



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Mejoramiento de la capacidad de transporte de glucosa en una cepa de *Escherichia coli* (PTS⁻) sobreproductora de shikimato”

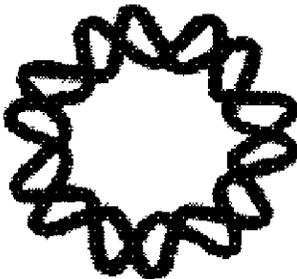
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

Q. A. ANIA OLEŃKA CERVANTES SALINAS

ASESOR:

DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA



CUERNAVACA, MORELOS

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 del Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la DGAPA-UNAM a través de los proyectos PAPIIT IN205811, IN206812 e IN220403, del CONACyT a través de los proyectos CONACyT FONSEC Salud 44126 y 126793, CONACyT Ciencia Básica 105782, así como la beca para realizar estudios de posgrado del CONACyT. Se recibió beca para conclusión de estudios de Maestría del proyecto IN220403.

AGRADECIMIENTOS

Mamá: No hay forma de agradecer todo lo que has hecho por mí, eres mi pilar, mi motor, mi sostén y mi fuerza. Te admiro y amo profundamente.

Claudio: Gracias por ser un ejemplo y sembrar en mi la curiosidad por continuar mi preparación académica. Te amo.

Igor: Llegaste en un momento difícil a mi vida y en un muy corto tiempo te apoderaste de un lugar muy especial en mi corazón. Gracias por existir. Te amo.

Dr. Adelfo: Fue un honor y un placer trabajar bajo su tutoría. Le agradezco su inagotable paciencia y su incondicional apoyo. Siempre será mi mentor y más que eso mi entrañable amigo.

Maestra Martha Giles: Le agradezco enormemente la confianza y el apoyo, pues sin él no habría llegado al Instituto. Todo mi aprecio y mi cariño hacia usted.

Isra, Paul, Vio, Carol, Fer, Anuar: Amigos mil gracias por todos los increíbles momentos juntos. ¡Los quiero!

Silvia: Fuiste un apoyo primordial durante mi estancia en Cuernavaca. Gracias por brindarme tu amistad y acompañarme por igual en momentos de lágrimas y de risas.

Andy: Un halo de alegría te rodea e inunda todo el laboratorio, mil gracias por siempre responder con una sonrisa y hacer más llevadero mi día a día. ¡Te quiero amiga! Cesar

O: ¡Ya deja de chatear! Muchas gracias por todos los buenos momentos.

Andrés: Gracias por todos los consejos, el apoyo, los memes, los gags y los comics que me ayudaron a sobrellevar los momentos más álgidos.

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

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

A la Q.I. Luz María Martínez Mejía por la asesoría en el manejo de radiactividad.

A Mercedes Enzaldo Cruz y Aurelia González Guzmán por su invaluable apoyo técnico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
La vía del SHK.....	5
Ingeniería de vías metabólicas en <i>E. coli</i>	7
Sistemas de transporte de glucosa en <i>E. coli</i>	7
Cepas PTS ⁻	8
Cepas sobreproductoras de shikimato.....	11
Regulación de la expresión genética.....	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos particulares.....	17
METODOLOGÍA	18
Cepas y plásmidos	18
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	19
Preparación de células electrocompetentes	20
Transformación bacteriana.....	21
Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina.....	21
Extracción y purificación de DNA.....	22
Reacción en cadena de la polimerasa	22
Transducción mediada por el fago P1 vir	23
Análisis de transporte de [¹⁴ C]-glucosa (nmol _{GLC} /mg _{prot} min)	24
Evaluación del crecimiento en sistemas de matraz	25
Evaluación de las cepas en sistemas de fermentación en lote.....	25
Determinación de crecimiento bacteriano	27
Cuantificación de metabolitos.....	28

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Construcción de la cepa PB12. SA22 <i>galP</i> ⁺	29
Análisis de transporte de [¹⁴ C]-Glucosa	34
Evaluación del crecimiento de las cepas en matraz	36
Evaluación de la cepa PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ en sistemas de fermentación en lote	38
• Cultivos con 25 g/L de glucosa.....	38
• Cultivos con 100 g/L de glucosa	42
• Cultivos con 100 g/L de glucosa + Betaína 2 mM	46
• Cultivos con 25 g/L de glucosa + Betaína 2 mM	51
• Cultivos con 50 g/L de glucosa + Betaína 2 mM	52
• Cultivos con 25 g/L de glucosa + 30 g /L de EL + Betaína 2 mM.....	57
• Cultivos con 50 g/L de glucosa + 30 g /L de EL + Betaína 2 mM.....	62
CONCLUSIONES	74
PERSPECTIVAS	75
BIBLIOGRAFÍA	76
APÉNDICE	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del shikimato.	3
Figura 2. Metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos en <i>E. coli</i>	6
Figura 3. Sistemas de transporte de glucosa en cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻	10
Figura 4. Ingeniería de vías metabólicas en el metabolismo central de carbono y vía del SHK en cepas de <i>E. coli</i> PTS ⁻ glc ⁺ para la sobreproducción de SHK.	12
Figura 5. Secuencia del promotor P _{trc}	14
Figura 6. Sistema de fermentación.....	27
Figura 7. Gen <i>galP</i> bajo control del promotor P _{trc} presente en el cromosoma de la cepa VH32GalP ⁺	29
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación de pérdida de casetes de resistencia ap y cm.....	30
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación del genotipo P _{trc} <i>galP</i>	31
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación del genotipo P _{trc} <i>galP</i>	32
Figura 11. Alineamiento local de la secuencia del producto de PCR y la secuencia <i>trc galP</i> para la candidata 4 con la secuencia construida como referencia.	33
Figura 12. Curvas correspondientes a la concentración de [¹⁴ C]-Glucosa transportada con respecto al tiempo para la cepa PB12.SA22 y PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	35
Figura 13. Cinética de crecimiento para las cepas creciendo en matraz.....	37

Figura 14. Gráfica comparativa que muestra el perfil de crecimiento (■), consumo de glucosa (▲) y producción de SHK (●) para las cepas PB12.SA22 y PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.....	39
Figura 15. Producción de compuestos aromáticos y AAc de la cepa PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.....	40
Figura 16. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ empleando una concentración de 100 g/L de glucosa en el medio de producción.....	43
Figura 17. Producción de compuestos aromáticos y AAc de la cepa PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ empleando una concentración de 100 g/L de glucosa en el medio de producción.....	44
Figura 18. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.	47
Figura 19. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.	49
Figura 20. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa en el medio de producción.	53
Figura 21. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.	55
Figura 22. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	58
Figura 23. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	60

Figura 24. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	63
Figura 25. Producción de compuestos aromáticos y AAC de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	65
Figura 26. Gráfica comparativa que muestra la μ alcanzada por ambas cepas según la concentración inicial de glucosa empleada.	69
Figura 27. Gráfica comparativa que muestra el $Y_{X/S}$ alcanzado por ambas cepas según la concentración inicial de glucosa empleada.....	70
Figura 28. Gráfica que muestra el título de SHK (g/L) alcanzado según la concentración de glucosa (mol/L) con la que se inició la fase estacionaria para las fermentaciones con ambas cepas.	72
Figura 29. Gráfica que muestra el $Y_{P/S}$ alcanzado según la concentración de glucosa (mol/L) con la que se inició la fase estacionaria para las fermentaciones con ambas cepas.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados y contruidos en el presente trabajo.	18
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo.	22
Tabla 3. Componentes de las reacciones de amplificación de ADN.	23
Tabla 4. Condiciones de las reacciones de PCR.	23
Tabla 5. Velocidades iniciales de consumo de [¹⁴ C]-glucosa (τ).	35
Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento de las cepas creciendo en matraz.	37
Tabla 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.	41
Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas.	45
Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.	50
Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.	56
Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	61
Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.	67
Tabla 13. Comparativa de los parámetros cinéticos y estequiométricos para la cepa construida y la control en todas las condiciones evaluadas en el estudio.	68

RESUMEN

El shikimato es empleado como un precursor para la síntesis química del inhibidor de la enzima neuraminidasa, que se emplea para el tratamiento de infecciones virales tales como influenza estacional tipos A y B, influenza aviar H5N1 e influenza A/H1N1. Las semillas del anís estrella chino (*Illicium verum*) son la principal fuente comercial de shikimato. La producción de shikimato por fermentación empleando microorganismos genéticamente modificados actualmente ha comenzado a suplir la demanda comercial de éste compuesto. En *E. coli*, una vez en el periplasma, la glucosa es introducida y fosforilada preferencialmente por el sistema de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). La inactivación de dicho sistema incrementa la disponibilidad de PEP, sin embargo, la velocidad específica de crecimiento en glucosa disminuye sustancialmente comparada con la cepa silvestre. Dicha inactivación en la cepa de *E. coli* JM101 dio lugar a la cepa PB11, misma que al ser sometida a un proceso de evolución adaptativa permitió la selección de una mutante (PB12), capaz de crecer en glucosa al seleccionar el sistema de permeasa de galactosa (GalP, codificada por el gen *galP*), para internalizarla y fosforilarla por medio de la enzima glucocinasa (Glc, codificada por *glk*). La utilización del fondo genético PB12 permitió obtener la cepa derivada PB12.SA22 ($PTS^- glc^+ aroK^- aroL^- aroG^{fbr} tktA aroB aroE$) que produce 7.1 g/L de shikimato con un rendimiento de 0.29 mol SHK/mol glucosa en cultivos de 0.5 L en fermentador, utilizando un medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. En este trabajo, en la cepa PB12.SA22 se reemplazó la región promotora nativa del gen *galP* por el promotor fuerte *trc* con el fin de incrementar y controlar la transcripción de *galP* y así mejorar la velocidad de transporte de glucosa

obteniendo la cepa PB12.SA22 *galP*⁺. La velocidad inicial de consumo de [¹⁴C]-glucosa en esta cepa tuvo un aumento del 276.6% con respecto a la control. En las condiciones de fermentación en lote con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura se observó una mejora en la velocidad específica de crecimiento y productividad volumétrica. Los resultados obtenidos demuestran que se mejoró la velocidad de transporte de glucosa en la cepa construida y que para la cepa PB12.SA22, la capacidad de transporte de glucosa resulta una limitante y al lograr contender con ésta circunstancia se logra mejorar a la cepa en diversos aspectos.

INTRODUCCIÓN

El shikimato (SHK) (Figura 1) es un compuesto hidroaromático que posee un anillo carbocíclico de seis miembros con tres carbonos quirales y un grupo funcional carboxilo que le otorgan funcionalidad y orgánica sintéticamente útil. Es uno de los intermediarios claves en la ruta de síntesis de compuestos aromáticos (vía del SHK) que está presente en bacterias y plantas principalmente (Ghosh *et al*, 2012).

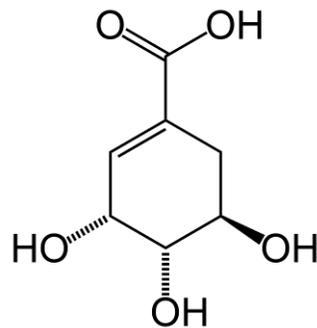


Figura 1. Estructura del shikimato.

El SHK es empleado como un precursor para la síntesis química del inhibidor de la enzima neuraminidasa, oseltamivir fosfato (OSF) producido por Roche bajo el nombre comercial Tamiflu®, que se emplea para el tratamiento de infecciones virales tales como influenza estacional tipos A y B, influenza aviar H5N1 e influenza A/H1N1 (Escalante *et al*, 2009). También posee otras aplicaciones tales como aditivo en alimentos y piensos, inyectables, precursor en la síntesis de diversos antibióticos, alcaloides, herbicidas y en la producción de fenol (Chandran *et al*, 2003; Krämer *et al*, 2003; Johansson *et al*, 2005).

A partir de 1999, Roche incrementó su producción de Tamiflu® para asegurar una reserva de este compuesto en varios países desarrollados en previsión de una posible pandemia de gripe aviar. Sin embargo, se ha estimado que en caso de presentarse este escenario, la producción de Tamiflu® sería insuficiente para atender la población de países en vías de desarrollo. Ante esta situación, es importante contar con capacidades locales y regionales para producir este compuesto antiviral y otras moléculas antivirales de nueva generación por medio de aproximaciones biotecnológicas (Escalante *et al*, 2009).

Las semillas del anís estrella chino (*Illicium verum*) son la principal fuente comercial de SHK. La producción de SHK por fermentación empleando microorganismos genéticamente modificados actualmente ha comenzado a suplir la demanda comercial de éste compuesto (Ghosh *et al*, 2012).

En nuestro grupo de investigación se aplican diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM) en la modificación de cepas de *Escherichia coli* que sobreproduzcan SHK como parte de un proyecto multidisciplinario cuyo objetivo es la producción del compuesto OSF, con el objeto de aumentar las capacidades de producción local de este antiviral y de su uso como precursor para la síntesis de nuevos antivirales.

ANTECEDENTES

La vía del SHK

En *E. coli* la vía del SHK inicia con la reacción de condensación de los intermediarios de la glicólisis y vía de las pentosas, fosfoenolpiruvato (PEP) y de la eritrosa-4-P (E4P), respectivamente, para formar 3-deoxi-D-*arabino*heptulosoato 7-fosfato (DAHP). Esta reacción es catalizada por cada una de las tres isoformas de la enzima DAHP sintasa (DAHPS), AroF, AroG y AroH (codificadas por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*, respectivamente). Aunque estas tres isoenzimas catalizan la misma reacción, cada una de ellas es inhibida por producto por los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano, respectivamente. Del 100% de la actividad del complejo DAHPS, la isoenzima AroG posee el 80%, la AroF posee alrededor del 20%, mientras que la isoenzima AroH posee alrededor del 1%. El DAHP es convertido a 3-dehidroquinato (DHQ), por acción de la enzima 3-DHQ sintasa (codificada por el gen *aroB*). El DHQ es deshidratado para rendir 3-dehidroshikimato (DHS) por la enzima 3-DHQ deshidratasa (codificada por el gen *aroD*). El DHS es reducido a SHK con el consumo de NADH por la enzima SHK deshidrogenasa (codificada por el gen *aroE*). El SHK es convertido a shikimato-3-P (S3P), por las enzimas Shikimato cinasa I y II (codificadas respectivamente por los genes *aroK* y *aroL*). El S3P es convertido a 5-enolpiruvilshikimato-3-P (EPSP), por la enzima 5-EPSP sintasa (codificada por el gen *aroA*). Este último intermediario es convertido a corismato por la enzima Corismato sintasa (codificada por el gen *aroC*). En *E. coli* las enzimas DHQ sintasa, DHQ deshidratasa y la SHK deshidrogenasa son expresadas constitutivamente en contraste con la regulación transcripcional de las isoenzimas DAHPS AroG, AroF y AroH, mientras que se presenta un mecanismo de inhibición por acumulación de producto a

nivel de la SHK deshidrogenasa por SHK. Se han identificado también como reacciones limitantes de la vía a las catalizadas por las enzimas SHK deshidrogenasa (*aroB*) y SHK cinasa (*aroL* o *aroK*) (Krämer *et al*, 2003) (Figura 1).

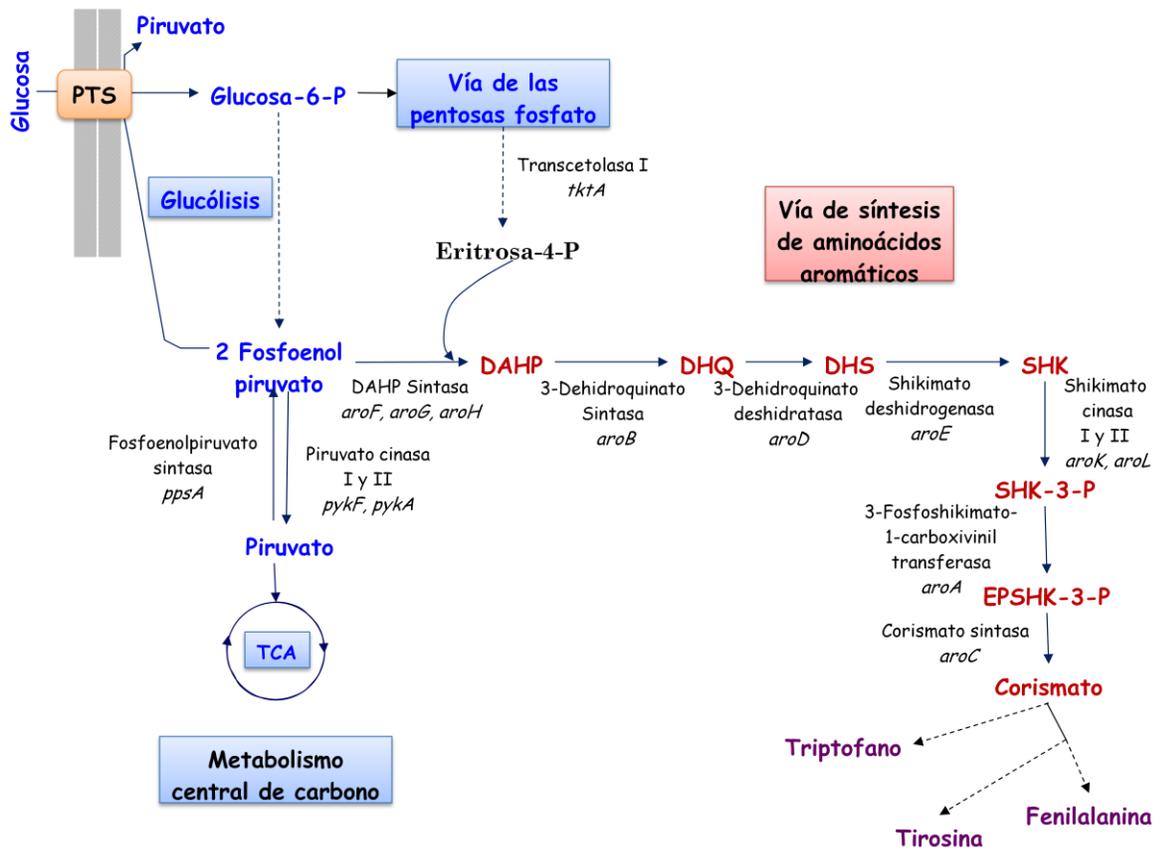


Figura 2. Metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*.

PTS, Sistema de fosfotransferasa de glucosa dependiente de fosfoenolpiruvato; TCA, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; OAA, Oxaloacetato; DAHP, 3-deoxi-Darabinoheptulosonato-7-P; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHK, shikimato; SHK-3P, shikimato-3-P; EPSHK-3-P, 5-enolpiruvil-shikimato-3-P. Las líneas continuas representan una sola reacción enzimática independientemente de si es catalizada por una enzima o más isoenzimas. Las líneas punteadas representan dos o más reacciones. Se muestran las enzimas participantes en varias de las reacciones de relevancia y los genes que las codifican. Tomado de Escalante *et al* (2009).

