna en respuesta a choque por fago	Procesos celulares, respuesta a estrés	NC
<i>ycfR</i>	0.0926	0.0100	(bhsA) Polipéptido: membrana externa involucrada en permeabilidad, resistencia al estrés y formación biopelícula	Procesos celulares, respuesta a estrés y formación de biopelícula	ComR, Crp
<i>ybiM</i>	0.0667	0.0111	(mcbA) Polipéptido: proteína involucrada en producción de ácido colánico	Procesos celulares, señalización célula-célula, formación de biopelícula	McbR
<i>yech</i>	0.1329	0.0471	Polipéptido: proteína conservada	Proteína conservada	NC

<i>ybaA</i>	0.1343	0.0406	Polipéptido: proteína conservada	Proteína conservada	NC
<i>yjfY</i>	0.0375	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ybfA</i>	0.0540	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>yohC</i>	0.0889	0.0238	Polipéptido: membrana interna predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ygbA</i>	0.1010	0.0318	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	Fnr, NsrR
b1965	0.1327	0.0300	(<i>yedS_2</i>) Polipéptido: proteína predicha, fragmento medio	Proteína por predicción	NC
<i>ycgZ</i>	0.0437	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción, procesos celulares, estimulación choque por frío	YcgE
<i>pspA</i>	0.1092	0.0321	Polipéptido: proteína regulatoria por choque por fago operón	Regulador transcripcional negativo de porinas	NC
<i>ytfH</i>	0.1215	0.0310	Polipéptido: transcripcional regulador predicho	Regulador transcripcional por predicción	NC
<i>pspC</i>	0.0330	0.0000	Proteína: PspC transcripcional regulador; toxina del PspC-PspB toxina-antitoxina par	Regulador, activador transcripcional, en infección por fagos, exposición a etanol o choque osmótico	NC
<i>pspB</i>	0.0435	0.0000	Polipéptido: PspC media la activación transcripcional del operón psp; antitoxina del PspC-PspB par toxina-antitoxina	Regulador, activador transcripcional, en infección por fagos, exposición a etanol o choque osmótico	NC
<i>yceP</i>	0.1108	0.0375	(<i>bssS</i>) Polipéptido: regulador de formación de biopelícula	Regulador, producción de biopelícula	NC
<i>ymgB</i>	0.0421	0.0000	(<i>ariR</i>) Proteína: regulador de ácido resistencia, influenciado por indol	Regulador, producción de biopelícula y estrés ácido	YcgE

b1649	0.0626	0.0125	(<i>nemR</i>) Polipéptido: NemR con unión a DNA represor transcripcional	Regulador, regulador transcripcional negativo	NemR, RutR
<i>dsrA</i>	0.0557	0.0000	RNA: DsrA RNA; riboregulador de producción de RpoS y H-NS	Regulador, RNA regulador	LeuO
<i>ryjA</i>	0.0294	0.0000	RNA: RyjA pequeño RNA regulador	RNA pequeño de función desconocida	NC
<i>ytfS</i>	0.1227	0.0455	(<i>ytfR</i>) Polipéptido: galactofuranose / galactopiranosas ABC transportador - putativo ATP subunidad de unión	Transportador de azúcares	NC
b2670	0.1112	0.0290	(<i>alaE</i>) Transportador: L-alanina exportador	Transportador, aminoácidos (exportador)	NC
<i>ynfM</i>	0.0317	0.0000	Polipéptido: YnfM MFS transportador	Transportador, eflujo de drogas	NC
b2392	0.1210	0.0360	(<i>mntH</i>) Transportador: Mn(2+) / Fe(2+): H+ simporte MntH	Transportador, iones	FurR, MntR

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc (ecocyc.org); NC, Factor transcripcional no conocido.

9.3.2 Genes diferencialmente expresados en estacionario, resultados y discusión

Para el análisis realizado en la fase STA1 respecto a la STA2 se observó la sobre expresión de 50 genes y la represión de 47 genes de acuerdo al punto de corte de 0.5 en el valor de FDR del análisis por el RA (Breitling *et al.*, 2005) (Tabla 10). La Tabla 13 muestra un resumen de los 30 genes con los mayores valores de sobre expresión, mientras que la Tabla 14 muestra un resumen de los 30 genes mayormente reprimidos. Las Tablas 13 y 14 también incluyen los factores transcripcionales involucrados en su expresión y represión, respectivamente.

Las diferencias principales entre las etapas estacionarias temprana y tardía, son el aumento de la producción de SHK y el agotamiento de glucosa en el medio de cultivo. Entre estos dos puntos la cepa agota la glucosa del medio lo que corresponde al 72% añadida en el sistema. Durante STA1 y la STA2 la cepa PB12.SA22 produce el 65% de SHK. En el punto en el que se tomo la muestra de STA2, han transcurrido 18 horas sin glucosa en el medio, aun así a partir de este momento y hasta el final de la fermentación la cepa es capaz de sintetizar 1.63 g/L de SHK.

En el estado STA1 entre a hora 8 y 9 se detiene el crecimiento, aun con glucosa en el medio. Los resultados experimentales indican que la cepa PB12.SA22 probablemente entra al estado estacionario porque han agotado los compuestos aromáticos del medio de cultivo (Figura 7). Una vez que ha entrado al estado estacionario comienza la mayor producción de SHK. En el estado estacionario tardío (44hr) no hay crecimiento, se ha agotado la glucosa y se observa la mayor concentración extracelular de SHK.

El estado STA la cepa PB12.SA22 no presentó aumento de la biomasa pero si un importante incremento en la producción alta SHK en el medio de cultivo y consumo de glucosa. En este estado se encontró la sobre expresión de genes relacionados con la adaptación al pH ácido, la adaptación al estrés osmótico, la producción de energía, la modificación de lípidos de la membrana, los transportadores y el metabolismo de aminoácidos.

Los resultados de transcripción indican (Tabla 15, 16) que los reguladores: ArgR, GadE presentan una participación importante en el control de la expresión durante la etapa estacionaria.

En estado STA la cepa detiene su crecimiento, probablemente porque ha consumido la mayor parte de las fuentes de carbono del YE, así que es de esperarse que se observe la subexpresión de genes

relacionados al catabolismo y sobre expresión genes relacionados a la biosíntesis. Se encontró la sobre expresión de genes relacionados a la biosíntesis de cobalamina (*metE*), cisteína (*cysD*, *cysN*), L-arginina (*argA*, *argBCDEGHI*, *artJ* y *hisM*, *carA*, *carB*) (Tabla 15). Y se observó la subexpresión de los genes *astCADBE* (Tabla 14) que codifican para la vía de degradación de L-arginina. La expresión de estos genes se regula por la disponibilidad de L-arginina y nitrógeno, mediado por NtrC y ArgR (Schneider *et al.*, 1998; ecocyc.org; regulondb.unam.mx).

El gen *metE* (Tabla 15) codifica para homocisteína transmetilasa dependiente de cobalamina, MetE. MetE en ausencia de vitamina B12 exógena cataliza el paso final de la biosíntesis de metionina. La expresión de *metE* se reprime en presencia de la vitamina B12, mientras que MerR unida a homoserina activa la expresión. La homoserina es un intermediario de la biosíntesis de metionina (González *et al.*, 1992). Este resultado sugiere que la cepa productora ha consumido la vitamina B12 adicionada al medio de cultivo al inicio de la fermentación y que probablemente la vía de síntesis de metionina está activa en esta etapa. Los genes *cysD* y *cysN* (Tabla 13) codifican para la sulfato adeniltransferasa, la cual transforma el sulfato a adenosin-5-fosfosulfato (A5F). La expresión de expresión *cysD* y *cysN* se activa por CysB unido a O-acetilserina. La serina acetiltransferasa cataliza la síntesis de este compuesto acetilserina y la actividad de esta enzima se regula por inhibición por cisteína. Por lo tanto la concentración de cisteína controla indirectamente la expresión de los genes *cysD*, *cysN*, su presencia en el medio de cultivo resulta en la represión de las enzimas involucradas en la asimilación de sulfuro (Van der Ploeg *et al.*, 2001). La expresión de estos genes sugiere que en estado STA1 probablemente la cepa PB12.SA22 ha consumido por completo la cisteína lo que promueve la síntesis de este aminoácido a partir de sulfato y serina.

En *E. coli* los genes *argABCDEGHI* están dispersos en el genoma, su expresión la controla la proteína ArgR unida a L-arginina mediante represión. La vía está conectada con la biosíntesis de la pirimidina, las poliaminas y algunas vías catabólicas. En fase STA se requiere la actividad de RpoS para el control completo de la síntesis de L-arginina. El aminoácido no solo se utiliza en la síntesis de proteína sino también como precursor de las poliaminas y la putrecina (Lu, 2006). La L-arginina es un metabolito importante en estado STA debido a que es un importante reservorio de nitrógeno y representa hasta el 11% de total del nitrógeno contenido en las células. Es un precursor potencial de la biosíntesis de las poliaminas como la putrecina y la esperimidina, los cuales son compuestos que reducen el daño oxidativo de proteínas y del DNA durante STA (Weerasinghe *et al.*, 2006). Además la L-arginina se utiliza en la síntesis de proteínas de 'novo' para la adaptación y mantenimiento en este estado. La sobre expresión de los genes relacionados a la toma y biosíntesis de L-arginina, en estado STA1,

sugieren que la cepa PB12.SA22 podría utilizarse el aminoácido para la síntesis de AroB AroE AroG^{fbr}, cuyos genes están clonados en plásmidos, requeridos para la producción de SHK.

Se encontró también la sobre expresión del gen *narU* (Tabla 15) que codifica para un transportador de nitrato en *E. coli* NarU (Bonney et al., 1994). La sobre expresión de los genes *argA*, *argBCDEGHI*, *artJ* *hisM*, *carAB*, *narU* en STA y su alta subexpresión en EXP son evidencias del alto control de expresión sobre la vía de síntesis de aminoácidos. Los resultados indican que en STA la cepa productora podría haber consumido por completo a la L-arginina por lo que presenta alta demanda del aminoácido y nitrógeno.

