



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**INGENIERÍA METABÓLICA EN UNA CEPA DE *Escherichia coli* NO
FERMENTATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO A PARTIR DE
GLUCOSA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARIANA MARTÍNEZ VALENZUELA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA AYALA ACEVES

Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional Autónoma de México

DR. JOSÉ UTRILLA CARRERI

Centro de Ciencias Genómicas – Universidad Nacional Autónoma de México

Cuernavaca, Morelos, febrero, 2018



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 bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la realización del mismo se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC Número C0013 – 248192.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves	IBT – UNAM
Dr. José Utrilla Carreri	CCG – UNAM
Dr. Alfredo Martínez Jiménez	IBT – UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE	Dr. Agustín López Munguía Canales	IBT – UNAM
SECRETARIO	Dra. Katy Juárez López	IBT – UNAM
VOCAL	Dr. Juan Carlos Sigala Alanís	UAM - Cuajimalpa
VOCAL	Dra. Cinthia Ernestina Núñez López	IBT – UNAM
VOCAL	Dr. Víctor Humberto Bustamante	IBT – UNAM
	Santillán	

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Elvirita y Luis Antonio, por su amor, por creer en mí y por siempre echarme porras.

A Marcela, Aldo y Coral, por estar a mi lado en esta etapa, por ayudarme a salir de la rutina y por toda la ayuda que siempre me brindaron.

A Javier, por dejarme compartir esta experiencia contigo, estos dos años no fueron fáciles, pero a pesar de la distancia siempre estuviste motivándome y ayudándome.

Al Dr. Alfredo, por aceptarme en su grupo de trabajo y contribuir en mi formación profesional, gracias por su apoyo y enseñanzas.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Marcela Ayala y el Dr. José Utrilla, por sus aportaciones al proyecto a lo largo de la maestría.

A académicos y técnicos del laboratorio, por los comentarios y críticas constructivas en los seminarios de grupo y la ayuda en el laboratorio. Específicamente se agradece el apoyo técnico y metodológico de las Dras. Alejandra Vargas Tah, Noemi Flores y Andrea Sabido, y de la Maestra Georgina Hernández Chávez y la Química Luz María Martínez Mejía.

A mis amigos, compañeros del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, compañeros de generación, de fútbol, del grupo de teatro y a mis compañeras de departamento, les agradezco su amistad y me llevo de recuerdo todos los buenos momentos.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. El ácido succínico como precursor de compuestos de interés comercial.....	3
3.2. Microorganismos productores de ácido succínico.....	3
3.3. Producción biotecnológica de ácido succínico	6
3.4. Ingeniería de vías metabólicas.....	6
3.5. Producción de ácido succínico bajo condiciones de limitación de oxígeno....	9
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. HIPÓTESIS	11
6. OBJETIVO	11
6.1. Objetivos particulares.....	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS	12
7.1. Cepas, plásmidos y técnicas de biología molecular utilizadas	12
7.2. Construcción de las cepas	15
7.2.1. Integración cromosomal de <i>frdA</i> en <i>E. coli</i> MS01	15
7.2.2. Integración cromosomal del gen <i>pck</i> en el locus de <i>lacZ</i>	16
7.2.3. Inactivación cromosomal del gen <i>ppc</i>	20
7.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	22
7.3.1. Caracterización en minifermentadores	22
7.3.2. Caracterización en biorreactores	23
7.4. Determinación de la concentración de biomasa.....	24
7.5. Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	24
7.6. Cálculos	24
8. RESULTADOS.....	26
8.1. Caracterización de las cepas	26
8.1.1. Evaluación de la cepa MS01 <i>frdA</i> en minifermentadores	26
8.1.2. Evaluación del efecto del uso de condiciones de limitación de oxígeno sobre la producción de ácido succínico	31
8.1.3. Evaluación del efecto de la integración del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasa en la producción de ácido succínico.	37
8.1.4. Evaluación del efecto de la eliminación del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en biorreactor utilizando glucosa fuente de carbono	42

8.1.5. Evaluación de la cepa MS01 <i>frdA</i> $P_{trc}pck$ Δppc en biorreactor utilizando xilosa y mezclas glucosa-xilosa como fuente de carbono	47
9. RESUMEN DE RESULTADOS	54
10. CONCLUSIONES	56
11. PERSPECTIVAS	58
12. BIBLIOGRAFÍA CITADA	59
13. ANEXOS	64
13.1 Curvas de crecimiento durante las evaluaciones en minifermentador y biorreactor.....	64
13.2 Participación en congresos.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la producción de ácido succínico por diferentes microorganismos.....	5
Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.....	13
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	14
Tabla 4. Composición medio mineral AM1.....	22
Tabla 5. Comparación de los parámetros de crecimiento, consumo y producción en la cepa MS01 <i>frdA</i> en condiciones anaerobias utilizando glucosa como fuente de carbono	26
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cepa MS01 <i>frdA</i> evaluada a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (OTR) (Los datos que se muestran son los obtenidos de un solo experimento).....	34
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepa MS01 <i>frdA</i> evaluada a 2.24 mmol O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹ por duplicado.....	36
Tabla 8. Resultados de la evaluación de la cepa MS01 <i>frdA</i> P _{trc} <i>pck</i> en minifermentador y en biorreactor.	38
Tabla 9. Afinidades por diferentes sustratos reportadas para las enzimas Ppc y Pck.	41
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la evaluación de la cepa MS01 <i>frdA</i> P _{trc} <i>pck</i> Δ <i>ppc</i> en biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbono.	42
Tabla 11. Comparación de parámetros cinéticos observados en la cepa MS01 <i>frdA</i> P _{trc} <i>pck</i> Δ <i>ppc</i> en la evaluación con diferentes fuentes de carbono.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Metabolismo central de carbono y vía sintética de producción de ácido succínico propuesta en *E. coli*. Se muestran el nombre de los genes que codifican para las enzimas del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato (PEP-PIR-OAA) en líneas punteadas, la vía seleccionada para la carboxilación del fosfoenolpiruvato se muestra en línea roja..... 8
- Figura 2. Restablecimiento del locus *frdA*. Se muestra el gel de agarosa de la comprobación de la integración del gen *frdA* en colonias individuales (1, 6, 15, 16, 17, 18). El tamaño esperado se señala con la flecha. Como controles se utilizó ADN cromosomal de las cepas MS01 (control negativo) y MG1655 (control positivo). Marcador de peso utilizado: 1kb..... 15
- Figura 3. Esquema de la construcción del vector pLoxGentrcpck a partir del vector de integración pLoxGentrc. El gen *pck* se integró río abajo del promotor *trc*. Se obtuvieron tres candidatas las cuales posteriormente se evaluaron por patrones de digestión.. 18
- Figura 4. Comprobación de la construcción del vector pLoxGentrcpck por doble digestión con las enzimas *NcoI* y *PstI*. Se observa el patrón esperado: una banda de 6255 pb y una banda de 1664 pb en las tres candidatas evaluadas. Marcador de peso utilizado: 1kb 19
- Figura 5. Comprobación de la integración del gen *pck* en el locus de *lacZ* por la prueba con el método de selección por colonias azules y blancas. Las candidatas 17 y 18 presentaron el fenotipo blanco por la interrupción de la actividad de la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*..... 19
- Figura 6. Izq.: Comprobación de tamaño de producto de PCR amplificado a partir del vector pKD3; tamaño fragmento: 1123 pb, se señala con una flecha. Der.: Comprobación de la inserción del casete de resistencia a Cm^{30} en las cepa MS01 *frdA* $P_{trc}pck$ utilizando con los oligos 3' ppc/cat y cm1. El tamaño de banda esperado es de 366 pb y se señala con una flecha. Control negativo MS01 *frdA*. Marcador de peso 1kb. 21
- Figura 7. Comprobación de la eliminación de la resistencia a Cm^{30} con los oligos ppcFw y ppcRv en la cepa MS01 *frdA* $P_{trc}pck$. Se observa el tamaño de banda esperado (697 pb), se señala con una flecha. Marcador de peso 1 kb. 21
- Figura 8. Efecto de la adición de K_2CO_3 en la producción de ácido succínico. A, B) Distribución de los principales metabolitos en la evaluación de la cepa MS01 *frdA* y MG1655 (control). Primera evaluación realizada con NaHCO_3 y sin añadir K_2CO_3 en la mezcla de control de pH. C, D) Distribución de los tres principales metabolitos observada en la evaluación de la cepa MS01 *frdA* y MG1655 (control) utilizando KHCO_3 y la mezcla 1:1 de K_2CO_3 2M y KOH 4M para el control de pH. En la cepa construida se observa un aumento en la concentración final de ácido succínico con respecto a la primera evaluación. E) Cinética del crecimiento de las cepas MS01 *frdA* y MG1655 con y sin adición de K_2CO_3 28

Figura 9. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de glucosa en la cepa MS01 <i>frdA</i> a diferentes OTR: A) 1.04, B) 2.24, C) 3.89 y D) 4.58 mmol O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹ . E) Biomasa producida durante la etapa exponencial (X _{MAX}) y biomasa final en las cuatro condiciones de OTR evaluadas.....	33
Figura 10. Biomasa producida en fase estacionaria y biomasa final en la cepa MS01 <i>frdA P_{trc}pck</i> en minifermentador y biorreactor	39
Figura 11. Consumo de glucosa y producción de ácido succínico y pirúvico en la cepa MS01 <i>frdA P_{trc}pck</i> en: A) Minifermentador – condiciones anaerobias, B) Biorreactor – condiciones de limitación de oxígeno.....	39
Figura 12. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de glucosa de la cepa MS01 <i>frdA P_{trc}pck Δppc</i> en biorreactor.	43
Figura 13. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de sustrato en la cepa MS01 <i>frdA P_{trc}pck Δppc</i> en cultivos en biorreactor con medio AM1 adicionados con A) Xilosa y B) Glucosa + xilosa.....	48
Figura 14. Producción de ácido succínico en la cepa MS01 <i>frdA P_{trc}pck Δppc</i> en las evaluaciones utilizando: A) Glucosa, B) Glucosa + Xilosa y C) Xilosa	49

ABREVIATURAS

Mt	Miles de toneladas
MMt	Millones de toneladas
PEP	Fosfoenolpiruvato
OAA	Oxaloacetato
ATP	Adenosín trifosfato
rpm	Revoluciones por minuto
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
nm	Nanómetros
mM	Milimolar
M	Molar
pb	Pares de bases
mg	Miligramos
g	Gramos
Kb	Kilobase
Cm	Antibiótico cloranfenicol
Km	Antibiótico kanamicina
Cb	Antibiótico carbenicilina
μ	Velocidad específica de crecimiento
Qp	Productividad volumétrica
qs	Velocidad específica de consumo en etapa estacionaria
qp	Velocidad específica de producción en etapa estacionaria
Y _{p/s}	Rendimiento producto sobre sustrato
X _{MAX}	Biomasa producida en etapa exponencial
k _{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
CDW	Peso celular seco

1. RESUMEN

El ácido succínico posee potencial para ser utilizado como precursor de compuestos industriales, tales como el tetrahidrofurano y la butirolactona. La producción biotecnológica tiene la ventaja de utilizar como materia prima sustratos renovables tales como los azúcares presentes en residuos lignocelulósicos. Mediante el uso de ingeniería metabólica, en este proyecto se planteó la modificación de una cepa de *Escherichia coli* no fermentativa (cepa MS01) generada previamente en el grupo de trabajo y a la cual se le inactivaron las vías de producción de etanol, ácido láctico, ácido fórmico y ácido succínico, y a partir de ella obtener una cepa sobreproductora de ácido succínico. En *E. coli* la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) actúa normalmente como enzima principal de carboxilación de fosfoenolpiruvato y utiliza los mismos sustratos que fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Pck), sin embargo, con Ppc no se obtiene una molécula de ATP por cada reacción como ocurre con Pck, lo cual representa una ventaja para la célula en términos energéticos y favorece la producción de ácido succínico. La estrategia planteada fue la reintegración del gen de la enzima fumarato reductasa como primer paso para restablecer la capacidad de producir ácido succínico (cepa MS01 *frdA*); y con el fin de obtener una cepa que utilizara la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa, como principal vía de carboxilación de fosfoenolpiruvato hacia oxaloacetato, se realizó la integración del gen *pck* en cromosoma bajo control de un promotor inducible (cepa MS01 *frdA P_{trc}pck*) y la eliminación del gen *ppc* (cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc*). Las cepas construidas se caracterizaron en minifermentadores de 250 ml y biorreactores de 1 L en medio mineral y glucosa. Adicionalmente, se evaluó el efecto de bajas velocidades de transferencia de oxígeno (OTR) sobre la producción de succínico. La reintegración del gen *frdA* permitió a la cepa producir ácido succínico en condiciones anaerobias, sin embargo, durante la evaluación en minifermentadores sin aireación se observó baja capacidad de producción de ácido succínico. Al evaluar en biorreactor de 1 L con medio mínimo y glucosa a cuatro diferentes OTR, se observó que la condición de limitación de oxígeno que favorece la producción de succínico es de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹. Una vez determinada una OTR que favorece la producción de ácido succínico, se evaluó a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en biorreactor con medio mineral y glucosa, y se observó que el efecto conjunto de la integración del gen *pck* en cromosoma y la eliminación del gen *ppc* fue un incremento en el título final, rendimiento y productividad volumétrica de ácido succínico. Posteriormente, se evaluó a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* utilizando xilosa y una mezcla glucosa-xilosa. Los parámetros cinéticos, el título y los rendimientos de succínico fueron similares en las tres evaluaciones independientemente del sustrato utilizado. Una observación importante que se encontró durante la evaluación en la mezcla glucosa-xilosa fue el consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono, aunado al consumo simultáneo de ácido pirúvico, lo cual podría estar asociado a la eliminación del gen *ppc* modificando el fenómeno de represión catabólica. En conclusión, mediante ingeniería de vías metabólicas se logró modificar una cepa no fermentativa para la sobreproducción de ácido succínico, haciendo uso de la enzima Pck como principal vía de carboxilación de PEP, además se logró mejorar la capacidad de producción utilizando condiciones de limitación de oxígeno en medio mínimo con glucosa, xilosa o una mezcla de glucosa y xilosa como fuente de carbono.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el ácido succínico se produce principalmente a partir del petróleo, sin embargo, se están buscando alternativas que permitan sustituir el proceso tradicional por procesos biotecnológicos (Jarboe et al., 2010). La aplicación de procesos biotecnológicos para la producción de compuestos de uso industrial es relevante ya que los microorganismos tienen la capacidad de utilizar materias primas renovables como sustrato (Cheng et al., 2013).

El ácido succínico es un intermediario del ciclo de Krebs en condiciones aerobias, pero también puede producirse como producto final del metabolismo durante la fermentación anaerobia. La rama reductora del ciclo de Krebs, la ruta del glioxilato y la rama oxidativa del ciclo de Krebs son las vías del metabolismo que pueden utilizarse para la síntesis de ácido succínico (Cheng et al., 2013). Debido a que la generación de subproductos es uno de los principales inconvenientes en procesos fermentativos, se hace uso de la ingeniería metabólica con el fin de desviar el flujo de carbono hacia la síntesis del metabolito de interés, en este caso el ácido succínico (Cheng et al., 2013; McKinlay et al., 2007). Esta herramienta permite el mejoramiento de las actividades celulares a través de la manipulación de las funciones reguladoras, enzimáticas y de transporte de la célula (Bailey, 1991).

3. ANTECEDENTES

3.1. El ácido succínico como precursor de compuestos de interés comercial

El ácido succínico, es un ácido dicarboxílico formado por cuatro átomos de carbono y puede usarse como punto de partida para la síntesis de otros compuestos químicos y se estima que el potencial de mercado es de aproximadamente 270 Mt al año (Jarboe et al., 2010; Kurzrock et al., 2010). Puede utilizarse como base para la producción de 1,4-butanodiol, el cual se utiliza para generar tetrahidrofurano (THF), γ -butirolactona, los cuales a su vez son empleados en la producción de solventes. Además, el THF se utiliza para la fabricación de elastómeros de uretano termoplástico y fibras de poliuretano. El ácido succínico también puede utilizarse para sustituir al ácido adípico (que se utiliza para hacer nylon) y al anhídrido maleico, utilizado en la industria de la vivienda, construcción y automotriz (McKinlay et al., 2007).

3.2. Microorganismos productores de ácido succínico

Muchas bacterias han sido identificadas por su habilidad natural para producir ácido succínico como principal producto fermentativo. Algunas de estas son *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Corynebacterium glutamicum* y *Mannheimia succiniciproducens*. El inconveniente de la producción biotecnológica de este compuesto utilizando sobreproductores naturales es que poseen un requerimiento de medios de cultivo con ingredientes de composición compleja (e.g. extracto de levadura o triptona) lo cual incrementa el costo general de la producción, la purificación y el manejo de residuos (Tabla 1) (Jantama et al., 2008). Debido a la importancia de desarrollar biocatalizadores que puedan utilizar recursos renovables para la producción de compuestos químicos, el microorganismo de elección debe ser capaz de crecer en medios de cultivo minerales con fuentes de carbono baratas, y ser capaz de metabolizar hexosas y pentosas, para poder utilizar como sustrato la totalidad de los componentes de la biomasa vegetal presente en los residuos lignocelulósicos. Además, debe poseer alta velocidad metabólica (la cual es necesaria para una alta velocidad de producción), y no debe requerir procesos de fermentación complicados. Así mismo, debe mostrar resistencia a los inhibidores producidos durante el proceso de pretratamiento al cual se someten los residuos lignocelulósicos, y ser

tolerante a concentraciones de sustrato y producto elevadas para que sea posible obtener altas cantidades del producto deseado (Jarboe et al., 2010).

E. coli posee muchas de las características fisiológicas mencionadas y es, por lo tanto, una excelente base para la producción de metabolitos de interés (Jarboe et al., 2010). Sin embargo, este microorganismo produce varios compuestos por medio de fermentación como son ácido acético, etanol, ácido fórmico, ácido láctico, y ácido succínico, pero este último en cantidades muy pequeñas (Hong & Lee, 2001).