Ingeniería de vías metabólicas en *E. coli*

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) se define como la modificación directa de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de otras nuevas, por medio del uso de la tecnología del ADN recombinante. Las estrategias a considerar para incrementar la producción de un metabolito de interés en el contexto de la IVM son: (i) Incremento de la disponibilidad de la fuente de carbono utilizada como sustrato para la obtención de precursores utilizados para la biosíntesis de productos de interés; (ii) incremento en la disponibilidad de los intermediarios obtenidos del catabolismo de la fuente de carbono, a través del metabolismo central de carbono; (iii) mejoramiento de la reacción que cataliza la canalización de los intermediarios del metabolismo central de carbono, a la vía de interés; (iv) eliminación de los mecanismos de control transcripcional y alostérico de la vía; (v) identificación y eliminación de reacciones limitantes de la vía; y (vi) prevención de la pérdida de carbono hacia otras vías (Escalante *et al*, 2009).

Sistemas de transporte de glucosa en *E. coli*

Actualmente la glucosa es la materia prima más empleada en fermentaciones industriales con *E. coli* debido a que es relativamente económica y es la fuente de carbono y energía preferencial para esta bacteria. Como componente en un medio de cultivo, provee esqueletos de carbono para la biomasa y generación de productos. La capacidad de la célula de consumir y metabolizar este carbohidrato tiene un profundo impacto en su velocidad de crecimiento y productividad. Por tanto, es de esperarse que las modificaciones a los sistemas de transporte de glucosa tengan repercusiones importantes en la fisiología celular y esto a su vez pueda mejorar o ser perjudicial en un proceso de producción industrial.

E. coli internaliza la glucosa del medio extracelular al periplasma por los sistemas de transporte inespecíficos OmpC (Porina de membrana externa C), OmpF (Porina de membrana externa F) y LamB (Proteína receptora del fago Lambda; receptor de maltosa de alta afinidad). Una vez en el periplasma, la glucosa es introducida preferencialmente por el sistema fosfotransferasa:glucosa dependiente de PEP (PTS:glucosa:PEP) (Gosset, 2005). Este sistema está compuesto por los componentes proteicos no específicos Enzima I y HPr, cuya función es transferir el grupo fosfato proveniente del PEP a las proteínas carbohidrato específicas IIA y IIB. El sistema PTS también está involucrado en la regulación de diversos procesos celulares tales como la represión catabólica y la quimiotaxis, formando parte de una red regulatoria global que controla la capacidad de las células de encontrar, seleccionar, transportar y metabolizar diversos tipos de fuentes de carbono (Flores *et al*, 2005).

La glucosa también puede ser transportada activamente hacia el citoplasma por sistemas que normalmente están involucrados en la internalización de la galactosa como el MFS GalP (Permeasa de galactosa, codificada por el gen *galP*) y MglABC (Transportador ABC de galactosa) (Gosset, 2005).

Cepas PTS⁻

En *E. coli* creciendo en glucosa como fuente de carbono la mitad del PEP producido durante la glicolisis es consumido por el sistema PTS, lo cual limita su disponibilidad para la síntesis de diversos metabolitos que derivan de dicho precursor. La inactivación del sistema PTS (PTS⁻) incrementa la disponibilidad de moléculas de PEP provenientes del catabolismo de glucosa, el inconveniente de esta inactivación es que la velocidad específica de crecimiento (μ) en glucosa disminuye sustancialmente comparada con la de la cepa silvestre. Las cepas PTS⁻ exhiben una capacidad muy limitada para

transportar glucosa que se realiza principalmente por los sistemas GalP y Mgl. La glucosa así transportada se fosforila concomitantemente en citoplasma por medio de la enzima glucocinasa (Glk, codificada por el gen *glk*) a expensas de ATP para así poder entrar a la vía glicolítica (Figura 2).

La delección del operón *ptsHlcr* en la cepa de *E. coli* JM101 dió lugar a la cepa PB11 (PTS⁻). Al someter a dicha cepa a un proceso de evolución adaptativa mediante un cultivo continuo en quimiostato alimentado con glucosa de forma progresiva se obtuvo una mutante espontánea capaz de crecer en glucosa (cepa PB12). Análisis transcriptómicos sugieren que al seleccionar el sistema de GalP, para internalizar la glucosa y fosforilarla por medio de la enzima Glk, la cepa PB12 logra transportar la glucosa a una velocidad mayor que la cepa PB11 (Flores *et al*, 2005).

GalP constituye una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de facilitadores de la clase de transportadores que son impulsados por potencial electroquímico. GalP puede importar la glucosa con una Km de 10.2 μM y una V max de 0.0156 U/mg. Los genes que codifican para este transportador están normalmente inducidos por la presencia de galactosa en el medio, sin embargo, en las cepas PTS⁻ que crecen en medios con glucosa, dichos genes se encuentran máximamente inducidos en ausencia de galactosa (Gosset, 2005). En la cepa PB12 creciendo en fermentadores de 1L en medio M9 con 2 g/L de glucosa, el nivel de transcripción del gen *galP* es 13.1 (±1.87) veces mayor al de la cepa parental JM101 (Flores *et al*, 2005; Flores *et al*, 2007). La actividad de Glk en *E. coli* no es esencial cuando la glucosa es abundante y su transporte está mediado por PTS. Sin embargo, en condiciones limitantes de glucosa o en una cepa PTS⁻, la inactivación de *glk* debilita severamente la capacidad de crecimiento (Gosset, 2005). En la cepa PB12 el nivel de transcripción del

gen *glk* es 2.2 veces mayor al de la cepa parental JM101 (Flores *et al*, 2005; Flores *et al*, 2007) (Figura 2).

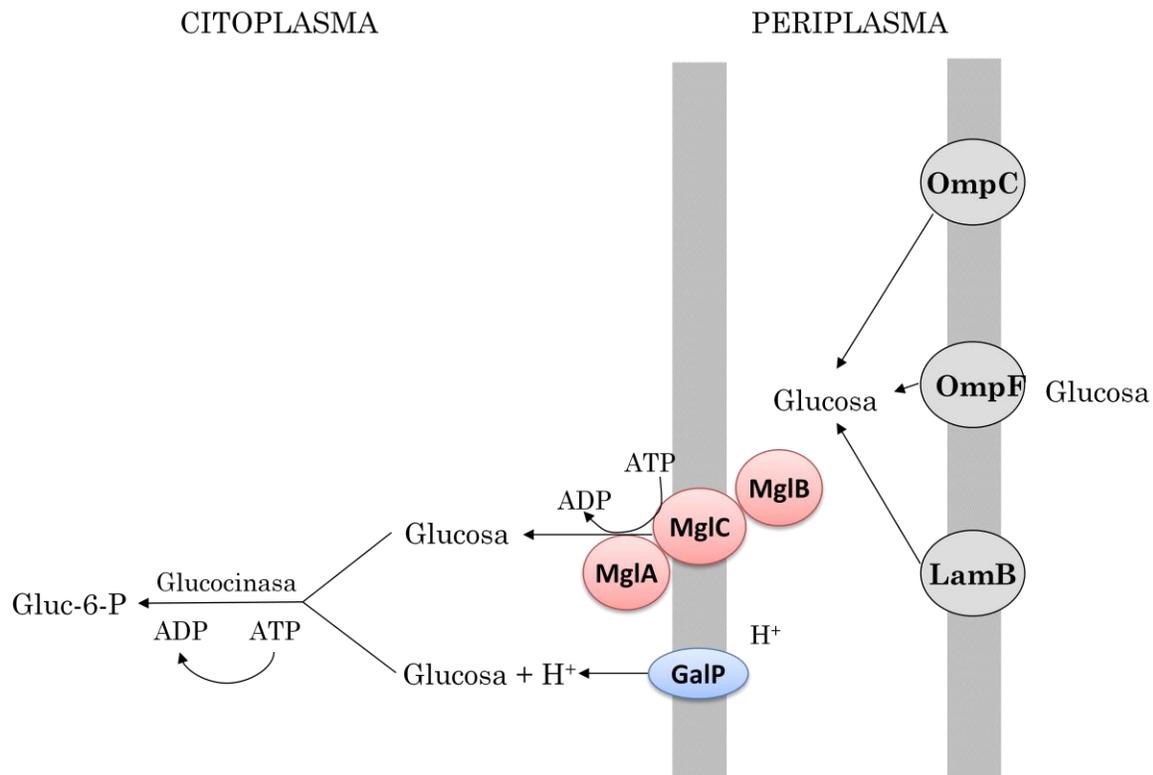


Figura 3. Sistemas de transporte de glucosa en cepas de *E. coli* PTS⁻.

OmpC (Porina de membrana externa C), OmpF (Porina de membrana externa F) y LamB (Proteína receptora del fago Lambda; receptor de maltosa de alta afinidad); Sistemas de transporte de galactosa MFS GalP (Permeasa de galactosa) y MglABC (Transportador ABC de galactosa). Tomado de Gosset (2005).

Cepas sobreproductoras de shikimato

En la literatura se encuentran reportados diversos esfuerzos basados en ingeniería de vías metabólicas para sobreproducir SHK en *E. coli* por vía fermentativa (Knop *et al*, 2001; Chandran *et al*, 2003; Krämer *et al*, 2003; Yi *et al*, 2003; Johansson *et al*, 2005; Ahn *et al*, 2008). Todos estos están basados en modificaciones genéticas para alterar el metabolismo central de carbono así como la vía del SHK.

La utilización del fondo genético PTS⁻ (PB12) (Flores *et al*, 2007) permitió la obtención de la cepa sobreproductora de SHK, PB12.SA22 (PTS⁻ glc⁺ *aroK*⁻ *aroL*⁻ *aroG*^{fbr} *tktA* *aroB* *aroE*). Esta cepa tiene bloqueado el flujo de carbono hacia corismato por la doble deleción de los genes que codifican para ambas shikimato cinasas (*aroK* y *aroL*) y porta un par de plásmidos, el pJLBaroG^{fbr} *tktA* así como el pTOPO*aroB* *aroE*. La versión insensible a inhibición por retroalimentación (*fbr-feedback resistant*) de la enzima AroG (la de mayor actividad del complejo DAHPS) permite evitar el efecto que pudieran ejercer los aminoácidos aromáticos presentes en el medio en el primer paso de la vía del SHK, mientras que la copia extra del gen *tktA* permite aumentar la poza de la E4P, intermediario iniciador de la vía. Por otro lado, el plásmido pTOPO porta copias adicionales de los genes que codifican para las enzimas que catalizan las reacciones que son consideradas las limitantes en la vía. Esta cepa logra acumular 7.1 g/L de SHK con un rendimiento de 0.29 mol SHK/mol glucosa en cultivos de 0.5 L en fermentador, utilizando un medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura (EL). Dicho rendimiento es el mejor valor reportado en la literatura para cepas productoras de SHK (Escalante *et al*, 2010) (Figura 3).

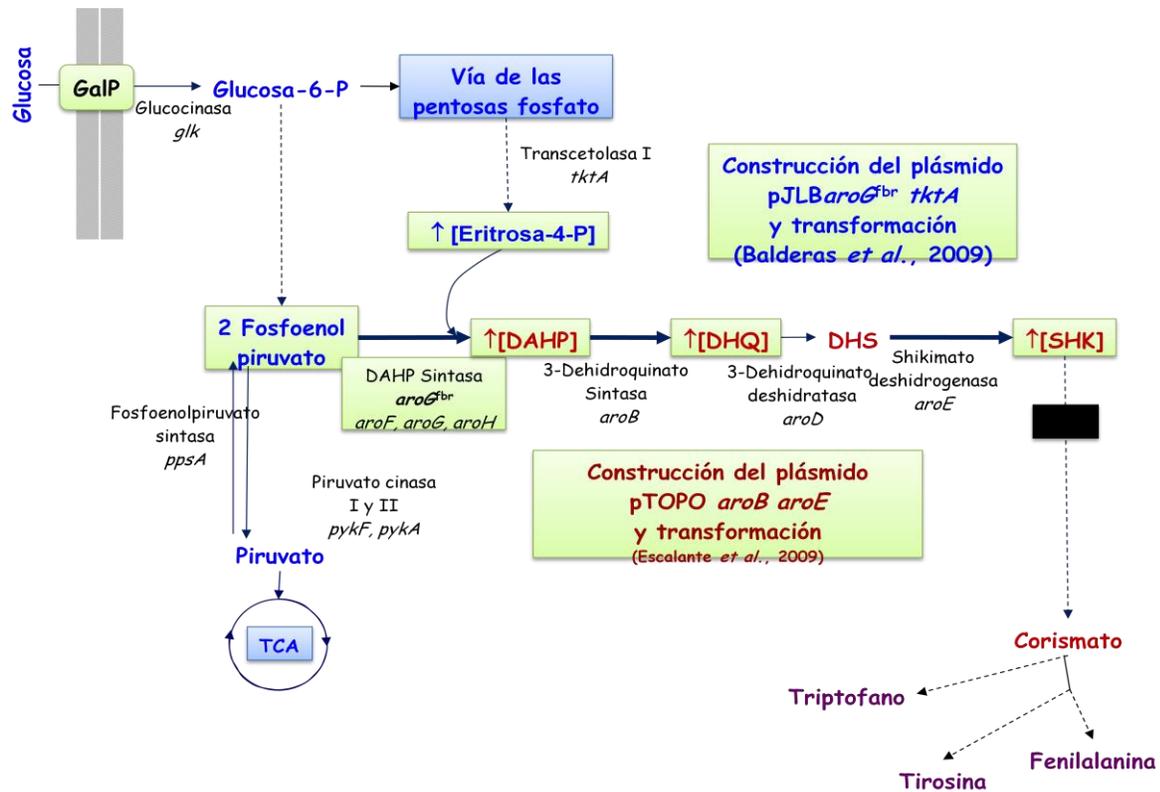


Figura 4. Ingeniería de vías metabólicas en el metabolismo central de carbono y vía del SHK en cepas de *E. coli* PTS⁻ glc⁺ para la sobreproducción de SHK.

GalP, Permeasa de galactosa; TCA, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; OAA, Oxaloacetato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptuloseonato-7-P; DHQ, 3-dehidroquinato; DHS, 3-dehidroshikimato; SHK, shikimato; fbr, versión insensible a inhibición alostérica; ■, inactivación del gen correspondiente; ↑[], incremento en la concentración del intermediario indicado. Las líneas continuas representan una sola reacción enzimática independientemente de si es catalizada por una enzima o por dos o más isoenzimas. Las líneas punteadas representan dos o más reacciones. Se muestran las enzimas participantes en varias de las reacciones de relevancia y los genes que las codifican. Tomado de Escalante *et al.* (2009).

Regulación de la expresión genética

Para poder expresar eficientemente cualquier gen de *E. coli*, es necesario colocarlo bajo el control de las señales que reconoce la maquinaria de transcripción y de traducción del organismo huésped (Lewin, 2004).

El promotor es la secuencia que reconoce la RNA polimerasa como señal de inicio de la transcripción. La secuencia de nucleótidos de los promotores varía considerablemente, influyendo en la afinidad de unión de la RNA polimerasa. De tal manera que la fuerza de un promotor está relacionada con la similitud que tenga con respecto a la secuencia consenso (Nelson y Cox, 2001). De acuerdo a su regulación, los promotores pueden ser constitutivos, los que siempre permiten la transcripción del gen o genes bajo su control y regulados, los que únicamente permiten la expresión genética en condiciones ambientales y metabólicas específicas. El control de la transcripción a partir de los promotores regulados se lleva a cabo por la interacción entre proteínas de unión específicas y secuencias determinadas localizadas en, o próximas al promotor. Dichas moléculas actúan como activadores (regulación positiva) o represores (regulación negativa). Algunos promotores inducibles como P_{lac} y P_{lacUV5} , están controlados negativamente por la proteína represora LacI y positivamente por la proteína receptora de AMP-cíclico (AMPc) o CRP. En ausencia de glucosa, el complejo CRP-AMPc se une al DNA en el sitio CRP, estimulando la interacción de la RNA polimerasa con el promotor y activando la transcripción de los genes localizados corriente abajo. En contraste, el represor LacI se une al operador, el cual está contiguo al sitio del inicio de la transcripción. Esta unión bloquea la región que es reconocida por la RNAPol, impidiendo que se transcriba el gen de interés. La inducción de la transcripción a partir de estos promotores, se lleva a cabo en presencia de alolactosa (inductor natural) o de

compuestos químicos de bajo peso molecular como el isopropil-β-D-tiogalactopiranosido o IPTG (inductor gratuito). Estos inductores se unen al represor y cambian su conformación, impidiendo que éste interactúe con la región del operador. Por lo tanto, la RNAPol es libre de unirse al promotor y de iniciar la transcripción. La transcripción del gen *lacI* ocurre sólo una o dos veces por generación, produciendo alrededor de 10 moléculas represoras por célula. Sin embargo, la mutación denominada I^q incrementa la afinidad de la RNA polimerasa por dicho promotor (Calos, 1978) generando un incremento de 100 moléculas de represor por célula. El promotor sintético híbrido P_{trc} se construyó con las secuencias de las cajas -35 del promotor P_{trp} y -10 del promotor P_{lacUV5}, separadas por 17 pares de bases (Figura 4). Su regulación es similar a la que tienen los promotores que le dieron origen, puesto que se reprime por el producto del gen *lacI*, por lo que se induce con lactosa o IPTG, y como carece del sitio de unión para CRP-cAMP, es insensible a represión catabólica. En el caso del promotor del operón de triptófano, P_{trp}, éste se regula negativamente por el represor TrpR unido a L-triptófano. Para mantener este promotor activo, se utiliza ácido indol-acrílico (IAA), el cual inactiva al represor al impedir su unión con el triptófano. Existen diferentes promotores que regulan de manera eficiente el inicio de la transcripción, por lo que se emplean para expresar genes (Amann *et al*, 1988).



Figura 5. Secuencia del promotor P_{trc}.
Tomado de (Hernández-Montalvo *et al*, 2003).

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la expresión en plásmido del gen *galP*, bajo control del promotor fuerte *trc*, en cepas PTS⁻ cultivadas en matraces de 250 mL con medio M9 suplementado con 0.2% de glucosa, ha permitido restaurar la μ a los niveles de la cepa silvestre (de 0.03 a 0.55 h⁻¹) (Hernández-Montalvo *et al*, 2003). La transcripción del gen *galP* se encuentra incrementada 2.56 (± 0.79) veces en la cepa PB12.SA22 creciendo en fermentadores de 1L en medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura con respecto a la cepa parental JM101 (Carmona, 2011). Sin embargo, se plantea reemplazar la región promotora nativa del gen *galP* por el promotor fuerte *trc* con el fin de incrementar y controlar la transcripción y así mejorar la velocidad de transporte de glucosa aumentando la disponibilidad de dicha fuente de carbono para ser canalizada hacia la síntesis de SHK. En este contexto, queda abierta la posibilidad de aumentar la concentración de glucosa empleada en el medio de producción en sistemas de fermentación.

HIPÓTESIS

El incremento en la capacidad de asimilación de glucosa en la cepa sobreproductora de SHK de *E. coli* PB12.SA22 por medio de la expresión del gen *galP* bajo control del promotor *trc* favorecerá su velocidad de crecimiento y productividad de SHK a partir de dicha fuente de carbono.

OBJETIVOS

Objetivo general

Incrementar la capacidad de transporte de glucosa en *E. coli* PB12.SA22 (PTS⁻ glc⁺ *aroK*⁻ *aroL*⁻ *aroG*^{fb} *tktA* *aroB* *aroE*) y evaluar su efecto sobre el crecimiento y la producción de SHK.