Cabe mencionar que en el estado STA se detectan la mayor concentración de SHK extracelular, esto concuerda con la sobre expresión de una gran cantidad de genes en respuesta al aumento intracelular de acidez, *gadE* (*yhiE*), *gadBC*, *hdeABD*, *dctR* (*yhiF*), *ybaS* (Tabla 13). El gen *gadE* (*yhiE*) codifica para el factor transcripcional GadE que controla la regulación de los genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis del pH y del principal sistema de ácido resistencia dependiente de glutamato (AR2) (*gadA*, *gadB*). Los genes *gadA* y *gadB* codifican para las isoenzimas glutamato descarboxilasa GadA y GadB, respectivamente. Estas enzimas reemplazan el grupo α -carboxil del glutamato utilizando un protón reclutado del citoplasma, en esta reacción se produce CO₂ y γ -ácido aminobutírico (AAB). El gen *gadC* codifica para el antiporter GadC que exporta los productos de decarboxilación y los intercambia por un nuevo glutamato como sustrato (Tucker et al., 2003; Foster et al., 2004). En *E. coli* existen tres sistemas de ácido resistencia: el dependiente de glucosa (AR1), glutamato (AR2), L-arginina (AR3) y el propuesto por Lee et al., 2007b, YmgABC. El sistema AR1 se presenta en condiciones de limitación de glucosa, sin embargo no se sabe cuáles son los genes que intervienen en la regulación intracelular del pH (Foster et al., 2004). El sistema AR3 es sistema similar al AR2, en este caso la arginina descarboxilasa, AdiA, lleva a cabo la reacción de sustitución del grupo carboxil liberando agmatina y el antiporter AdiC libera el producto de decarboxilación (Foster et al., 2004). Considerando dos puntos importante: la sobre expresión de los genes de la biosíntesis de L-arginina y la sobre expresión de los genes que codifica para el sistema AR3, el cual requiere de este aminoácido extracelular para regular el pH interno, son fuertes indicativos de que el glutamato es el principal sistema de ácido resistencia utilizado por la cepa PB12.SA22 en estado STA2 para regular el pH.

La sobre expresión del gen que codifica para el regulador GadE hacen sentido con la expresión de genes en activado por GadE como *dctR* y en respuesta al aumento de acidez como lo son los genes *hdeABD* (Tabla 15), los cuales pertenecen al operón de estrés por acidez. Los genes *hdeABD*

codifican para las enzimas HdeA y HdeB, respectivamente, son proteínas chaperonas que disminuyen la agregación de proteínas periplásmicas en condiciones ácidas y se ha identificado que en vivo son necesarias para la óptima protección del periplasma contra estrés por acidez (Kern *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha observado que la expresión de los genes *hde* disminuyen con el aumento en la concentración intracelular de indol (Lee *et al.*, 2007b). La sobre expresión de estos genes podría sugerir que es estado STA la concentración intracelular de indol es menor con respecto al EXP probablemente al aumento de su exporte. Se ha propuesto que la proteína codificada por *dctR* y *slp* contrarrestan los efectos de la acumulación de productos finales del metabolismo: formato, succinato y lactato, los cuales son dañinos debido a que provocan la disminución del pH hasta 2.5 (Mates *et al.*, 2007). Por otra parte el gen *ybaS* codifica para una glutaminasa que es altamente selectiva a L-glutamina, su expresión es activada por GadX y se ha observado que su expresión incrementa en condiciones de acidez (ecocy.org).

RpoS es el principal factor sigma que controla la respuesta general de estrés en *E. coli* y activa la expresión de los genes que típicamente se expresan en condiciones de estrés como los genes *gad* (Notley- McRobb *et al.*, 2002). A su vez, el producto de los genes *gad* activan la expresión genes en respuesta a acidez *hdeBA*, *yhiD* (Tabla15). Por lo que estos resultados son un claro indicativo de que el medio de cultivo, así como la producción y la acumulación de ácido desencadenan la respuesta general de estrés en la cepa PB12.SA22.

Se ha observado que someter a *E. coli* bajo condiciones de limitación de glucosa y de nitrógeno se generan mutaciones en el gen *rpoS* lo que provoca la pérdida de la funcional de su producto, RpoS. La pérdida o la disminución de la actividad de RpoS es un fenómeno que le permite a las cepas mutantes contender con el estrés causado por la limitación de nutrientes. La mutación favorece el aumento de la expresión de genes relacionados con sistema de transportadores con alta afinidad por glucosa requeridos en una condición de *scavenging* (Notley- McRobb *et al.*, 2002, Minty *et al.*, 2011).

Ahora bien, se sabe que la cepa PB12 presenta una mutación en la posición 98, del gen *rpoS* que modifica el codón TCG a TAG y provoca la aparición de un codón de paro que suprime la traducción de RpoS (Flores N *et al.*, 2008). Sin embargo, la cepa parental JM101 contiene una mutación *supE* la cual suprime parcialmente el codón de paro (Bolivar *et al.*, 1977). Esto le permite a la cepa PB12 la expresión de *rpoS* y síntesis de RpoS aunque en una menor proporción. Lo anterior se refleja en la expresión de genes que depende exclusivamente de RpoS, tal como se observa en Flores N *et al.*, 2008 y que coincide con este trabajo. Flores N *et al.*, 2008 y Olvera *et al.*, 2009 han propuesto que la disminución de la actividad de la RpoS en las cepa PB12 se compensa parcialmente por la actividad

de sigma 70 (RpoD) debido a la similitud entre los promotores de ambos sigmas. De esta forma la disminución de la actividad de RpoS le permite a la cepa PB12.SA22 sobreponerse a la condición PTS- dándole la posibilidad de consumir glucosa como única fuentes de carbono y en el medio de cultivo y le permite alcanzar un alta biomasa mediante el transporte y la utilización de compuestos nutritivos de YE. Por otro la actividad de RpoD le permitiría la expresión por ejemplo de los genes glucolíticos en estado STA. De allí que se observe el consumo de de glucosa durante esta etapa, por parte de la PB12.SA22.

Los resultados de transcripción de la cepa productora en estado STA sugieren que esta ha consumido la mayor parte de los compuestos nutritivos en el medio, por lo que observa la sobre expresión de genes relacionados a la vía de biosíntesis de diversos aminoácidos y la subexpresión de genes relacionados al transporte y catabolismo. Así también, se encontró que la mayor parte de los genes sobre expresados en esta etapa responden al aumento del estrés, particularmente el incremento de acidez, probablemente relacionado con el aumento de la producción de SHK, aumento de la concentración de compuestos de desecho y el agotamiento de nutrientes.

Tabla 15. Genes sobre expresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes con la mayor sobre expresión)

Gen/ b number	Expresión promedio ^a	FDR ^a	Producto ^b	Categoría funcional ^b	Factor transcripcional (activador) ^b
<i>yhiE</i>	224.6027	0.0000	(<i>gadE</i>) Polipéptido: GadE activador transcripcional con unión a DNA	Adaptación, resistencia a pH ácido	EvgA, GadE, GadW, GadX, PhoP, YdeO
<i>hdeD</i>	140.6337	0.0000	Polipéptido: proteína de membrana sistema de ácido resistencia	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, GadY, PhoP, RcsB
<i>hdeA</i>	125.3695	0.0000	Proteína: dímero HdeA, forma inactiva de proteína de ácido resistencia	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, PhoP, RcsB, Tor, TorI
<i>hdeB</i>	104.9129	0.0000	Polipéptido: chaperona de estrés por acidez	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, PhoP, RcsB, Tor, TorI
<i>gadB</i>	94.5462	0.0000	Enzima: glutamato decarboxilasa B	Adaptación, resistencia a pH ácido	AdiY, GadE, GadX, RcsB
<i>yhiF</i>	33.7016	0.0000	(<i>dctR</i>) Polipéptido: predicho regulador transcripcional con unión a DNA	Adaptación, resistencia a pH ácido	GadE, RcsB, GadX
<i>gadC</i>	28.9528	0.0061	Transportador: antiporter de ácido glutámico:4-aminobutirato	Adaptación, resistencia a pH ácido	AdiY, GadE, GadX, RcsB
<i>ybaY</i>	31.4852	0.0000	Polipéptido: predicha proteína externa de membrana	Adaptación, respuesta a estrés osmótico	NC
<i>cysD</i>	34.5193	0.0031	Polipéptido: CysD	Metabolismo, compuestos azufrados	CysB
<i>ydiQ</i>	32.4583	0.0000	Polipéptido: putativo subunidad de flavoproteína YdiQ-YdiR	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de electrones	NC

<i>ydiR</i>	32.3715	0.0000	Polipéptido: putativo subunidad de flavoproteína YdiQ-YdiR	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de electrones	NC
<i>ydiT</i>	28.0548	0.0000	Polipéptido: putativo ferredoxina	Metabolismo, producción de energía/transporte, aceptor de electrones	NC
<i>argA</i>	87.9837	0.0000	Enzima: acetilglutamate sintasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>ilvG-1</i>	75.4038	0.0000	Polipéptido: acetolactato sintasa II, subunidad grande, fragmento N-terminal (pseudogene)	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	IhfB, IhfA (dual)
<i>argG</i>	65.2192	0.0000	Enzima: argininosuccinato sintetasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	Crp
<i>metE</i>	59.0097	0.0000	Enzima: cobalamin-independiente homocisteína transmetilasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	MetR
<i>argC</i>	53.4932	0.0000	Enzima: N-acetilglutamilfosfate reductasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>argB</i>	45.8143	0.0000	Enzima: N-acetilglutamate cinasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>argI</i>	33.2672	0.0000	Enzima: ornitina carbamoiltransferasa cadena I	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	DksA, ppGpp
<i>ilvG-2</i>	24.6648	0.0000	Polipéptido: acetolactato sintetasa II, subunidad grande, fragmento N-terminal (pseudogene)	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	IhfB, IhfA (dual)
<i>argH</i>	23.7859	0.0000	Enzima: argininosuccinate liase	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>argD</i>	21.9053	0.0000	Enzima: N-succinildiaminopimelato-aminotransferasa / acetilornitina	Metabolismo, utilización de	NC

			transaminasa	carbono, aminoácidos	
<i>carA</i>	107.7785	0.0000	Polipéptido: CarA	Metabolismo, utilización de carbono aminoácidos/nucleótidos	Fis, RutR
<i>carB</i>	23.9781	0.0000	Polipéptido: CarB	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos/nucleótidos	Fis, RutR
<i>b2254</i>	33.1058	0.0000	(<i>arnC</i>) Enzima: undecaprenil fosfato-L-Ara4FN transferasa	Procesos celulares, modificación de lípidos de membrana	NC
<i>ykfE</i>	40.8144	0.0000	(<i>ivy</i>) Proteína: inhibidor de la lisozima de vertebrado tipo C	Procesos celulares, resistencia (lisozima)	NC
<i>artJ</i>	120.3908	0.0000	Polipéptido: proteína con unión a periplasma transportador tipo ABC	Transportador, aminoácidos	NC
<i>hisM</i>	44.5442	0.0000	Polipéptido: lisina/arginina/ornitina/histidina transportador ABC	Transportador, aminoácidos	P-NtrC, H-NS
<i>yhiD</i>	52.2858	0.0000	Polipéptido: transporte de Mg(2+) ATPasa predicho	Transportador, putativo	GadE, PhoP, RcsB, Tor, TorI
<i>narU</i>	62.1767	0.0000	Transportador: NarU MFS nitrato/nitrito antiporter	Transportador, nitrito/nitrato	NC

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc; NC, Factor transcripcional no conocido.