Tabla 1. Comparación de la producción de ácido succínico por diferentes microorganismos

Microorganismo	Medio y condiciones de cultivo	Título (g/L) ^a	Rendimiento (g _{Succ} /g _{Glu}) ^b	Referencia
<i>E. coli</i> KJ060 $\Delta IdhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ackA$, $\Delta focA$, $\Delta pflB$, <i>pck*</i> , <i>ptsI*</i> (Inóculo 0.2 g _{CDW} /L)	Medio mineral AM1 + glucosa (100 g L ⁻¹) con 10 g L ⁻¹ KHCO ₃ , fermentación por lote, 120 h de incubación, control pH con mezcla 1:1 de KOH 6 M + K ₂ CO ₃ 3 M	73.45 [0.61]	1.06	Jantama et al., 2008
<i>E. coli</i> AFP111 $\Delta pflAB$, $\Delta IdhA$, $\Delta ptsG$, <i>Rhizobium etli pyc</i> sobre expresada	Glucosa (40 g L ⁻¹) en medio suplementado con triptona (20 g L ⁻¹), extracto de levadura (10 g L ⁻¹) y MgCO ₃ (40 g L ⁻¹), fermentación de dos fases en lote alimentado, 76 h de incubación	99.31 [1.31]	1.10	Vemuri et al., 2002a, b
<i>Actinobacillus succinogenes</i> FZ53	Glucosa (130 g L ⁻¹) suplementada con licor de maíz fermentado (15 g L ⁻¹), extracto de levadura (5 g L ⁻¹) y MgCO ₃ (80 g L ⁻¹), fermentación anaerobia en lote, 78 h de incubación	106.04 [1.36]	0.82	Guettler et al., 1996
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ATCC 53488	Glucosa (120 g L ⁻¹) en medio peptona/extracto de levadura, biorreactor-electrodialisis con membrana integrada con burbujeo de CO ₂ , 150 h de incubación	83.02 [0.55]	0.89	Meynial-Salles et al., 2007
<i>E. coli</i> SBS550MG $\Delta IdhA$, $\Delta adhE$, $\Delta iclR$, $\Delta ackA$ - <i>pta</i> , <i>Lactococcus lactis pyc</i> , <i>Bacillus subtilis citZ</i>	Glucosa (20 g L ⁻¹ ; 100 g total) en medio LB suplementado con NaHCO ₃ (1 g L ⁻¹), ampicilina (200 mg L ⁻¹) y 1 mM IPTG. 100% CO ₂ a 1 L/min STP espacio de cabeza, fermentación en lote alimentado, 95 h de incubación	40.03 [0.42]	1.06	Sánchez et al., 2005
<i>Corynebacterium glutamicum</i> R	Glucosa (40 g L ⁻¹) en medio mineral definido con NaHCO ₃ (400 mM), fermentación en lote alimentado, 6 h de incubación	23.03 [3.83]	0.19	Okino et al., 2005
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> $\Delta IdhA$, $\Delta pflB$, Δpta - <i>ackA</i>	Glucosa (63 g L ⁻¹) in MMH3 (Medio a base de extracto de levadura), fermentación en lote alimentado, burbujeo de CO ₂ (0.25 vol/vol/min), 30 h de incubación	52.43 [1.75]	0.76	Lee et al., 2006

*Modificado de Jantama et al., 2008.

^a La productividad volumétrica se muestra entre corchetes [g L⁻¹ h⁻¹].

^b El rendimiento molar se calcula con base en la producción de ácido succínico del azúcar metabolizado durante ambas condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La biomasa se genera principalmente durante el crecimiento aeróbico. El ácido succínico se produce principalmente durante la incubación anaerobia con CO₂, H₂, o una mezcla de ambos.

3.3. Producción biotecnológica de ácido succínico

En la actualidad, la mayor cantidad del ácido succínico disponible se produce mediante procesos químicos, en los cuales el gas licuado de petróleo o aceite de petróleo son utilizados como materia prima. La producción mediante fermentación microbiana de carbohidratos ha recibido mucha atención debido a la problemática que existe por el agotamiento de los yacimientos fósiles y las emisiones de gases de efecto invernadero (Li et al., 2016; Song & Lee, 2006).

En ese sentido, está reportado que en México se producen anualmente 45 MMt de rastrojos, a partir de cuatro cultivos principales (maíz, sorgo, trigo y cebada) y en el cultivo de maíz se genera casi tres cuartas partes del rastrojo total (Vélez-Izquierdo et al., 2013). Los componentes lignocelulósicos de los rastrojos de maíz, generan glucosa y xilosa durante su hidrólisis (Vargas-Tah et al., 2015). Es por esta razón que una de las características importantes del microorganismo utilizado es la capacidad de poder utilizar diferentes fuentes de carbono. En particular, en este estudio el enfoque se dirige hacia la producción de ácido succínico a partir de glucosa ya que es uno de los productos más abundantes en la biomasa de las plantas (McKinlay et al., 2007). Adicionalmente, se incluyeron cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono, ya que la información obtenida permitirá que eventualmente se haga uso de los residuos lignocelulósicos como materia prima de las fermentaciones microbianas.

3.4. Ingeniería de vías metabólicas

Las cepas silvestres de *E. coli* son capaces de fermentar glucosa en medios minerales simples, pero producen ácido succínico como producto minoritario. Debido a esto, con el propósito de obtener mejor rendimiento y productividad, una de las estrategias principales es eliminar las vías competitivas en donde se generan otros productos (Jarboe et al., 2010). Por tal razón en este proyecto se partió de la cepa MS01 (*E. coli* MG1655 $\Delta pf1B$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy1FGH$, Δreg 27.3 kb, *gatC* S184L, $\Delta midarpA$, $\Delta ldhA$), a la cual previamente se le eliminaron los genes para las vías fermentativas principales de producción de ácido láctico, acetil-CoA, ácido fórmico, etanol y ácido succínico.

La estrategia que se propone para mejorar el rendimiento de ácido succínico involucra incrementar la carboxilación de PEP o ácido pirúvico hacia un precursor de cuatro

carbonos del cual se pueda obtener ácido succínico en el nodo del fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato (PEP-PIR-OAA). En la red metabólica de *E. coli* existen cuatro enzimas de carboxilación nativas que podrían ser utilizadas con este propósito (Figura 1). La carboxilación de PEP a OAA por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) se conoce como la vía primaria para la producción fermentativa de ácido succínico en *E. coli*. La segunda y tercera vías utilizan enzimas dependientes de NADH y NADPH (MaeA y MaeB, respectivamente) para catalizar la carboxilación reversible de ácido málico a ácido pirúvico. La cuarta vía utiliza a la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas (Pck), para la carboxilación de PEP a OAA con la conservación de la energía como ATP. Aunque la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas normalmente funciona sólo durante la gluconeogénesis, en la dirección de OAA hacia PEP, se ha probado que también funciona en la dirección opuesta (Zhang et al., 2009).

Se sabe que en las bacterias del rumen sobreproductoras de ácido succínico (*A. succinogenes*, *A. succiniciproducens* y *M. succiniciproducens*) la enzima que se utiliza principalmente es la enzima Pck, en donde funciona en la dirección opuesta a lo que ocurre en cepas de *E. coli* nativas (Zhang et al., 2009). Con esta enzima, la conversión de PEP a OAA conserva energía (en forma de ATP) en comparación con la reacción catalizada por Ppc (Li et al., 2013). En el caso de *E. coli*, el uso de Pck como principal enzima de carboxilación de PEP en lugar de Ppc y, por consiguiente, el incremento en la cantidad de ATP disponible, favorecería el balance energético, el crecimiento celular y la producción de ácido succínico (Zhang et al., 2009).

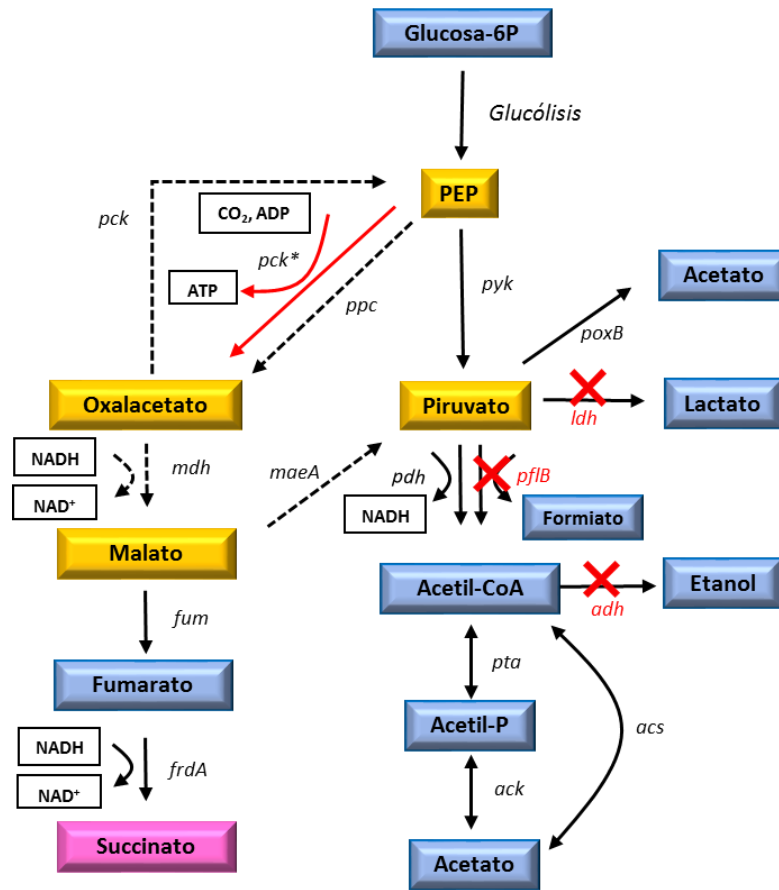


Figura 1. Metabolismo central de carbono y vía sintética de producción de ácido succínico propuesta en *E. coli*. Se muestran el nombre de los genes que codifican para las enzimas del nodo fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato (PEP-PIR-OAA) en líneas punteadas, la vía seleccionada para la carboxilación del fosfoenolpiruvato se muestra en línea roja.

Con respecto a esto, en un estudio de evolución adaptativa que se realizó para mejorar la producción de ácido succínico, se reporta el reclutamiento de la enzima gluconeogénica Pck como principal ruta de carboxilación de PEP en las cepas de *E. coli* evaluadas de manera similar a lo que ocurre en las bacterias del rumen. Las mutaciones a las cuales se les atribuye el aumento en la cantidad de transcrito y el aumento de la actividad enzimática, son la pérdida de la represión catabólica y un cambio de base en la región del promotor del gen *pck*. Estas modificaciones permitieron la expresión de este gen en presencia de glucosa e incrementaron el flujo de carbono hacia ácido succínico y el aumento de la conservación de la energía metabólica en forma de ATP (Zhang, et al., 2009).

3.5. Producción de ácido succínico bajo condiciones de limitación de oxígeno

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo de trabajo con una cepa derivada de la cepa MS01, se reporta que el uso de condiciones de limitación de oxígeno mejora el rendimiento y la productividad durante la producción de etanol. En dichas condiciones se logró que la tensión de oxígeno disuelto fuera de cero, aunque la transferencia de oxígeno tuvo un valor positivo. Esto se debe a que la velocidad de consumo de oxígeno se ve limitada por la velocidad de transferencia de oxígeno al medio. La mayor productividad volumétrica de etanol se logró al usar una aireación de 0.1 vvm, una agitación de 400 rpm en un biorreactor de 1 L con un volumen de operación de 0.75 L y usando una turbina Rushton de 6 paletas planas, lográndose un k_{La} de 7.2 h^{-1} a una velocidad de transferencia de oxígeno de $1.55 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fernández-Sandoval, 2012). Debido a que la cepa evaluada en el estudio mencionado (Fernández-Sandoval, 2012) y las cepas a utilizar en este trabajo son derivadas del mismo fondo genético (cepa MS01) se considera importante evaluar el efecto del uso de cultivos con limitación de oxígeno para la producción de ácido succínico.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente una gran cantidad de compuestos químicos se obtienen de derivados del petróleo; sin embargo, debido a los inconvenientes que conlleva la utilización de esta materia prima, es necesario buscar fuentes renovables que permitan sustituir a las fuentes no renovables. La necesidad de utilizar microorganismos que posean características ideales para los procesos fermentativos ha llevado al uso de diversas estrategias de cultivo y a la modificación genética. La ingeniería de vías metabólicas permite obtener cepas con mejores capacidades de producción, dirigir el flujo de carbono hacia el metabolito de interés, minimizar la producción de subproductos e incrementar el rendimiento final. Es importante continuar con el desarrollo de cepas productoras, sin embargo, para lograr que estas puedan ser utilizadas a nivel industrial es necesario que se comprenda el metabolismo y la manera en que responde la célula a ciertas modificaciones y condiciones de cultivo.

Las estrategias de ingeniería metabólica se plantearon para obtener una cepa de *Escherichia coli* sobreproductora de ácido succínico. Estas estrategias comprenden el restablecimiento del gen que codifica para la enzima fumarato reductasa en la cepa de *E. coli* MS01, la cual es una cepa no fermentativa previamente generada en el laboratorio. Así mismo, para lograr que Pck sea la principal enzima encargada de la carboxilación de PEP es necesario eliminar el gen que codifica para la enzima Ppc y expresar Pck utilizando un promotor inducible. Adicionalmente, de acuerdo a un estudio previo en una cepa similar, el uso de condiciones de limitación de oxígeno en los cultivos permitirá mejorar la capacidad de producción de ácido succínico.

5. HIPÓTESIS

El restablecimiento de la actividad de la fumarato reductasa y la utilización de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxicinasas, como principal enzima para la carboxilación de fosfoenolpiruvato hacia oxaloacetato, en la cepa no fermentativa MS01 conllevarán a la generación de una cepa de *E. coli* sobreproductora de ácido succínico.

6. OBJETIVO

Construir una cepa de *E. coli* sobreproductora de ácido succínico a partir de glucosa, usando estrategias de ingeniería de vías metabólicas.

6.1. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la reintegración del gen de la enzima fumarato reductasa, que cataliza la reacción de fumarato hacia ácido succínico, en la cepa MS01 en condiciones anaerobias
2. Evaluar el efecto del uso de condiciones de limitación de oxígeno en la capacidad de producción de ácido succínico
3. Evaluar el efecto de la integración del gen que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas, bajo control de un promotor inducible, y la eliminación del gen que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en la producción de ácido succínico

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas, plásmidos y técnicas de biología molecular utilizadas

En este estudio se partió de la cepa modificada de *E. coli* denominada MS01 (MG1655 $\Delta pf1B$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy1FGH$, Δreg 27.3 kb, *gatC* S184L, $\Delta midarpA$, $\Delta ldhA$) (Fernández-Sandoval et al., 2012) la cual es una cepa no fermentativa que se obtuvo en nuestro grupo de trabajo, el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología Sintética, del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (Tabla 2).

En este estudio se realizó la integración en cromosoma del gen *frdA* que codifica para la enzima fumarato reductasa que había sido previamente eliminado. Esto se realizó mediante recombinación homóloga y selección por viabilidad (Datsenko & Wanner, 2000). También se integró el gen *pck*, amplificado a partir de la cepa silvestre MG1655, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas en cromosoma en el locus del gen *lacZ* bajo control del promotor *trc*; esto se realizó utilizando el plásmido de integración pLoxGentrc de acuerdo con lo reportado por Sabido y colaboradores (2013). Para la delección del gen *ppc* se siguió el protocolo descrito por Datsenko (2000). Las mutantes transformadas se seleccionaron por resistencia a antibiótico y en el caso de la reintegración del gen *frdA* se seleccionaron por viabilidad en condiciones anaerobias ya que no se utilizó casete de resistencia en esta variante del método.