Objetivos particulares

1. Reemplazar el promotor nativo del gen *galP* de *E. coli* PB12.SA22 por el promotor fuerte *trc* en cromosoma.
2. Determinar la velocidad inicial de consumo de [¹⁴C]-glucosa (nmol_{GLC}/mg_{prot}min) para la cepa construida y la cepa original.
3. Evaluar el efecto de ésta modificación sobre el crecimiento de las cepas en cultivos en medio de producción sin extracto de levadura en fermentaciones en matraz.
4. Realizar fermentaciones en lote con el fin de evaluar el efecto de esta modificación sobre la producción de SHK.

METODOLOGÍA

Cepas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados y construidos en el presente trabajo se enlistan en la tabla 1. La cepa JM101 de *E. coli* se utilizó para la propagación y amplificación de vectores.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados y construidos en el presente trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F'	(Messing, 1979)
<i>E. coli</i> PB12	JM101 $\Delta(ptsH-l-crr)::km$ <i>glc</i> ⁺	(Flores <i>et al</i> , 1996)
PB12. SA2	PB12 $\Delta aroL\Delta aroK::cm$	(Escalante <i>et al</i> , 2010)
PB12. SA22	PB12.SA2 pJLBaroGfbr <i>tktA</i> pTOPO <i>aroB aroE</i>	(Escalante <i>et al</i> , 2010)
VH32galP ⁺	W3110 $\Delta(ptsH-l-crr)::km$, $\Delta lacI$, <i>lacZ::loxP</i> , P _{trc} <i>galP::cm</i>	(De Anda <i>et al</i> , 2006)
PB12.SA2 <i>cm</i> ^S	PB12 $\Delta aroL\Delta aroK$	Este trabajo.
PB12.SA2 <i>galP</i> ⁺	PB12 $\Delta aroL\Delta aroK$ P _{trc} <i>galP::cm</i>	Este trabajo.
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	PB12 $\Delta aroL\Delta aroK$ P _{trc} <i>galP::cm</i> pJLBaroGfbr <i>tktA</i> pTOPO <i>aroB aroE</i>	Este trabajo.
Plásmido	Características	Referencia
pCP20	Amp ^R , Cm ^R , FLP ⁺ , Rep ^{ts} Tiene un origen de replicación termosensible y presenta inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP.	(Cherepanov y Wackernagel, 1995)
pJLBaroG ^{fbr} <i>tktA</i>	Tc ^R , <i>aroG</i> ^{fbr} expresado bajo control del promotor <i>lacUV5</i> , <i>tktA</i> con su promotor nativo, tiene el origen de replicación del pACYC184.	(Balderas-Hernandez <i>et al</i> , 2009)
pTOPO <i>aroB aroE</i>	Km ^R , Zn ^R , P _{lac} <i>lacZ</i> - α ORF, <i>ccdB</i> y <i>kan</i> bajo control del promotor T7, contiene a los genes <i>aroB</i> y <i>aroE</i> tiene el origen de replicación Zeocina pUC	(Escalante <i>et al</i> , 2010)

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Medio Luria-Bertani (LB): 10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 5g/L de NaCl.

Medio SOB: 20 g/L de bactotriptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0.584 g/L de NaCl y 0.186 g/L de KCl.

Medio SOC: 20g/L de bactotriptona, 5g/L de extracto de levadura, 2.5g/L de MgSO₄, 2g/L de MgCl₂, 0.58g/L NaCl, 93.18 mg/L de KCl y 3.6 g/L de glucosa.

Medio de producción sin extracto de levadura: 7.5 g/L de K₂HPO₄, 7.5 g/L de KH₂PO₄, 0.3 g/L de citrato de amonio fierro (III), 2.1 g/L de ácido cítrico monohidrato, 0.7 g/L de L-fenilalanina, 0.7 g/L de L-tirosina, 0.35 g/L de L-triptófano, 1.2 mL de H₂SO₄ concentrado, 25 g/L de glucosa, 0.24 g/L de MgSO₄, 0.0147 g/L de CaCl₂, 0.010 g/L de ácido *p*-hidroxibenzoico, 0.010 g/L de *p*-aminobenzoato de potasio, 0.010 g/L de ácido 2,3-dihidroxibenzoico, 0.0037 g/L de (NH₄)₆(Mo₇O₂₄)· 4H₂O, 0.0029 g/L de ZnSO₄· 7H₂O, 0.0247 g/L de H₃BO₃, 0.0025 g/L de CuSO₄· 5H₂O y 0.0158 g/L de MnCl₂ (Knop *et al*, 2001).

Medio de producción: 7.5 g/L de K₂HPO₄, 7.5 g/L de KH₂PO₄, 0.3 g/L de citrato de amonio fierro (III), 2.1 g/L de ácido cítrico monohidrato, 15 g/L de extracto de levadura, 1.2 mL de H₂SO₄ concentrado, 25 g/L de glucosa, 0.24 g/L de MgSO₄, 0.0147 g/L de CaCl₂, 0.0037 g/L de (NH₄)₆(Mo₇O₂₄)· 4H₂O, 0.0029 g/L de ZnSO₄· 7H₂O, 0.0247 g/L de H₃BO₃, 0.0025 g/L de CuSO₄· 5H₂O y 0.0158 g/L de MnCl₂ (Frost, 2010).

Las cepas de *E. coli* empleadas en el presente trabajo se crecieron de forma rutinaria en medio LB líquido o sólido. Para seleccionar las construcciones deseadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli*, se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos: 30 µg/mL de kanamicina (km), 20 µg/mL de cloranfenicol (cm), 30 µg/mL de tetraciclina (te), 25 µg/mL de zeocina (zn) y 100 µg/mL de ampicilina (ap). Para fines de producción la concentración de IPTG empleada fue de 0.1 mM y también se suplementó 0.0001 g/L de vitamina B₁. Todas las cepas de *E. coli* se incubaron a 300 rpm y a 37°C, excepto cuando se transformaron con el plásmido pCP20 que tiene un origen de replicación termo-sensible, en cuyo caso la incubación se hizo a 30°C.

Preparación de células electrocompetentes

Se preparó un matraz de 125 mL con 5 mL de medio LB así como los antibióticos pertinentes y se inoculó con una asada de glicerol de la cepa en cuestión, dejándolo incubar toda la noche a 37°C y 300 rpm. Con la totalidad del volumen de dicho precultivo fue inoculado un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB así como los antibióticos pertinentes incubando en las mismas condiciones hasta alcanzar una D.O._{600nm} de entre 0.5 y 0.9. El matraz se enfrió en hielo por 5 minutos y las células fueron cosechadas centrifugando 10 minutos a 4°C y 4000g, el medio fue descartado mientras que el paquete celular fue lavado 2 veces con 10 mL de agua fría centrifugando en las condiciones ya mencionadas. El paquete celular lavado fue resuspendido en 2mL de glicerol frío al 10% y posteriormente centrifugado en las condiciones previamente mencionadas descartando el sobrenadante. Finalmente las células fueron resuspendidas en un volumen de 0.3 mL de glicerol frío al 10% y alícuotas de 40 µL fueron congeladas en hielo seco y almacenadas a -70°C.

Transformación bacteriana

El ADN plasmídico se transformó en *E. coli* por electroporación en células electrocompetentes utilizando cubetas de electroporación (BioRad, Hercules, CA, USA) y un electroporador marca Eppendorf modelo 2510 a 2500 volts. Las células fueron recuperadas en medio SOC con glucosa a 37°C o 30°C (en el caso del plásmido pCP20) por 3 y hasta 4 horas. Las células transformantes fueron seleccionadas por crecimiento en placas de medio LB suplementadas con los antibióticos pertinentes.

Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se tomaron 1.5 mL de un cultivo saturado y se centrifugaron por 2 minutos, desechando el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido en 150 µL de solución I (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, sacarosa 8%, pH 8.0) fría y 5 µL de RNAsa (5 mg/mL). Se adicionaron 350 µL de solución II (SDS 1%, NaOH 0.2M) mezclando por inversión e incubando por 5 minutos en hielo. Se adicionaron 250 µL de la solución III (Acetato de sodio 3M, pH 5.2) fría mezclando por inversión. Tras incubar por 5 minutos en hielo se centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm. El paquete celular fue descartado mientras que el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que fue llenado con isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm desechando el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de etanol al 70% mezclando por inversión. Nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm desechando el sobrenadante. El tubo conteniendo el ADN plasmídico fue secado a 37°C y finalmente resuspendido en 50 µL de agua mQ estéril.

Extracción y purificación de DNA

El ADN cromosomal se extrajo usando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories. Los productos de PCR fueron purificados empleando el High Pure PCR Product Purification Kit de Roche o el GeneJET PCR Purification Kit de Fermentas mientras que para recuperar fragmentos de ADN embebidos en geles de agarosa se empleó el Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de Zymo Research.

Reacción en cadena de la polimerasa

En la Tabla 2 se presenta una lista de los oligonucleótidos que fueron empleados en el presente trabajo para verificar la identidad de las cepas, tanto para la presencia del gen *galP* bajo control del promotor *trc*, así como las deleciones de los genes que codifican para ambas shikimate cinasas.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
upgalP-cat	CCG CCC GCA CAA TAA CAT CAT TCT TCC TGA TCA CGT TTC ACC GCC GAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG C
trcgalP	GCC TTG TTT GAC CGC CCC TGT TTT TTA CGC TCA GGC ATG GTC TGT TTC CTG TGT GAA ATT G
prom2	CTG AAA TGA GCT GTT GAC NAT TAA TCA TCC GGC TCG
galP4	CAT CAG CAG CAT GGC GAT GGC G
-500aroK5'	CAT TCC CTG GTT CGG GCA AT
+500aroK3'	GGG ATG GTT GAC CGC AGT TT
-500aroL5'	TTG TCC GGC AGT GTG AAG CG
+500aroL3'	TTA CCG GGC AAG TGT GAA GC

Para las reacciones de PCR se empleó la enzima Taq DNA Polimerasa recombinante de Fermentas. La mezcla de reacción fue la que se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Componentes de las reacciones de amplificación de ADN.

Componente	Volumen
ADN Templado	1 μ L
Amortiguador 10X	5 μ L
Sulfato de magnesio 25 mM	2.5 μ L
Mezcla de dNTPs 10 mM	1 μ L
Primer forward 10 μ M	2.5 μ L
Primer reverse 10 μ M	2.5 μ L
Enzima (1 U/ μ L)	1.25 μ L
Agua	34.25 μ L
Total	50 μL

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador PCR Sprint de Thermo Hybaid con las condiciones mostradas en la Tabla 4:

Tabla 4. Condiciones de las reacciones de PCR.

1 ciclo de desnaturalización	94°C por 10 min
30 ciclos de amplificación	Desnaturalización 95°C por 30 seg
	Alineamiento 56 °C por 1 min
	Polimerización 70°C por 2 min
1 ciclo de amplificación final	72°C por 10 min

Transducción mediada por el fago P1 vir

Se centrifugaron 1.5 mL de un cultivo fresco de la cepa donadora y el paquete celular fue resuspendido en 750 μ l de una solución 10 mM de MgSO₄ y 5 mM de CaCl₂. A dicha suspensión se le añadieron 100 μ l del fago silvestre y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadieron 40 μ l de MgSO₄, 20 μ l de CaCl₂ y 4 mL de agar suave y se sembró en cajas de LB dejando incubar toda la

noche. Después del periodo de incubación la sobrecapa de agar suave fue raspada y suspendida en 5 mL de LB y se añadieron 200 μ l de cloroformo. El fago fue purificado centrifugando (300 rpm, 15 minutos, 4°C) y filtrando (0.45 μ m) dicha suspensión. La cepa receptora fue infectada con 100 μ l del fago obtenido como se detalló para la cepa donadora. Al terminar el periodo de incubación se añadieron 100 μ l de citrato de sodio y se sembró en cajas de LB con cm dejando incubar toda la noche.

Análisis de transporte de [¹⁴C]-glucosa (nmol_{GLC}/mg_{prot}min)

Las velocidades iniciales de transporte de [¹⁴C]-glucosa se determinaron colectando 1 D.O._{600nm} de un cultivo creciendo en fase exponencial a 37°C en sistemas de fermentación en lote en medio de producción. Las células fueron centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C y lavadas con sales M9 con el fin de eliminar cualquier traza del medio de producción para finalmente ser resuspendidas en sales M9 y mantenidas a 4°C. Alícuotas de 540 μ L fueron incubadas a 37°C y 300 rpm por 10 minutos y la reacción fue iniciada con la adición de 60 μ L de [¹⁴C]-glucosa (0.5 mM 5 mci/mmol) manteniendo la agitación. Cada 30 segundos se tomaron alícuotas de 50 μ L de las células que incorporaban la [¹⁴C]-glucosa y fueron filtradas en membranas de 0.45 μ m de tamaño de poro colocadas sobre una corriente de aire. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con 5 mL de sales M9 a 4°C y se dejaron secar toda la noche. Las membranas secas fueron transferidas a viales de centelleo con 5 mL de líquido de centelleo Ecolite, midiendo la glucosa incorporada en el contador de centelleo. Así mismo la proteína total fue determinada por el método de Bradford (Báez *et al*, 2001; Hernández-Montalvo *et al*, 2001; Utrilla *et al*, 2009).

Evaluación del crecimiento en sistemas de matraz

Para determinar la μ de las cepas construidas se realizaron cultivos de 50 mL en matraces Klett bafleados de 250 mL con medio de producción sin extracto de levadura, suplementado con 0.1 mM de IPTG, 0.001 g/L de vitamina B1 y antibióticos a las concentraciones previamente indicadas. El inóculo para dichos cultivos se preparó a partir de gliceroles, inoculando 10 mL de medio LB con los antibióticos pertinentes en matraces bafleados de 125 mL. Después de incubar toda la noche, se determinó la concentración de biomasa y se calculó el volumen de inóculo requerido para ajustar a una $DO_{600\text{ nm}}$ inicial de 0.1. El crecimiento fue monitoreado cada hora en un colorímetro Klett.

Evaluación de las cepas en sistemas de fermentación en lote

Se realizaron fermentaciones por duplicado en fermentadores de volumen nominal de 1L (Applikon, Schieman, The Netherlands), acoplados a una consola (ADI 1025, Applikon) y un controlador (ADI 1010, Applikon) que permitieron regular los parámetros de temperatura, pH, agitación y aireación, empleando el medio de producción previamente descrito. El fermentador fue ensamblado y provisto del matraz de venteo, probeta para adición de base, manguera con filtro para la entrada de aire estéril y electrodos de pH y oxígeno (Figura 6). La base mineral del medio, así como el extracto de levadura fueron disueltos en 350 mL de agua mQ y ajustados a pH 7 con NaOH 1N para ser esterilizados en autoclave junto con el fermentador por 20 minutos a 121°C. Una vez estéril, el fermentador fue conectado a las consolas, permitiendo la saturación del electrodo de oxígeno. El resto de los componentes del medio (glucosa, elementos traza, $MgSO_4$, $CaCl_2$, Vitamina B₁, IPTG y antibióticos) fueron esterilizados por filtración y añadidos previo a la adición del inóculo. Para el inóculo se preparó un cultivo de 50

mL en matraz de 250 mL con medio de producción (sin IPTG, MgSO_4 ni CaCl_2), que fue inoculado con la cepa que se mantenía congelada en glicerol a -70°C , dejándolo crecer hasta alcanzar una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de al menos 6. Se calculó el volumen de inóculo requerido para iniciar la fermentación a $0.3 \text{ D.O.}_{600\text{nm}}$ y así mismo se calculó el volumen de agua necesario añadir para tener en el reactor un volumen de trabajo de 500 mL. Los fermentadores se mantuvieron a 37°C , a pH 7 (controlado mediante la adición de NH_4OH 10%), 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) y la agitación fluctuó entre 500 y 700 rpm, de forma tal que los niveles de oxígeno disuelto nunca estuvieran por debajo del 20%. Las fermentaciones duraron 50 horas, período en el que se monitoreó tomando muestras cada hora durante las primeras 8 horas y posteriormente cada 6 horas. El volumen de las muestras fue de 1.5 mL y estas fueron centrifugadas y resuspendidas para medir la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$, mientras que el sobrenadante fue congelado a -20°C , para posteriormente cuantificar los metabolitos presentes en el mismo.



Figura 6. Sistema de fermentación.

Determinación de crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se cuantificó en función de la turbidez, midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70 y/o en fotocolorímetro Klett de Belart Scienceware. Las unidades Klett posteriormente se convirtieron a unidades de densidad óptica ($DO=[0.0119*U \text{ Klett}]+0.1344$).

Cuantificación de metabolitos

Se determinó la concentración de SHK, DHS, DHQ, AG (ácido gálico) Y AAc (ácido acético) en el sobrenadante de muestras de fermentación previamente filtradas (0.45 μm), por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución con un equipo Waters, Miliford 600E bomba cuaternaria, 717 inyector automático, 2410 índice de refracción y 996 arreglo de fotodiodos equipado con una columna Aminex HPX-87H (300x7.8mm, 9 μm) (Bio-Rad, Hercules, CA). Se empleó como fase móvil H_2SO_4 5 mM, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min a 50°C

La glucosa fue cuantificada en el analizador bioquímico (Biochemistry Analyzer YSI 2700 Select, Yellow Springs, Ohio). Para el DAHP se utilizó el método del ácido tioarbitúrico (Weissbach y Hurwitz, 1958).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de la cepa PB12. SA22 *galP*⁺

Para construir la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ se decidió transducir a partir de la cepa VH32GalP⁺ la construcción del gen *galP* bajo control del promotor P_{trc} y el gen *Cat2* de resistencia a cm (Figura 6).



Figura 7. Gen *galP* bajo control del promotor P_{trc} presente en el cromosoma de la cepa VH32GalP⁺.

Tomado de De Anda *et al* (2006).

La cepa receptora, PB12.SA2, también porta al gen *Cat2* como un marcador de resistencia remanente producto de la inactivación del gen *aroK*, lo cual la hacía incompatible para la transducción pues impedía la selección de las células receptoras de la construcción de interés por su fenotipo de resistencia a cm.

En la cepa VH32GalP⁺ el promotor nativo del gen *galP* fue reemplazado empleando una modificación de la técnica reportada por Datsenko y Wanner (2000), por tanto el gen *Cat2* en dicha cepa se encuentra flanqueado por sitios FRT (De Anda *et al*, 2006).

El plásmido pCP20 tiene un origen replicación termosensible y presenta inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP por lo tanto media el evento de recombinación que permite escindir el fragmento de ADN que se encuentra flanqueado por los sitios FRT y por su origen de replicación se puede curar por incubación a 42°C luego de que ha ocurrido la escisión (Datsenko y Wanner, 2000).

Para escindir el gen *Cat2*, la cepa PB12.SA2 fue transformada con el plásmido pCP20 y las células transformantes fueron seleccionadas por crecimiento en placas de medio LB con ap a 30°C. Se eligieron 10 colonias que fueron purificadas en placas de LB a 42°C. Posteriormente se comprobó la pérdida de las resistencias en placas con los antibióticos. Se requirió una segunda incubación a 42°C para asegurar la pérdida de ambas resistencias, eligiendo al final dos candidatas. Para verificar el genotipo $\Delta aroL\Delta aroK$ y la escisión del gen *Cat2* se llevó a cabo una amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos -500aroK5', +500aroK3', -500aroL5' y +500aroL3', que hibridan 500 bases río arriba (-) o río abajo (+) del gen correspondiente, dando como producto un amplicón de 1500 pb en presencia del gen funcional, de 2000 pb en presencia del gen *Cat2* y de 1000 pb en ausencia del gen funcional.