Tabla 16. Genes subexpresados en STA1 respecto a STA2 (30 genes altamente subexpresados)

Gen/ b number	Expresión promedio ^a	FDR ^a	Producto ^b	Categoría funcional ^b	Factor transcripcional (represor) ^b
b1748	0.1561	0.0000	(<i>astC</i>) Enzima: succinilornitina transaminasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
b1746	0.5891	0.0043	(<i>astD</i>) Enzima: aldehído deshidrogenasa	Metabolismo, utilización de carbono, aminoácidos	NC
<i>rhaD</i>	0.2643	0.0000	Enzima: rhamnulosa-1-fosfate aldolasa	Metabolismo, utilización de carbono, carbohidratos	NC
<i>cdd</i>	0.1256	0.0000	Enzima: citidin deaminasa	Metabolismo, utilización de carbono, nucleótidos	CytR, NsrR, Crp(dual)
<i>trxC</i>	0.0985	0.0000	Polipéptido: thioredoxina reducida 2	Procesos celulares, crecimiento aerobio	NC
<i>ffs</i>	0.2415	0.0000	RNA: 4.5S RNA componente de la señal de partícula de reconocimiento (SRP)	Procesos celulares, mecanismo de integración en proteínas en membrana	NC
<i>b4140</i>	0.0704	0.0000	(<i>fxsA</i>) Polipéptido: proteína interna de membrana; su sobre producción inhibe la exclusión de bacteriófago T7	Procesos celulares, procesos asociados a infección de fagos	NC
<i>grxA</i>	0.1283	0.0000	Polipéptido: glutaredoxin reducida 1	Procesos celulares, procesos de oxidorreducción	NC
<i>hokB</i>	0.1094	0.0000	Polipéptido: pequeño polipéptido de membrana tóxico	Procesos celulares, proteína tóxica	NC
<i>ytfE</i>	0.1249	0.0000	Polipéptido: proteína involucrada en la reparación de clústeres de hierro sulfuro	Procesos celulares, respuesta a estrés por daño de clústeres hierro-azufre	Fnr, NsrR

<i>yhfY</i>	0.1400	0.0045	Polipéptido: proteína conservada	Proteína conservada	NC
<i>ygbA</i>	0.0794	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	Fnr, NsrR
<i>yjfY</i>	0.1045	0.0000	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ydchH</i>	0.1595	0.0040	Polipéptido: proteína predicha	Proteína por predicción	NC
<i>ycdZ</i>	0.0927	0.0000	Polipéptido: proteína interna de membrana predicha	Proteína por predicción asociada a membrana	NC
<i>ybjM</i>	0.1855	0.0042	Polipéptido: proteína interna de membrana predicha	Proteína por predicción asociada a membrana	NC
<i>tpr</i>	0.1665	0.0000	Polipéptido: proteína parecida a protamina predicha	Proteína por predicción asociada a protaminas	NC
<i>b1649</i>	0.1554	0.0103	(<i>nemR</i>) Polipéptido: NemR represor transcripcional con unión a DNA	Regulador, regulador transcripcional negativo	NemR, RutR
<i>galS</i>	0.2031	0.0071	Polipéptido: GalS regulador transcripcional dual con unión a DNA	Regulador, represor transcripcional, operón gal	GalR, GalS
<i>ryjA</i>	0.0865	0.0000	RNA: RyjA pequeño RNA	RNA pequeño	NC
<i>rttR</i>	6.5303	0.0074	(<i>rttR</i>) RNA: RttR pequeño RNA	RNA pequeño procesado del transcrito de <i>tyrT</i>	NC
<i>ytfQ</i>	0.1118	0.0000	Polipéptido: proteína con unión a periplasma transportador ABC – galactofuranosa /galactopiranososa	Transportador de azúcares, galactosa	NC
<i>yjfF</i>	0.1879	0.0000	Polipéptido: transportador ABC galactofuranosa /galactopiranososa putativo	Transportador de azúcares, galactosa	NC
<i>ytfR</i>	0.1834	0.0156	Polipéptido: transportador ABC, subunidad con unión a ATP galactofuranosa /galactopiranososa putativo	Transportador de azúcares, galactosa	NC

<i>rbsA</i>	0.1571	0.0077	Polipéptido: transportador ABC, ribosa, subunidad con unión a ATP putativo	Transportador de azúcares, ribosa	RbsR
<i>ynfM</i>	0.0300	0.0000	Polipéptido: YnfM MFS transportador	Transportador de función desconocida	NC
<i>wzxC</i>	0.5568	0.0000	Polipéptido: WzxC	Transportador de función desconocida	NC
<i>gntP</i>	0.1055	0.0000	Transporter: transportador GntP gluconato/fructuronato	Transportador, gluconato/fructonato	OxyR, UxuR
<i>ytfS</i>	0.1213	0.0000	(<i>ytfR</i>) Polipéptido: transportador ABC galactofuranosa / galactospiranosa putativo	Transporte de azúcares	NC
<i>yfiK</i>	0.1292	0.0000	(<i>eamB</i>) Transportador: O-Acetilserina/Cisteína Permeasa	Transporte de proteínas	NC

^a.Valores de análisis de ranqueo; ^b.Información obtenida de Ecocyc; NC, Factor transcripcional no conocido.

9.3.4 Metabolismo Central de Carbono y vía del shikimato

Los valores de expresión de los genes del Metabolismo Central de Carbono (MCC) no presentaron cambios de expresión diferencial de acuerdo al método de RP. Al analizar los resultados de las Tablas 12-17 y la tendencia en los valores de expresión de los genes del MCC (mostrados en la Figura 8), se encontró que tienen similitud con lo que reporta Hardiman *et al.*, 2007 y Martínez, 2011. A partir de los resultados de estos autores se propone lo que podría estar sucediendo sobre el MCC de la cepa PB12.SA22 en el medio de producción.

Durante el estado EXP se encontró una expresión mayor de los genes de TCA y la vía de las pentosas fosfato (PPP), mientras que la mayoría de los genes de la vía de glucólisis se encontraron poco expresados. De acuerdo a Hardiman *et al.*, (2007) esta condición metabólica es característica de una cepa de *E. coli* en un estado de limitación de carbono. En esta condición se observa un aumento de la concentración intracelular de cAMP y CRP. Debido a lo anterior el flujo de TCA aumenta considerablemente dado el incremento del nivel de CRP-cAMP que activa casi todos los genes de ciclo: *gltA*, *acnB*, *acnA*, *sucABCD*, *lpdA*, *sdhCDAB*, *fumB*, y *mdh*. En este trabajo se encontró una expresión mayor de todos estos genes (Figura 10).

Bajo condición de limitación de carbono, Hardiman *et al.*, 2007 observó que el flujo de carbono sobre glucólisis disminuye debido a la represión de los genes de esta vía. Propone además, que la proteína Cra es el principal controlador del flujo de carbono bajo esta condición. Cuando las reacciones de la glucólisis no permiten la acumulación de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) el metabolito se une a la proteína Cra y de esta forma la proteína reprime la expresión de los genes *pfkA*, *pykF*, que codifican para la enzima que cataliza la transformación de fructosa-6-fosfato (F6P) a FBP (PfkA) y la enzima que transforma PEP a PYR (PykF), respetivamente, mientras que activa la expresión de *pps* y *pck*, genes que codifican para la enzima que lleva a cabo la reacción inversa que PykF (fosfoenolpiruvato cinasa) y la enzima que transforma el OXA a PEP (fosfoenolpiruvato carboxicinasa), respetivamente. Por lo tanto Cra promueve un flujo gluconeogénico (Ramseier *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 2010). Esto coincide con la tendencia de resultados obtenidos del MCC de este trabajo (Figura 8).

En estado EXP se encontró una mayor expresión de los genes de TCA sobre los de glucólisis, esto podría sugerir una mayor concentración de las enzimas del ciclo y probablemente una mayor actividad enzimática de las mismas. Lo anterior aunado al bajo consumo de glucosa durante esta etapa, nos permite proponer que, durante EXP, TCA probablemente presenta un papel fundamental en la

utilización de los nutrientes, recirculación de metabolitos y obtención de energía. TCA supe la alta demanda bioenergética impuesta bajo la condición de limitación de carbono. Por otra parte la probable disminución de actividad de la vía de la glucólisis podría estar limitando el flujo de carbono hacia TCA, lo que permite mantener un flujo moderado hacia PPP, por lo que la cepa también es capaz de sintetizar precursores biosintéticos.

Se propone que durante la etapa EXP se reúnen varias condiciones que desencadenan la señal de limitación de carbono. En primer lugar el aumento del nivel de cAMP puede deberse a la actividad de la enzima acetil-CoA sintetasa codificada por el gen *acs* que presenta una expresión alta en EXP. La acetil-CoA sintetasa transforma el acetato en cAMP, lo que concuerda con el hecho de que el acetato solo se detecta durante las primeras tres horas de fermentación y luego desaparece. La síntesis de cAMP permitiría la activación de los genes de TCA, y la expresión de los operones de toma y catabolismo de fuentes de carbono aun en presencia de glucosa, lo que le da la capacidad de explotar todas las fuentes de carbono disponibles en YE, tal como se observa en este trabajo (Tabla 11, Figura 5).