Las integraciones e inactivaciones fueron comprobadas por tamaño del producto amplificado por PCR y, adicionalmente, por secuenciación para el caso de las integraciones en cromosoma. Los protocolos para la realización de PCR, digestión con enzimas de restricción, transformación de cepas por electroporación, visualización del ADN por electroforesis en geles de agarosa, se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar y a lo descrito en el manual de cada una de las enzimas o reactivos. El ADN cromosomal fue aislado y purificado con el kit "Ultra Clean Microbial DNA Isolation" (MO BIO laboratories, Inc, USA). Cuando se necesitaba hacer evaluaciones de varias colonias a la vez, el ADN se obtuvo por el método de ebullición. Los productos de PCR utilizados para la modificación de las cepas se amplificaron con la enzima de alta fidelidad Kapa HiFi (KAPA BIOSYSTEMS, Inc, USA). Posterior a la

amplificación los productos de PCR se purificaron a partir de banda de agarosa 0.8% utilizando el kit “GeneJet Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa	Genotipo / Características	Referencia
MG1655	<i>E. coli</i> K12 F-, $\Delta\lambda$ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb-50</i> , <i>rph-1</i>	Jensen, 1993
MS01 DE3	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xy1FGH</i> , Δ <i>reg</i> 27.3 kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i> , Δ <i>ldhA</i> que porta los genes del fago lambda λ DE	Fernández-Sandoval et al., 2012
MS01 <i>frdA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>xy1FGH</i> , Δ <i>reg</i> 27.3 kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i> , Δ <i>ldhA</i> <i>frdA</i>	Este trabajo
MS01 <i>frdA</i> P _{trc} <i>pck</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>xy1FGH</i> , Δ <i>reg</i> 27.3 kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i> , Δ <i>ldhA</i> P _{trc} <i>pck</i>	Este trabajo
MS01 <i>frdA</i> P _{trc} <i>pck</i> Δ <i>ppc</i>	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pf1B</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>xy1FGH</i> , Δ <i>reg</i> 27.3 kb, <i>gatC</i> S184L, Δ <i>midarpA</i> , Δ <i>ldhA</i> P _{trc} <i>pck</i> Δ <i>ppc</i>	Este trabajo
pKD46	Plásmido que porta los genes de la recombinasa Red	Datsenko & Wanner, 2000
pLoxGen _{trc}	Plásmido derivado de pLoxGen4DHindIII con una región de pTrc99A que contiene el promotor <i>trc</i> , un sitio de clonación múltiple, las secuencias terminadoras <i>rrmB</i> de T1 y T2 y el gen <i>lacI</i>	Sabido et al., 2013
pLoxGen _{trc} <i>pck</i>	Plásmido derivado de pLoxGen _{trc} portador del gen <i>pck</i> de <i>E. coli</i>	Este trabajo
pJW168	Plásmido Amp ^r porta el gen <i>cre</i> bajo control del promotor PlacUV5 y con las funciones de replicación termosensibles del plásmido pSC101.	Palmeros et al., 2000
pKD3	Plásmido usado como molde del casete de cloranfenicol para generación de productos de PCR	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	Plásmido que porta los genes de la recombinada FLP	Datsenko & Wanner, 2000

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Referencia
Integración <i>frdA</i>		
<i>frdA</i> Fw	ACGAAGTCTACTCGCAACGCGA	Este trabajo
<i>frdA</i> Rv	CGATGAAGTGGGTTCATATCGACCAC	Este trabajo
FrdA-Fw-1	GTGCAAACCTTTCAAGCCGA	Este trabajo
FrdA-Fw-2	TACAACACCAACGGCGGCAT	Este trabajo
FrdA-Fw-3	TTCGGCCGTCTGGCCGGTGA	Este trabajo
Integración <i>pck</i> en <i>lacZ</i>		
Pck-PstI	CGATACGATTCTGCAGTTACAGTTTCGGACCAGCCG	Este trabajo
Pck-NcoI-SD	CTACCATGCCATGGGATAAAGGAGGTTCGCTGCTATGCGCGTTAACAATGGTT TGACCC	Este trabajo
<i>trcmE</i> /lacZ fw	GAGTGGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCTCAACGCTTATC ATCGACTGCACGG	Sabido et al., 2013
<i>trcmE</i> /lacZ rv	GACATGGCCTGCCCGGTTATTATTATTTTTGACACCAGACCAACTGCACAGA TGCGTAAGGAGAA	Sabido et al., 2013
<i>lacZ</i> :: <i>trcm1</i>	GTGGAAGCTGCCTGCACTAA	Sabido et al., 2013
<i>lacZ</i> :: <i>trcm2</i>	GTGGCGAACGATGAGCCAAT	Sabido et al., 2013
<i>aacC1</i> 5'	AGCCACCTACTCCCAACATCAG	Sabido, 2014a
<i>MtyrA3</i>	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCC	Sabido et al., 2013
PckSEC1	AGCTGTCAAACCAGATCAAT	Este trabajo
PckSEC2	TCCGTCCGTTTCATCACCGA	Este trabajo
PckSEC3	GTCACCGTCCGTGAAGATGG	Este trabajo
PckSEC4	TTGCCCGTCTCACTGGTGAA	Este trabajo
PckSEC5	GGATCGAGCTCTTCCTGATA	Este trabajo
Eliminación <i>ppc</i>		
5' <i>ppc</i> /cat	AGAAGAGGAAGATTAGCCGGTATTACGCATACCTGCCGCAATCCCGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC	Sabido, 2014a
3' <i>ppc</i> /cat	TTTACGTGGCTTTATAAAAAGACGACGAAAAGCAAAGCCCGAGCATATGGGAA TTAGCCATGGTCC	Sabido, 2014a
<i>ppcFw</i>	GCATCTTATCCGACCTACAC	Martínez-Gómez et al., 2012
<i>ppcRv</i>	GCCTGTAGCAGAGTAGAGAA	Martínez-Gómez et al., 2012
<i>cm1</i>	CGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCAT	Palmeros et al., 2000

7.2. Construcción de las cepas

7.2.1. Integración cromosomal de *frdA* en *E. coli* MS01

La cepa de la cual se partió en este estudio es la cepa no fermentativa *E. coli* MS01. Entre otros, tiene eliminado el gen de la enzima fumarato reductasa (*frdA*), encargada de la síntesis de ácido succínico a partir de ácido fumárico en condiciones anaerobias. Por lo que el primer paso para generar una cepa sobreproductora de ácido succínico fue el restablecimiento del locus *frdA* mediante la reintegración de este gen.

La integración del gen *frdA* se llevó a cabo empleando una variante del método reportado por Datsenko y Wanner (2000). A partir del ADN cromosomal de la cepa nativa MG1655 se utilizaron los oligos *frdA* Fw y *frdA* Rv para amplificar un fragmento de 2,431 pb que contiene el gen *frdA* flanqueado por regiones de homología con el sitio en donde se desea integrar. La cepa MS01 se transformó con el plásmido pKD46, que codifica la recombinasa lambda, para promover la recombinación homóloga en los sitios que flanquean al gen *frdA*. Las cepas recombinantes se seleccionaron en medio mineral AM1 (Martínez et al., 2007) sólido suplementado con glucosa (20 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), betaína (1 mM) y acetato de sodio (2 g L⁻¹) en condiciones anaerobias. Para proveer la atmósfera anaerobia se utilizó una jarra para generación de condiciones anaerobias Anaerojar (Oxoid Anaerojar de 2.5 L, Thermo Fisher Scientific, Inc, USA), en las cuales se colocaron las cajas que se sembraron junto con un sobre para generación de anaerobiosis (Oxoid Anaerogen 2.5L Sachet, Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Bajo estas condiciones, solamente las cepas recombinantes que expresaban el gen de la enzima fumarato reductasa fueron capaces de crecer, ya que la cepa MS01 progenitora es una cepa no fermentativa y

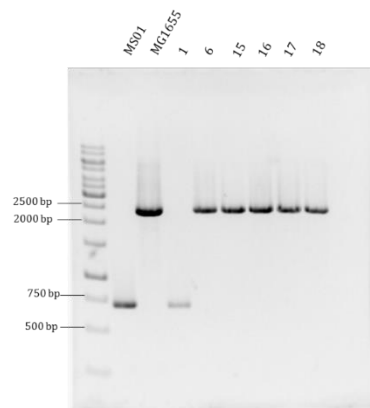


Figura 2. Restablecimiento del locus *frdA*. Se muestra el gel de agarosa de la comprobación de la integración del gen *frdA* en colonias individuales (1, 6, 15, 16, 17, 18). El tamaño esperado se señala con la flecha. Como controles se utilizó ADN cromosomal de las cepas MS01 (control negativo) y MG1655 (control positivo). Marcador de peso utilizado: 1kb.

por lo tanto le es imposible crecer en ausencia de oxígeno. La cepa obtenida fue denominada MS01 *frdA* (Tabla 2) y su correcta construcción se comprobó por PCR con los oligos *frdA* Fw y *frdA* Rv (Figura 2). El producto amplificado con los oligos *frdA* Fw y *frdA* Rv usando como molde el ADN cromosomal de la cepa MS01 *frdA* se purificó y se envió a secuenciar con los oligos *frdA* Fw, *FrdA*-Fw-1, *FrdA*-Fw-2y *FrdA*-Fw-3 para confirmar su inserción apropiada.

7.2.2. Integración cromosomal del gen *pck* en el locus de *lacZ*

Con el fin de que la enzima Pck funcione como enzima principal de carboxilación de fosfoenolpiruvato hacia oxalacetato, es necesario expresar el gen *pck* de manera controlada. Para esto se integró *pck* en cromosoma bajo control de un promotor inducible por IPTG en el locus de *lacZ*.

Para realizar la integración del gen *pck* en el locus de *lacZ* primero fue necesario construir el vector pLoxGentrc*pck* a partir del vector pLoxGentrc. Esto se realizó amplificando el gen *pck* utilizando la cepa silvestre de *E. coli* MG1655 como molde con los oligos Pck-PstI y Pck-NcoI-SD que poseen los sitios de restricción *NcoI* y *PstI* (tamaño 1664 pb). Posteriormente, se digirieron de manera independiente el vector y el producto de PCR y se unieron los extremos por medio de una reacción de ligación con la enzima ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA) (Figura 3). Se comprobó la construcción por restricción, observándose los tamaños esperados para el vector linealizado y el gen *pck*, 6255 y 1664 pares de bases, respectivamente (Figura 5). A partir del vector pLoxGentrc*pck* se amplificó un fragmento de 3643 pb utilizando los oligos trcmelA/*lacZ* fw y trcmelA/*lacZ* rv que incluía el gen *pck* bajo el control del promotor P_{trc} y el gen que codifica para la resistencia a gentamicina flanqueado por los sitios *loxP*, este fragmento está flanqueado en sus extremos por regiones de homología con el gen *lacZ*. El producto de PCR obtenido se digirió con la enzima DpnI para eliminar el molde y se purificó por electroforesis en gel de agarosa 0.8% utilizando el kit "GeneJet Gel Extraction Kit" (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). La cepa MS01 *frdA*, que había sido transformada previamente con el plásmido pKD46, se transformó con 1 μ l de producto de PCR purificado, se recuperó en SOC adicionado con glucosa durante 4 horas, a 30 °C, 300 rpm. De este cultivo se sembraron 200 μ l en cajas de LB

sólido + gentamicina 5 mg L⁻¹ (Gm⁵), a 37 °C durante 18 horas. Las colonias candidatas se resembraron a 37 °C hasta que se observó pérdida del plásmido pKD46 en cajas de LB sólido + Cb¹⁰⁰ a 30 °C. Las colonias que mostraron el fenotipo de resistencia a Gm⁵ se comprobaron con el método de selección por colonias azules y blancas con X-gal, en el cual las colonias blancas son aquellas que poseen el gen *lacZ* interrumpido (Figura 4). Posteriormente, se comprobó la integración en el locus de *lacZ* por PCR, con un tamaño de banda esperado de 5586 pb y usando como control ADN de la cepa MS01 *frdA*. Con el fin de eliminar el gen de resistencia a gentamicina se transformó la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Gm^R* con 1 µl de plásmido pJW168, que contiene el gen de la recombinasa específica *cre*, la recombinación se lleva a cabo en los sitios *loxP*, se recuperó en SOC adicionado con glucosa durante 4 horas, a 30 °C, 300 rpm. Del cultivo de recuperación de células transformantes se sembraron 200 µl en cajas de LB sólido con IPTG 0.1 mM y Cb¹⁰⁰. Se comprobó la eliminación del casete por PCR y por secuenciación con el fin de verificar que el fragmento que se integró en cromosoma no contiene errores. Para esto, se amplificó un fragmento de 2689 pb con los oligos *lacZ::trcm1* y *MtyrA3* y se mandó a secuenciar con los oligos *lacZ::trcm1*, *pckSEC1*, *pckSEC2*, *pckSEC3*, *pckSEC4* y *pckSEC5*. Los resultados obtenidos de la secuenciación muestran que el fragmento fue integrado en el sitio correcto y que no contiene modificaciones en la parte estructural del gen o en la región reguladora. La cepa obtenida se denominó MS01 *frdA P_{trc}pck* (Figura 6).

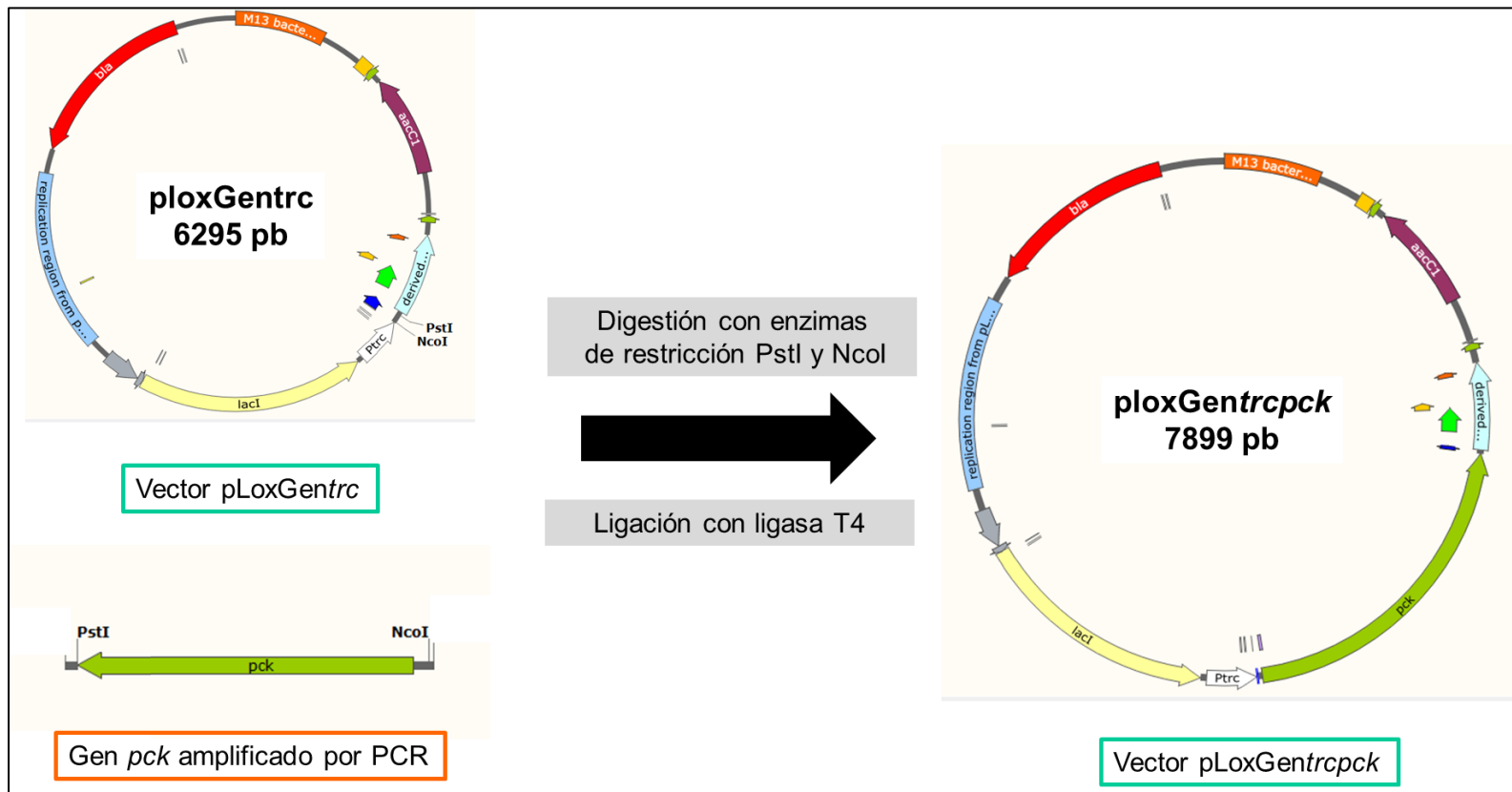
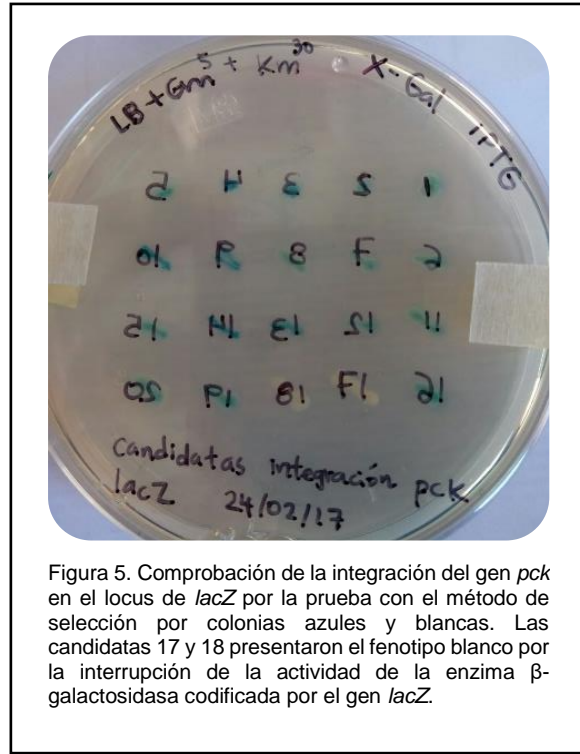
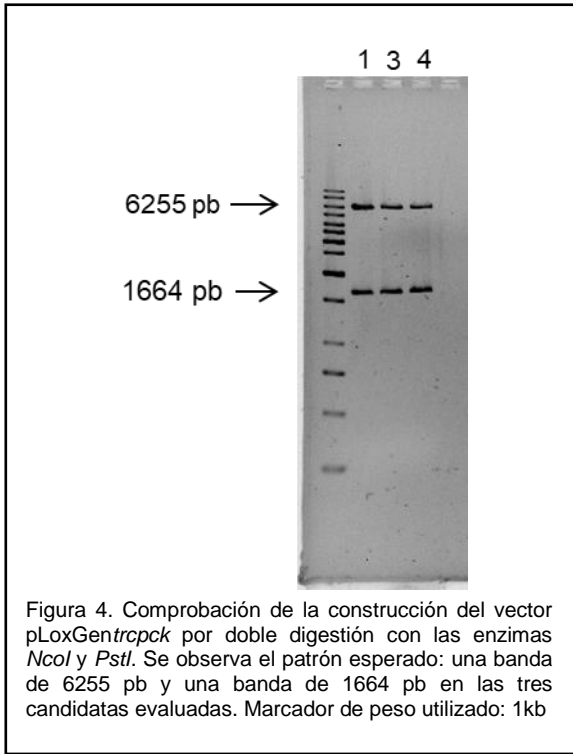


Figura 3. Esquema de la construcción del vector pLoxGentrcpck a partir del vector de integración pLoxGentrc. El gen *pck* se integró río abajo del promotor *trc*. Se obtuvieron tres candidatas las cuales posteriormente se evaluaron por patrones de digestión.



7.2.3. Inactivación cromosomal del gen *ppc*

La enzima Ppc utiliza el mismo sustrato que Pck para llevar a cabo la reacción (Figura 1) y posee mayor afinidad por los sustratos (Tabla 9). Se decidió eliminar el gen *ppc* para evitar la competencia por los sustratos y permitir que Pck actúe como principal enzima de carboxilación del PEP.