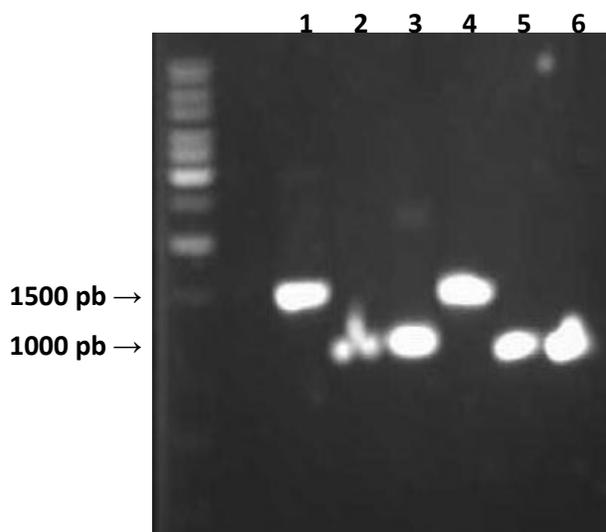


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación de pérdida de casetes de resistencia ap y cm.

Carril 1: *aroK* en JM101 (control). Carril 2: *aroK* en candidata 1. Carril 3: *aroK* en candidata 2. Carril 4: *aroL* en JM101 (control). Carril 5: *aroL* en candidata 1. Carril 6: *aroL* en candidata 2.

El tamaño de los amplicones que se observan en el gel de agarosa (Figura 7) confirma la escisión del casete de resistencia a *cm* y esto concuerda con el fenotipo observado.

Una vez que fue removido el casete de resistencia a *cm* se procedió a realizar la transducción mediada por el fago P1 (Thomason *et al*, 2001) con la cepa PB12.SA2 *cm^S* como receptora.

Se seleccionó a las células receptoras que portaban el gen *galP* bajo control del promotor *trc* por su fenotipo de resistencia a cloramfenicol, eligiendo a 6 candidatas. Para verificar el genotipo $P_{trc} galP$ se llevó a cabo una amplificación por PCR empleando los oligonucleótidos *upgalP-cat* y *trcgalP* (De Anda *et al*, 2006) cuyo producto de amplificación es de alrededor de 1500 pb.

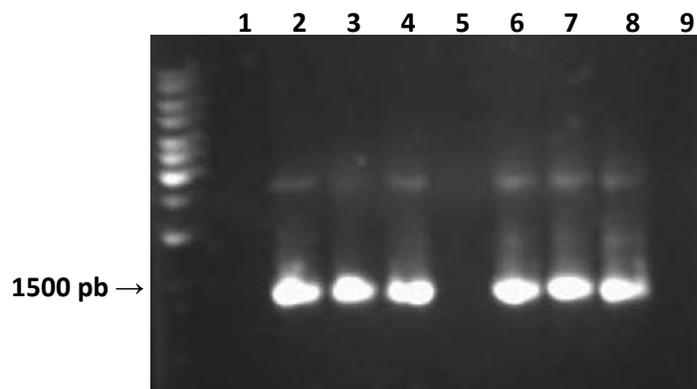


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación del genotipo $P_{trc} galP$.

Carril 1: $P_{trc} galP$ en JM101 (control). Carril 2 y 3: $P_{trc} galP$ en VH32galP⁺ (control). Carril 4: $P_{trc} galP$ en candidata 1. Carril 5: $P_{trc} galP$ en candidata 2. Carril 6: $P_{trc} galP$ en candidata 3. Carril 7: $P_{trc} galP$ en candidata 4. Carril 8: $P_{trc} galP$ en candidata 5. Carril 9: $P_{trc} galP$ en candidata 6.

En la Figura 8 se observa que las candidatas 2 y 6 no dieron el producto de amplificación esperado, por lo que se puede inferir que no se transdujo la construcción deseada, sino únicamente el gen de resistencia, por ello presentaron crecimiento en cloramfenicol pero en realidad se trataba de falsas positivas.

Para corroborar la presencia de la construcción deseada en las cuatro candidatas positivas, se realizó una reacción de PCR empleando el par de oligonucleótidos prom2 y galP4 (De Anda *et al.*, 2006) cuyo producto de amplificación es de alrededor de 1100 pb (Figura 9).

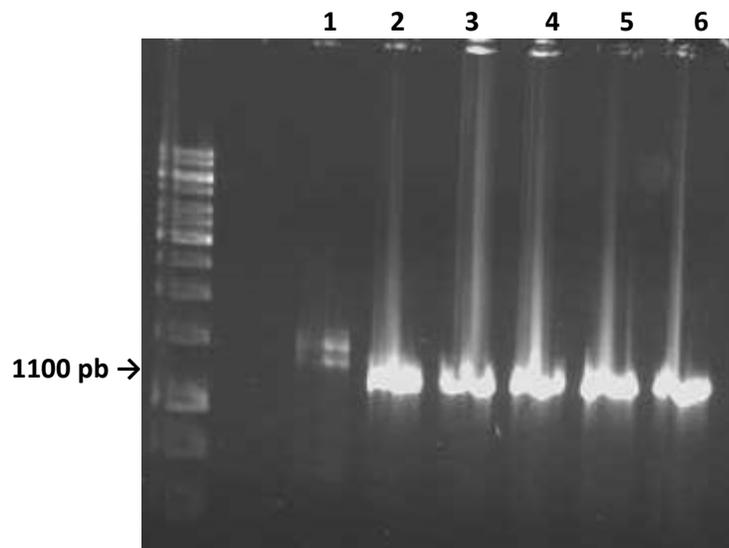


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para verificación del genotipo $P_{trc} galP$.

Carril 1: $P_{trc} galP$ en JM101 (control). Carril 2: $P_{trc} galP$ en VH32galP⁺ (control). Carril 3: $P_{trc} galP$ en candidata 1. Carril 4: $P_{trc} galP$ en candidata 3. Carril 5: $P_{trc} galP$ en candidata 4. Carril 6: $P_{trc} galP$ en candidata 5.

Para las cuatro candidatas evaluadas se obtuvo el producto de PCR esperado (candidatas 1, 3, 4 y 5) y se eligió a la candidata 4 para continuar trabajando. El producto de PCR obtenido empleando los oligonucleótidos prom2 y galP4 fue purificado y enviado a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología. Se presenta un alineamiento hecho en el programa Clone Manager de Sci-Ed tomando como referencia la secuencia denominada “trc galP” que se construyó ensamblando las secuencias del gen *Cat2*, el promotor P_{trc} y el gen *galP* tomadas de la base de datos del NCBI (Figura 10). Posteriormente la cepa fue transformada con los plásmidos pJLBaroG^{fb} *tkfA* y pTOPO *aroB aroE* con lo que finalmente se obtuvo la cepa PB12.SA22 *galP*⁺.



Figura 11. Alineamiento local de la secuencia del producto de PCR y la secuencia trc galP para la candidata 4 con la secuencia construida como referencia.

Análisis de transporte de [¹⁴C]-Glucosa

Con el fin de determinar cuál fue el efecto que ejerció el cambio en la fuerza del promotor del gen *galP* sobre la velocidad de transporte de glucosa en la cepa construida, con respecto a la PB12.SA22 (control), se decidió llevar a cabo un experimento de transporte de dicho sustrato marcado radiactivamente. Cabe resaltar que este experimento debe realizarse en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, pues cualquier otro tipo de sustrato que esté presente en el mismo podría enmascarar el valor real interfiriendo con el resultado. Debido a su auxotrofia, esta cepa no puede crecer en medios mínimos, por lo que para este ensayo la cepa fue crecida de forma rutinaria y luego las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en medio mínimo como se describe detalladamente en la parte de metodología.

A continuación se presentan las curvas correspondientes a la concentración de [¹⁴C]-glucosa transportada con respecto al tiempo para la cepa control así como para la que porta el gen *galP* bajo control del promotor *trc*.

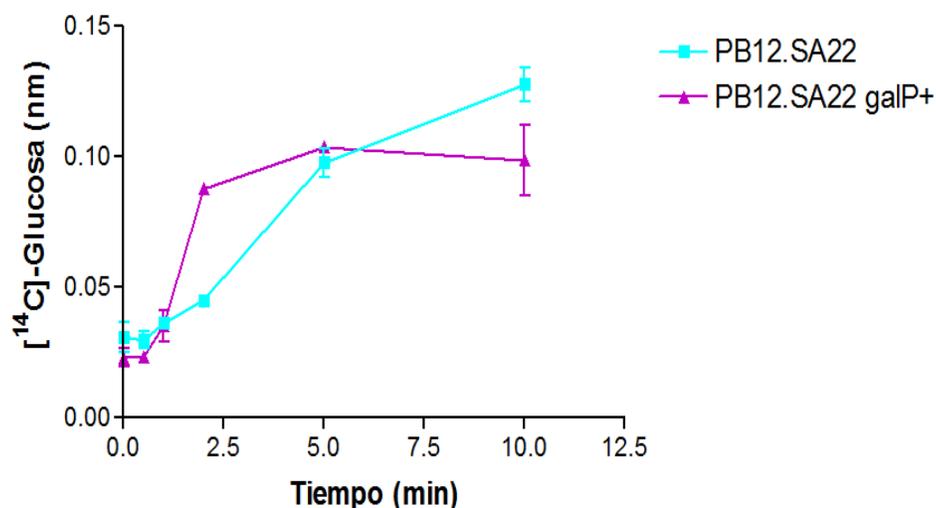


Figura 12. Curvas correspondientes a la concentración de [¹⁴C]-Glucosa transportada con respecto al tiempo para la cepa PB12.SA22 y PB12.SA22 *galP*⁺.

Se muestran en la Tabla 5 las velocidades iniciales de consumo de [¹⁴C]-glucosa (τ) referidas a la concentración de proteína determinada en las células:

Tabla 5. Velocidades iniciales de consumo de [¹⁴C]-glucosa (τ).

Cepa	τ (nm [¹⁴ C]-Glc/min·mg proteína)
PB12.SA22	1.28±0.12
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	4.82±0.28

Se observa que la τ tuvo un aumento importante, que corresponde al 276.6% con respecto a la cepa control, teniendo este resultado concordancia con lo esperado al reemplazar el promotor nativo del gen *galP*.

Cabe resaltar que estos resultados son inéditos para estas cepas, pues el único dato relacionado existente es el reportado para la cepa PB12 creciendo en matraces con medio M9 suplementado con 2 g/L de glucosa, la cual tiene una τ de 10.3 nm [¹⁴C]-Glc/min·mg proteína (Flores *et al*, 2002). El dato reportado aquí es más bajo pero debe considerarse que esta cepa tiene las dos delecciones además de la carga metabólica

que le representa la expresión de los dos plásmidos y que las células cosechadas para este ensayo provienen de un medio suplementado con extracto de levadura y creciendo en reactor.

Evaluación del crecimiento de las cepas en matraz

Para evaluar el crecimiento de la cepa obtenida se decidió emplear el medio de producción sin extracto de levadura y no el medio que rutinariamente se emplea en el laboratorio (suplementado con 15 g/L de extracto de levadura), con el fin de observar el efecto en el crecimiento celular ejercido únicamente por la mejora en la eficiencia de la internalización de la glucosa, sin observar el efecto sinérgico del extracto de levadura. Se encontró que las cepas no logran crecer en dicho medio, por lo que se infiere que la suplementación con los aminoácidos y las vitaminas aromáticas no resulta suficiente para sustentar su crecimiento. Esto puede deberse a las deleciones en los genes que codifican para ambas Shikimate cinasas. Por ello se procedió a repetir el experimento y esta vez se empleó el medio de producción suplementado con extracto de levadura. La cinética de crecimiento para ambas cepas empleando dicho medio se muestra en la Figura 12. Se observa que el comportamiento de ambas cepas es muy similar, presentando una mínima fase lag así como una fase exponencial que se prolonga por alrededor de 8 horas, luego de las cuales entran a fase estacionaria. A partir de ahí el aumento en la densidad óptica es mínimo. La μ calculada para estas condiciones, se presenta en la Tabla 6.

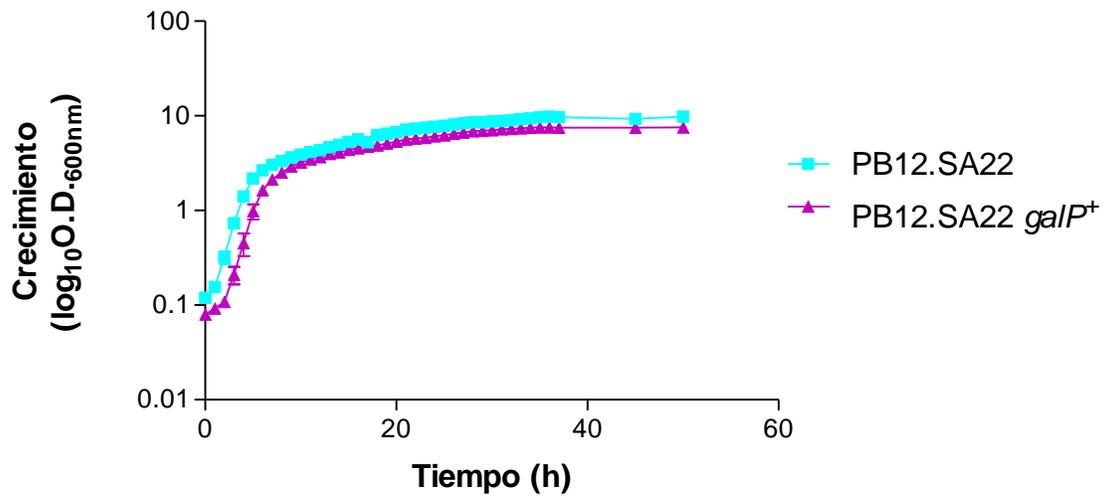


Figura 13. Cinética de crecimiento para las cepas creciendo en matraz.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento de las cepas creciendo en matraz.

Cepa	μ (h ⁻¹)
PB12.SA22	0.53±0.02
PB12.SA22 galP ⁺	0.56±0.0

Se observa que la μ para la cepa PB12.SA22 galP⁺ se mantiene en el mismo nivel que la alcanzada por la cepa original para estas condiciones.

Evaluación de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ en sistemas de fermentación en lote

- Cultivos con 25 g/L de glucosa

Se procedió a evaluar la cepa en sistemas de fermentación en lote empleando la concentración de 25 g/L de glucosa, que es la que es rutinariamente empleada en el laboratorio para la cepa PB12.SA22 con fines comparativos.

La cepa PB12.SA22 exhibe el típico perfil de crecimiento en dos etapas: exponencial y estacionaria; en la primera, el crecimiento está sustentado por el extracto de levadura y se caracteriza por un bajo consumo de glucosa, mientras que en la segunda se da el mayor consumo de glucosa, agotándola después de la hora 20, así como la acumulación de SHK y otros intermediarios de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. El título máximo de SHK es alcanzado a la hora 50 (Escalante *et al*, 2010).

Se muestra en la Figura 13 el perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de SHK encontrados para la cepa construida y control en una grafica comparativa. Se observa que el perfil de crecimiento de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ se mantiene similar al de la cepa de referencia, mientras que el consumo de glucosa es mayor en la etapa de crecimiento exponencial, para luego mostrarse más lento a lo largo de la etapa estacionaria, consumiendo por completo la glucosa después de la hora 26.

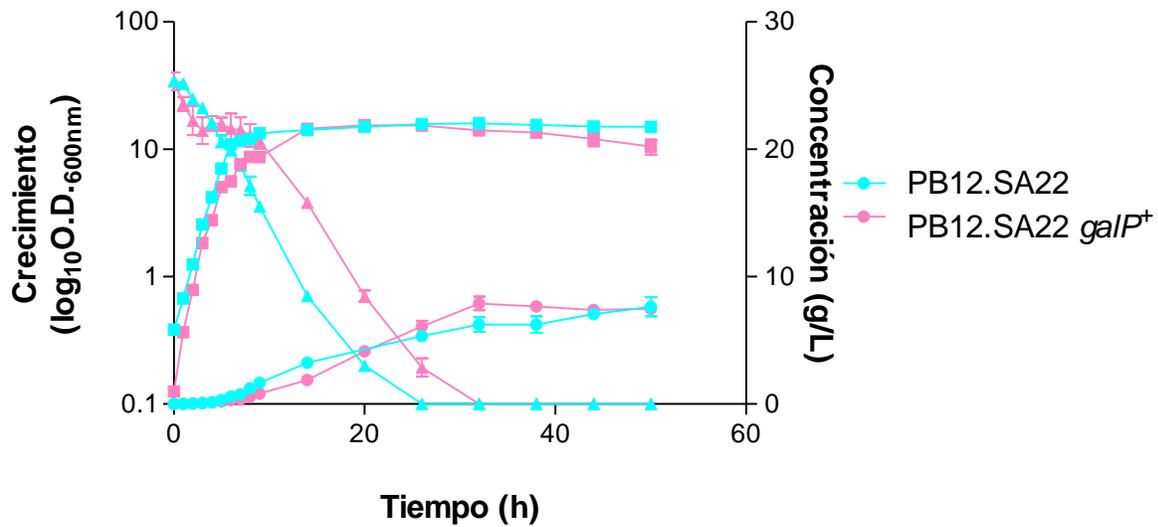


Figura 14. Gráfica comparativa que muestra el perfil de crecimiento (■), consumo de glucosa (▲) y producción de SHK (●) para las cepas PB12.SA22 y PB12.SA22 *galP*⁺ empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

Por otro lado, con respecto a la producción de compuestos aromáticos, el título de SHK se mantiene en el mismo nivel; la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ alcanza el título máximo a la hora 32, tiempo que coincide con el agotamiento de la glucosa como se observa en la Figura 14. Este tiempo contrasta con el que le toma a la PB12.SA22, que es de 50 horas.

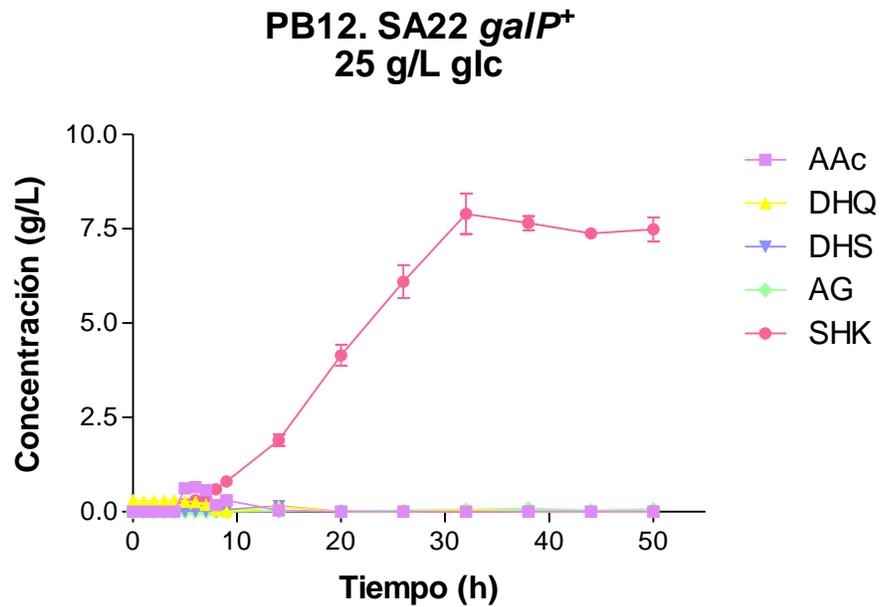


Figura 15. Producción de compuestos aromáticos y AAc de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la Tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados para estas condiciones de fermentación. La disminución de 18 horas en el tiempo de la fermentación se refleja de manera significativa en el parámetro de productividad volumétrica (Q_{vol}) que tiene un aumento correspondiente al 66.7% con respecto a la cepa control. Por otro lado la μ tuvo un incremento del 24.1%, mientras que el rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) se mantuvo en el mismo nivel. La velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) se incrementó en un 52.3% para el caso de la etapa exponencial de crecimiento y en un 47.8% para la estacionaria. Como se encuentra reportado en la literatura, el mejoramiento en la capacidad de la célula de

transportar la glucosa ejerce un profundo impacto en su velocidad de crecimiento y productividad (Gosset, 2005).