La expresión de los genes de TCA permite la recirculación de los esqueletos de carbono de los aminoácidos, a partir de los cuales se genera PYR y PEP, destinados al parecer, al crecimiento y división celular. Dada la condición PTS-, el PEP puede acumularse lo que podría causar la inhibición de la actividad de la PfkA, lo que provocaría una disminución del flujo glicolítico, esto concuerda con el bajo consumo de glucosa de la PB12.SA22 en EXP. Se encontró alta la expresión de los genes que codifican para las isoenzimas fructosa-1-6-bis-fosfatasas (*fbp*, *glpX*, *ybhA*), el aumento de la concentración de estas enzimas pudiera ser la causa de la disminución de FBP en estado EXP lo que generaría un aumento de la actividad de la proteína Cra. Estas dos condiciones podrían impulsar el flujo de carbono en sentido glucogénico y hacia la PPP. De acuerdo a lo anterior se propone que durante el estado EXP la cepa PB12.SA22 presenta una topología metabólica similar a la que se observa cuando *E. coli* silvestre se somete a una condición de limitación de carbono, con un flujo de carbono alto en TCA, PPP y un flujo bajo en glucolisis. Estos resultados son similares a los encontrados por Martínez, 2011 en cepas PTS-.

Durante la fase EXP, es posible imaginar que existe PEP proveniente de TCA disponible para ser canalizado a la síntesis de SHK. Sin embargo se observa una baja de producción de SHK. Durante este estado parece ser que la cepa presenta una baja capacidad de importar fierro, compuesto indispensable para la actividad de la DAHP sintasa (*AroG^{fbr}*). En estado EXP la *AroG^{fbr}* podría ser

incapaz de condensar la E4P y el PEP, proveniente de TCA, a una tasa mayor hacia la formación de DAHP, lo que provocaría una disminución en el flujo de carbono sobre la vía de aromáticos.

El PEP podría acumularse lo que tendría un efecto sobre la PfkA, como ya se menciona. Por lo tanto la baja capacidad de canalización de PEP tendría un efecto sobre la actividad de glucólisis.

Por lo tanto se propone que la baja capacidad de canalización del PEP por parte de la AroG^{fb} debido a la disminuida disponibilidad intracelular de hierro podría ser un factor limitante en el flujo de carbono en la vía de aromáticos en la síntesis de SHK, lo que explicaría el fenómeno que se observa en el fermentador.

Los resultados sugieren que en STA el hierro está disponible para unirse a fur por lo que se observa la alta subexpresión del operón *fec*. El aumento de la concentración de Hierro intracelular puede que se de paulatinamente a lo largo de la etapa EXP y que sea llevado a cabo por CirA, sideróforo cuya expresión depende de CRP. El aumento de hierro intracelular podría tener un efecto positivo sobre actividad enzimática de AroG^{fb} y permitiría por un lado liberar el bloqueo en glucólisis, ya que consumiría el PEP, y por otro lado se vería incrementado el flujo de carbono sobre la vía de aromáticos, lo cual que se vería reflejado en el aumento de la producción de SHK en STA1, tal como se observa en la Figura 8.

Cabe mencionar que la transcripción de los genes contenido en plásmidos presentan niveles de expresión altas y permanecen constantes en todo el cultivo.

De izquierda a derecha: expresión relativa con respecto a STA1, EXP con respecto a STA2, STA1 con respecto a STA2. Modificado de Carmona, 2011.

GLC: glucosa, G6P: β -D-glucosa-6-fosfato, F6P: fructosa 6 fosfato, FBP: fructosa 1,6-bisfosfato, GAP: gliceraldehído-3-fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, 1,3-BPG: 1-3 bifosfoglicerato, 3PG: 3-fosfoglicerato, 2PG: 2-fosfoglicerato, PEP: fosfoenol piruvato, PYR: piruvato, Ac-CoA: Acetil-CoA, cAMP:AMP cíclico, Acetyl-P: acetil fosfato, MAL: malato, FUM: fumarato, SUC: succinato, SUC-CoA: succinil-CoA, A-KG: alfa cetoglutarato, ICT: isocitrato, CIT: citrato, OXA: oxalacetato, 6PGNL: glucono- δ -lactona-6-fosfato, 6PGNT: 6-fosfo-D-gluconato, RU5P: D-ribulosa-5-fosfato, X5P:D-xilulosa-5-fosfato, R5P: D-ribosa-5-fosfato, G3P: gliceraldehído-3-fosfato, S7P: septoheptulonato, E4P: eritrosa-4-fosfato, DAHP: 3-deoxy-D-*arabino* heptulonato 7-fosfato, DHQ: 3-dehidroquinato, DHS: 3-dehidroshikimato, SHIK: shikimato, S3P: shikimato 3 fosfato, EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato.

9.3.5 Participación del indol en el sistema de producción de SHK

Únicamente en EXP/STA2 se encontró la subexpresión de genes en respuesta al aumento de indol, *ymgA*, *ymgB*, *ymgC*, *ycfR* (*bhsA*), *ybiM*, *bssR*, *bssS*, lo que sugiere que la cepa PB12.SA22 produce el indol durante el EXP y probablemente lo exporta en un punto entre estado EXP y STA1.

Adicionalmente se ha reportado que existe una relación entre los cambios en la composición proteica de la membrana y el aumento de la producción de metabolitos en *E. coli* (Minty *et al.*, 2011). La propuesta del modelo de Yang *et al.*, (2006) concuerdan con los resultados que se encontraron en este trabajo, la sobre expresión de los genes que codifican para porinas y transportadores, *oppABCDF*, *dppABDF*, *ompC*, *ompT*, *nmpC*, *glpT* (Tabla 11 y 15) y sub expresión de genes en respuesta a indol, *ymgA*, *ymgB*, *ymgC*, *ycfR* (*bhsA*), *ybiM*, *bssR*, *bssS*, así como la sobre el consumo de TRP en el estado EXP (*tniAB*, Figura 5, Tabla 7). Estos resultados fueron la pauta para realizar una revisión sobre la probable participación del indol en la producción del SHK en medio enriquecido.

El gen *ompC* codifica para la porina membrana externa, OmpC, la cual permite la entrada de iones y de solutos hidrofílicos a través de la membrana, los solutos deben ser menores de 500 Daltones. Algunos análisis proteómicos han identificado que el incremento de la expresión de *ompC* se asocia con a la resistencia de *E. coli* al ácido nalidíxico y a la tetraciclina (Lin *et al.*, 2008; Zhang D *et al.*, 2008). El gen *ompT* una endopeptidasa de membrana externa, rompe el enlace peptídico entre dos aminoácidos básicos. Presenta la capacidad de funcionar en condiciones extremas de desnaturalización, por ejemplo en alta concentración de urea (Stathopoulos *et al.*, 1998). Se ha observado que su expresión y actividad la enzima responden y aumenta al choque térmico, así como la sobre expresión de proteínas recombinantes (Gill *et al.*, 2000).

Los genes *oppABCDF* (Tabla 13) codifican para el sistema de transporte de oligopéptidos dependiente de ATP. *OppABCDF* tiene afinidad exclusivamente por oligopéptidos de más de cinco aminoácidos. Se ha observado que la expresión de *oppABCDF* incrementa después de una fase larga de adaptación en medio complejo con acetato o propionato (Polen *et al.*, 2003). Los genes *dppABDF* codifican para el transportador de dipéptidos *Dpp*. El gen *nmpC* (Tabla 11) codifica para la porina *NmpC*, se cree que es una porina de membrana exterior con diámetro efectivo de 1.2 nm. El gen *glpT* (Tabla 11) codifica para el principal transportador de glicerol-3-fosfato (G3P) en *E. coli*. Su expresión en aerobiosis se induce por G3P presente en el medio de cultivo. Mientras que *GlpR* reprime la expresión del gen en ausencia de G3P (Lemieux *et al.*, 2004; ecocyc.org; regulondb.ccg.unam.mx). Como se observa la expresión de estos genes responde a condiciones que provocan estrés, por lo que Minty *et al.*, (2011) propone que los cambios en la composición proteica de la membrana celular, aumento de proteínas de transporte, en cepas de *E. coli* productora de butanol contrarresta los efectos del estrés provocado por el medio de cultivo y la producción-acumulación del metabolito sobre la integridad de la membrana y sus propiedades mecánicas. Esto podría explicar porque en la cepa PB12.SA22 expresa genes de transportadores que aparentemente no necesita como *glpT*, transportador de G3P, compuesto que no está presente en el medio, por lo que en teoría no debería estar expresado.

Ahora bien, en cuanto al indol esta es una molécula señal secretada en grandes cantidades cuando *E. coli* se cultiva en medio rico. Esta indol tiene diversos efectos sobre el metabolismo de la bacteria: inhibición de la formación de biopelícula mediante la reducción de la motilidad y división celular, influye en el sistema de resistencia al ambiente ácido y en el de la quimiotaxis. La presencia de indol incrementa la resistencia a las drogas y los antibióticos mediante la inducción de sistemas de exporte y controla la estabilidad de plásmidos (Lee *et al.*, 2007a).

Las bacterias se comunican a través del uso de moléculas señales, este proceso se denomina *quorum sensing*. La acumulación de las señales de *quorum sensing* (QSS) en el medio de cultivo generalmente es reflejo de la densidad celular. Una vez que la molécula señal ha alcanzado cierta concentración el QSS activa factores transcripcionales que estimulan la expresión de múltiples genes. El QSS se ha relacionado con el control de la bioluminiscencia, la expresión del factor de virulencia, la formación de biopelícula, la entrada al estado estacionario y la esporulación. Parece ser que el indol ejerce su control sobre el metabolismo de *E. coli* a través de la proteína *SdiA*. Se ha propuesto que el indol afecta la transcripción del gen *sdiA*, aunque no se ha sido determinado como lo hace. La proteína *SdiA* es el factor de supresión del inhibidor de la división celular, participa en la regulación de la expresión de genes relacionados a la disminución de la motilidad y quimiotaxis, ejerce un efecto

pleiotrópico en genes relacionados a sensibilidad a drogas, replicación y reparación de DNA, metabolismo macromolecular, genes involucrados en la sistema AR-2, así como en el incremento de la expresión del sistema de exporte multidrogas (MDR) (Lee J *et al.*, 2007a; Yang S *et al.*, 2006; ecocyc.org; regulondb.ccg.unam.mx).