Se realizó la inactivación del gen que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa utilizando la metodología de inactivación cromosomal por productos de PCR (Datsenko & Wanner, 2000). A partir del vector pKD3 que posee el gen de resistencia a Cm³⁰ y utilizando los oligos 5' *ppc/cat* y 3' *ppc/cat* se amplificó un fragmento de 1123 pb (Figura 7) que incluye el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm³⁰) flanqueado por los sitios FRT y las homologías con los extremos del gen *ppc*. El producto purificado se transformó en células electrocompetentes de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* previamente transformadas con el plásmido pKD46, las transformantes se seleccionaron en cajas LB + Cm³⁰ y se verificó la integración del casete de resistencia por PCR con los oligos 3' *ppc/cat* y *cm1* (Figura 6). Posteriormente, se seleccionó una candidata de aquellas que dieron positivo en la confirmación de la integración de la resistencia a antibiótico y se procedió a transformar células electrocompetentes de esta candidata con el plásmido pCP20 para la eliminación del casete de resistencia a Cm. Las transformantes que crecieron en cajas LB+ +Cb¹⁰⁰ se seleccionaron ya que portan al plásmido pCP20, se estriaron en cajas de LB sin antibiótico y estas se incubaron a 42 °C durante toda la noche. Posteriormente se picaron las colonias en cajas LB + Cb¹⁰⁰, LB + Cm³⁰ y LB sin antibiótico, con el fin de corroborar la pérdida de plásmido pCP20 y pérdida de casete de resistencia. De las candidatas que no crecieron en las cajas de LB + Cb¹⁰⁰ y LB + Cm³⁰, pero si crecieron en la caja LB sin antibiótico se comprobó pérdida de resistencia a Cm³⁰ por PCR con los oligos *ppcFw* y *ppcRv* (Figura 7). La cepa generada se denominó MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc*.

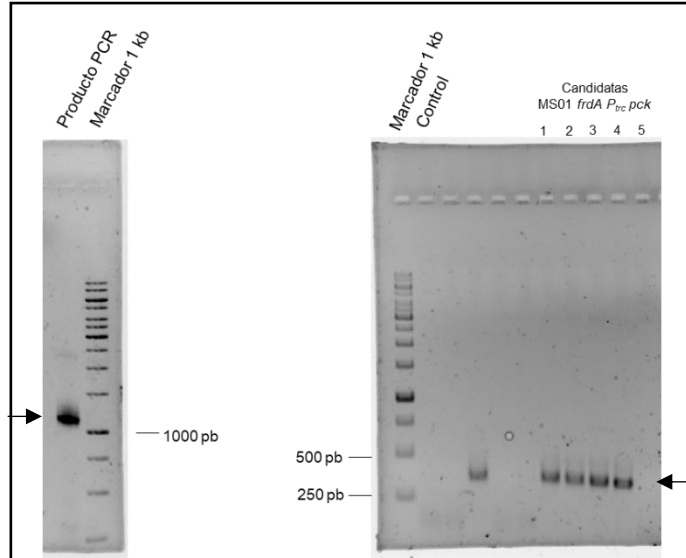


Figura 6. Izq.: Comprobación de tamaño de producto de PCR amplificado a partir del vector pKD3; tamaño fragmento: 1123 pb, se señala con una flecha. Der.: Comprobación de la inserción del casete de resistencia a Cm^{30} en las cepa MS01 *frdA* P_{trc} *pck* utilizando con los oligos 3' *ppc/cat* y *cm1*. El tamaño de banda esperado es de 366 pb y se señala con una flecha. Control negativo MS01 *frdA*. Marcador de peso 1kb.

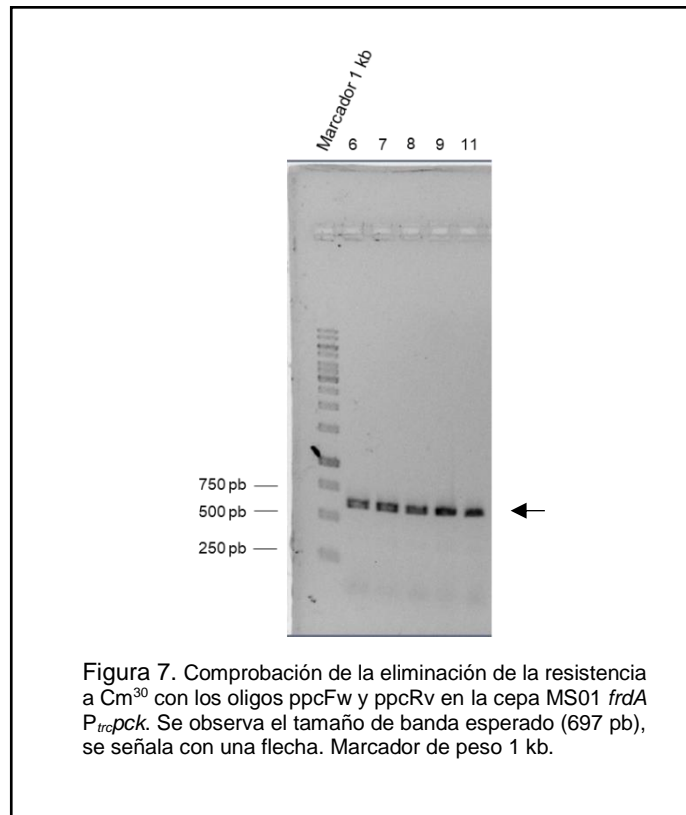


Figura 7. Comprobación de la eliminación de la resistencia a Cm^{30} con los oligos *ppcFw* y *ppcRv* en la cepa MS01 *frdA* P_{trc} *pck*. Se observa el tamaño de banda esperado (697 pb), se señala con una flecha. Marcador de peso 1 kb.

7.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

7.3.1. Caracterización en minifermentadores

Se realizó la evaluación del crecimiento, producción de ácido succínico y consumo de glucosa en minifermentadores o fleakers. A partir del glicerol de la cepa transformada se sembraron cajas de medio AM1 (Tabla 4) suplementado con glucosa (20 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), betaína (1 mM), acetato de sodio (2 g L^{-1}) y agar (12 g L^{-1}), y se incubaron durante 48 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Para el preinóculo, de las cajas se tomó lo equivalente a 3 colonias grandes y se cultivaron durante 3 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 300 rpm en tubos de vidrio 16×150 con 3 ml de medio LB; los antibióticos se añadieron en caso de ser necesarios. Posteriormente, para preparar el inóculo se vertió el contenido de los tubos en los fleakers de 250 ml con 200 ml de medio AM1 suplementado con glucosa (20 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}) y bicarbonato de potasio (2 g L^{-1}). El cultivo se realizó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm , a $\text{pH } 7$ controlado con una mezcla 1:1 de $\text{KOH } 4 \text{ M}$ y $\text{K}_2\text{CO}_3 \text{ } 2 \text{ M}$. Transcurridas 24 horas se tomó el volumen necesario para iniciar el cultivo en los fleakers de evaluación a 0.1 DO_{600} y se centrifugó a $8,000 \text{ rpm}$ durante 5 minutos. Se evaluó por triplicado la capacidad de crecimiento, producción de ácido succínico y consumo de glucosa durante 48 horas en medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm , a $\text{pH } 7$. Se añadió antibiótico o IPTG (0.1 mM) en caso de ser necesario.

Tabla 4. Composición medio mineral AM1

Componente	Concentración
Sales de fosfatos:	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.63 g L^{-1}
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.87 g L^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mM
Betaína	1 mM
Elementos traza:	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0024 g L^{-1}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0003 g L^{-1}
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00015 g L^{-1}
ZnCl_2	0.0003 g L^{-1}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0003 g L^{-1}
H_3BO_3	$0.000075 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$0.000495 \text{ g L}^{-1}$
KCl	2 mM

7.3.2. Caracterización en biorreactores

Se realizó la evaluación del crecimiento y producción de ácido succínico utilizando glucosa como fuente de carbono en biorreactores Applikon ADI 1010/ ADI 1025 (Schiedam, The Netherlands) de 1 L. A partir del glicerol de la cepa transformada se sembraron cajas de medio AM1 sólido de la misma manera que se indica en la sección anterior. Para el preinóculo, de las cajas se tomó lo equivalente a 3 colonias grandes y se crecieron durante 3 horas a 37 °C y 300 rpm en tubos de vidrio 16x150 con 3 ml de medio LB; los antibióticos se añadieron en caso de ser necesarios. Posteriormente para iniciar el inóculo se vertió el contenido de los tubos en matraces de 250 ml con 50 ml de medio AM1 suplementado con glucosa (20 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹) y, como amortiguador de pH, se adicionó MOPS (0.1 M). El cultivo se realizó a 37 °C, 300 rpm. Transcurridas 12 horas se tomó el volumen necesario para iniciar el cultivo en biorreactor a 0.1 DO₆₀₀ y se centrifugó a 8,000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. Se evaluó la capacidad de crecimiento, producción de ácido succínico y otros metabolitos, y consumo de glucosa durante 48 horas en 750 ml de medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹), bicarbonato de sodio (20 g L⁻¹) a 37 °C, 400 rpm, a pH 7. Se añadió antibiótico o IPTG (0.1 mM) en caso de ser necesario. El control de pH se realizó con una mezcla 1:1 de K₂CO₃ 2 M y KOH 4 M.

Para la evaluación de la cepa utilizando xilosa como fuente de carbono se siguió la misma metodología descrita en el párrafo anterior. Se utilizó xilosa a las mismas concentraciones que las utilizadas en la evaluación con glucosa en el cultivo del inóculo en matraz y en el cultivo de evaluación en biorreactor.

Adicionalmente, se realizó una evaluación utilizando mezclas de glucosa-xilosa como fuente de carbono en una proporción de 40 y 30 g/L, respectivamente. La mezcla de glucosa y xilosa se utilizó a las mismas concentraciones que las utilizadas en la evaluación con glucosa en el cultivo del inóculo en matraz (20 g/L totales de sustrato) y en el cultivo de evaluación en biorreactor (40 g/L totales de sustrato).

Para la obtención de colonias a partir de glicerol en cultivos con xilosa y mezclas de glucosa-xilosa se utilizaron cajas de medio AM1 preparadas de la misma manera a la descrita previamente, usando solamente glucosa como fuente de carbono.

7.4. Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó como densidad óptica (OD_{600}) a 600 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 20. Posteriormente se multiplicó por el factor $1 OD_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ para obtener la concentración de biomasa en gramos de peso celular seco (Anexo 13.1) (Sabido et al., 2013).

7.5. Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La determinación de los metabolitos por HPLC se llevó a cabo por cromatografía con H_2SO_4 (5 mM) como fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min en una columna Aminex HPX-87H a 50 °C. La detección se hizo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Empower 2. La concentración de biomasa, azúcar consumida y productos obtenidos fueron corregidos en función al volumen de base adicionado a cada tiempo mediante un factor de dilución (FD).

7.6. Cálculos

- **Corrección de biomasa por factor de dilución**

La concentración de biomasa, ácido succínico producido, sustrato consumido y demás productos obtenidos fueron corregidos en función al volumen de base adicionado a cada tiempo mediante un factor de dilución (FD).

$$FD = (V_i + V_b) / V_i$$

V_i = Volumen inicial del cultivo

V_b = Volumen de base añadido

- **Rendimientos globales**

$$Y_{p/s} = \text{g de producto} / \text{g de sustrato consumido}$$

$Y_{x/s} = X_{MAX} / \text{g de sustrato consumido}$

$Y_{p/x} = \text{g de producto} / X_{MAX}$

$X_{MAX} = \text{g de biomasa producida en etapa exponencial}$

- **Velocidad específica de consumo de sustrato en fase exponencial (q_s)**

$q_s = \mu / Y_{x/s \text{ Exp}}$

$\mu = \text{velocidad específica de crecimiento}$

$Y_{x/s \text{ Exp}} = \text{Rendimiento de biomasa con respecto al sustrato en la fase exponencial}$

- **Velocidad específica de producción en fase exponencial (q_p)**

$q_p = (Y_{p/s \text{ Exp}}) (\mu)$

$\mu = \text{velocidad específica de crecimiento}$

$Y_{p/s \text{ Exp}} = \text{Rendimiento de producto con respecto al sustrato en la fase exponencial}$

- **Velocidad específica de consumo de sustrato en fase estacionaria (q_s)**

$q_s = \text{g de sustrato consumido etapa estacionaria} / (\text{Tiempo etapa estacionaria} * X_{PROM})$

$X_{PROM} = \text{Biomasa promedio en la etapa estacionaria}$

- **Velocidad específica de producción en fase estacionaria (q_p)**

$q_p = \text{g de producto obtenido en etapa estacionaria} / (\text{Tiempo etapa estacionaria} * X_{PROM})$

$X_{PROM} = \text{Biomasa promedio en la etapa estacionaria}$

- **Productividad volumétrica (Q_p)**

$Q_p = \text{g de producto} / \text{Tiempo de cultivo}$

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización de las cepas

8.1.1. Evaluación de la cepa MS01 *frdA* en minifermentadores

La primera evaluación que se realizó a la cepa MS01 *frdA* fue en minifermentadores en medio AM1 con glucosa, de acuerdo con las condiciones señaladas en la sección 6.2.2. Se utilizó a la cepa silvestre MG1655 como control, ya que la cepa parental MS01 no crece en condiciones anaerobias. Las condiciones anaerobias se generaron como consecuencia del consumo de oxígeno de la cepa y se demuestra en el perfil de metabolitos generados. No se inyectaron gases para eliminar el oxígeno del medio, sin embargo, las tapas de los minifermentadores actúan como sellos para evitar la entrada o salida de aire.

A partir de los datos de biomasa generada durante la etapa exponencial se calculó la velocidad específica crecimiento (μ) para cada una de las cepas. Para la cepa control se obtuvo una $\mu = 0.29 \text{ h}^{-1}$, mientras que el valor de μ para la cepa MS01 *frdA* fue de 0.14 h^{-1} (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los parámetros de crecimiento, consumo y producción en la cepa MS01 *frdA* en condiciones anaerobias utilizando glucosa como fuente de carbono

Cepa	Condiciones de cultivo	X_{Max} (g _{DCW} /L)	Biomasa final (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	$Y_{\text{p/s}}$
MS01 <i>frdA</i>	Mini-fermentador	0.07 ±0.03	0.17 ±0.01	0.14 ±0.02	0.25 ±0.03	2.22 ±1.93	0.29 ±0.35
MS01 <i>frdA</i>	Mini-fermentador + K ₂ CO ₃	0.09 ±0.01	0.40 ±0.01	0.10 ±0.03	1.11 ±0.41	5.93 ±1.96	0.19 ±0.04
MG1655	Mini-fermentador	1.03 ±0.16	2.50 ±0.10	0.29 ±0.01	4.35 ±0.09	37.35 ±0.19	0.12 ±0.01
MG1655	Mini-fermentador + K ₂ CO ₃	1.29 ±0.09	1.95 ±0.04	0.37 ±0.02	5.56 ±0.06	38.92 ±0.84	0.14 ±0.01

A las 48 h de cultivo el título de ácido succínico fue de 0.25 g L⁻¹ y 4.35 g L⁻¹, para MS01 *frdA* y MG1655, respectivamente. La cepa MS01 *frdA* consumió 2.22 g L⁻¹ de glucosa comparado con 37.35 g L⁻¹ que consumió la cepa MG1655. Usando estos valores para determinar el rendimiento obtenido en cada una, se observa que para la cepa MS01 *frdA* el rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$) fue de 0.29 g_{Succ}/G_{Glu}, y en la cepa control se obtuvo un rendimiento de 0.12 g_{Succ}/G_{Glu}. En la cepa MS01 *frdA*, además de ácido succínico, se observó producción de ácido pirúvico y ácido acético. Es importante resaltar que el principal producto de la fermentación de esta cepa fue el ácido pirúvico con un título de 1.06 g L⁻¹, cuatro veces mayor que el título de ácido succínico. En la cepa control, no se detectó la presencia de ácido pirúvico al finalizar la evaluación cinética y la distribución de metabolitos varió de lo observado en la cepa MS01 *frdA*. Se detectó que el ácido fórmico fue el producto principal, seguido del ácido acético y del ácido succínico (Figura 8A y B)

A pesar de que la concentración final de ácido succínico producida por la cepa MS01 *frdA* fue 17.4 veces menor a la producida en la cepa control, es interesante notar que el valor de $Y_{p/s}$ fue mayor en la cepa construida. Esto se asocia al genotipo de la cepa MS01 *frdA*, ya que tiene eliminados los genes que codifican para las enzimas de las vías de producción de etanol, ácido láctico, acetil-CoA y ácido fórmico (Fernández-Sandoval, 2012). Lo cual dirige una mayor proporción del carbono hacia la síntesis de ácido succínico, al contrario de lo que sucede en la cepa control, que al ser una cepa silvestre produce una mayor diversidad de metabolitos para mantener el balance redox en condiciones anaerobias. La cepa MS01 depende de manera importante de la vía de producción de ácido succínico para lograr el balance redox (Lin et al., 2005), ya que la reacción que va desde fumarato hacia ácido succínico regenera NAD⁺. En cepas silvestres durante cultivos anaerobios, la síntesis de ácido acético, etanol, ácido láctico y otros productos fermentativos, le permite a la célula regenerar transportadores de electrones y producir energía (Wong et al., 2014).