Tabla 7. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g DCW/ mmol glc)	q _s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	Y _{P/S} (mol SHK/ mol glc)	Q _{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22	0.58±0.0	0.25±0.09	2.62±1.1	0.23±0.01	7.6±1.3	0.29±0.05	0.15±0.03 (50 h)
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	0.72±0.02	0.18±0.03	3.99±0.54	0.34±0.04	7.9±0.94	0.32±0.04	0.25±0.03 (32 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; Y_{X/S}=rendimiento biomasa/sustrato;
q_s=velocidad específica de consumo de sustrato; Y_{P/S}=rendimiento producto/sustrato;
Q_{vol}=productividad volumétrica

- Cultivos con 100 g/L de glucosa

Del mismo modo y teniendo el antecedente del aumento en la q_s y la Q_{vol} , se procedió a realizar la evaluación de la cepa en sistemas de fermentación en lote con una condición de alta concentración de glucosa (100 g/L).

Se observa en la Figura 16 que empleando esta concentración de glucosa el perfil de crecimiento es diferente con respecto a la concentración de 25 g/L, pues la cepa no logra alcanzar la misma densidad óptica, además de que en la etapa estacionaria se observa un declive en la misma. Este efecto pudiera estar relacionado con la presión osmótica ejercida en el cultivo debida a la alta concentración de glucosa empleada.

Por otro lado, también se observa que se consume una mayor cantidad de glucosa en menor tiempo en la etapa exponencial, en comparación con la misma cepa en el medio con 25 g/L de glucosa. En la etapa estacionaria el consumo se torna más lento, dejando una concentración residual de 25 g/L de glucosa en el medio.

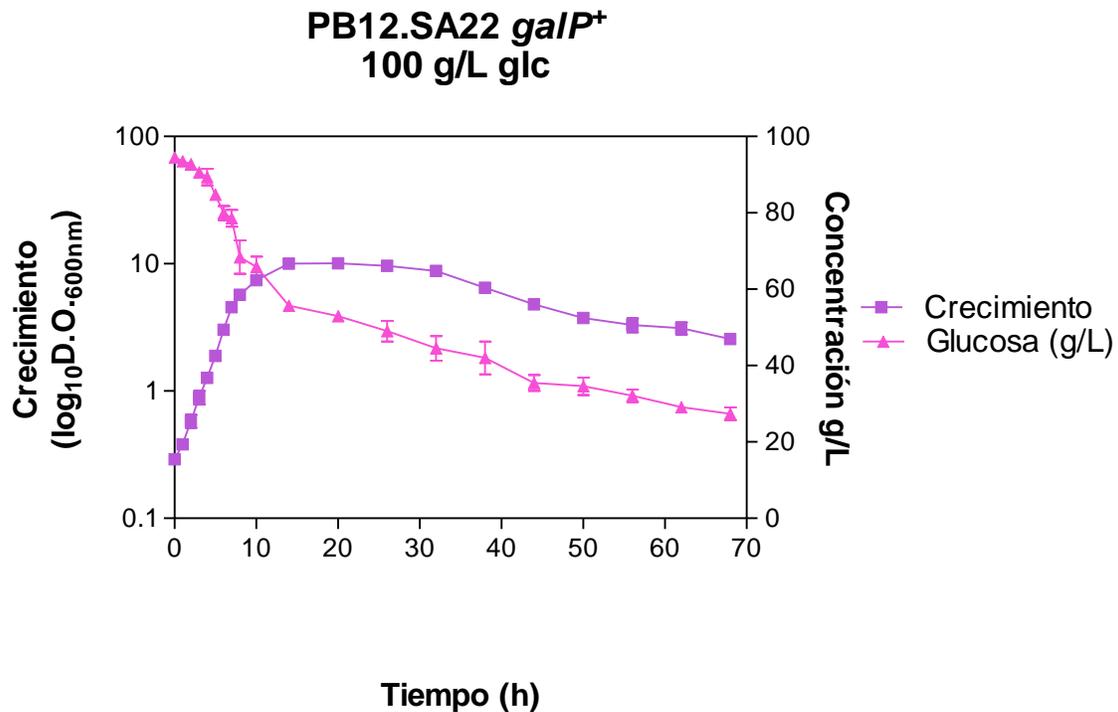


Figura 16. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ empleando una concentración de 100 g/L de glucosa en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la Figura 17 se observa que el perfil de producción de compuestos aromáticos intermedios de la vía se mantiene similar en esta condición, en comparación con la de 25 g/L de glucosa. Sin embargo, se observan dos cambios muy importantes; por un lado la concentración de AAC que para las condiciones mencionadas era despreciable en este caso se detecta hasta en alrededor de 4 g/L mientras que la concentración de SHK no supera los 5 g/L siendo inferior a la anteriormente alcanzada con las condiciones normales de cultivo.

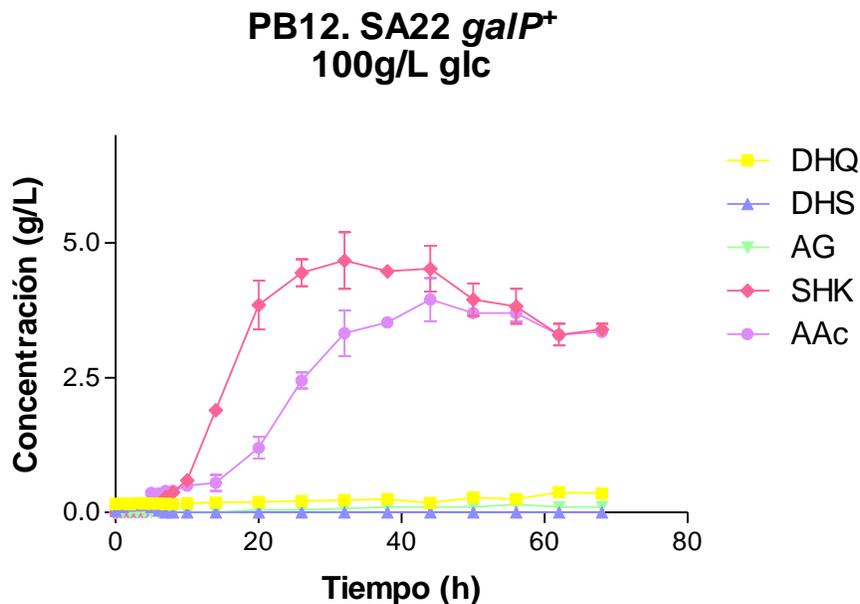


Figura 17. Producción de compuestos aromáticos y AAc de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ empleando una concentración de 100 g/L de glucosa en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la Tabla 8 se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se observa en que la μ disminuye en un 43% con respecto a la que había sido previamente alcanzada por dicha cepa en la condición de 25 g/L de glucosa. El valor de $Y_{x/s}$ disminuye drásticamente (77.7% menor) mientras que la q_s aumenta en un 184.2% en la etapa exponencial y un 141.2% en la etapa estacionaria al ser comparados con la misma cepa en la condición de 25 g/L de glucosa.

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g DCW/ mmol glc)	q _s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	Y _{P/S} (mol SHK/ mol glc)	Q _{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ 25 g/L glc	0.72± 0.02	0.18±0.03	3.99± 0.54	0.34±0 .04	7.9±0.94	0.32±0.04	0.25±0.03 (32 h)
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺ 100 g/L glc	0.41± 0.01	0.04±0.01	11.34 ±2.27	0.82±0 .09	4.7±0.74	0.05±0.01	0.15±0.02 (32 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; Y_{X/S}=rendimiento biomasa/sustrato; q_s=velocidad específica de consumo de sustrato; Y_{P/S}=rendimiento producto/sustrato; Q_{vol}=productividad volumétrica

Con este antecedente, considerando el importante decremento en el valor de Y_{X/S}, se decidió repetir el experimento adicionando betaína como osmoprotector (Le Rudulier y Bouillard, 1983) con el fin de elucidar si este efecto negativo sobre el crecimiento celular era consecuencia de la alta osmolaridad del medio de producción con 100 g/L de glucosa.

La betaína es considerada como el más eficiente osmoprotector caracterizado a la fecha para *E. coli* (Felitsky *et al*, 2004) y se ha demostrado que logra aumentar la tolerancia a azúcares, sales y ácidos orgánicos. Este compuesto se transporta activamente al citoplasma por los sistemas ProP y ProU y actúa como un osmolito intracelular. Las bacterias entéricas como *E. coli* no pueden emplear la betaína como fuente de carbono o nitrógeno (Csonka, 1989; Miller y Ingram, 2007).

- Cultivos con 100 g/L de glucosa + Betaína 2 mM

En la Figura 18 se muestran los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa encontrados para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ y la cepa control. Nótese que estas fermentaciones debieron ser monitoreadas por 74 horas, es decir 24 horas más de lo habitual debido a la alta concentración inicial del sustrato. La adición de la betaína como osmoprotector resulta muy favorecedor, pues no se observa decaimiento en el crecimiento, manteniéndose estable la densidad óptica a lo largo de toda la fase estacionaria. En las curvas se observa que la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ alcanza una densidad óptica ligeramente mayor que la PB12.SA22, además de lograr agotar prácticamente la totalidad de la glucosa inicial presente en el medio (93.2%) dejando un remanente de tan solo 6.8 g/L, mientras que la PB12.SA22 al cabo de 74 horas consume solamente el 65.2%, dejando un remanente de 34.8 g/L.

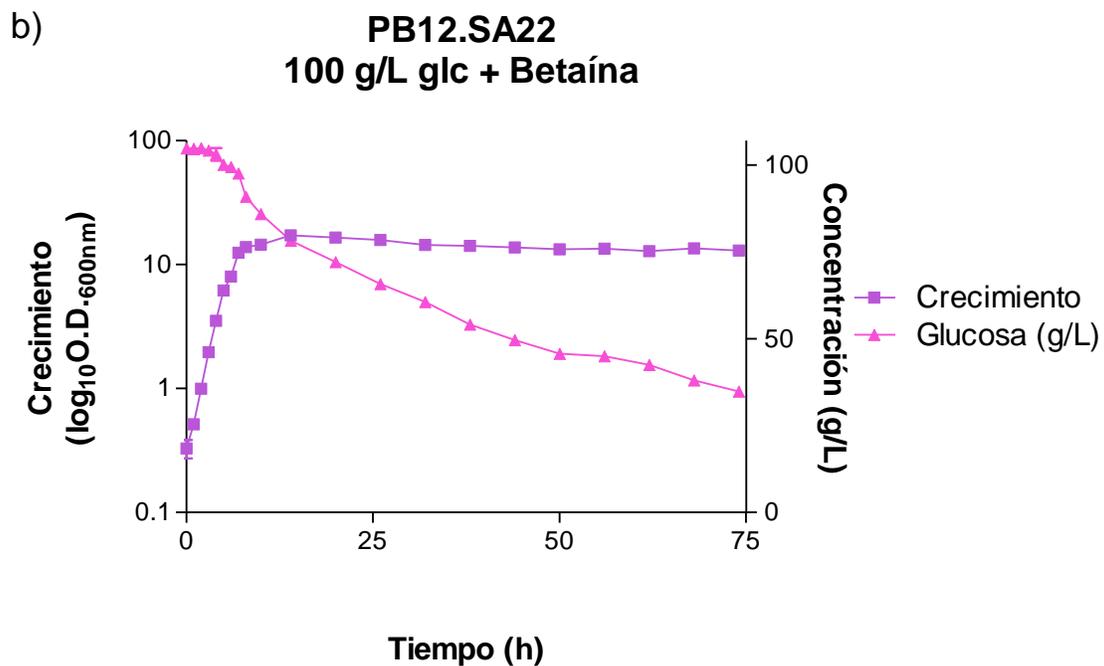
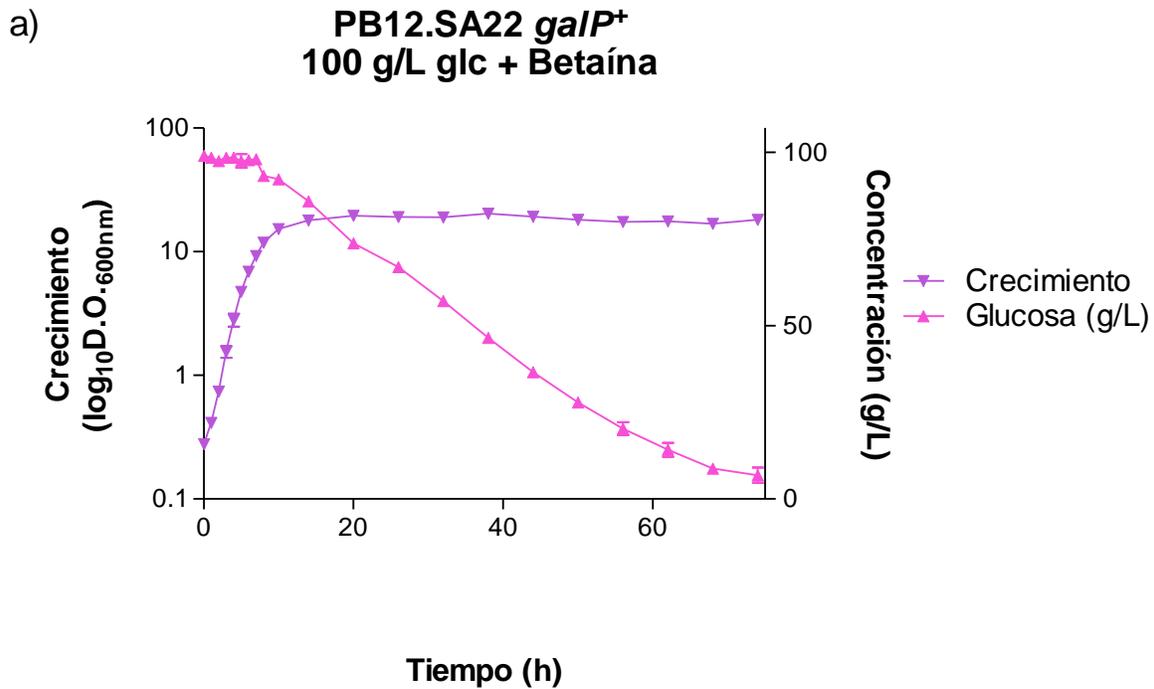


Figura 18. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En cuanto a producción de SHK, la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ alcanza un título de 12.5 g/L de SHK a la hora 68 (Figura 19 a), mientras que la cepa PB12.SA22 a ese mismo tiempo ha acumulado 13.1 g/L y al cabo de 74 horas logra alcanzar un máximo de 13.4 g/L (Figura 19 b). La producción de los otros compuestos aromáticos analizados se mantiene un perfil de formación similar para ambas cepas, excepto por el DHQ, que para el caso de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ hacia la hora 68 se comienza a acumular en una concentración de alrededor de 0.85 g/L, efecto que no es observado para la cepa PB12.SA22. Por otra parte, llama la atención el hecho de que la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ acumula una concentración máxima de 5.6 g/L de AAc, mientras que la PB12.SA22 muestra un perfil de producción de este metabolito similar al obtenido en las fermentaciones con la concentración rutinaria de 25 g/L de glucosa. Es decir, no hay presencia de AAc al final de la fermentación. Cabe mencionar que en estas condiciones de cultivo el volumen de base necesario para neutralizar el pH es significativamente mayor a la condición control (25 g/L de glucosa) previamente evaluada, lo cual se encuentra relacionado con la acidificación del medio debida a la formación de ácidos orgánicos. Este sobreflujo metabólico y su consecuente desviación de esqueletos de carbono hacia AAc y otros ácidos orgánicos pudiera explicar parcialmente el hecho de que aunque la cepa es capaz de consumir una mayor cantidad del sustrato que la cepa control, ambas alcanzan un título de SHK muy similar al ser evaluadas bajo estas condiciones de cultivo.

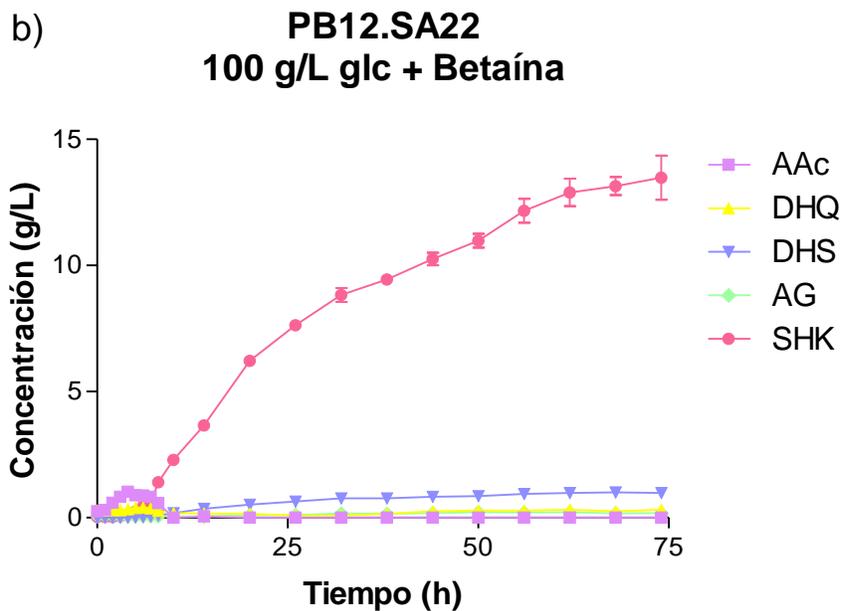
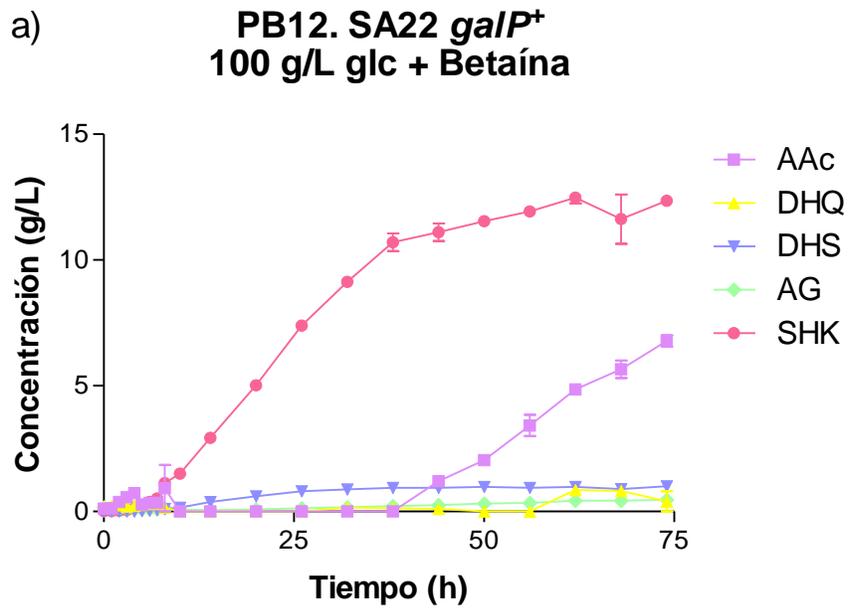


Figura 19. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la Tabla 9 se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se observa que la μ se mantiene en el mismo nivel para ambas cepas en estas condiciones. El valor de $Y_{X/S}$ para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ aumenta drásticamente en un 206.7%, pues la densidad óptica que alcanza dicha cepa al cabo de la fermentación es de 16.9 mientras que la PB12.SA22 alcanza una D.O. de 12.9. La q_s disminuye en un 69.3% en la etapa exponencial sin embargo aumenta en un 15.4% en la etapa estacionaria al ser comparada con la cepa control en estas condiciones.