Ahora bien, en *E. coli* existen al menos tres MDR, AcrAB/TolC, MdfA y NorE, los cuales expelen fluoroquinolones. SdiA promueve la sobre expresión del transportador AcrAB/TolC. Yang S *et al.*, (2006) inactivó los genes *acrAB*, *norE* o *tolC* en *E. coli*, las cepas mutantes presentaron un crecimiento mayor en pruebas de densidad óptica, proteína total, conteo de células visibles y conteo de células viables, con respecto a la cepas silvestres. Adicionalmente presentaron una disminución considerable en la expresión de gen *rpoS*. Por otra parte, en las cepas mutantes se sobre expresaron los genes *acrAB* lo que resultó en la inducción de *rpoS*, esto indico que AcrAB emite una respuesta de activación de la expresión *rpoS*. Cabe mencionar que la sobreexpresión de MdfA y NorE no tuvo el mismo efecto sobre la expresión de *rpoS*. Dado sus resultados tanto AcrAB, NorE y posiblemente otros MDR promueven la comunicación célula – célula mediante la expulsión de QSS de manera más eficiente que por difusión a través de la membrana. Finalmente, Yang S *et al.*, (2006) propone un modelo: durante el crecimiento de la cepa produce QSS, el cual es exportado por el sistema AcrAB, una vez que la concentración extracelular de QSS llega a un punto considerable, este se une con un receptor en el periplasma, lo que estimula la expresión del gen *rpoS* y desencadena la entrada al estacionario. En el caso de las cepas *acrAB*⁻, el QSS se acumula intracelularmente evitando la unión de QSS con su receptor periplásmicos y disminuyen la expresión del gen *rpoS*, retardando la estrada al estado estacionario.

De acuerdo a los resultados de transcripción de este trabajo, la relación del indol con la activación de SdiA y la activación del sistema AcrAB/TolC mediante SdiA, se propone que el modelo planteado por Yang S *et al.*, 2006 podría explicar el comportamiento observado en la cepa PB12.SA22 en el medio de producción. El indol podría producirse en el estado EXP dada la actividad de la triptofanasa (*tnABL*). Durante esta etapa el indol podría exportarse mediante el sistema AcrAB/TolC, cuando la concentración de indol llegara a un punto crítico, este podría unirse a su receptor en el periplasma estimulando la expresión del gen que codifica para el regulador RpoS y de esta forma favorecería que la cepa PB12.SA22 entrara al estado STA, a pesar de que aun existe glucosa en el medio de cultivo, además del agotamiento de compuestos aromáticos, lo que haría sentido con lo que se observa en el fermentador (Figura 5). También, es probable que el aumento de la concentración de RpoS en estado

STA hace sentido con el aumento de la expresión de genes bajo su control, *gadEXW*. Cabe mencionar que Minty *et al.*, 2011 propone un modelo similar para una cepa de *E. coli* genéticamente modificada productora de butanol. Lo cual podría indicar de este tipo de comunicación célula – célula tiene particular relevancia sistemas de producción.

9.3.6 Síntesis de glicógeno en el sistema de producción de SHK

Durante la etapa EXP se encontró al gen *csrC* subexpresado (Tabla 12, 14). El producto regula negativamente la acumulación de glucógeno porque inhibe la traducción del operón *glgCAP* y el gen *glgB* del operón *glgBX*. Los genes *glgA*, *glgC*, *glgB* codifican para enzimas del anabolismo de glucógeno, mientras que los productos de los genes *glgP*, *glgX* están involucrados en el catabolismo del mismo (Timmermans *et al.*, 2009; Timmermans *et al.*, 2010). Este resultado aunado a la bajo rendimiento de SHK, si compara lo producido con el carbono en el sistema, da pie proponer que la cepa productora podría estar destinando carbono hacia la formación de compuestos de almacén como el glucógeno.

Por otra parte la síntesis de este compuesto está directamente relacionada con la actividad de RpoS (Notley- McRobb *et al.*, 2002, Minty *et al.*, 2011) y dada que este regulador tiene una actividad media en la cepa PB12.SA22 es poco probable que esté produciendo glucógeno. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que se esté perdiendo carbono hacia algún compuesto de almacén, por lo que se propone un estudio que determine si la cepa sintetiza glucógeno durante la producción de SHK.

X. CONCLUSIONES

La producción, acumulación de SHK, los componentes del medio de cultivo, antibióticos e IPTG probablemente desencadenan una respuesta general de estrés sobre la cepa productora, que tiene como consecuencia el aumento de la expresión de proteínas de membrana que le proporciona estabilidad a la misma.

De acuerdo a los resultados del fermentador y transcriptómicos, la cepa PB12.SA22 en estado exponencial probablemente presenta una actividad gluconeogénica mayor que glucolítica. Por lo que en esta etapa TCA y vía de pentosas fosfato podrían tener una participación en esta etapa. Siendo los compuestos del extracto de levadura los que soportan el crecimiento, el mantenimiento y la división

celular durante el estado exponencial y parte del estado estacionario de la cepa PB12.SA22. Mientras que en la etapa estacionaria la actividad del MCC probablemente sea mas glucolítica que gluconeogénica.

Los resultados de transcripción sugieren que durante la etapa exponencial la molécula cAMP y la proteína Cra tienen una participación importante sobre la actividad del Metabolismo Central de Carbono.

Reportes previos y los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que la probable disminución la actividad de RpoS y el aumento de la concentración de molécula cAMP le permite a la cepa productora explorar el catabolismo de otras fuentes de carbono mediante la expresión de múltiples sistemas transporte así como la expresión de genes catabólicos reprimidos por glucosa, aun en presencia de ésta.

Dado los niveles de expresión de *tnaABL*, el consumo de TRP y la represión de genes en respuesta a indol, se propone que es muy probable que durante la producción de SHK también se genere y acumule indol, particularmente durante el estado exponencial, lo que podría ser una de las causas por las que la cepa PB12.SA22 entre al estado estacionario aun con glucosa presente en el medio. Además, la presencia del indol podría tener una participación importante en la represión y la activación de diversos genes de la cepa productora, en el medio de producción.

Los resultados de transcripción sugieren que la cepa PB12.SA22 presenta una nivel intracelular bajo de hierro durante la etapa exponencial y alto en estacionario. Este fenómeno podría ser uno de los factores que limitan en el flujo de carbono hacia la vía de aromáticos, debido a que el hierro es compuesto indispensable para la actividad de la DAHP sintasa^{fbr}, enzima que controla el flujo de carbono sobre la vía de aromáticos.

Dada que la expresión de los genes de la vía del SHK clonados en plásmido permanecen altos y constantes durante la fermentación se propone que su transcripción probablemente no sea un factor limitante en la producción.

De acuerdo a los resultados de transcripción, en el estado estacionario presenta una mayor actividad biosintética probablemente debido a la depleción de los compuestos nutritivos del medio de cultivo. De manera particular se observo la sobre expresión de los genes de la biosíntesis de L-arginina, aminoácido que es el principal reservorio de nitrógeno.

En el estado estacionario se observó un patrón transcriptómico característico en respuesta de estrés por acidez lo cual concuerda con el aumento de la producción de SHK. La respuesta de estrés generada por el sistema de producción (medio de cultivo, producción- acumulación de metabolito) parece tener relación con la producción de indol. Los resultados transcriptómicos de este trabajo concuerdan con el modelo propuesto por Yang S *et al.*, (2006) y observado por Minty *et al.*, 2011 en cepas sobre productoras de butanol.

XI. PROPUESTAS Y PERSPECTIVAS

Como perspectiva a los resultados de este trabajo se deben corroborar la expresión de genes que se consideren clave con estudios por ejemplo de RT-PCR. Partiendo de las hipótesis planteadas a partir de los resultados obtenidos se propone realizar las siguientes estudios y determinaciones:

Determinación la concentración extracelular e intracelular de indol en las tres etapas del cultivo (EXP, STA1, STA2) en la cepa PB12.SA22 en medio de producción.

Determinación de la producción de biopelícula en las tres etapas del cultivo (EXP, STA1, STA2) en la cepa productora en medio de producción.

Cuantificación de cAMP extracelular e intracelular en las tres etapas del cultivo (EXP, STA1, STA2) de la cepa PB12.SA22 en medio de producción.

Inactivación de los genes del sistema AcrAB/TolC para estudiar su efecto sobre la fisiología celular y producción de SHK.

Estudio de la inactivación de los genes *fim* sobre la producción y rendimiento de SHK, crecimiento y formación de biopelícula.

Sobre expresión del gen *aroD*, para evitar la formación de intermediarios de la vía de SHK y aumentar la síntesis de SHK.

Estudiar el efecto de la sobre expresión de los genes de la vía de síntesis de la enterobactina, con el objetivo de mejorar el nivel intracelular de Fe^{2+} , que de acuerdo con la hipótesis formulada, tendrá un efecto sobre el flujo de la vía de SHK y glucólisis. Se recomienda que la expresión de estos genes estén bajo un promotor que solo se exprese durante el EXP, para evitar un aumento de hierro intracelular en STA que genere un exceso de agentes oxidantes.

Estudiar el efecto de la sobre expresión de los genes de la vía de síntesis de CirA, el sideróforo que probablemente sea el responsable del aumento de la concentración de hierro intracelular, que con el

objetivo de mejorar el nivel intracelular de Fe^{2+} , que de acuerdo con la hipótesis formulada, tendrá un efecto sobre el flujo de la vía de SHK y glucólisis.

Con el objetivo de mejorar el flujo de carbono sobre glucólisis en EXP, se propone el estudio del efecto de la sobre expresión de *pfkA* sobre el consumo de glucosa.

Estudiar la eliminación de gen *ydiB* para determinar su contribución en la formación de DHS y AQ.