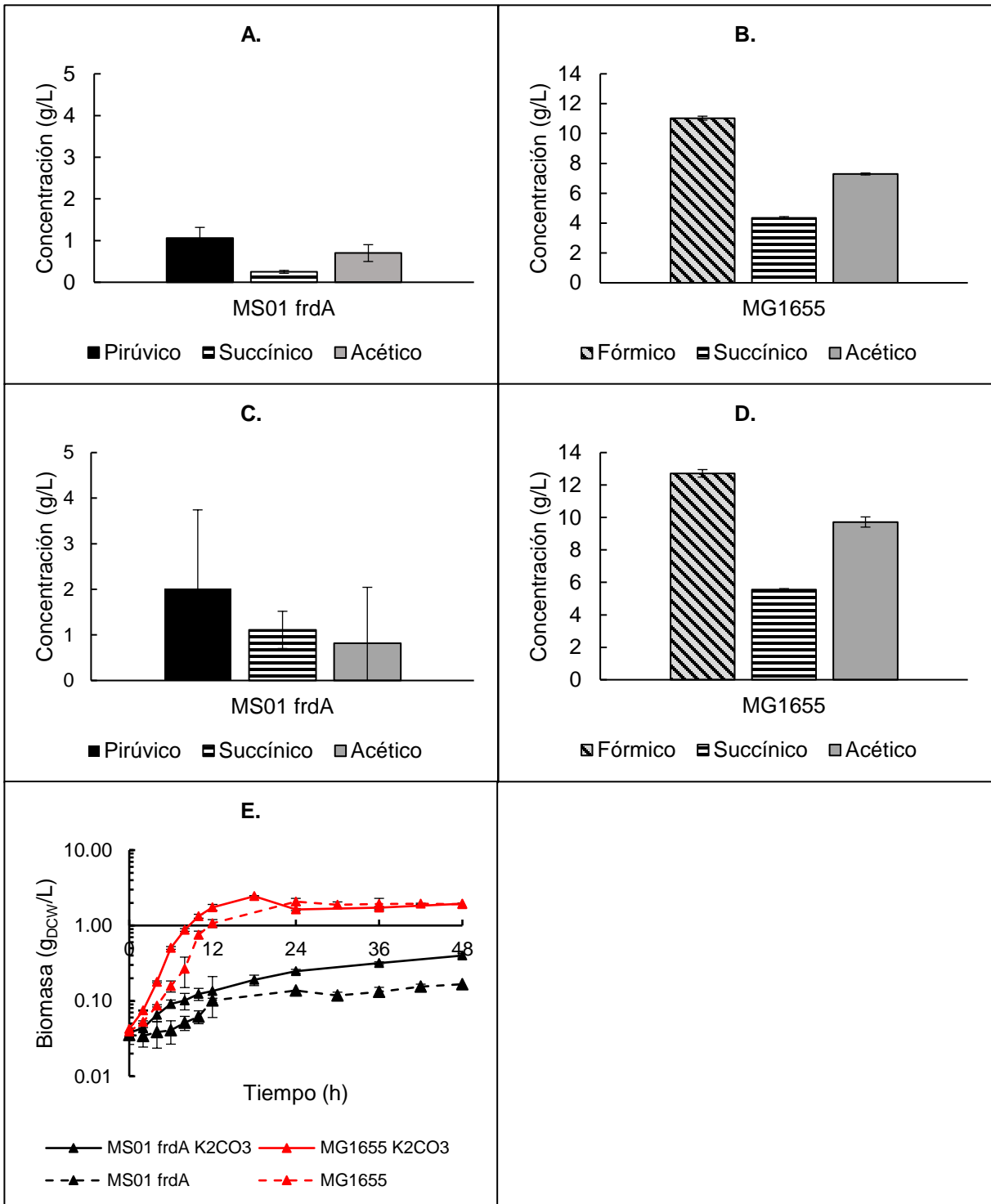


Figura 8. Efecto de la adición de K₂CO₃ en la producción de ácido succínico. A, B) Distribución de los principales metabolitos en la evaluación de la cepa MS01 *frdA* y MG1655 (control). Primera evaluación realizada con NaHCO₃ y sin añadir K₂CO₃ en la mezcla de control de pH. C, D) Distribución de los tres principales metabolitos observada en la evaluación de la cepa MS01 *frdA* y MG1655 (control) utilizando KHCO₃ y la mezcla 1:1 de K₂CO₃ 2M y KOH 4M para el control de pH. En la cepa construida se observa un aumento en la concentración final de ácido succínico con respecto a la primera evaluación. E) Cinética del crecimiento de las cepas MS01 *frdA* y MG1655 con y sin adición de K₂CO₃.

Al analizar las muestras, se observa que el uso de la mezcla 1:1 de K_2CO_3 2 M + KOH 4 M para controlar el pH tiene un efecto que favorece la producción de ácido succínico y en el consumo de glucosa (Figura 8C y D). La cepa MS01 *frdA* produjo 1.11 g L^{-1} de ácido succínico y consumió 5.93 g L^{-1} de glucosa. La cepa control produjo 5.56 g L^{-1} de ácido succínico y consumió 38.92 g L^{-1} de glucosa. La adición de K_2CO_3 incrementó el título final de ácido succínico en la cepa MS01 *frdA* (4.4 veces mayor) y el consumo de glucosa fue 2.7 veces mayor a lo observado en el cultivo en medio AM1 con glucosa, con la adición de $NaHCO_3$ y sin usar K_2CO_3 para el control de pH. Las velocidades específicas de producción y consumo en etapa estacionaria también incrementaron con las nuevas condiciones de cultivo utilizadas (Tabla 5). Se observa que el rendimiento obtenido con las nuevas condiciones de cultivo fue 0.19, el cual es menor a lo observado en la evaluación previa sin K_2CO_3 . Esta disminución en el valor del rendimiento producto/sustrato puede deberse a que la concentración final de biomasa y otros metabolitos también se vieron favorecidas (ácido pirúvico y ácido acético) al incrementar el consumo de glucosa, lo que disminuyó la proporción de carbono dirigida hacia la producción de ácido succínico. Como se reporta en la bibliografía, la presencia de carbonato y/o bicarbonato en el medio de cultivo durante la fermentación favorece la producción de ácido succínico, debido a que la reacción que va de fosfoenolpiruvato hacia oxaloacetato es una reacción de carboxilación que requiere de HCO_3^- como sustrato (Jantama et al., 2008; Kwon et al., 2016).

El efecto de la adición de K_2CO_3 en la mezcla para el control de pH incrementó la concentración de biomasa final producida por la cepa MS01 *frdA*. El valor de biomasa a las 48 h fue de $0.40 \text{ g}_{DCW} \text{ L}^{-1}$, mientras que para la cepa sin K_2CO_3 la biomasa final obtenida fue de $0.17 \text{ g}_{DCW} \text{ L}^{-1}$ (Tabla 5). Sin embargo, a pesar de que se favoreció la producción de biomasa, la velocidad específica de crecimiento obtenida en el cultivo con K_2CO_3 fue de solo 0.10 h^{-1} . Este valor es menor al valor de la μ observada previamente en la cepa MS01 *frdA* (0.14 h^{-1}) en las condiciones iniciales. A pesar de que la velocidad específica de consumo no presentó un incremento, en la evaluación en donde se adicionó $NaHCO_3$ y no se utilizó K_2CO_3 se observa una fase de adaptación de 6 h, mientras que este comportamiento no se presentó en la evaluación cinética

cuando se utilizó KHCO_3 en la preparación del medio y K_2CO_3 en la mezcla de control de pH (Figura 8E).

La distribución de metabolitos no varió de manera importante, los principales metabolitos fueron ácido pirúvico, ácido succínico y ácido acético, con 2.01, 1.11 y 0.82 g L^{-1} , respectivamente (Figura 8C y 9D). De acuerdo a los efectos favorables que se observaron por el uso de bicarbonato y carbonato de potasio en el medio de cultivo, que concuerdan con lo reportado (Jantama et al., 2008) se determinó el uso de KHCO_3 y K_2CO_3 en las cinéticas posteriores.

A pesar de que se observa que la reintegración del gen de la enzima fumarato reductasa le permitió a la cepa crecer en condiciones no aireadas, se considera que su capacidad de producción de ácido succínico y de consumo de glucosa están limitadas en condiciones anaerobias en medio mineral. La cepa no logra consumir toda la glucosa disponible en el medio y solamente utiliza una octava parte del total. Este bajo consumo se ve reflejado en el título final de ácido succínico. Este comportamiento podría estar asociado a una deficiencia en la regeneración de poder reductor o en la síntesis de ATP (Wong et al., 2014).

El rendimiento producto/sustrato observado en la cepa en condiciones anaerobias con medio mínimo utilizando glucosa como fuente de carbono estuvo entre 0.19 - 0.29 $\text{g}_{\text{Succ}}/\text{G}_{\text{Glu}}$ dependiendo de las condiciones utilizadas que se mencionan en este apartado. En la literatura, el rendimiento más alto reportado se obtuvo en una cepa de *E. coli* (ΔldhA , ΔadhE , ΔackA , ΔfocA , ΔpflB , *pck**, *ptsI**) obtenida con ingeniería metabólica combinada con evolución adaptativa ($Y_{p/s} = 1.06 \text{ g}_{\text{Succ}}/\text{g}_{\text{Glu}}$) (Jantama et al., 2008). El rendimiento observado en la cepa MS01 *frdA* es menor a este valor de la literatura. Sin embargo, es importante destacar que mediante la estrategia inicial de reintegrar el gen *frdA*, y la modificación de las condiciones de cultivo, se obtuvo una cepa sobreproductora de ácido succínico. Es necesario implementar y evaluar las estrategias planteadas para dirigir el flujo de carbono a través de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxicinasas hacia la síntesis de ácido succínico.

8.1.2. Evaluación del efecto del uso de condiciones de limitación de oxígeno sobre la producción de ácido succínico

A causa de los resultados obtenidos en el crecimiento de la cepa MS01 *frdA* en condiciones anaerobias, en los cuales se observa baja producción de ácido succínico asociada a poca generación de biomasa y bajo consumo de glucosa, se decidió evaluar la cepa en condiciones de limitación de oxígeno. Para determinar un valor de velocidad de transferencia de oxígeno que favorezca la producción de ácido succínico, se cultivó la cepa a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (OTR – Oxygen Transfer Rate).

Se evaluó la producción de ácido succínico a 1.04, 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹. Los valores de flujo de aireación se calcularon con respecto al volumen de agua desplazado en un tiempo determinado. A partir de los datos de volumen de agua desplazado (vvm) se hizo el cálculo de OTR con respecto a los datos reportados en un trabajo previo del laboratorio, en el cual se trabajó con condiciones de cultivo similares (Fernández-Sandoval, 2012).

Por tratarse de una evaluación para determinar la condición con la cual se trabajaría en las cinéticas posteriores, estos cultivos se realizaron una vez (no por duplicado). Una vez que se determinó la condición que favorece la producción de ácido succínico, se realizó el cultivo por duplicado con la velocidad de transferencia de oxígeno seleccionada.

Se generaron condiciones de limitación de oxígeno pues se observa que el nivel de oxígeno disuelto (DO – Dissolved Oxygen) en el medio fue de cero después de 4-6 h de iniciados los cultivos y continuó así hasta finalizar el cultivo a las 48 h. En estas condiciones la velocidad de transferencia de oxígeno limita la velocidad de consumo de oxígeno, y es por esto que la concentración de oxígeno disuelto se mantiene en cero hasta finalizar el cultivo. Se distinguen dos fases en este proceso, una fase aerobia con una disminución constante del oxígeno disuelto y otra fase donde la concentración de oxígeno disuelto se mantiene en cero, es decir bajo limitación de oxígeno, similar a lo reportado en la literatura (Durnin et al., 2009).

Se evaluó el impacto de las diferentes velocidades de transferencia de oxígeno sobre el título de ácido succínico. Se observa que, independientemente de las OTR, la concentración final de ácido succínico fue mayor a la observada en la cepa MS01 *frdA* en condiciones anaerobias. La concentración de ácido succínico fue de 3.60, 8.85, 9.67, 9.86 g L⁻¹ a 1.04, 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. A partir del valor de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ se mantiene estable la producción de ácido succínico, ya que a mayores velocidades de transferencia de oxígeno no se observa incremento importante en el título final. El rendimiento de producto/sustrato fue de 0.08, 0.18, 0.20, 0.21 g_{Succínico}/g_{Sustrato}, a 1.04, 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, similar a lo observado en condiciones anaerobias. No hay incremento considerable del rendimiento de producto/sustrato a partir de la OTR de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹. En esta condición se consume toda la glucosa en 36 h y se duplica el rendimiento producto/sustrato con respecto a 1.04 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹. El título final de ácido succínico es 8 veces mayor a lo que se obtiene en condiciones anaerobias con la cepa MS01 *frdA*.

Al realizar la comparación de los datos de título de ácido succínico que se producen en las 4 velocidades de transferencia de oxígeno (Figura 9), se observa que un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno no conlleva a un aumento sustancial en la concentración final de ácido succínico, ya que el título de ácido succínico se mantuvo estable a pesar de incrementar la velocidad de transferencia de oxígeno. Se eligió la velocidad de transferencia de oxígeno de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ para evaluar las cepas a construir posteriormente. Altas velocidades de transferencia de oxígeno podrían no favorecer la producción de ácido succínico, debido a que incrementa el flujo por el ciclo de Krebs y la cadena de fosforilación oxidativa, y una mayor proporción del carbono se dirige a la generación de biomasa y CO₂ (Figura 9E) (Yang et al., 2014). En condiciones aeróbicas, se favorece la generación de productos oxidados, la producción de ATP y se pierde una cantidad significativa de carbono hacia la generación de biomasa, CO₂ y ácido pirúvico, que se generó a una mayor velocidad conforme se incrementó la OTR. En condiciones anaerobias, se favorece la producción de compuestos reducidos, se limita la generación de ATP y la pérdida de carbono hacia biomasa, CO₂ y ácido pirúvico (Jain et al., 2015). Las condiciones de limitación de

oxígeno permiten encontrar un balance entre la cantidad de biomasa generada y la producción de compuestos fermentativos de interés.

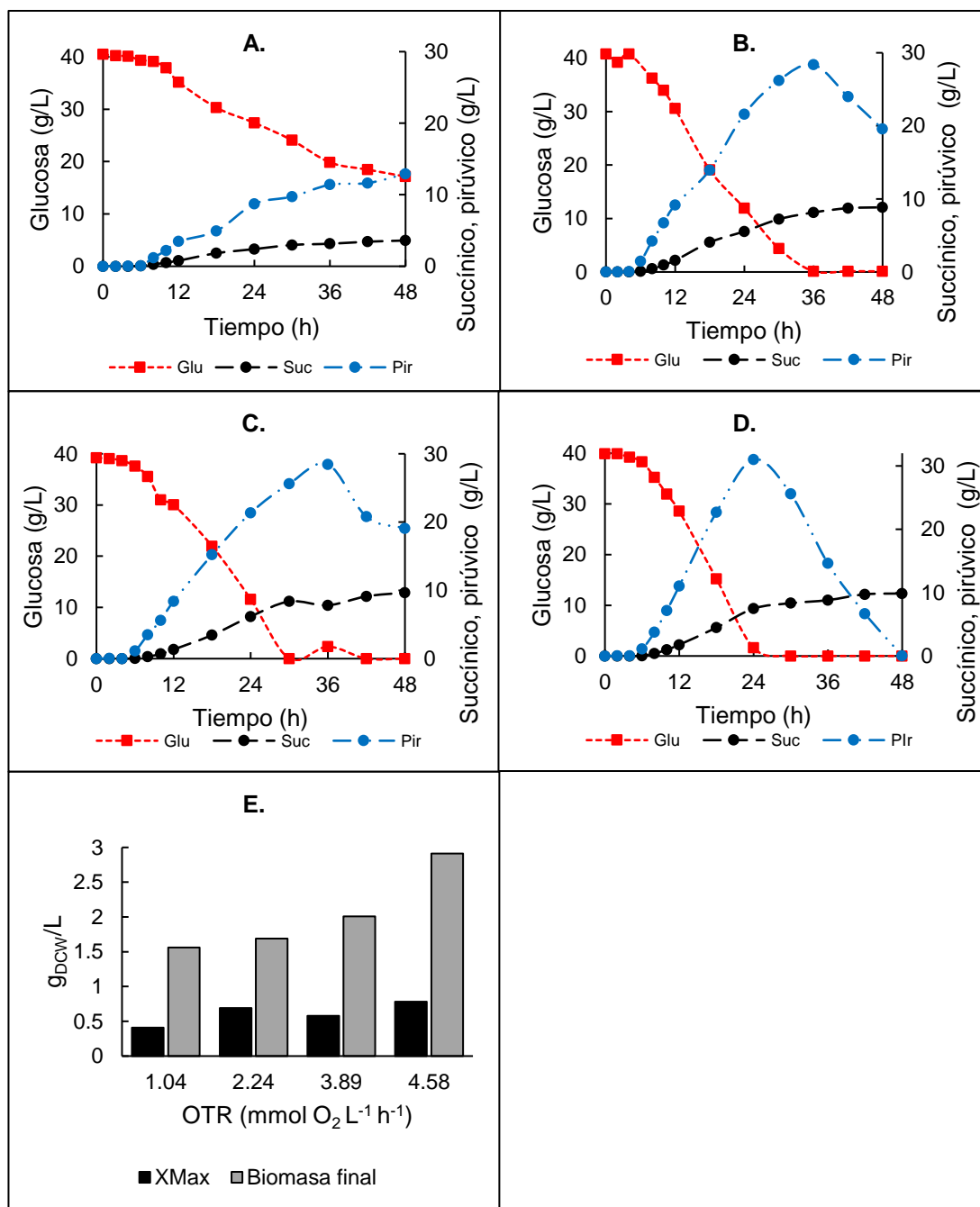


Figura 9. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de glucosa en la cepa MS01 *frdA* a diferentes OTR: A) 1.04, B) 2.24, C) 3.89 y D) 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹. E) Biomasa producida durante la etapa exponencial (X_{MAX}) y biomasa final en las cuatro condiciones de OTR evaluadas

El efecto del uso de condiciones de limitación de oxígeno sobre el consumo de glucosa varió dependiendo de la velocidad de transferencia de oxígeno (Tabla 6). En el cultivo a la mayor velocidad de transferencia de oxígeno evaluada ($4.58 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), la glucosa se consume completamente a las 24 h con una $q_s = 0.45 \text{ g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$.

A la OTR de $3.89 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ la glucosa se consumió totalmente a las 30 h después de que se inició el cultivo ($q_s = 0.54 \text{ g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$). En el valor de $2.24 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ la velocidad específica de consumo de glucosa en etapa estacionaria fue de $0.55 \text{ g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$ y a las 36 h se agotó totalmente el sustrato. A $1.04 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ la cepa no utilizó toda la glucosa disponible, a las 48 h la concentración de glucosa era de 17.15 g L^{-1} . En esta condición ($1.04 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), se observó mayor consumo de glucosa que lo observado en la evaluación en minifermentador en condiciones anaerobias, en los cuales se consumieron 6.133 g L^{-1} . Sin embargo, este valor de OTR no favorece que la cepa crezca lo suficiente para consumir todo el sustrato disponible en el medio en 48 h y esto se ve reflejado en la producción de ácido succínico, ya que se obtuvieron 3.60 g L^{-1} .