A partir de estos parámetros se puede inferir que para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ en la etapa exponencial de crecimiento, la glucosa internalizada está siendo canalizada hacia la producción de biomasa, lo que permite llegar a la fase estacionaria con una densidad celular mayor y como consecuencia, le es posible consumir prácticamente la totalidad de dicho sustrato en esta etapa sin que esto tenga un efecto significativo sobre la acumulación del metabolito de interés.

Tabla 9. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 100 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g DCW/ mmol glc)	q_s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	$Y_{P/S}$ (mol SHK/ mol glc)	Q_{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22	0.62±0.01	0.15±0.01	4.23±0.10	0.52±0.01	13.4±1.23	0.13±0.01	0.18±0.02 (74 h)
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	0.58±0.02	0.46±0.0	1.30±0.0	0.60±0.0	12.5±0.32	0.13±0.01	0.20±0.01 (62 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; $Y_{X/S}$ =rendimiento biomasa/sustrato;
 q_s =velocidad específica de consumo de sustrato; $Y_{P/S}$ =rendimiento producto/sustrato;
 Q_{vol} =productividad volumétrica

- Cultivos con 25 g/L de glucosa + Betaína 2 mM

Considerando la sustancial mejora que representó para el crecimiento celular la adición del osmoprotector, se decidió evaluar si el estrés osmótico al que se encontraba sometida la célula era debido a la alta concentración de sustrato inicial (100 g/L) o era una condición previamente existente desde las condiciones control (25 g/L de glucosa). Se replicó el experimento con la adición del osmoprotector encontrando el mismo comportamiento en cuanto a crecimiento, consumo de glucosa y producción de SHK así como para los parámetros cinéticos y estequiométricos, confirmando así que el estrés osmótico para esta cepa en estas condiciones es atribuible a la alta osmolaridad del medio (resultados no mostrados).

- Cultivos con 50 g/L de glucosa + Betaína 2 mM

Al comparar los títulos de SHK que se logran alcanzar empleando una concentración baja de glucosa en el medio de fermentación (25 g/L) con los de la condición de elevada concentración (100 g/L) y considerando que ésta última genera un sobreflujo metabólico promoviendo la desviación de los esqueletos de carbono hacia AAc y otros ácidos orgánicos, se decidió emplear una concentración de sustrato inicial intermedia, es decir 50 g/L de glucosa. Así mismo, con el antecedente del estrés osmótico que genera la alta osmolaridad del medio con concentraciones altas de glucosa se decidió realizar estos experimentos con la adición del osmoprotector.

En la Figura 20, se muestran los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa encontrados para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ y la cepa control. Nótese que estas fermentaciones, al igual que las que se realizaron con 100 g/L de glucosa inicial, debieron ser monitoreadas por 74 horas, es decir 24 horas más de lo habitual debido a la alta concentración inicial del sustrato. Al igual que para el experimento con 100 g/L de glucosa, se observa que a adición de la betaína como osmoprotector estimula el crecimiento de la célula en medios con fuerza osmótica inhibitoria (Le Rudulier y Bouillard, 1983), como el empleado para ambos ensayos. En la Figura 20 a) se observa que la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ logra agotar prácticamente la totalidad de la glucosa inicial presente en el medio (93.6%) dejando un remanente de tan solo 3.2 g/L, mientras que la PB12.SA22 al cabo de 74 horas consume solamente el 76.2% dejando un remanente de 11.9 g/L (Figura 20 b).

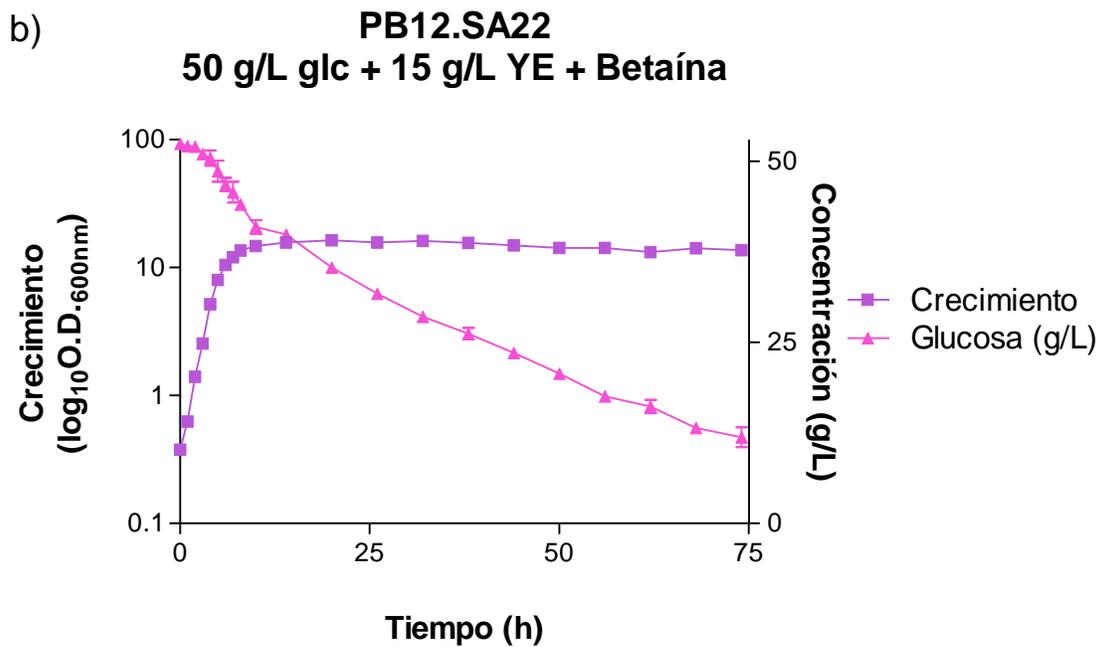
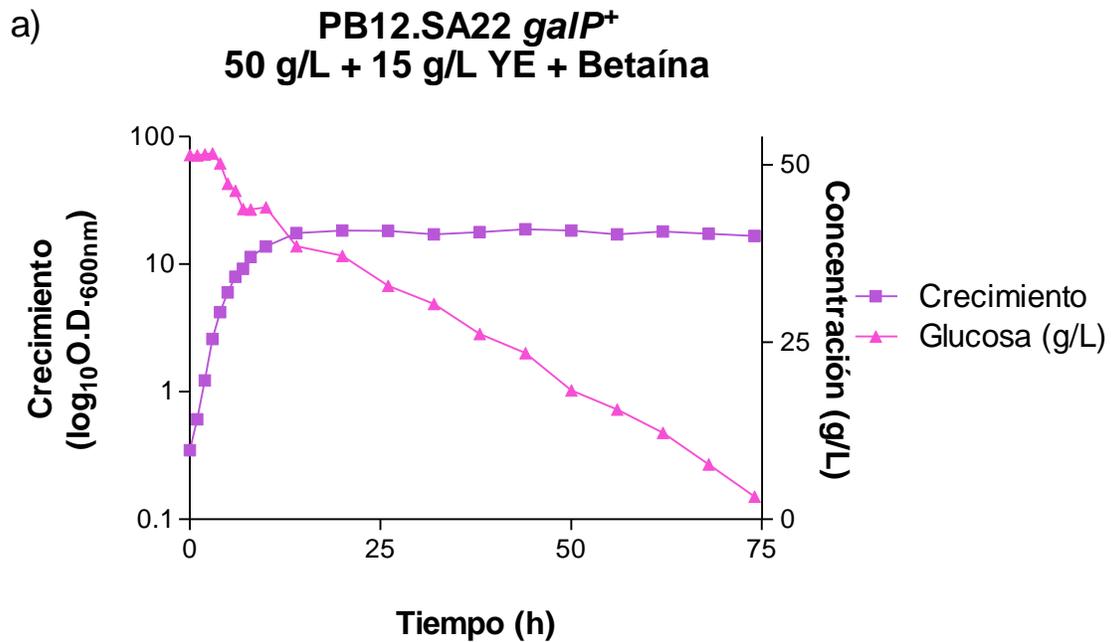


Figura 20. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En cuanto a producción de SHK, la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ alcanza un título de 11.7 g/L a la hora 74 (Figura 21 a) mientras que al cabo de ese mismo tiempo, la cepa PB12.SA22 acumula 8.5 g/L (Figura 21 b). El perfil de formación de los otros compuestos aromáticos cuantificados es muy similar para ambas cepas.

Es importante remarcar que, a diferencia de los cultivos con 100 g/L de glucosa, en estas condiciones de fermentación la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ no acumula AAc de forma significativa. Por otro lado, dicha cepa al ser cultivada con 50 g/L de glucosa iniciales alcanza un 93.6% del título final de SHK alcanzado con 100 g/L de glucosa iniciales por tanto se puede inferir que el efecto de sobreflujo metabólico observado en los cultivos con 100 g/L de glucosa no se ejerce bajo estas condiciones, resultando más favorable para la célula sin que esto represente una disminución drástica en términos del título final de SHK.

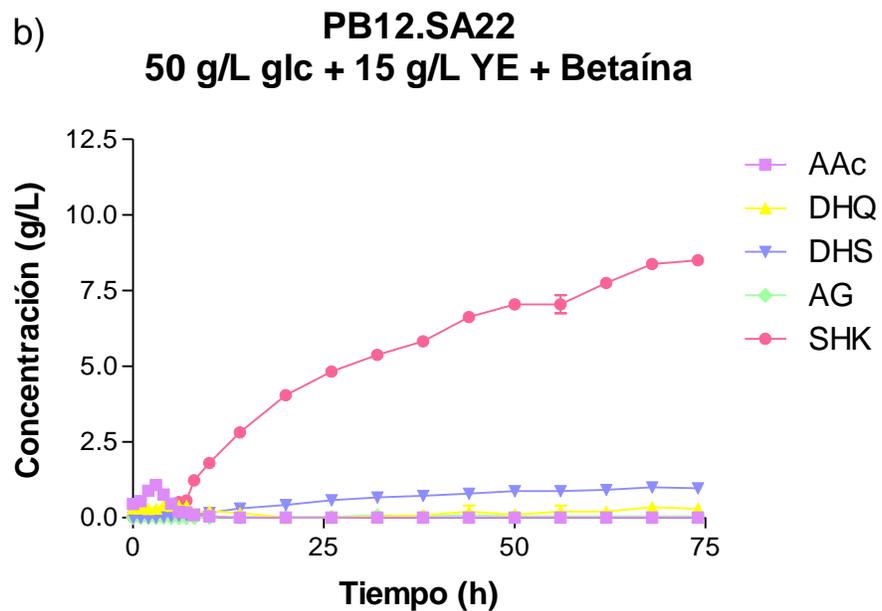
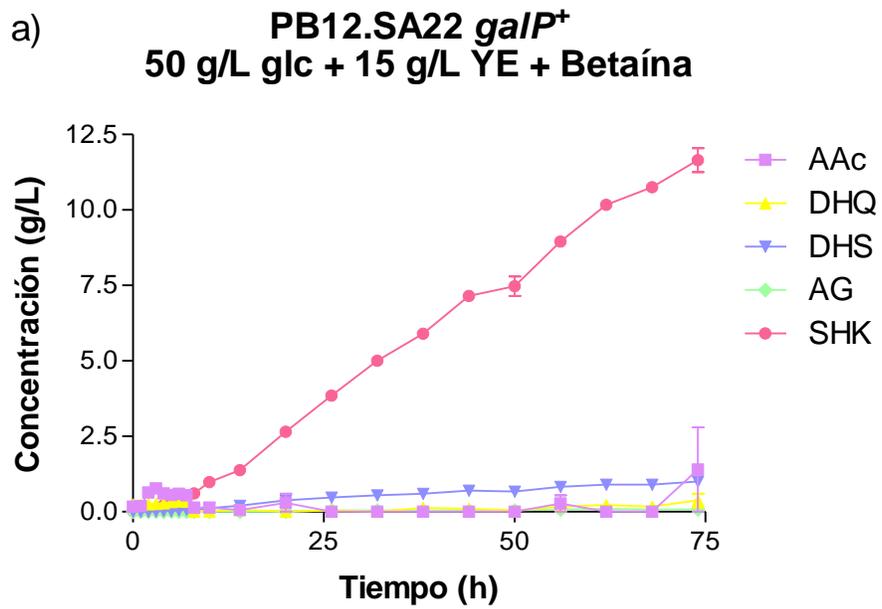


Figura 21. Producción de compuestos aromáticos y AAC de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la tabla 10 se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se observa que en ambas etapas la μ , el valor de $Y_{X/S}$ y la q_s se mantienen en el mismo nivel para ambas cepas. Así mismo el valor de $Y_{P/S}$ para la cepa PB12.SA22 *galP⁺* aumentó en un 76.9% con respecto a las condiciones de 100 g/L de glucosa iniciales ($Y_{P/S}=0.13$), lo cual indica que para dicha cepa estas condiciones de fermentación favorecen una conversión más eficiente del sustrato al producto de interés.

Tabla 10. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa y betaína en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g DCW/ mmol glc)	q_s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	$Y_{P/S}$ (mol SHK/ mol glc)	Q_{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22	0.63±0.0	0.19±0.02	3.30±0.39	0.27±0.01	8.5±0.21	0.17±0.0	0.11±0.0 (74 h)
PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.59±0.02	0.19±0.04	3.18±0.7	0.30±0.01	11.7±0.57	0.23±0.01	0.16±0.01 (74 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; $Y_{X/S}$ =rendimiento biomasa/sustrato;
 q_s =velocidad específica de consumo de sustrato; $Y_{P/S}$ =rendimiento producto/sustrato;
 Q_{vol} =productividad volumétrica

- Cultivos con 25 g/L de glucosa + 30 g /L de EL + Betaína 2 mM

Chandran y colaboradores (2003) reportan que la suplementación con extracto de levadura en cultivos de 10 L de una cepa PTS⁻ sobreproductora de SHK que expresa un sistema heterólogo (de *Zymomonas mobilis*) de transporte de glucosa (SP1.1*pts*/pSC6.090B), tuvo un profundo impacto en el título final, así como en el rendimiento de SHK, atribuyendo este efecto al aumento en la disponibilidad de esqueletos de carbono que pueden ser destinados a su biosíntesis. Con dicho antecedente se planteó determinar el efecto que ejercía incrementar la concentración de éste suplemento en el medio de cultivo. De igual forma, considerando el estrés osmótico que genera un medio con alta osmolaridad se decidió realizar estos experimentos con la adición del osmoprotector.

Se muestran los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa encontrados para la cepa construida y la control. Se observa que la suplementación con 30 g/L de extracto de levadura permite a ambas cepas alcanzar concentraciones celulares muy elevadas, llegando a alrededor 36 unidades de densidad óptica para el caso de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ (Figura 22 a) y de 31 para la PB12.SA22 (Figura 22 b). Bajo esta condición, ambas cepas logran agotar la glucosa. Sin embargo, lo hacen a tiempos diferentes: a la PB12.SA22 *galP*⁺ le toma 44 horas mientras que la PB12.SA22 lo hace en tan solo 26.

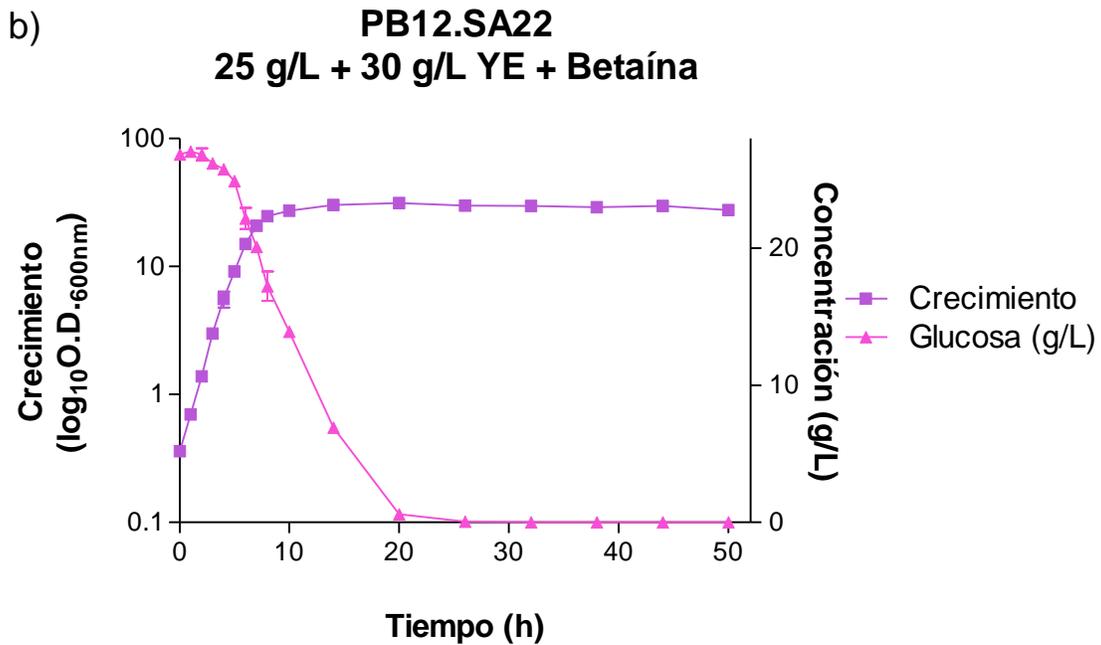
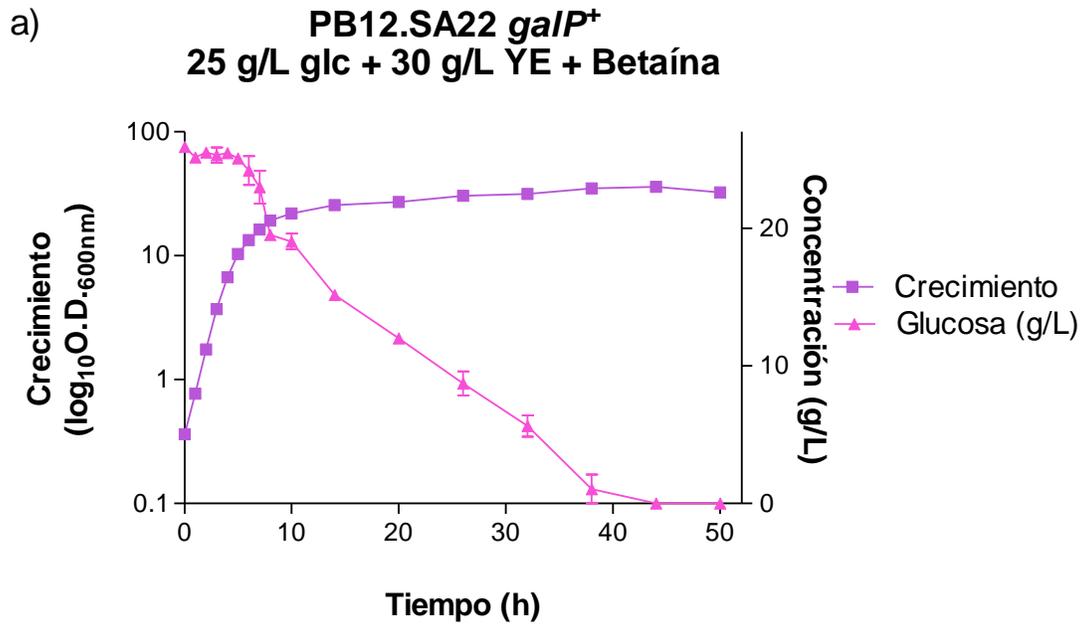


Figura 22. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En cuanto a producción de SHK, la cepa PB12.SA22 *galP⁺* alcanza un título de 5.5 g/L a la hora 44 (Figura 23 a) mientras que a la cepa PB12.SA22 le toma solamente 26 horas alcanzar 6.5 g/L (Figura 23 b). Los compuestos aromáticos intermediarios de la vía se mantienen un perfil de formación similar para ambas cepas.