XII. REFERENCIAS

- Abbot A. Avian flu special: What's in the medicine cabinet. *Nature* 2005, **435**:407-409.
- Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K: High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2006, **70**: 2579-2582.
- Aguado M. Microarreglos de DNA en microbiología. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2007, **1**:125-134.
- Aguilar C, Escalante A, Flores N, De Anda R, Riveros-McKay F, Gosset G, Morett E, Bolívar F. Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *MBC Genetics* 2012, **13**:385.
- Báez-Viveros J, Flores N, Juarez K, España-Castillo P, Bolivar F, Gosset G: Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microbial cell factories* 2007, **6**:30.
- Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F, Gosset G: Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factory* 2009, **8**:19.
- Blumer C, Kleefeld A, Lehnen D, Heintz M, Dobrindt U, Nagy G, Michaelis K, Emödy L, Polen T, Rachel R, Wendish V, Unden G: Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2005, **151**: 3287-3298.
- Boes T, Neuhäuser M: Normalization for affimetrix genechips. *Methods Informatic Medicine* 2005, **44**: 414-421.
- Bolívar F, Rodríguez R, Greene P, Betlach M, Hyenecker H, Boyer H, Crosa J, Falkow S: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977, **2**: 95-113.
- Bonnefoy V, Demoss J: Nitrate reductases in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1994, **66**:47-56.
- Boos W, Shuman H: Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiology Molecular Biology Review* 1998, **62**:204-29.
- Breitling R, Herzyk P: Biological master games: using biologists' reasoning to guide algorithm development for integrated functional genomics. *Journal of Integrative Biology* 2005, **9**: 225-232.
- Calderón R. Tesis de maestría: Evaluación del efecto de la sobre-expresión e interrupción de genes relacionados a la producción de shikimato en cepas de *Escherichia coli* que carecen de sistema de fosfotransferasa (PTS-). Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- Carmona C. Tesis de licenciatura: Efecto de la clonación del gen *zwf* sobre la producción de shikimato en la cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.

- Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W, Frost J: Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress* 2003, **19**:808-814.
- Dalma-Weiszhausz D, Warrington J, Miyada E: The affymetrix genechip® platform: An overview, *Methods in Enzymology* 2006, **410**: 3-28.
- 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.
- Domka J, Lee J, Wood TK. YliH (BssR) and YceP (BssR) regulate *Escherichia coli* k-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology* 2006, **13**:2446-2459.
- Earhart C. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In: Neidhardt F, Curtiss III R, Ingraham J, Lin E, Low K, Magasanik B, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1996. pp. 1075-1090.
- Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De Anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F: Metabolic engineering for the production of shikimic acid in *Escherichia coli* PB12 strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 2010, **9**:21.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 1996, **14**:620-X4.
- Flores N, Flores S, Escalante A, Deanda R, 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 gene in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering* 2005, **17**:70-87.
- Flores N, Leal L, Sigala J, De Anda R, Escalante A, Martínez A, Ramírez O, Gosset G, Bolivar F: 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 glucocinasa and galactose permease, *Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology* 2007, **13**: 105-116.
- Flores N, Escalante A, De Anda R, Báez-Viveros J, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: 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**:176-92.
- Flores S, Flores N, De Anda R, Gozález A, Escalante A, Sigala J, Gosset G, Bolivar F: Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2005, **10**:52-53.
- Flores : 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.

- Foster J: *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature* 2004, **2**: 898:907.
- Gill R, DeLisa M, Shiloach M, Holoman T, Bentley W: OmpT expression and activity increase in response to recombinant chloramphenicol acetyltransferase overexpression and heat shock in *E. coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2000, **2**:283-9.
- González J, Banerjee R, Huang S, Sumner J, Matthews R: Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry* 1992, **31**:6045-56.
- Hardiman T, Lemuth K, Keller M, Reuss M, Siemann-Herzberg M: Topology of the global regulatory network of carbon limitation in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 2007, **132**:359-374.
- Herrman K, Weaver L: The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1999, **50**:473–503.
- Hochreiter S, Clevert D, Obermayer K: A new summarization method for Affymetrix probe level data. *Bioinformatics* 2006, **22**:943-9.
- Hua Q, Oshima T, Mori H, Shimizu K: Analysis of the expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemotast cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**:2354-2366.
- Huang I, Li W, Sui J, Marasco W, Hyeryun C, Michael F: Influenza a virus neuraminidase limits viral superinfection. *Journal of Virology* 2008, **82**:4834 - 4843.
- Huber W, Irizarry R. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S: editors. *Bioinformatic and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Preprocessing data from genomic experiments. 9th ed. China, Springer; 2005. pp. 20-115.
- Humbert R, Simoni R: Genetic and biomedical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1980, **142**: 212-20.
- Johansson L, Lidén G: Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of, *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *Journal of Biotechnology* 2006, **17**:528-545.
- Kern R, Malki A, Abdallah, Tagouri J, Richarme G: *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *Journal of Bacteriology* 2007, **189**:603-610.
- Kessler A, Gots J: Regulation of *guaC* expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1985, **164**:1288-93.
- Krämer M, Bongaerts J, Bovenger R, Kremer S, Müller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L: Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering* 2003, **5**:277-283.
- Lease R, Belfort M: Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Molecular Microbiology* 2000, **38**:667-672.
- Lee J, Jayaraman A, Wood T: Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology* 2007, **7**:42-57(a).

- Lee J, Page R, García-Contreras R, Palermينو J, Zhang X, Doshi O, Wood TK, Peti W: Structure and function of the *Escherichia coli* protein YmgB: a protein critical for biofilm formation and acid-resistance. *Journal of Molecular Biology* 2007, **373**:11-26 (b).
- Lin X, Li H, Wang C, Peng X: Proteomic analysis of nalidixic acid resistance in *Escherichia coli*: Identification and functional characterization of OM Proteins. *Journal of Proteome Research* 2008, **7**:2399-405.
- Lockhart D, Winzeler E: Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000, **6788**: 827-836.
- Lu C: Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **70**:261-72.
- Lucht J, Bremer E: Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system *proU*. *FEMS Microbiology Reviews* 1994, **14**:3-20.
- Luo M: Did drug researchers have a lucky break when they developed antiviral drugs for influenza? Crystal structures of enzymes from the H5N1 virus suggest that they did, and provide avenues for further exploration. *Nature* 2006, **443**: 37-38.
- Manual DIFCO: Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth Edition. DIFCO Laboratories Incorporated. Detroit Michigan 1985.
- Martínez K. Tesis de doctorado: Caracterización de una cepa de *Escherichia coli* carente de 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. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- Mates AK, Sayed AK, Foster JW. Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *Journal of Bacteriology* 2007, **189**: 2759-68.
- McIntosh M, Earhart C: Coordinate regulation by iron of the synthesis of phenolate compounds and three outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1977, **131**: 331-9.
- Minty J, Lesnefsky A, Lin F, Chen Y, Zaroff T, Veloso A, Xie B, McConnell C, Ward R, Schwartz D, Rouillard J, Gao Y, Gulari E, Lin X: Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factory* 2011, **25**:10-18.
- Model P, Jovanovic G, Dworkin J: The *Escherichia coli* phage-shock Protein (*psp*) operon. *Molecular Microbiology* 1997, **24**: 255-261.
- Navarro L, Tormo a, García-Martínez: Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2010, **19**:476-495.
- Notley L, Ferenci T: Differential expression of mal genes under cAMP and endogenous inducer control in nutrient-stressed *Escherichia coli*. *Molecular of Microbiology* 1995, **16**:121-9.
- Notley-McRobb L, King T, Ferenci T: *rpoS* mutation and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *Journal of Bacteriology* 2002, **184**: 806-811.

- Olvera L, Mendoza-Vargas A, Flores N, Olvera M, Sigala J, Gosset G, Morett E, Bolívar 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**:e7466.
- Park J, Lee S: Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production, *Current Opinion in Biotechnology* 2008, **5**: 454-460.
- Pittard A: Biosynthesis of the aromatic amino acids. In: Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J, Lin E, Low K, Magasanik B, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M, Umberger H, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1996. pp. 458-478.
- Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, Sahm H. DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, **69**:1759-74.
- Ramseier T: Cra and the control of carbon flux via metabolic pathway. *Research in Microbiology* 1996, **147**:489-93.
- Ren D, Bedzyj L, Thomas S, Ye R, Wood T: Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Applied and Environmental Applied Biotechnology* 2004, **64**:515-524.
- Schneider B, Kiupakis A, Reitzer L: arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1998, **180**: 4278-86.
- Shao Z, Newman E: Sequencing and characterization of the *sdaB* gene from *Escherichia coli* K-12. *European journal of Biochemistry FEBS* 1993, **212**: 777-84.
- Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A: Novel members of the *cra* regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2010, **193**: 649–659.
- Srinivasan P, Sprinson D: 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonoic acid 7-phosphate synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 1959, **324**: 716:722.
- Stathopoulos C: Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial endopeptidase family: a micro-review. *Membrane & Cell Biology* 1998, **12**:1-8.
- Stauffer L, Fogarty S, Stauffer G: Characterization of the *Escherichia coli gcv* operon. *Gene* 1994, **142**:17-22.
- Stephanopoulos, G. Metabolic Fluxes and Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering* 1999, **1**:1-11.
- Timmermans J, Van L: Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2009, **191**:1722-1724.
- Timmermans J, Van L: Posttranscriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cellular and molecular Life Science* 2010, **67**: 2897-2908.
- Tucker D, Tucker N, Ma Z, Foster J, Miranda R, Cohen P, Conway T: Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2003, **185**:3190-201.