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la cepa MS01 *frdA* evaluada a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno (OTR) (Los datos que se muestran son los obtenidos de un solo experimento)

OTR ($\text{mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	X_{Max} ($\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$)	Biomasa final ($\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$)	μ (h^{-1})	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	$Y_{\text{p/s}}$ ($\text{g}_{\text{Succ}}/\text{g}_{\text{Glu}}$)	q_s ($\text{g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$)	q_p ($\text{g}_{\text{Succ}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$)	Q_p ($\text{g}_{\text{Succ}}/\text{L h}$)
1.04	0.41	1.56	0.48	3.60	23.35	0.15	0.46	0.07	0.08
2.24	0.69	1.69	0.53	8.85	40.66	0.22	0.55	0.13	0.18
3.89	0.58	2.01	0.54	9.67	39.19	0.25	0.54	0.14	0.20
4.58	0.78	2.91	0.56	9.86	39.89	0.25	0.42	0.12	0.21

A pesar de que los resultados se obtuvieron de un solo experimento, es interesante notar que la OTR más alta no presenta la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s) más alta. El valor de este parámetro cinético está asociado a la biomasa promedio durante la fase estacionaria, y esto explica porque la q_s no incrementa al aumentar la OTR (Tabla 6, Figura 9E).

Durante los cultivos a 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ se observa una producción de ácido pirúvico considerable, y el comportamiento observado es que primero incrementa la concentración y una vez que se agota la glucosa, la concentración empieza a disminuir. En la mayor OTR la producción de ácido pirúvico llega a la concentración más alta (31.01 g L⁻¹) y también más rápido de las observadas en los cuatro cultivos, e incluso en esta condición de OTR la concentración de ácido pirúvico a las 48 h llega a cero. Se ha reportado en otro trabajo (Yang et al., 2014) un comportamiento similar, en el cual la concentración de ácido pirúvico disminuye cuando se agota la glucosa (Figura 9 B,C y D). En particular, se asocia este comportamiento a que el principal sistema de transporte de glucosa en la cepa utilizada es el sistema PTS y que esto ocasiona la acumulación de ácido pirúvico, como resultado de la fosforilación dependiente de PEP. En el caso de la cepa MS01 *frdA* la acumulación inicial de ácido pirúvico podría estar asociada al transporte de glucosa por el sistema PTS. Una vez que se agota la glucosa, la cepa utiliza al ácido pirúvico acumulado para metabolizarlo. Sin embargo, no queda claro hacia dónde se dirige el flujo de carbono del piruvato consumido, ya que la concentración de ácido succínico en el medio no incrementa de manera importante al disminuir la concentración de ácido pirúvico. Algunas de las vías que podrían estar utilizando al ácido pirúvico son las de producción de ácido acético a través de la enzima piruvato oxidasa (*poxB*) o el complejo de la enzima piruvato deshidrogenasa (*aceEF*) el cual está activo aun en condiciones fermentativas con limitación de oxígeno y contribuye con la formación de NADH y acetyl-CoA (Cassey et al., 1998; Utrilla et al., 2009).

La cantidad de oxígeno que se suministra al medio de cultivo tiene un efecto muy importante sobre el consumo de sustratos, sobre la velocidad específica de crecimiento y sobre la mezcla de productos que se genera. Esto se debe a su papel como aceptor final de electrones y a la consecuente regeneración de poder reductor (Wong et al., 2014). Dependiendo de la cantidad de oxígeno que se transfiera, *E. coli* posee la capacidad de ajustar su metabolismo de aerobio a anaerobio y viceversa. FNR y *arcAB* son los reguladores transcripcionales más importantes involucrados en coordinar esta respuesta hacia los cambios en la disponibilidad de oxígeno (Steinsiek et al., 2011). El control de la expresión de genes, entre varios reguladores

transcripcionales, provee a *E. coli* una mayor flexibilidad para la adaptación a cambios nutricionales y ambientales, como la variación en la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Nikel et al., 2009).

Con los resultados observados en esta etapa del proyecto, se puede concluir que el uso de condiciones de limitación de oxígeno tiene un efecto favorable en el metabolismo de la cepa MS01 *frdA*. En estas condiciones la cepa muestra una mejor capacidad de producción de ácido succínico, de consumo de glucosa y de crecimiento. Se sugiere que esto puede deberse a que la presencia de oxígeno permite que se mantenga el balance redox y que sea posible obtener mayor cantidad de energía necesaria para los procesos celulares. La producción de ácido succínico en condiciones anaerobias permite obtener buenos rendimientos y títulos. Sin embargo, el uso de estas condiciones presenta algunos inconvenientes como el poco crecimiento celular, el mayor tiempo de cultivo y la poca disponibilidad de NADH (Yang et al., 2014). La producción en condiciones de limitación de oxígeno permite acoplar la síntesis de este ácido orgánico a la producción de ATP y otros metabolitos esenciales para el crecimiento, y mantener el balance redox (Wong et al., 2014). El uso de cultivos en condiciones de limitación de oxígeno tiene un gran potencial para aplicarse en la producción de compuestos de interés industrial ya que permite eliminar la necesidad de medios ricos sin perder la capacidad de sintetizar una gran cantidad de productos (Durnin et al., 2009).

Una vez que se definió la OTR de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ como la condición que favoreció la producción de ácido succínico, el experimento se realizó por duplicado y se obtuvieron resultados consistentes. Estos datos se utilizaron posteriormente para comparar a las siguientes cepas evaluadas (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la cepa MS01 *frdA* evaluada a 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ por duplicado.

OTR (mmol O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)	X _{Max} (g _{DCW} /L)	Biomasa final (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Y _{p/s} (g _{Succ} /g _{Glu})	q _s (g _{Glu} /g _{DCW} h)	q _p (g _{Succ} /g _{DCW} h)	Q _p (g _{Succ} /L h)
2.24	0.56 ±0.05	1.40 ±0.21	0.49 ±0.01	9.06 ±0.97	36.02 ±0.99	0.25 ±0.03	0.56 ±0.01	0.17 ±0.01	0.19 ±0.02

8.1.3. Evaluación del efecto de la integración del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa en la producción de ácido succínico.

Como se menciona en la sección de antecedentes, está reportado que el uso de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa (Pck) podría representar una ventaja energética para la cepa MS01 *frdA*, ya que la reacción catalizada por esta enzima aprovecha la energía presente en PEP al obtener una molécula de ATP en la carboxilación de PEP a OAA, lo cual no ocurre en la reacción catalizada por Ppc. Se evaluó el efecto de la integración y expresión del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa en la cepa a la cual se le denominó MS01 *frdA P_{trc}pck*. Inicialmente, se evaluó en minifermentadores de la misma manera que se realizó para la cepa MS01 *frdA*.

La concentración de ácido succínico de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* a las 48 h de cultivo fue de 1.22 g L⁻¹ (Tabla 8). Este título es similar al título que generó la cepa MS01 *frdA* en la evaluación en minifermentador en condiciones anaerobias. La cepa consumió 8.92 g L⁻¹ de glucosa y el rendimiento producto sustrato fue de 0.14 g_{Succ}/g_{Glu}, un poco menor a lo observado en la cepa MS01 *frdA* en condiciones anaerobias. En lo que respecta a la velocidad específica de producción de ácido succínico en etapa estacionaria (*qp*) y de consumo de glucosa en etapa estacionaria (*qs*), se observa una ligera disminución en los valores de estos parámetros cinéticos con respecto a lo que se obtuvo con la cepa MS01 *frdA*, principalmente en la *qs*.

Previamente, en la evaluación de la cepa MS01 *frdA* en minifermentadores en condiciones anaerobias, se sugiere que la capacidad de crecimiento y de producción de ácido succínico están limitadas en estas condiciones, debido a un déficit en la producción de ATP y en la regeneración de cofactores. Al observar los resultados de la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* en estas mismas condiciones es posible que ocurra algo similar, ya que a pesar de la estrategia utilizada no hay un cambio importante en el título final de ácido succínico.

Por tal motivo se decidió que las evaluaciones de las cepas construidas se realizarían solamente en biorreactor a 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ utilizando medio mineral AM1 con glucosa como fuente de carbono. Se indujo con IPTG al inicio de la cinética para la

expresión del gen *pck*. Previamente se evaluó la cepa MS01 *frdA* en biorreactor y se obtuvo un título final de ácido succínico de 9.06 g L⁻¹, casi diez veces mayor a lo que se produjo con esta misma cepa en minifermentadores. Se observó que el uso de condiciones limitadas de oxígeno tiene un efecto favorable sobre la producción de ácido succínico. Por esta razón, se considera que, si la expresión del gen *pck* tiene un efecto sobre la producción de ácido succínico, este será más evidente en condiciones de cultivo con limitación de oxígeno.

En los resultados de la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* en biorreactor se observa que la producción de ácido succínico fue de 7.77 g L⁻¹, se consumieron 45.74 g L⁻¹ de glucosa y el rendimiento de producto/sustrato fue de 0.17 g_{Succ}/g_{Glu} (Tabla 8). La velocidad específica de producción de ácido succínico en etapa estacionaria (*qp*) fue de 0.12 g_{Succ}/g_{DCW} h. Para la velocidad específica de consumo de glucosa en etapa estacionaria el valor observado fue de 0.69 g_{Glu}/g_{DCW} h. La glucosa se agota a las 30 horas y, en este punto la concentración de ácido pirúvico empieza a disminuir. Todo esto se vio reflejado en la concentración de biomasa producida en condiciones de limitación de oxígeno, ya que, al tener mejor capacidad de consumo del sustrato, la cepa es capaz de utilizar esta fuente de carbono para producir una mayor densidad celular (Figura 10).

Tabla 8. Resultados de la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* en minifermentador y en biorreactor.

Condiciones de cultivo	X _{Max} (g _{DCW} /L)	Biomasa final (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Y _{p/s}	qs (g _{Glu} /g _{DCW} h)	qp (g _{Succ} /g _{DCW} h)	Qp (g _{Succ} /L h)
Mini-fermentador + K₂CO₃	0.12 ±0.05	0.46 ±0.02	0.08 ±0.01	1.22 ±0.40	8.92 ±0.43	0.14 ±0.05	0.46 ±0.12	0.09 ±0.01	0.03 ±0.01
Biorreactor 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹	0.82 ±0.08	1.77 ±0.69	0.39 ±0.01	7.77 ±1.23	45.74 ±2.32	0.17 ±0.04	0.69 ±0.15	0.12 ±0.00	0.16 ±0.03

Al comparar estos datos con los datos observados en la evaluación de la cepa en condiciones anaerobias, es evidente que el uso de condiciones de limitación de oxígeno tiene un efecto importante ya que favorece la capacidad de producción de ácido succínico (Figura 11). Este efecto puede explicarse de la misma manera que en el caso de la cepa MS01 *frdA* al utilizar condiciones de limitación de oxígeno. Debido al genotipo de la cepa que no cuenta con los genes para la producción de ácido láctico, etanol, acetil-CoA y ácido fórmico, entre otros, la adición de oxígeno a bajas velocidades de transferencia favorece la generación de energía y la regeneración de cofactores.

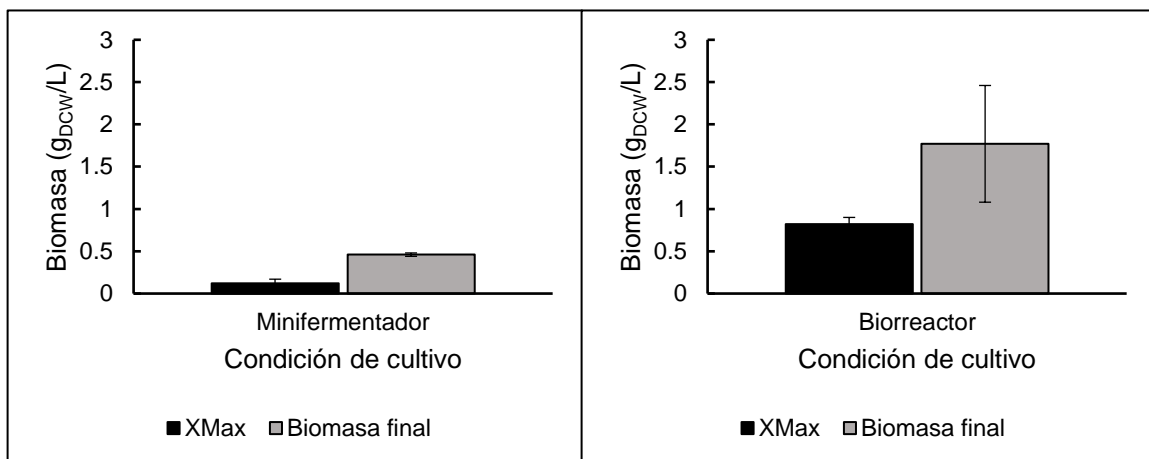


Figura 11. Biomasa producida en fase estacionaria y biomasa final en la cepa MS01 *frdA P_{trc:pck}* en minifermentador y biorreactor

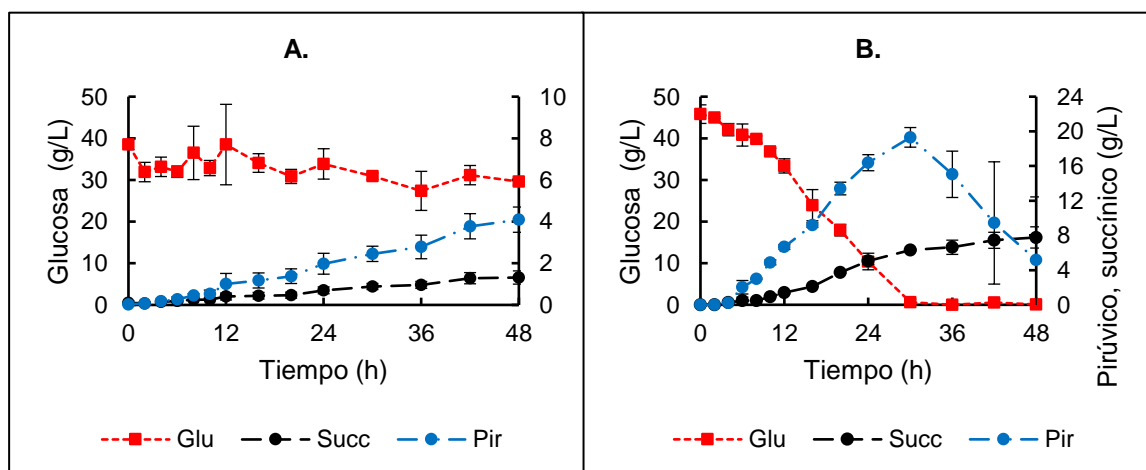


Figura 10. Consumo de glucosa y producción de ácido succínico y pirúvico en la cepa MS01 *frdA P_{trc:pck}* en: A) Minifermentador – condiciones anaerobias, B) Biorreactor – condiciones de limitación de oxígeno

Con respecto a la cepa MS01 *frdA*, el efecto de la integración del gen *pck* en cromosoma bajo control del promotor *trc* en cultivo en biorreactor con condiciones de limitación de oxígeno condujo a una pequeña disminución en el título final. El rendimiento disminuyó, de 0.25 a 0.17 g_{Succ}/g_{Glu}. Es interesante notar que a pesar de que el título del ácido succínico disminuyó, la velocidad específica de consumo de glucosa en fase estacionaria incrementó, el valor para la *q_s* fue de 0.69 g_{Succ}/g_{DCW} h. Acorde con esto, la glucosa se agotó a las 30 h de cultivo, 6 horas antes del tiempo en el que la cepa MS01 *frdA* agotó esta fuente de carbono. Este incremento se considera que puede estar relacionado con la eliminación de la inhibición ocasionada por la acumulación de PEP sobre enzimas de la vía glucolítica como la glucocinasa, fosfofructocinasa y aldolasa (Ogawa et al., 2007; Peng et al., 2004). Está reportado que la presencia de PEP, que es un compuesto de naturaleza altamente energética, ejerce un efecto inhibitorio sobre las enzimas glucolíticas, y se sabe, además, que actúa como molécula señal para controlar el flujo de consumo de glucosa. El sentido fisiológico de la reacción catalizada por Pck es de OAA hacia PEP, sin embargo, considerando la expresión constitutiva de Pck y tomando en cuenta el equilibrio químico se puede favorecer la direccionalidad de la reacción hacia la producción de OAA (Zhang, 2009). Se sugiere que la presencia de las enzimas Ppc y Pck, sabiendo que ambas utilizan PEP como sustrato, no permitió que este metabolito se acumulara en el nodo PEP-OAA-PIR, lo cual podría incrementar el flujo de la vía glucolítica y de esta manera permitió que se incremente la capacidad de consumo de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck*. Se podría proponer que se genera un ciclo inútil en presencia de concentraciones elevadas de OAA, sin embargo no se ha reportado la acumulación de este metabolito en condiciones de cultivo anaerobias en la vía de producción de ácido succínico.

El comportamiento de producción de ácido pirúvico de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* es similar a lo que se observó en la evaluación de la cepa MS01 *frdA*. Se observa que hay producción de ácido pirúvico y una vez que se agota la glucosa, la concentración de este disminuye (Figura 11B). La concentración más alta de este metabolito se encontró a las 30 h (19.31 g L⁻¹), tiempo en el que la concentración de glucosa es de cero. A las 48 h, la concentración de ácido pirúvico observada fue de 5.16 g L⁻¹.

Se esperaba que la expresión del gen *pck* mejorara la capacidad de producción de la cepa. Sin embargo, está reportado que esta enzima compite por los mismos sustratos (PEP y HCO_3^-) con otra enzima, llamada fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc). Aunque ambas catalizan la reacción de carboxilación del PEP, la enzima Pck es más eficiente energéticamente hablando ya que en la reacción se genera una molécula de ATP (Kwon et al., 2016). A pesar de que la afinidad que posee Ppc por PEP es cerca de tres veces mayor a la afinidad de Pck por PEP, la diferencia importante se observa en las afinidades por el HCO_3^- , ya que difieren en dos órdenes de magnitud. Ppc (0.15 mM) muestra una afinidad mayor por el HCO_3^- , a la afinidad que posee la enzima Pck (13 mM) (Tabla 9) (Millard et al., 1996). En la evaluación que se realizó y con los resultados obtenidos se propone que lo que ocurre en esta cepa es que la expresión del gen *pck* no es suficiente para que sea utilizada como principal enzima de carboxilación en el nodo del PEP-PIR-OAA, debido a que la afinidad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa por el sustrato es mucho mayor. No se descarta que la sobreexpresión del gen *ppc* podría tener un efecto positivo sobre la generación de ácido succínico. Esto ha sido evaluado en bacterias como *C. glutamicum* donde a priori se expresa *ppc* para mejorar la capacidad de producción de ácido succínico (Litsanov, 2012).