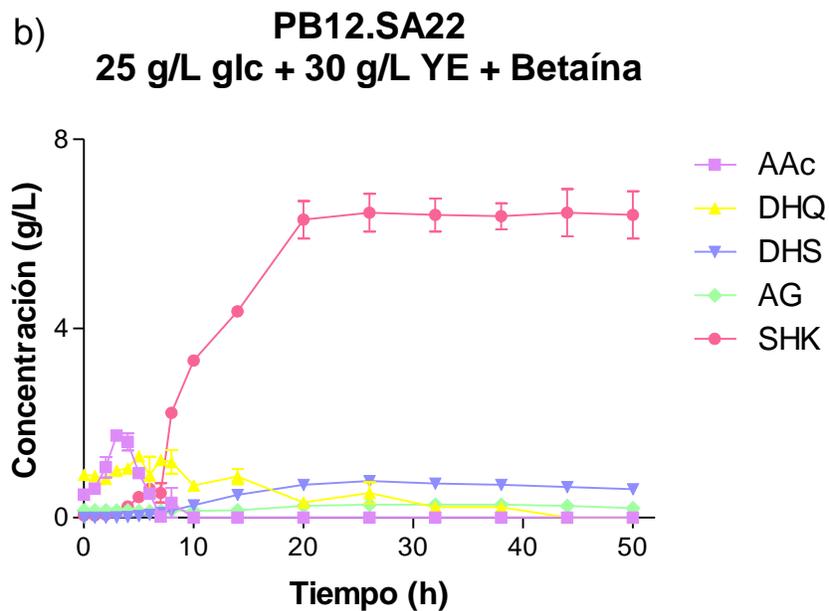
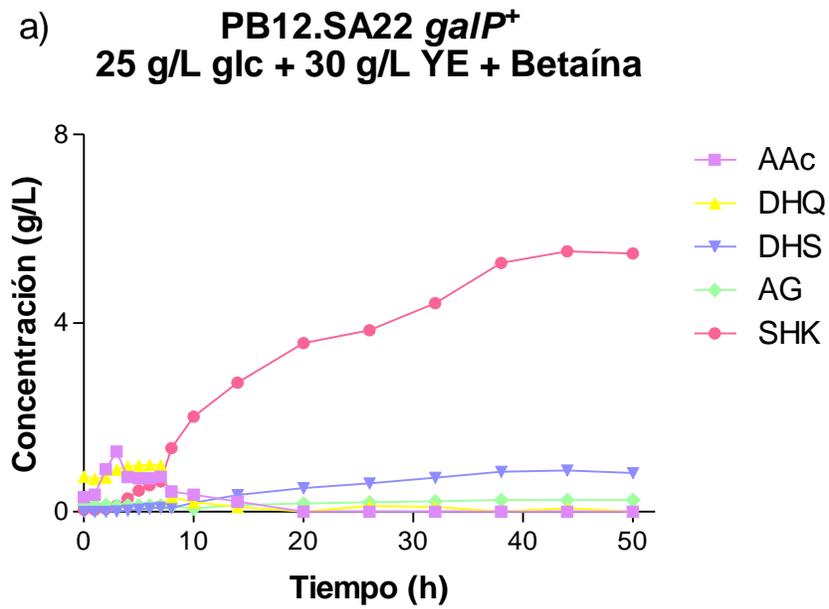


Figura 23. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En la tabla 11 se muestran los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se observa que estas condiciones de fermentación resultan más favorables para la cepa control PB12.SA22, pues esta alcanza una mejor q_s (para ambas etapas), título, $Y_{P/S}$ y Q_{vol} que la PB12.SA22 *galP⁺*. Aunque la cepa PB12.SA22 resulta más favorecida bajo estas condiciones, el proceso global no resulta más favorable en comparación con el de las condiciones rutinarias (25 g/L de glucosa, 15 g/L de extracto de levadura). Esto implica que el extracto de levadura está siendo canalizado primordialmente hacia la formación de biomasa, efecto que es aún más notorio para la cepa PB12.SA22 *galP⁺* que exhibe un $Y_{X/S}$ 850% mayor que la cepa control, por tanto se infiere que estas condiciones no confieren ninguna ventaja en términos de producción.

Tabla 11. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 25 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g DCW/ mmol glc)	q_s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	$Y_{P/S}$ (mol SHK/ mol glc)	Q_{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22	0.66±0.02	0.60±0.0	1.10±0.03	0.32±0.0	6.45±0.57	0.25±0.02	0.25±0.02 (26 h)
PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.74±0.01	5.70±1.42	0.13±0.03	0.24±0.0	5.53±0.18	0.22±0.01	0.13±0.0 (44 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; $Y_{X/S}$ =rendimiento biomasa/sustrato;
 q_s =velocidad específica de consumo de sustrato; $Y_{P/S}$ =rendimiento producto/sustrato;
 Q_{vol} =productividad volumétrica

- Cultivos con 50 g/L de glucosa + 30 g /L de EL + Betaína 2 mM

Con el fin de evaluar si pudiera existir un efecto sinérgico entre el extracto de levadura y la glucosa se decidió probar una condición que incluyera la concentración que resultó más favorable, es decir 50 g/L de glucosa con la suplementación de extracto de levadura a una concentración de 30 g/L. De forma semejante a experimentos previos, considerando el estrés osmótico que genera un medio con alta osmolaridad se decidió realizar estos experimentos con la adición del osmoprotector.

Se muestran los perfiles de crecimiento y consumo de glucosa encontrados para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ y la control. Se observa que para estas condiciones la suplementación con 30 g/L de extracto de levadura permite a ambas cepas alcanzar concentraciones celulares muy elevadas llegando a alrededor 41 densidades ópticas para el caso de la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ (Figura 24 a) y de 37 para la PB12.SA22 (Figura 24 b). Ambas cepas bajo esta condición logran agotar la glucosa sin embargo lo hacen a tiempos diferentes: a la PB12.SA22 *galP*⁺ le toma 38 horas mientras que la PB12.SA22 lo hace en 56 horas.

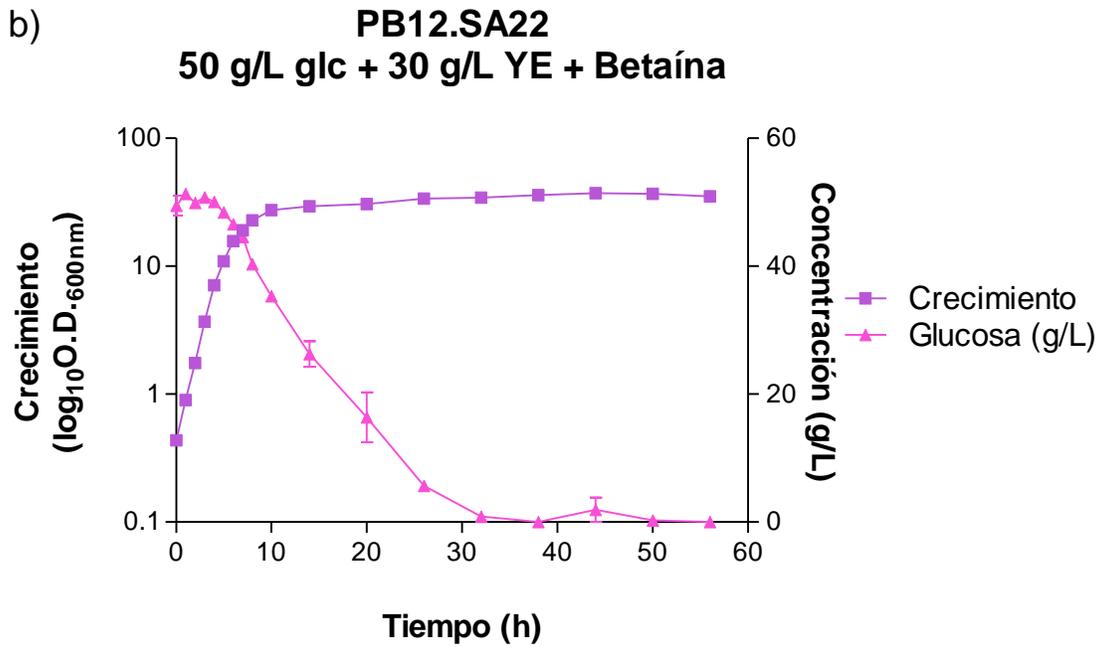
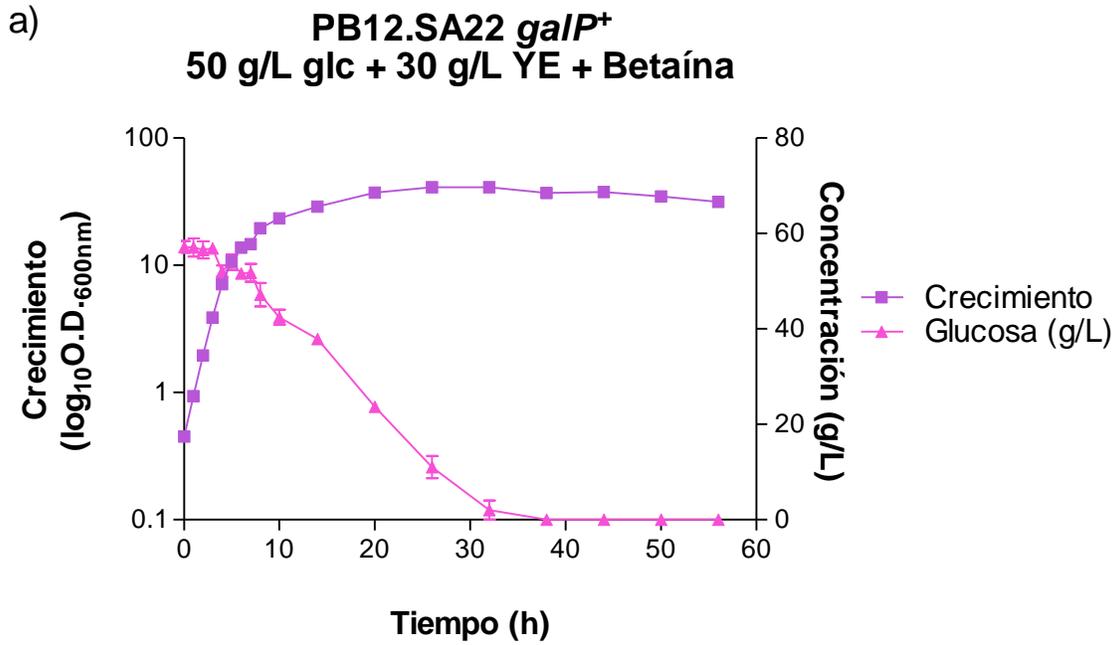


Figura 24. Perfil de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

En cuanto a producción de SHK, la cepa PB12.SA22 *galP^t* alcanza un título de 9.7 g/L a la hora 38 (Figura 25 a) mientras que a la cepa PB12.SA22 le toma 56 horas alcanzar 7.9 g/L (Figura 25 b). Los compuestos aromáticos intermediarios de la vía se mantienen un perfil de formación similar para ambas cepas.

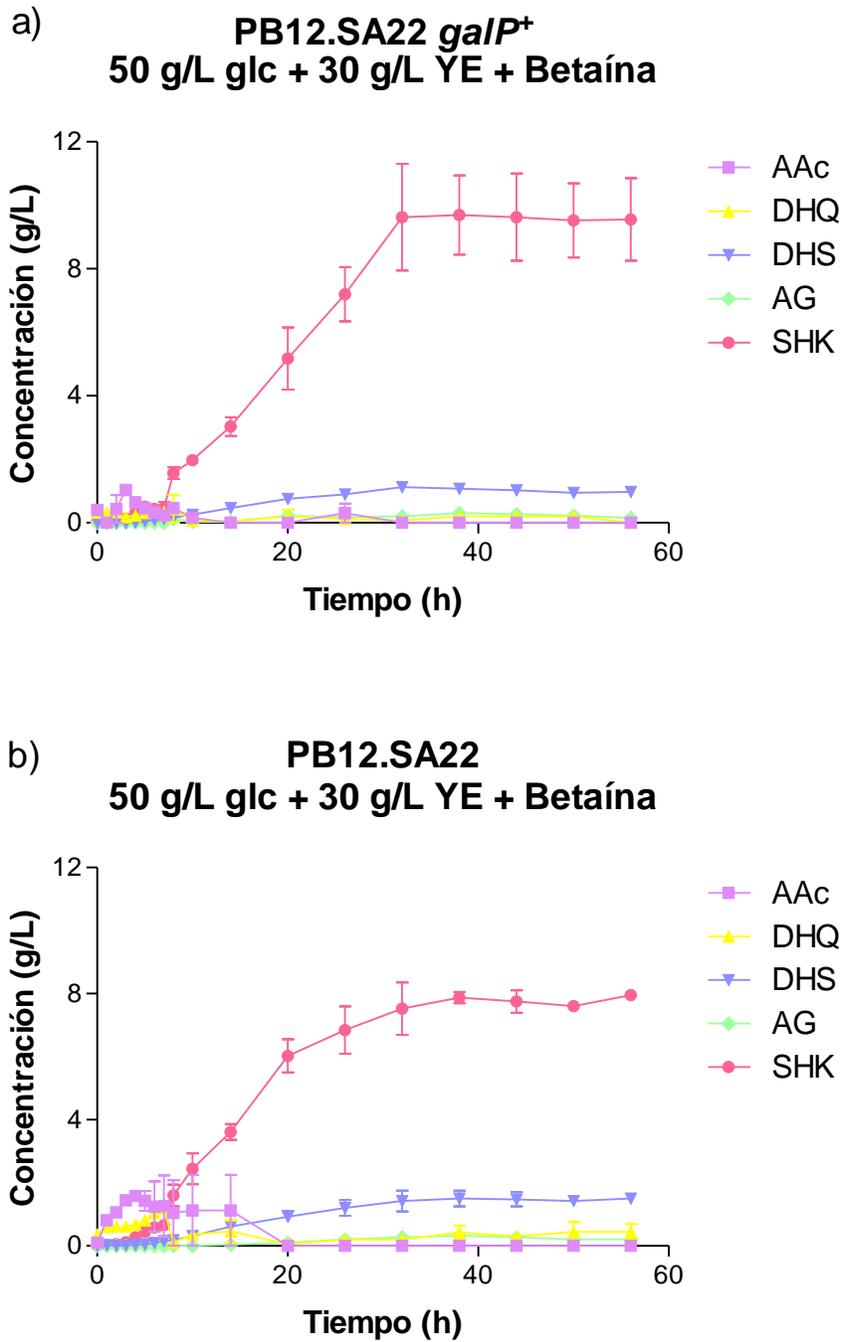


Figura 25. Producción de compuestos aromáticos y AAc de las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Se muestra el promedio de tres fermentaciones independientes.

A partir de los parámetros cinéticos y estequiométricos mostrados en la Tabla 12 se puede observar que estas condiciones favorecen más a la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ pues tanto la q_s (en ambas etapas), título y la Q_{vol} son mayores, contrario a lo que sucede en el experimento anterior (25 g/L de glucosa y 30 g/L de extracto de levadura) en las cuales se ve favorecida la cepa PB12.SA22. La μ y la $Y_{P/S}$ se mantienen en el mismo nivel para ambas cepas mientras que el $Y_{X/S}$ disminuye en un 80.4% con respecto a la cepa control. En este contexto se observa que en comparación con el experimento previo para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ tanto el título de SHK como la Q_{vol} aumentan en un 75.4% y 100% respectivamente mientras que el $Y_{P/S}$ disminuye en un 22.7%. En comparación con las condiciones que habían resultado más favorables para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺, es decir las de 50 g/L de glucosa, la Q_{vol} aumenta en un 62.5%, la μ aumenta en un 16.9% y la q_s para ambas etapas aumenta en un 113.3% y 53.3% respectivamente mientras que el resto de los parámetros no superan a los que la cepa logra alcanzar en dicha condición. Con estos datos se puede inferir que bajo estas condiciones el extracto de levadura está siendo canalizado primordialmente hacia la formación de biomasa efecto que podría explicar tanto el importante aumento en los consumos debido a una mayor densidad celular así como la menor concentración de SHK que logra acumular la cepa. Por todo lo anterior se considera que estas condiciones no confieren ninguna ventaja en términos de producción.

Tabla 12. Parámetros cinéticos y estequiométricos para las cepas empleando una concentración de 50 g/L de glucosa, 30 g/L de EL y betaína en el medio de producción.

Cepa	μ (h ⁻¹)	Y _{X/S} (g DCW/ mmol glc)	q _s (mmol glc/ g DCW h)		SHK (g/L)	Y _{P/S} (mol SHK/ mol glc)	Q _{vol} (g SHK/L h)
			Exp	Sta			
PB12.SA22	0.70±0.02	0.51±0.06	1.38±0.12	0.25±0.01	7.9±0.21	0.16±0.01	0.14±0.0 (56 h)
PB12.SA22 <i>galP</i> ⁺	0.69±0.03	0.10±0.01	6.72±0.88	0.46±0.01	9.7±1.8	0.17±0.03	0.26±0.05 (38 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; Y_{X/S}=rendimiento biomasa/sustrato;
q_s=velocidad específica de consumo de sustrato; Y_{P/S}=rendimiento producto/sustrato;
Q_{vol}=productividad volumétrica

Tabla 13. Comparativa de los parámetros cinéticos y estequiométricos para la cepa construida y la control en todas las condiciones evaluadas en el estudio.