- Van der Ploeg J, Eichhorn, Leisinger T: Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* 2001, **176**:1-8.
- Weerasinghe J, Dong T, Schertzberg M, Kirchhof M, Sun Y, Schellhorn H: Stationary phase expression of the arginine biosynthetic operon *argCBH* in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* 2006, **6**:14.
- Yang S, Lopez C, Zechiedrich E: Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proceeding National Academy of Science of the United States of America* 2006, **103**:2386-91.
- Yanofsky C, Horn V, Gollnick P: Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1991, **173**:6009-17.
- Ye R, Wang T, Bedzyk L, Croker K: Application of DNA microarrays in microbial systems, *Journal of Microbiological Methods* 2001, **47**:257-272.
- Zhang D, Jiang B, Xiang Z, Wang S: Functional characterization of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008, **32**:315-9.
- Zhang X, García-Contreras R, Wood T: *Escherichia coli* transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). *The ISME Journal* 2008, **2**:615-31.
- Zhang X, García-Contreras R, Wood T: YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *Journal of Bacteriology* 2007, **189**:3051-62.
- Zhang Z, Gosset G, Barabote R, Gonzalez C, Cuevas W, Saier M: Functional Interactions between the Carbon and Iron Utilization. *Journal of Bacteriology* 2005, **187**:980-990.
- Zhou Y, Zhu W, Bellur P, Rewinkel D, Becker D: Direct of linking of metabolism and gene expression in the proline utilization A Proteins from *Escherichia coli*. *Amino Acid* 2008, **35**:711-718.
- Zuluaga R. Tesis de licenciatura: Evaluación de las cepas de *E. coli* PB12 y VH33 para la producción de ácido shikímico. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

XIII. ANEXOS

1. Obtención del precultivo

El precultivo a partir del cual se inocula el fermentador, se obtuvo sembró la cepa respectiva (PB12, PB121.SA22) en un matraz Erlenmeyer de 250mL bafleados con 50mL de medio de producción sin inductor (IPTG) según la cepa y sin MgSO₄ y CaCl₂, se incubo por 12 horas a 37°C, con agitación de 300rpm, en una incubadora con agitación orbital (Incubator shaker 25, New Brunswick, New Jersey, USA).

2. Preparación de los fermentadores

Se calibró el electrodo de pH y se realizaron las conexiones necesarias, se esterilizó con 350mL del medio de producción. Una vez esterilizados se les colocó una chaqueta térmica 37°C y se le dejó en saturación de oxígeno por lo menos 8 horas. En el momento del inicio de la fermentación se adicionaron los metales traza, los suplementos y el agua para ajustar un volumen de operación de 500 mL se tomó en cuenta el volumen del inóculo. Se realizó un ajuste externo de pH y cuando los parámetros de temperatura y pH estén fueron estables se calibró a 100% de oxígeno disuelto. Se muestreó cada hora durante las primeras 8 horas y después cada 6 horas hasta la hora 50 de fermentación.

3. Cálculo de parámetros cinéticos

a) Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}). Se utilizó el programa de Office Excel, distribuido por Microsoft, para realizar los cálculos.

- Se obtuvo el peso seco, para lo cual se multiplicó por la densidad óptica por el factor (0.37). Se ajustaron los datos utilizando el LN del peso seco.
- Se graficó el tiempo contra el LN del peso seco y aplicó regresión lineal de la región recta de curva se obtiene la μ (h^{-1}) que corresponde a la pendiente de la ecuación lineal.
- Con los valores de μ de los experimentos hechos por triplicados, se calculó el promedio y la desviación estándar de dichos valores.

b) Se calculó el rendimiento biomasa por glucosa utilizando la siguiente relación $Y_{—}$ (—)
[g dwc/mol glc].

c) Se calculó la velocidad de consumo de glucosa utilizando la siguiente relación $Q_s = \frac{—}{—}$ (—)

4. Determinación de 3-D-arabino-heptulosonato-7-P (DAHP)

Los reactivos se prepararon como se indica a continuación:

- Ácido tricloro-acético (TCA) al 20% (J.T. Baker, Phillipsburg, USA); 2.5g en 10ml de agua destilada.
- Periodato de sodio 0.025M (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania); 0.26 g en 50ml de ácido sulfúrico 0.125N (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).

- Arsenito de sodio 2 g/L (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania); 2 g en 100ml de ácido clorhídrico 0.5N (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).
- Ácido tiobarbitúrico (TB) 0.3% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania); 0.76 g en 250 mL de agua destilada.
- Ácido sulfúrico 0.125N; 0.17 mL de ácido 36N en 49.83 mL de agua.
- Ácido clorhídrico 0.5N; 4.13 mL de ácido 12.1N en 95.87 mL de agua.

Se transfirieron 200 µl de la cada una de las muestras tomadas a lo largo de la fermentación en un tubo de ensayo de 13x100 y se inició la determinación adicionó 50 µl de TCA, se mezcló usando vortex por 10 s y se adicionaron 250 µl de periodato de sodio y se mezcló usando vortex por 10s. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 minutos después de este tiempo se adicionaron 500µl de arsenito de sodio y se mezcló usó vortex por 10s en este momento la solución tomo una coloración amarilla que desaparece gradualmente. Se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se adicionaron 2 mL de TB, se mezcló usando vortex. Finalmente se incubó en un baño de agua hirviendo durante 10 min, las muestras adquirieron un color rojizo.

Después de los 10 min de tiempo de incubación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 549 nm. El valor de absorbancia estuvo entre 0.02 y 1.2, y cuyo fue mayor a 1.2 se realizó una la dilución de la muestra y se repitió el procedimiento.

Cálculos: El valor de la concentración de DAHP se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Abs}_{549\text{nm}} \times 0.06717 \times \text{dilución} = \text{DAHP g/L.}$$

Coficiente de extinción molar a 549 nm = 45,000.

Nota: Los reactivos deben ser almacenados a 4 °C en donde son estables por 1 mes y antes de usarse se deben de filtran 0.22 µm y se guardan en frascos estériles.

5. Soluciones y reactivos utilizados en la extracción de RNA

Solución I. Para 250 mL:

Sacarosa (0.3M) 25.65g (J.T. Baker, Phillipsburg, USA), acetato de sodio (0.1M) 8.325mL de una solución 3M (Fermont, Monterrey, México).

La solución se filtro usó un filtro de 0.22 µ y se adicionaron 250 µL de Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), se incubó una noche a 37 °C a 300 rpm.

La solución I con lisozima (15 mg/mL): Se pesa 0.100 g de lisozima y disuelve en 10 mL

Solución II. Para 250 mL: SDS (2%) 5 g SDS, acetato de sodio (0.01M) 0.825 mL de una solución (3M).

Solución de **fenol:cloroformo:isoamílico**. Contiene una proporción de 25:24:1 de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, respectivamente.

Buffer MAE: MOPS 0.2M (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), 20.9 g, EDTA (0.01M), acetato de sodio (0.05M) 2.04 g, H₂O 500mL pH 7.0. Para ajustar el pH a 7 se utiliza con una solución de NaOH 10N (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) y se filtra con membrana estéril de 0.22 µm.

Buffer de carga 1.25X: Agua desionizada 2.2 mL, formaldehido comercial 37%, 0.8 mL, MAE (10X) 0.5 mL, glicerol 80% (J.T. Baker, Phillipsburg, USA), 0.4 mL, bromuro de etidio 1% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), 0.02 mL, Azul de bromofenol (0.025X) 0.01g (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).

Gel de RNA: Agarosa (1.2%) 0.6g, H₂O 39mL, MAE 10X 5mL, formaldehido comercial 37% 6mL (Fermont, Monterrey, México). El buffer de carga 1.25X se utiliza en una relación 1:4 con la muestra. El gel se corre en buffer MAE 1X.

6. Cálculo de la velocidad específica de consumo de aminoácidos aromáticos

Velocidad específica de consumo de aminoácidos aromáticos $q_{aa} = \frac{\Delta x}{\Delta t} \left[\frac{\text{g}}{\text{g} \cdot \text{h}} \right]$

- Se utilizó el programa de Office Excel, distribuido por Microsoft, para realizar los cálculos.
- Se determino el cambio del peso celular (Δx) entre los tiempos en los la cepa PB12.SA22 consume los aminoácidos aromáticos.
- Se determino el consumo de moles de aminoácido aromático (Δaa) entre los tiempos en los la cepa PB12.SA22 los consume.
- Usyo los datos anteriores se calculo el rendimiento de células por mol de aminoácido —
- Se obtuvo la q_{aa} dividiendo μ (h^{-1}) entre —
- Lo anterior se realizo por triplicado para cada una de las cepas, se calculo la desviación estándar de los tres experimentos utilizó la aplicación de Excel.

7. Evaluación de la calidad de los microarreglos

El boxplot proporciona un resumen simple de la distribución de las intensidades de las sondas a través del arreglo. Típicamente se espera que las cajas tengan un tamaño similar (IQR) y una posición media. Si la distribución de un grupo individual de arreglos es muy diferente a los otros del grupo esto podría indicar un problema experimental. Después de la normalización la distribución debe ser similar.

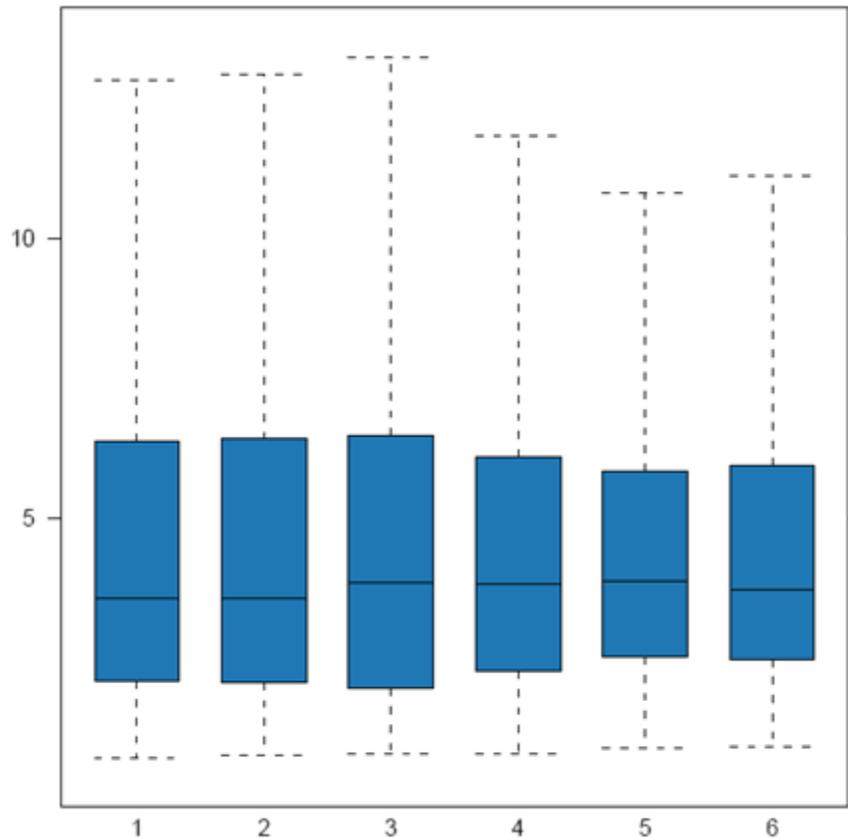


Figura 9. Grafico boxplot muestra un estimado simple de la distribución de las intensidades de las sondas a través del arreglo.