Tabla 9. Afinidades por diferentes sustratos reportadas para las enzimas Ppc y Pck.

Enzima		Referencia
Ppc (E.C. 4.1.1.31)	$\text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{OAA} + \text{ATP}$	
Km HCO_3^-	0.1 - 0.15 mM	Millard et al., 1996; Kai et al., 1999
Km OAA	No reportado	
Km PEP	0.19 mM	Kai et al., 1999
Pck (E.C. 4.1.1.49)	$\text{OAA} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{ADP}$	
Km HCO_3^-	13 mM	Millard et al., 1996
Km OAA	0.67 mM	Krebs et al., 1980
Km PEP	0.07	Krebs et al., 1980

8.1.4. Evaluación del efecto de la eliminación del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en biorreactor utilizando glucosa fuente de carbono

Se evaluó el efecto de la inactivación del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) sobre la producción de ácido succínico. Esta evaluación se realizó en biorreactor con las condiciones previamente descritas.

La producción de ácido succínico incrementó como consecuencia de la eliminación del gen *ppc*, el título final obtenido fue de 13.50 g L⁻¹. Este título es mayor a lo observado en la cepa MS01 *frdA* y MS01 *frdA P_{trc}pck* evaluadas en las mismas condiciones (9.06 y 7.77 g_{Succ}/L a las 48 h, respectivamente). El rendimiento producto/sustrato incrementó, a un valor de 0.33 g_{Succ}/g_{Glu} (Tabla 10, Figura 12). El efecto conjunto de la eliminación del gen *ppc* aunado a la integración y expresión del gen *pck* incrementó la capacidad de producción de ácido succínico de la cepa, ya que en comparación con la cepa MS01 *frdA*, hubo un incremento del 49% y 74% en comparación con la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* en el título final de ácido succínico. Además, el valor de la productividad volumétrica y el rendimiento producto/sustrato se duplicaron como consecuencia de la eliminación del gen *ppc*, y la productividad específica en etapa estacionaria también incrementó. En la literatura se reporta que la utilización de la enzima Pck le confiere a la cepa la capacidad de generar ATP por cada molécula de PEP que se carboxila, lo que favorece el estado energético global de la célula, lo cual es una ventaja si durante el cultivo se utiliza medio mínimo y condiciones de limitación de oxígeno (Jantama et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbono.

Cepa	X _{Max} (g _{DCW} /L)	Biomasa final (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Y _{p/s} (g _{Succ} /g _{Glu})	qs (g _{GluC} /g _{DCW} h)	qp (g _{Succ} /g _{DCW} h)	Qp (g _{Succ} /L h)
MS01 <i>frdA P_{trc}pck Δppc</i>	0.95 ±0.06	2.42 ±0.38	0.29 ±0.01	13.50 ±0.96	41.52 ±5.03	0.33 ±0.02	0.50 ±0.07	0.19 ±0.03	0.28 ±0.03

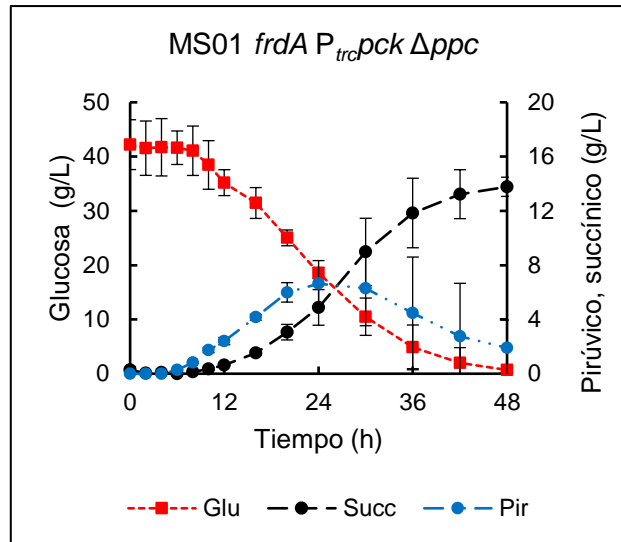


Figura 12. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de glucosa de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en biorreactor.

Al contrario de lo que ocurre en la capacidad de producción, el efecto de la eliminación del gen *ppc* sobre el consumo de sustrato es una reducción en la velocidad específica de consumo en la fase estacionaria con respecto a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck*. La glucosa se agotó a las 48 h de cultivo y el valor de q_s fue de $0.50 \text{ g}_{\text{Glu}}/\text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}$. En la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck* la glucosa se agota a las 30 h y el valor de q_s es mayor (Tabla 8). Sin embargo, la disminución de la q_s no impactó en el valor de q_p , ya que la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* presentó el mayor valor para la velocidad específica de producción de ácido succínico en etapa estacionaria.

En cuanto a la producción de ácido pirúvico se observa un comportamiento interesante ya que a pesar de que hay un incremento de ácido pirúvico y posteriormente la disminución (como ocurre en las cepas anteriores), se observan diferencias en la producción de este metabolito en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* (Figura 12). La primera diferencia es que la concentración de ácido pirúvico que produce la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* es considerablemente menor a lo observado en las cepas MS01 *frdA* y MS01 *frdA P_{trc}pck*. En estas cepas el ácido pirúvico alcanzó concentraciones de hasta 23.73 y 19.31 g L^{-1} , respectivamente, mientras que en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* la concentración máxima de ácido pirúvico fue de 6.63 g L^{-1} . La otra diferencia observada fue que la concentración de este ácido disminuye antes de que la glucosa

se agote. A las 30 h de cultivo, cuando la concentración de glucosa es de 10.50 g L^{-1} se observa que la concentración de ácido pirúvico empieza a disminuir. No es claro a qué se debe el consumo simultáneo de glucosa y ácido pirúvico. Se sugiere que el efecto de la eliminación del gen *ppc* influyó en la manera en que se regula el consumo de las fuentes de carbono, ya que se sabe que esta enzima tiene una importante influencia sobre la distribución del flujo de carbono en el metabolismo central, debido a que mantiene constante la concentración de oxaloacetato en el ciclo de Krebs (Ashworth & Kornberg, 1966; Izui et al., 1981; Peng et al., 2004). Aunque, de manera específica, previamente no se ha reportado que la eliminación de este gen permita el consumo simultáneo de más de una fuente de carbono, por lo que se vuelve importante investigar qué es lo que ocasiona este comportamiento. Se ha reportado previamente que la inactivación de otro gen catabólico como *mgsA* también influye en la eliminación del fenómeno de represión catabólica y el consumo simultáneo de diferentes sustratos (Utrilla et al., 2016).

Los resultados de la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck*, en donde solamente se realizó la expresión del gen *pck*, muestran una ligera disminución en el título y rendimiento de ácido succínico con respecto a MS01 *frdA* (Tabla 8). Al evaluar a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en biorreactor utilizando glucosa como fuente de carbono se demuestra que existe un efecto conjunto de la integración del gen *pck* y de la eliminación del gen *ppc*, ya que pasa de producir 7.77 g L^{-1} a producir 13.50 g L^{-1} (Tabla 10), de esta manera se recupera e incluso se supera la capacidad de producción que posee la cepa MS01 *frdA*. Previamente se ha reportado que es importante la eliminación del gen *ppc* para observar un efecto sobre la producción de ácido succínico en cepas que utilicen la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasa como principal vía de carboxilación (Kwon et al., 2016; Tan et al., 2013; Xia et al., 2015), ya que se sabe que ambas utilizan los mismos sustratos (PEP y HCO_3^-). Aunque ambas catalizan la reacción de carboxilación del PEP, la enzima Ppc tiene mayor afinidad por el HCO_3^- y es capaz de catalizar la reacción de carboxilación a muy bajas concentraciones de esta molécula. También se sabe que Pck es más eficiente energéticamente hablando ya que en la reacción se genera una molécula de ATP (Kwon et al., 2016; Millard et

al., 1996). Este comportamiento reportado concuerda con lo observado en este estudio en la evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc*.

Se ha reportado que el uso de la enzima Pck favorece la producción de ácido succínico incluso en cultivos en los cuales se utiliza otras fuentes de carbono, como el glicerol, ya que la reacción genera una molécula de ATP y favorece la actividad de las vías anapleróticas (Li et al., 2016). Adicionalmente, en el estudio reportado por Zhang et al. (2009) y Jantama et al. (2008), como resultado de la evaluación durante 120 h en cultivo lote se obtuvo un rendimiento de 1.06 gramos de ácido succínico por cada gramo de glucosa consumida, en este trabajo la cepa utiliza a la enzima Pck como principal vía de carboxilación. En su estudio reportan el incremento en la cantidad de ARN mensajero correspondiente al gen *pck*, lo cual indica que aumentó la expresión, y también resaltan que la actividad enzimática de Pck estaba a niveles similares a los de esta enzima en bacterias del rumen. Midieron la actividad de la enzima Ppc y observaron que la actividad de esta enzima era considerablemente baja (0.030 ± 0.003 U /mg proteína) con respecto a la actividad de Pck (8.4 ± 0.7 U /mg proteína). Todo esto como evidencia de que la utilización de Pck le aporta a la cepa una ventaja para el crecimiento en medio mínimo durante cultivos para la producción de ácido succínico.

Así mismo, Zhang et al. (2009) y Jantama et al. (2008) sugieren que la eliminación de la represión catabólica debido a una modificación en el gen *ptsI*, influyó en la utilización de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas. En *E. coli*, Pck actúa principalmente durante la gluconeogénesis y cataliza la reacción de OAA hacia PEP, en presencia de glucosa se reprime la expresión de este gen ya que para su expresión se requiere de la presencia del complejo CRP-cAMP, el cual incrementa su concentración en ausencia de glucosa (Goldie, 1980). Se sugiere que la inactivación del sistema PTS pudiera permitir que Pck actúe en la dirección deseada ($PEP \rightarrow OAA$), y que esto dirija el flujo de carbono hacia la producción de ácido succínico (Jantama et al., 2008; Li et al., 2016; Zhang et al., 2009). Para evitar esa problemática en la expresión del gen gluconeogénico *pck*, en la cepa que se construyó en este proyecto de investigación se indujo la expresión del gen *pck* con IPTG para que la enzima funcionara como principal vía de carboxilación de PEP, en presencia de glucosa y en ausencia de la enzima Ppc.

A pesar de que no se midió la actividad enzimática de estas enzimas, se evaluó el efecto de estas modificaciones sobre la producción de ácido succínico.

A pesar de que en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* hay un incremento en el título final de ácido succínico con respecto a las cepas anteriores, en el rendimiento producto/sustrato y en la productividad volumétrica (Tabla 10) no se observa una mejoría tan importante como la reportada por otros grupos de investigación (Tabla 1) (Jantama et al., 2008; Zhang et al., 2009). Se propone que esto podría estar relacionado con el hecho de que la cepa utilizada tiene un fondo genético que fue sometido previamente a un proceso de evolución adaptativa, durante el cual se perdió una región del cromosoma. Esta región incluye genes relacionados con el metabolismo de los nitratos, la reparación de ADN, la síntesis de polisacáridos de cápsula celular, entre otros (Utrilla et al., 2012). A pesar de que el fondo genético de nuestra cepa de trabajo tiene mutaciones involucradas en el metabolismo central de carbono similares a las reportadas para mejorar la producción de ácido succínico (eliminación de los genes *ldhA*, *pflB* y *adhE*), el hecho de que posea mayor número de mutaciones que involucran otras actividades celulares podría influir en la robustez de la cepa y en su capacidad productora.

8.1.5. Evaluación de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en biorreactor utilizando xilosa y mezclas glucosa-xilosa como fuente de carbono

Se decidió evaluar a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en cultivos con xilosa y una mezcla de glucosa-xilosa, ya que previamente había mostrado un incremento en la producción y rendimiento de ácido succínico en glucosa con respecto a las cepas MS01 *frdA* y MS01 *frdA P_{trc}pck*. Esto nos permitiría comparar la velocidad específica de consumo de ambos azúcares y determinar si el uso de diferentes fuentes de carbono tiene un impacto sobre la producción de ácido succínico.

Durante la evaluación en biorreactor utilizando xilosa como sustrato, se observa un patrón de crecimiento similar a lo observado en esta cepa con glucosa. El valor de X_{MAX} en ambas condiciones es similar. La velocidad específica de crecimiento en etapa exponencial incrementa ligeramente en el cultivo utilizando xilosa como fuente de carbono (pasó de 0.29 h^{-1} a 0.35 h^{-1}) (Tabla 10). La concentración de O_2 disuelto fue de cero 6 h después de que se inició el cultivo, y se mantuvo de esta manera hasta finalizar a las 48 h. El fondo genético utilizado en este trabajo utiliza principalmente el sistema PTS para transportar glucosa y el simporter GatCS184L para transportar xilosa (Utrilla et al., 2012). Se sugiere que el consumo de xilosa, al no depender del uso de PEP como donador de grupos fosforilo, podría ser más favorable energéticamente que el consumo de glucosa. Esto podría explicar porque la velocidad específica de crecimiento fue mayor en el cultivo con xilosa y glucosa-xilosa que lo observado en el cultivo con glucosa.

Tabla 11. Comparación de parámetros cinéticos observados en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en la evaluación con diferentes fuentes de carbono.

Sustrato	X_{Max} (g_{DCW}/L)	Biomasa final (g_{DCW}/L)	μ (h^{-1})	Título succínico (g/L)	Consumo glucosa o xilosa (g/L)	$Y_{p/s}$ ($g_{Succ} / g_{Glu \text{ o } Xil}$)	qs ($g_{Glu \text{ o } Xil} / g_{DCW} h$)	qp ($g_{Succ} / g_{DCW} h$)	Qp ($g_{Succ} / L h$)
Glucosa	0.95 ± 0.06	2.42 ± 0.38	0.29 ± 0.01	13.50 ± 0.96	41.52 ± 5.03	0.33 ± 0.02	0.50 ± 0.07	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.03
Glucosa + Xilosa	0.70 ± 0.10	1.93 ± 0.01	0.37 ± 0.02	12.52 ± 1.5	34.44 $\pm 2.14^{**}$	0.37 $\pm 0.07^{**}$	0.54 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.03
Xilosa	0.88 ± 0.08	1.79 ± 0.03	0.35 ± 0.01	10.34 ± 2.93	30.95 ± 0.91	0.33 ± 0.08	0.47 ± 0.06	0.18 ± 0.00	0.22 ± 0.06

El título final de ácido succínico fue de 10.34 g L⁻¹, esta concentración fue menor a la obtenido a partir de glucosa con esta misma cepa. El rendimiento fue similar a lo observado en la evaluación de la cepa utilizando glucosa como fuente de carbono, $Y_{p/s} = 0.33$ (Tabla 11). De la misma manera, la velocidad específica de producción de ácido succínico (q_p) fue similar. Esto es evidencia de que la cepa tiene la capacidad de producir ácido succínico utilizando glucosa o xilosa como fuente de carbono (Figura 13).

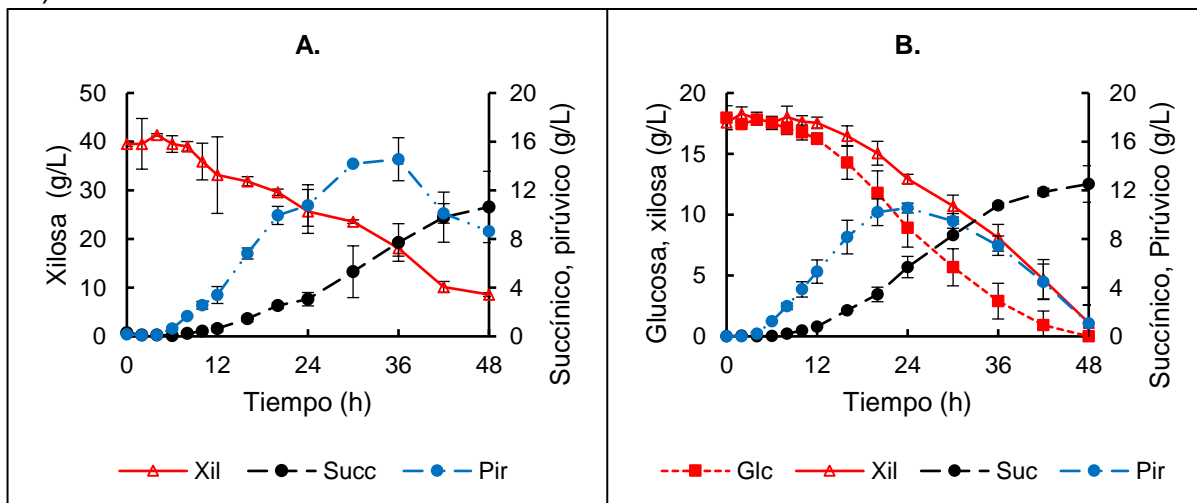
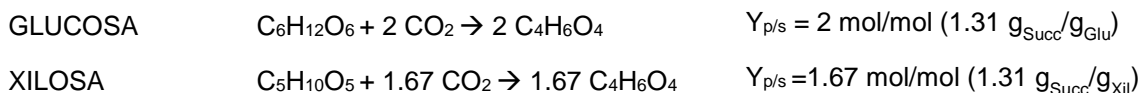


Figura 13. Producción de ácido succínico y ácido pirúvico, y consumo de sustrato en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en cultivos en biorreactor con medio AM1 adicionados con A) Xilosa y B) Glucosa + xilosa.

Durante la evaluación en biorreactor la cepa consumió 30.95 g L⁻¹ de esta fuente de carbono. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el cultivo con glucosa, la xilosa no se consumió en su totalidad, y a las 48 horas de cultivo la concentración fue de 8.60 g L⁻¹. Esto es interesante porque a pesar de que se consumieron alrededor de 10 g L⁻¹ menos de xilosa, el rendimiento y la q_p obtenidas en esta fuente de carbono fueron iguales a lo observado en el cultivo con glucosa. La velocidad específica de consumo en ambas fuentes de carbono es similar, este parámetro está asociado a la biomasa en etapa estacionaria y debido a que en el cultivo en glucosa la cepa produce más biomasa que en xilosa, se observa el mismo valor en ambos sustratos aun cuando la concentración de azúcar consumida fue diferente. Los rendimientos máximos teóricos a partir de cada una de las fuentes de carbono se muestran a continuación.