Condición	Cepa	μ (h^{-1})	$Y_{X/S}$ (g DCW/ mmol glc)	q_s (mmol glc/g DCW h)		SHK (g/L)	$Y_{P/S}$ (mol SHK/ mol glc)	Q_{vol} (g SHK/L h)
				Exp	Sta			
25 g/L de glucosa	PB12.SA22	0.58±0.0	0.25±0.09	2.62±1.1	0.23±0.01	7.6±1.3	0.29±0.05	0.15±0.03 (50 h)
	PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.72±0.02	0.18±0.03	3.99±0.54	0.34±0.04	7.9±0.94	0.32±0.04	0.25±0.03 (32 h)
100 g/L de glucosa + Betaína 2 mM	PB12.SA22	0.62±0.01	0.15±0.01	4.23±0.10	0.52±0.01	13.4±1.23	0.13±0.01	0.18±0.02 (74 h)
	PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.58±0.02	0.46±0.0	1.30±0.0	0.60±0.0	12.5±0.32	0.13±0.01	0.20±0.01 (62 h)
50 g/L de glucosa + Betaína 2 mM	PB12.SA22	0.63±0.0	0.19±0.02	3.30±0.39	0.27±0.01	8.5±0.21	0.17±0.0	0.11±0.0 (74 h)
	PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.59±0.02	0.19±0.04	3.18±0.7	0.30±0.01	11.7±0.57	0.23±0.01	0.16±0.01 (74 h)
25 g/L de glucosa+ 30 g/L de EL + Betaína 2 mM	PB12.SA22	0.66±0.02	0.60±0.0	1.10±0.03	0.32±0.0	6.45±0.57	0.25±0.02	0.25±0.02 (26 h)
	PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.74±0.01	5.70±1.42	0.13±0.03	0.24±0.0	5.53±0.18	0.22±0.01	0.13±0.0 (44 h)
50 g/L de glucosa+ 30 g/L de EL + Betaína 2 mM	PB12.SA22	0.70±0.02	0.51±0.06	1.38±0.12	0.25±0.01	7.9±0.21	0.16±0.01	0.14±0.0 (56 h)
	PB12.SA22 <i>galP⁺</i>	0.69±0.03	0.10±0.01	6.72±0.88	0.46±0.01	9.7±1.8	0.17±0.03	0.26±0.05 (38 h)

μ =velocidad específica de crecimiento; $Y_{X/S}$ =rendimiento biomasa/sustrato; q_s =velocidad específica de consumo de sustrato; $Y_{P/S}$ =rendimiento producto/sustrato; Q_{vol} =productividad volumétrica

En la Figura 26 se muestra una comparación de la μ para ambas cepas de acuerdo a la concentración inicial de glucosa empleada; sólo se incluyen las condiciones en las que no se incrementó la concentración de extracto de levadura a efectos comparativos.

Se observa que la concentración de glucosa inicial más baja (25 g/L) favorece a la cepa construida mientras que en las otras dos condiciones la cepa control resulta más favorecida aunque no con mucho mayor ventaja. Por otro lado para la cepa construida la velocidad decrece conforme aumenta la concentración de glucosa, efecto que no es tan marcado para la cepa control. Este efecto pudiera estar relacionado con el hecho que en esta cepa se está expresando bajo control de un promotor fuerte una proteína de membrana y es sabido que la sobre-expresión de éste tipo de proteínas puede llegar a afectar la integridad de la membrana (Wagner *et al*, 2007) haciendo a la célula más vulnerable al estrés osmótico que pueden generar las altas concentraciones de glucosa.

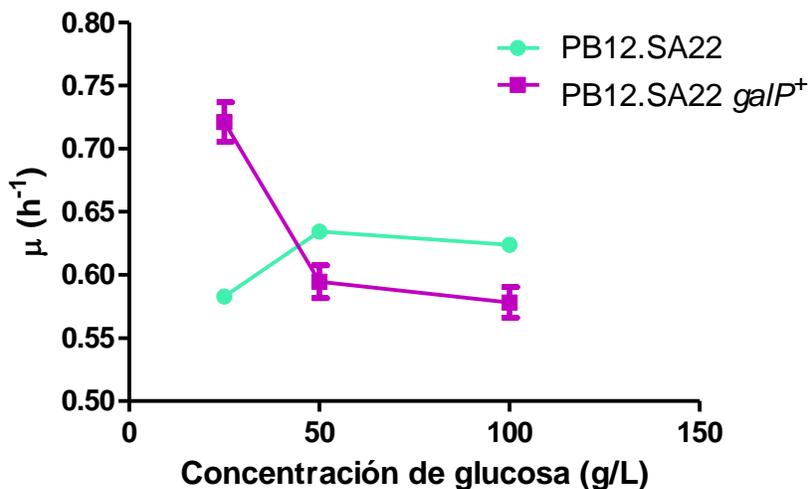


Figura 26. Gráfica comparativa que muestra la μ alcanzada por ambas cepas según la concentración inicial de glucosa empleada.

En la Figura 27 se muestra una comparación de la $Y_{X/S}$ para ambas cepas de acuerdo a la concentración inicial de glucosa empleada; sólo se incluyen las condiciones en las que no se incrementó la concentración de extracto de levadura a efectos comparativos.

Se observa que dicho parámetro no varía entre las cepas para las condiciones de 25 y 50 g/L de glucosa iniciales, sin embargo es notoria la diferencia para el caso de la condición del 100 g/L pues la cepa construida presenta un valor muy superior al de la cepa control lo cual resulta bastante sorprendente si se considera que ambas cepas alcanzan prácticamente el mismo título de SHK (Tabla 13), lo cual significa que para la cepa construida es claro que el carbono se está dirigiendo hacia la síntesis de biomasa sin embargo para la control esto no ocurre.

Debe considerarse que los rendimientos calculados son aparentes pues el medio de producción es suplementado con extracto de levadura, el cual también está siendo utilizado en la síntesis de biomasa.

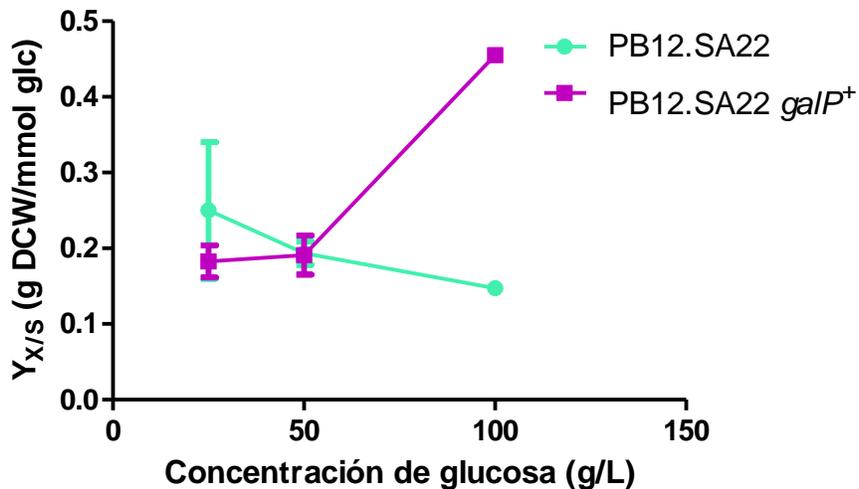


Figura 27. Gráfica comparativa que muestra el $Y_{X/S}$ alcanzado por ambas cepas según la concentración inicial de glucosa empleada.

La Figura 28 corresponde a la gráfica que muestra el título de SHK alcanzado de acuerdo a la concentración de glucosa con la cual se inició la fase estacionaria para ambas cepas; sólo se incluyen las condiciones en las que no se incrementó la concentración de extracto de levadura a efectos comparativos.

Se observa que si bien las concentraciones de glucosa al inicio de la fase estacionaria para ambas cepas son muy similares, las curvas obtenidas para cada caso son diferentes. Por un lado para el caso de la cepa PB12.SA22 no se observa diferencia en el título alcanzado al comparar entre los dos primeros valores, es decir los correspondientes a las condiciones de 25 y 50 g/L de glucosa iniciales respectivamente, el incremento solo es notorio para la concentración correspondiente a la condición de 100 g/L de glucosa; mientras que para la cepa PB12.SA22 *galP⁺* el incremento en el título alcanzado es notorio para el valor correspondiente a la condición de 50 g/L de glucosa inicial sin embargo éste ya no aumenta más en función de la concentración alcanzada bajo la condición de 100 g/L de glucosa iniciales.

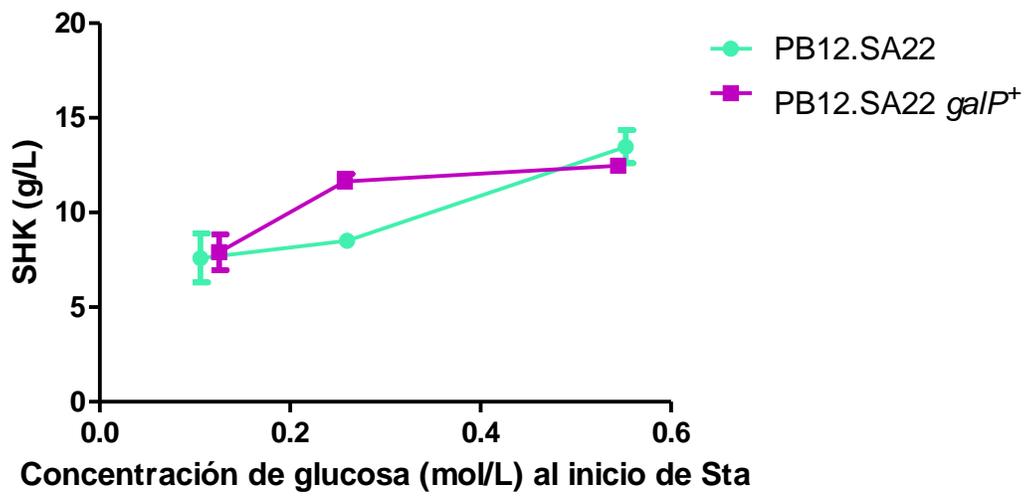


Figura 28. Gráfica que muestra el título de SHK (g/L) alcanzado según la concentración de glucosa (mol/L) con la que se inició la fase estacionaria para las fermentaciones con ambas cepas.

La Figura 29 corresponde a la gráfica que muestra el $Y_{P/S}$ obtenido de acuerdo a la concentración de glucosa con la cual se inició la fase estacionaria para ambas cepas; sólo se incluyen las condiciones en las que no se incrementó la concentración de extracto de levadura a efectos comparativos.

Se observa en la gráfica que ambas cepas presentan una tendencia muy similar por lo cual se puede inferir que bajo estas condiciones para la producción de SHK la velocidad de reacción está siendo un paso limitante.

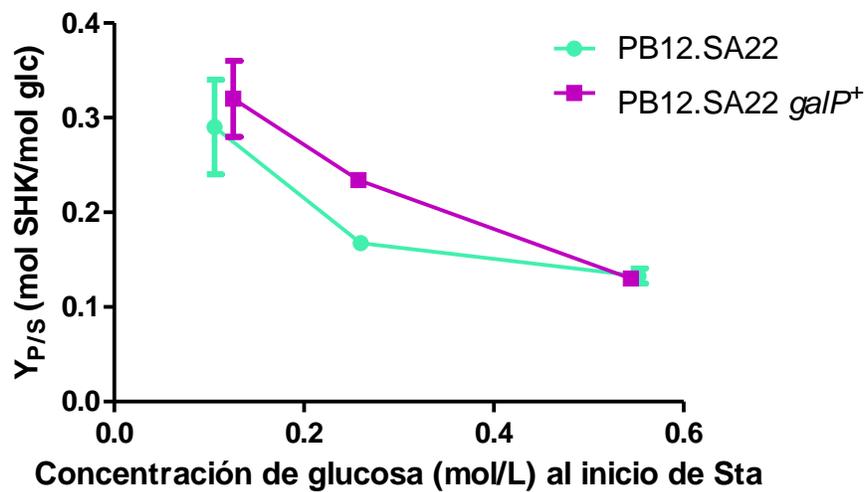


Figura 29. Gráfica que muestra el $Y_{P/S}$ alcanzado según la concentración de glucosa (mol/L) con la que se inició la fase estacionaria para las fermentaciones con ambas cepas.

CONCLUSIONES

- El control de *galP* bajo el promotor *trc* tiene como resultado para el caso de las condiciones rutinarias de fermentación en lote (25 g/L de glucosa) una mejora en la μ y Q_{vol} de la cepa al compararse con la cepa parental PB12.SA22.
- Considerándolo como un proceso global, de las condiciones de fermentación en lote evaluadas, la que resulta más favorable para la cepa PB12.SA22 *galP*⁺ es la de 25 g/L de glucosa pues es la que tiene la mejor Q_{vol} empleando la menor cantidad de recursos.
- Los resultados obtenidos tanto para las fermentaciones en lote como para el experimento de transporte de glucosa marcada demuestran que se mejoró la capacidad de transporte de glucosa en la cepa construida.
- Para la cepa PB12.SA22, la capacidad de transporte de glucosa resulta una limitante y al lograr contender con ésta circunstancia se logra mejorar a la cepa en diversos aspectos que impactan de forma positiva al proceso global de producción.

PERSPECTIVAS

- Contender con la desviación del flujo de carbono inactivando la vía de síntesis de AAc *poxB* y *ptA/ackA*.
- Elucidar que otras vías de síntesis están favoreciendo la desviación del flujo de carbono en esta cepa e inactivarlas.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn JO, Lee HW, Saha R, Park MS, Jung JK, Lee DY (2008). Exploring the effects of carbon sources on the metabolic capacity for shikimic acid production in *Escherichia coli* using in silico metabolic predictions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 1773-1784.

Amann E, Ochs B, Abel K-J (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**(2): 301-315.

Báez JL, Bolívar F, Gosset G (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnology and Bioengineering* **73**(6): 530-535.

Balderas-Hernandez V, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernandez-Chavez G, Baez-Viveros J *et al* (2009). Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **8**(1): 19.

Calos MP (1978). DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an "up" promoter mutation. *Nature* **274**(5673): 762-765.

Carmona S (2011). Efecto de la clonación del gen *zwf* sobre la producción de shikimato en la cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22. Tesis de Licenciatura, UNAM, México.

Chandran SS, Yi J, Draths KM, Daeniken Rv, Weber W, Frost JW (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress* **19**(3): 808-814.

Cherepanov PP, Wackernagel W (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**(1): 9-14.

Csonka LN (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **53**(1):121-147.

Datsenko KA, Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* **97**(12): 6640-6645.

De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F *et al* (2006). Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering* **8**(3): 281-290.

Escalante A, Valdivia A, Gosset G, Bolívar F (2009). Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* PTS⁻ para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato. *Mensaje Bioquímico* **33**: 171-180.

Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez O *et al* (2010). Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* **9**(1): 21.

Felitsky DJ, Cannon JG, Capp MW, Hong J, Van Wynsberghe AW, Anderson CF, Record MT Jr (2004). The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute. *Biochemistry* **43**(46): 14732-14743.

Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotech* **14**(5): 620-623.

Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda Rn, Leal L, Malpica R *et al* (2005). Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering* **7**(2): 70-87.

Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martínez A *et al* (2007). Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**(1-3): 105-116.

Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F (2002). Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering* **4**(2): 124-137.

Frost (JWO, MI, US), Frost, Karen M. (Okemos, MI, US). (2010). Board of Trustees Operating Michigan State University (East Lansing, MI, US): United States.

Ghosh S, Chisti Y, Banerjee U (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*.

Gosset G (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* **4**(1): 14.

Hernández-Montalvo V, Valle F, Bolivar F, Gosset G (2001). Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**(1): 186-191.

Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chavez G, Bolivar F, Valle F, Gosset G (2003). Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering* **83**(6): 687-694.

Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Lidén G (2005). Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **92**(5): 541-552.

Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL, von Daeniken R, Weber W *et al* (2001). Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *Journal of the American Chemical Society* **123**(42): 10173-10182.

Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Müller U, Orf S *et al* (2003). Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metabolic Engineering* **5**(4): 277-283.

Le Rudulier D, Bouillard L (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(1): 152-159.

Lewin B (2004). Transcription. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall: New Jersey, pp 241-256.

Messing J (1979). A multipurpose cloning system based on the single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recombinant DNA Technical Bulletin* **2**: 43-48.

Nelson D, Cox M (2001). Regulación de la expresión génica. *Lehninger Principios de Bioquímica*, 3era edn. Omega: España, pp 1072-1076.

Miller EN, Ingram LO (2007). Combined effect of betaine and trehalose on osmotic tolerance of *Escherichia coli* in mineral salts medium. *Biotechnology Letters* **29**(2): 213-217.

Thomason LC, Costantino N, Court DL (2001). *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. John Wiley & Sons, Inc.

Utrilla J, Gosset G, Martinez A (2009). ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**(8): 1057-1062.

Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW (2003). Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnology Progress* **19**: 1450-1459.

Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS, Nord O, Nygren P, van Wijk KJ, de Gier JW (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**: 1527-1550.

Weissbach A, Hurwitz J (1958). The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry* **234**(4): 705-709.

APÉNDICE

Estimación de los parámetros cinéticos y estequiométricos

- Velocidad específica de crecimiento (μ). Se calculó considerando únicamente la fase exponencial de las curvas de crecimiento y haciendo una regresión lineal de dicha recta. La μ correspondió a la pendiente de la misma.
- Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$). Se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_2 - X_1)}{(S_1 - S_2)}$$

En donde X_1 y X_2 son la biomasa en la parte inicial y final de la fase de crecimiento exponencial respectivamente (g DCW/L), mientras que S_1 y S_2 son la concentración de glucosa en la parte inicial y final de la misma fase respectivamente (mmol glc/L).

- Velocidad específica de consumo de sustrato (q_s). En fase de crecimiento exponencial se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$$

En fase estacionaria se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$q_s = \frac{S_1 - S_2}{(\bar{x})(t_2 - t_1)}$$

En donde S_1 y S_2 son la concentración de glucosa en la parte inicial y final de la fase de estacionaria respectivamente (mmol glc/L), \bar{x} es la biomasa promedio durante dicha fase (g DCW) y t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final de dicha fase respectivamente (h).

- Rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$). Se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$Y_{P/S} = \frac{[SHK]}{S_1 - S_2}$$

En donde [SHK] corresponde al título final de SHK (moles/L), mientras que S_1 y S_2 corresponden a la concentración de glucosa inicial y final respectivamente al cabo de la fermentación (moles/L).

- Productividad volumétrica (Q_{vol}). Se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$Q_{vol} = \frac{[SHK]}{t}$$

En donde [SHK] corresponde al título final de SHK (g/L), mientras que t corresponde al tiempo requerido para alcanzar dicho título (horas).

Cálculo de la velocidad inicial de consumo de [14 C]-glucosa

Se construyeron las curvas de [14 C]-glucosa (nm) vs. Tiempo (min) y considerando únicamente la parte lineal de estas curvas se obtuvo una pendiente que correspondió a la velocidad inicial de consumo de [14 C]-glucosa. Este dato se refirió a la concentración de proteína que fue determinada para las muestras empleadas de forma tal que el parámetro pudiera expresarse con las unidades: (nm [14 C]-Glc/min·mg proteína).