Cada una de las cajas corresponde a una GeneChip, del 1 al 3 se trata de las muestras en fase exponencial de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Del 4-6 corresponden a las muestras en fase estacionaria de crecimiento de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Datos normalizados.

Los gráficos de densidad típicamente tienen distribuciones en forma y rangos similares. Los arreglos cuya distribución es muy diferente a los otros arreglos deben ser considerados como problemáticos un arreglo con desplazamiento a la derecha indicaría altas intensidades de fondo.

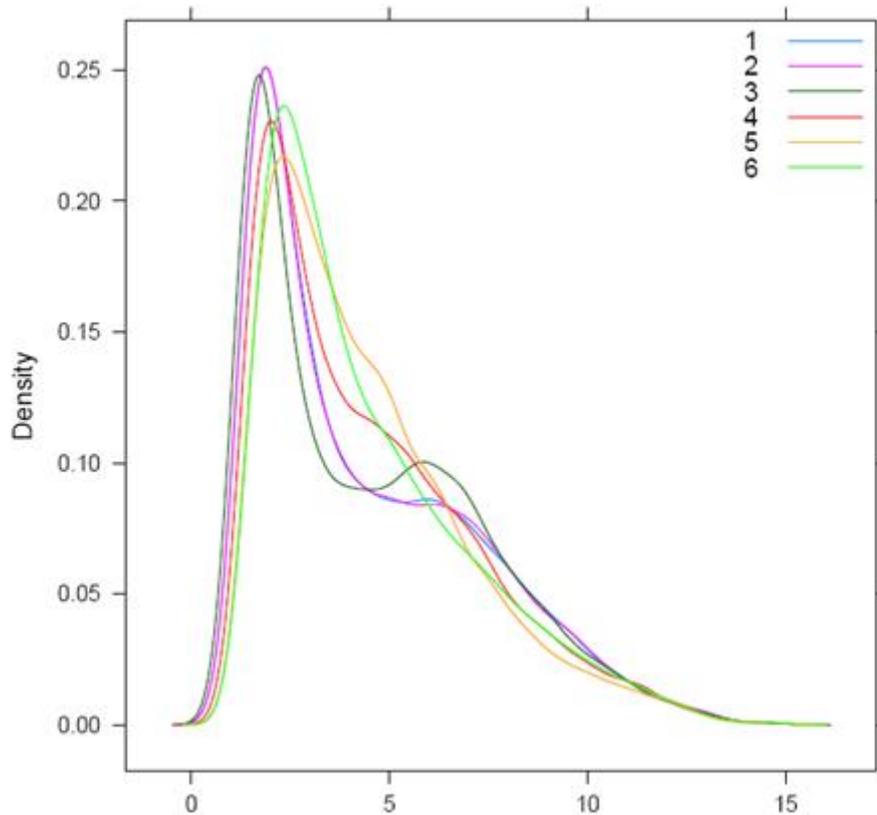


Figura 10. Grafico de densidad muestra los estimados de la densidad de datos.

Cada una de las curvas corresponde a una GeneChip, del 1 al 3 se trata de las muestras en fase exponencial de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Del 4-6 corresponden a las muestras en fase estacionaria de crecimiento de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Datos normalizados.

Gráfica MA. M y A son definidos como $M = \log_2(I_1) - \log_2(I_2)$, $A = \frac{1}{2} [\log_2(I_1) + \log_2(I_2)]$, donde la I_1 es la intensidad del arreglo en estudio, mientras que I_2 es la intensidad de un “pseudo” arreglo el cual tiene valores promedio de todos los arreglos. Por lo general se espera que la masa de distribución se concentre a lo largo del eje $M=0$ y no debe haber ninguna tendencia en la media de M como función de A . Si se observara una tendencia en el rango inferior de A indicaría que los arreglos tienen diferentes intensidades de fondo, lo que conduciría a una corrección de fondo. Una tendencia en el rango superior a A indicaría la saturación de las mediciones, en los casos sencillos puede ser ajustado por una normalización no lineal como el cuantil.

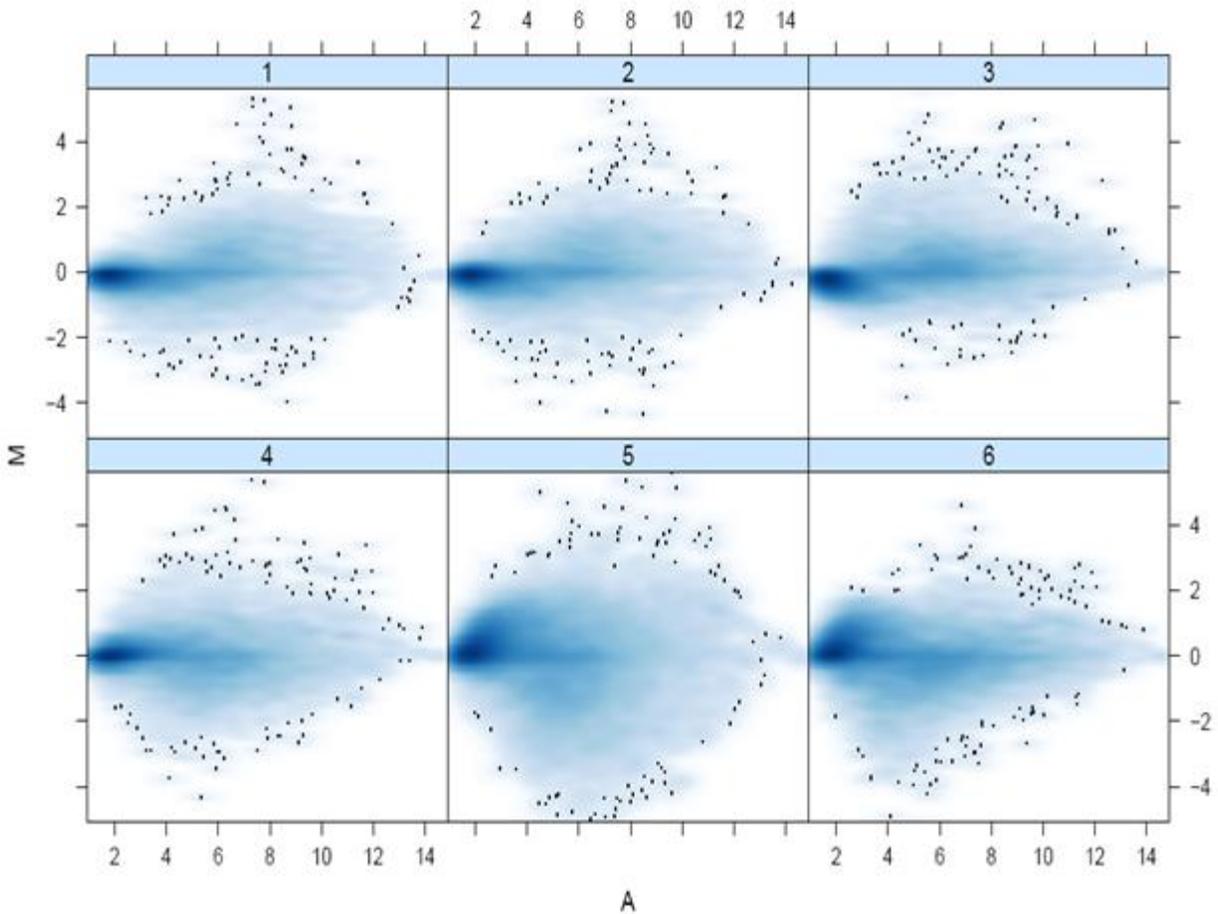


Figura 11. Grafico MA, para cada uno de los arreglos.

Del 1 al 3 corresponden a las muestras en fase exponencial de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Del 4-6 corresponden a las muestras en fase estacionaria de crecimiento de los fermentadores 1,2, y 3 respectivamente. Datos normalizados.

8. Códigos de programación (lenguaje Perl)

A continuación se muestran algunos ejemplos de las herramientas bioinformáticas utilizadas en el análisis de microarreglos.

```
#!/usr/bin/perl
```

```
# Programa que extrae solo las sondas de MG1655
```

```
open(ARCH,"EXPresion global 1.txt")|| die "no puedo abrir el archivo";
open (ARCHSAL1,">MG1655_global.txt");
open (ARCHSAL2,">otros.txt");
while($linea=<ARCH>){
chomp($linea);
if ($linea =~ /MG1655_\w/){
print ARCHSAL1 "$linea\n";
}else{
print ARCHSAL2 "$linea\n";
}##fin if
}##fin while
print "Se ha creado un archivo .txt\n";
close(ARCH);
close(ARCHSAL1);
close(ARCHSAL2);
```

```
#!/usr/bin/perl
```

```
#Programa que ordena en columnas el archivo crudo de microarreglos
```

```
open(ARCH,"EXPresion_up-sta.txt")|| die "no puedo abrir el archivo";
open (ARCHSAL,">up-sta-nombre-exp-funcion-gen.txt");
while($linea=<ARCH>){
chomp($linea);
($Set_ID,$F1_exp,$F2_exp,$F3_exp,$EXP,$F1_sta,$F2_sta,$F3_sta,$STA,$p_value,$fold,$ID,$Gene
_Title,$Gene_Symbol,$Gene_Ontology_Biological_Process,$Gene_Ontology_Cellular_Componente
ee,$Gene_Ontology_Molecular_Function,$Pathway) = split(/\t/,$linea);
print ARCHSAL "$ID\t$fold\t$Gene_Title\t$Gene_Symbol\n";
}##fin while
print "Se ha creado un archivo txt\n";
close(ARCH);
close(ARCHSAL);
```