El efecto del uso de xilosa como fuente de carbono en la producción de ácido pirúvico difiere de lo observado previamente en esta cepa cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Se observa que al utilizar xilosa la cepa produce más ácido pirúvico, y la concentración máxima obtenida fue más del doble (14.56 g L^{-1}). Adicionalmente, se observa una disminución en la concentración de ácido pirúvico a pesar de que la xilosa no se agota. A las 48 h de cultivo el título de ácido pirúvico es de 8.64 g L^{-1} , a diferencia de lo observado en el cultivo con glucosa, en el cual la concentración de ácido pirúvico es de cero al finalizar la evaluación. Se propone que la cepa incrementa la producción de ácido pirúvico para obtener ATP a partir de la reacción catalizada por PykAF, ya que se sabe que el rendimiento de ácido succínico (y por lo tanto de ATP a partir de Pck) es menor a partir de pentosas que a partir de hexosas (Xia et al., 2015).

Al evaluar a la cepa en biorreactor con mezclas de glucosa-xilosa, se produjeron 12.52 g L^{-1} de ácido succínico (Tabla 11). Este título es similar a lo obtenido en la cepa en la evaluación en biorreactor con solo glucosa o xilosa (Figura 14). Así mismo, el rendimiento producto/sustrato y la velocidad específica de producción de ácido succínico es similar a las observadas previamente en los cultivos con glucosa y xilosa.

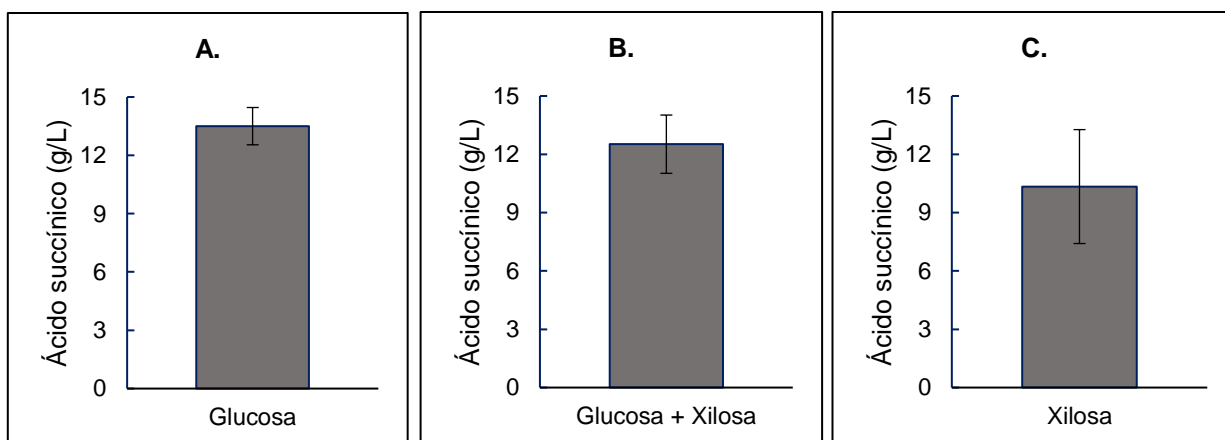


Figura 14. Producción de ácido succínico en la cepa MS01 *frdA P_{trc} pck Δppc* en las evaluaciones utilizando: A) Glucosa, B) Glucosa + Xilosa y C) Xilosa

En cuanto al consumo de sustratos se esperaba que la cepa consumiera primero la glucosa y, una vez que esta se agotara iniciaría el consumo de xilosa. Sin embargo, el resultado que se observa es que ambos azúcares se consumieron de manera

simultánea (Figura 13B) y ambos se agotan a las 48 h de cultivo. En total, tomando en cuenta ambos azúcares, la cepa consumió 34.44 g L⁻¹ de sustrato (Tabla 11).

A las 24 h de cultivo la cepa llegó a una concentración de 10.55 g L⁻¹ de ácido pirúvico en el cultivo en biorreactor utilizando glucosa y xilosa como fuente de carbono. Esta concentración es mayor a lo observado en glucosa y menor a lo observado en xilosa. Se sugiere que el título de ácido pirúvico no es tan alto al usar ambos azúcares porque al haber glucosa en el medio la necesidad de generar ATP a partir de la reacción de PEP→PIR es menor que en el cultivo utilizando solamente xilosa (Xia et al., 2015). Se observa que después de este tiempo la concentración de ácido pirúvico empieza a disminuir, cuando aún hay glucosa y xilosa en el medio. A partir de este punto se presenta un consumo simultáneo de estos tres compuestos. Previamente, en la evaluación de la cepa utilizando solamente una fuente de carbono (glucosa o xilosa) también se detecta que el consumo de ácido pirúvico inicia antes de que se agote el sustrato principal. Este comportamiento es relevante ya que en *E. coli* el sistema de transporte de glucosa PTS reprime la expresión de genes involucrados en el transporte de otras fuentes de carbono (Gosset, 2005; Liang et al., 2015; Wang et al., 2006), por lo cual el uso preferencial de glucosa es una de las limitaciones más importantes al momento de utilizar cultivos con diferentes fuentes de carbono (Wu et al., 2016).

La cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* que se construyó a partir de la MS01 (Fernández-Sandoval, 2012) no tiene eliminado ninguno de los genes que codifican para los componentes del sistema PTS (*ptsG*, *ptsH*, *ptsI*), sin embargo, tiene la capacidad de consumir glucosa y ácido pirúvico de manera simultánea, y glucosa, xilosa y ácido pirúvico de manera simultánea. Al evaluar a la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck*, antecesora de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* en las mismas condiciones de cultivo, no se observó este comportamiento. No hay reportes donde se mencione que la eliminación del gen *ppc* tenga algún efecto en el fenómeno de represión catabólica. Sin embargo, se sabe que Ppc es una enzima importante en cuanto a la regulación del flujo de carbono en el nodo PEP-PIR-OAA, ya que lleva a cabo funciones anapleróticas y mantiene estable el nivel de oxaloacetato en el ciclo de Krebs (Izui et al., 1981; Kameshita et al., 1979). Esta reportado que la eliminación de *mgsA*, que codifica para la enzima metilgloxal

sintasa de *E. coli*, afecta el consumo simultáneo de fuentes de carbono debido a que incrementa la concentración de la proteína reguladora CRP (Utrilla et al., 2016). Además, PEP es un metabolito de gran importancia en el metabolismo central de *E. coli*, ya que además de ser utilizado como donador de grupos fosforilo para el transporte de azúcares, está involucrado en la regulación de muchas enzimas por su naturaleza altamente energética, actúa como inhibidor competitivo de la glucocinasa y de la fosfoglucoisomerasa, y como inhibidor no competitivo de la fosfofructocinasa y de la aldolasa (Ogawa et al., 2007; Peng et al., 2004). En el nodo PEP-PIR-OAA están implicadas varias reacciones que se encargan de vincular las principales vías de metabolismo central y es en este punto, en donde se distribuye el flujo de carbono hacia catabolismo, anabolismo u obtención de energía (Sabido et al., 2014b).

A pesar de la importancia que tiene este punto en el metabolismo central del carbono, la información que se obtuvo en este estudio no es suficiente para determinar de manera precisa la razón del consumo simultáneo de glucosa y ácido pirúvico, y de glucosa, xilosa y ácido pirúvico. Sin embargo, el resultado obtenido es bastante importante y es esencial investigar a fondo sobre este fenómeno. Generalmente, las estrategias utilizadas para la generación de microorganismos capaces de cointegrar diferentes fuentes de carbono incluyen la inactivación del sistema PTS de transporte de glucosa, el incremento del flujo a través de la vía de pentosas fosfato o el uso de consorcios microbianos en los que cada uno de los microorganismos utilizados esté enfocado en el consumo de un solo sustrato, entre otras (Li et al., 2016; Liang et al., 2015; Xia et al., 2015). En nuestro caso, las modificaciones genéticas realizadas en la cepa (integración de *frdA*, integración de *pck* y eliminación de *ppc*) no se planearon inicialmente con el fin de obtener consumo simultáneo de varias fuentes de carbono. Sin embargo, es evidente que la eliminación de un gen como *ppc* y la sobreexpresión de otro como *pck* no son triviales y que el efecto de estas modificaciones puede incidir en el metabolismo general y la regulación de ciertos genes.

En el contexto global, la cepa generada tiene una capacidad de producción de ácido succínico inferior a lo reportado previamente (Tabla 1). Las bacterias del rumen tienen la capacidad natural de producir ácido succínico (Kwon et al., 2016), por lo que los

rendimientos que se obtienen al utilizar cepas silvestres de *Actinobacillus succinogenes* o *Anaerobiospirillum succiniciproducens* son muy buenos. Sin embargo, como se señala en la Tabla 1, estos microorganismos requieren que los medios utilizados contengan licor de maíz fermentado o extracto de levadura adicional a la glucosa agregada. Esto tiene la desventaja de hacer más costoso los procesos de producción, además, las estrategias de cultivos no son tan sencillas ya que en algunos casos se requiere de un sistema para burbujear CO₂, mantener condiciones de anaerobiosis estrictas o incluso realizar fermentaciones en dos fases. Esto hace que el uso de microorganismos del rumen como biocatalizadores no sea tan atractivo si lo que se desea es reducir costos y utilizar técnicas de cultivo simples. Sin embargo, se ha reportado la expresión de genes provenientes de otros microorganismos para la producción de ácido succínico en *E. coli*; entre estos se reporta la expresión de *pck* de *Actinobacillus succinogenes* (Kim, 2004), la expresión de *pyc* de *Rhizobium etli* que codifica para la piruvato carboxilasa (Vemuri, 2002a), o la piruvato carboxilasa de *Lactococcus lactis* (Sánchez, 2005). El uso de *E. coli* como microorganismo de producción permite hacer uso de medios mínimos y condiciones aerobias o anaerobias. Se ha reportado que, en cultivo en lote utilizando medio AM1 y glucosa como fuente de carbono, la cepa de *E. coli* KJ060 tuvo un rendimiento producto/sustrato de 1.06 g_{Succ}/g_{Glu} (Jantama et al., 2008). Este grupo de investigación asocia estos resultados principalmente a una modificación que le permite a la cepa utilizar a la enzima Pck como principal vía de carboxilación en el nodo PEP-PIR-OAA, lo cual es similar a lo que ocurre en las bacterias del rumen. En nuestro caso se realizó la integración del gen *pck* y la eliminación del gen *ppc*, con el fin de que la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* dirigiera una mayor cantidad de carbono hacia la vía de síntesis de ácido succínico. Sin embargo, en nuestra cepa el rendimiento más alto obtenido en cultivo utilizando glucosa es tres veces menor a lo reportado por Jantama (2008).

Algunas de las principales estrategias de ingeniería de vías metabólicas incluyen la eliminación de los genes *ldhA*, *pf1B*, *ackA*, *pta* *adhE* y *ptsG* con el fin de reducir la formación de subproductos como el etanol, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético o inactivar el sistema de transporte de glucosa PTS para incrementar la cantidad de PEP disponible (Tabla 1). Los rendimientos obtenidos en estas cepas están en el rango

de 0.76 a 1.10 g_{Succ}/g_{Glu}. Al comparar estos resultados con lo obtenido con la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc*, se sugiere que no se logra tener rendimientos similares debido a que el genotipo de la cepa además de tener inactivadas las vías de producción de otros subproductos, también se sometió a un proceso de evolución adaptativa. Podría ser que, en conjunto, todas estas mutaciones no permitan obtener un microorganismo tan robusto como el reportado por otros grupos y que, aún en condiciones de cultivo similares, no se logre tener los mismos rendimientos. El fondo genético del cual se partió en este proyecto ha sido utilizado previamente en el grupo de trabajo para la producción de ácido láctico, etanol, PHB, entre otros, (Fernandez-Sandoval et al., 2012; Centeno-Leija et al., 2014; Utrilla et al., 2016) con buenos rendimientos sin embargo el resultado obtenido con el ácido succínico no fue el esperado ya que no se obtuvieron rendimientos similares a los reportados en la literatura. Una alternativa que permitiría evaluar el efecto de las modificaciones genéticas propuestas en este proyecto sería realizar las mutaciones puntuales involucradas en el mejoramiento de la capacidad de producción de ácido succínico en una cepa silvestre como *E. coli* MG1655. No obstante, la información obtenida en el estudio de la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* es interesante, ya que posee la capacidad de producir ácido succínico en medios mínimos y, de consumir glucosa y xilosa de manera simultánea. Como ya se comentó anteriormente, los resultados obtenidos en esta tesis indican que es necesario estudiar a nivel de regulación el efecto de la eliminación de *ppc* en *E. coli* en el contexto del fenómeno de represión catabólica.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- La reintegración del gen *frdA* en la cepa no fermentativa MS01 permitió que creciera en condiciones anaerobias. Esto se debe a que recuperó la capacidad de regenerar cofactores a través de la vía de producción de ácido succínico. En estas condiciones, la cepa MS01 *frdA* produjo 1.11 g L⁻¹ de ácido succínico. El producto principal en estas condiciones de fermentación fue el ácido pirúvico.
- La cepa MS01 *frdA* se ve limitada en su capacidad de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido succínico en condiciones anaerobias, debido quizás a una limitada regeneración de cofactores y producción de ATP.
- Se realizó un barrido a cuatro diferentes velocidades de transferencia de oxígeno con el fin de determinar la que favoreciera la producción de ácido succínico. Se determinó 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ como la condición de transferencia de oxígeno que favorece la producción de ácido succínico en biorreactor en medio mínimo. La cepa MS01 *frdA* produce 9.06 g L⁻¹ de ácido succínico a 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ en medio mínimo con glucosa.
- El efecto conjunto de la integración del gen *pck* bajo control del promotor *trc* y la eliminación del gen *ppc* favoreció el incremento en el título final de ácido succínico, en la productividad volumétrica y en el rendimiento producto/sustrato en biorreactor en medio mínimo con glucosa. El título final de ácido succínico para la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* utilizando glucosa como fuente de carbono fue de 13.50 g L⁻¹. Este resultado es el título más alto que se observó en las cepas evaluadas en la presente tesis. En cuanto a la comparación de las cepas construidas en este proyecto tanto el valor de título y como el de rendimiento fueron importantes, sin embargo, con cepas generadas en otros grupos de investigación consideramos más importante comparar los valores de rendimiento obtenido.
- Un resultado importante fue que la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* es capaz de consumir glucosa, xilosa y ácido pirúvico de manera simultánea. Sin embargo, no queda claro cuál es el mecanismo celular involucrado en este fenómeno.

- El rendimiento producto/sustrato observado en la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* es muy similar al utilizar glucosa, xilosa o la mezcla glucosa-xilosa como fuente de carbono.

10. CONCLUSIONES

- La integración del gen *frdA* en la cepa no fermentativa MS01 restauró la capacidad de crecer en condiciones anaerobias, sin embargo, se considera que su capacidad de producción de ácido succínico y de consumo de glucosa están limitadas en cierta medida en condiciones anaerobias en medio mineral. La cepa no logra consumir toda la glucosa disponible en el medio y solamente utiliza una octava parte del total. Este bajo consumo se ve reflejado en el título final de ácido succínico. Este comportamiento podría estar asociado a una deficiencia en la regeneración de poder reductor y/o en la síntesis de ATP.
- El uso de cultivos en biorreactor en condiciones de limitación de oxígeno tiene un efecto favorable en el metabolismo de la cepa MS01 *frdA*, ya que en estas condiciones la cepa muestra una mejor capacidad de producción de ácido succínico, de consumo de glucosa y de crecimiento a lo observado en minifermentadores en condición anaerobia. Se sugiere que esto puede deberse a que la presencia de oxígeno permite que se mantenga el balance redox y que sea posible obtener mayor cantidad de energía necesaria para los procesos celulares.
- El efecto conjunto de la eliminación del gen *ppc* aunado a la integración y expresión del gen *pck* incrementó la capacidad de producción de ácido succínico de la cepa. La cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* obtuvo el mayor título de ácido succínico entre las cepas construidas. Se considera que este resultado está asociado a que el uso de la enzima Pck como principal enzima de carboxilación le aporta a la cepa una ventaja energética y le permite dirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de ácido succínico.
- La cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* es capaz de consumir glucosa, xilosa y ácido pirúvico de manera simultánea, pero no queda claro cuál es el mecanismo celular involucrado en este fenómeno. Las modificaciones genéticas realizadas en la cepa no se planearon inicialmente con el fin de obtener consumo simultáneo de varias fuentes de carbono. Sin embargo, es evidente que estas modificaciones pueden tener efectos importantes en el metabolismo general de la cepa.

- Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que es posible producir compuestos de interés industrial con medios de cultivo mínimos, condiciones de fermentación simples y utilizando fuentes de carbono económicas y abundantes.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc* a diferentes concentraciones de transferencia de oxígeno, con el fin de determinar la mejor condición para la producción de ácido succínico.

- Determinar hacia donde se dirige el flujo de ácido pirúvico producido y consumido en las cepas, ya que los datos obtenidos en este estudio no son suficientes para saber qué otros productos se están obteniendo durante el consumo de este compuesto. Esto se podría realizar con técnicas de espectrometría de masas o metabólica.

- Reducir los niveles de producción de ácido pirúvico, ya sea mediante la expresión de genes como *maeA* o *pyc* (gen heterólogo) para favorecer la conversión del ácido pirúvico en ácido málico u oxaloacetato; o la eliminación del gen *pykF* para evitar la formación de ácido pirúvico a partir de fosfoenolpiruvato. Y de esta manera dirigir el flujo de carbono hacia intermediarios de la vía de producción de ácido succínico.

- Eliminar el gen *ptsG* y *galR* con el fin de evaluar el efecto de esta modificación sobre la producción de ácido succínico. En este proyecto se construyó la cepa MS01 *frdA P_{trc}pck Δppc ΔptsG ΔgalR*, pero los resultados observados fueron la pérdida de la capacidad de crecimiento en medio AM1 utilizando glucosa o xilosa como fuente de carbono. Se sugiere la secuenciación de la cepa para determinar si la pérdida de viabilidad está asociada a alguna mutación de la que no se tiene conocimiento. Adicionalmente, debido a que la eliminación de *ppc* afectó el fenómeno de represión catabólica ejercido por la glucosa, es posible que la eliminación conjunta de *ppc* y *ptsG* generen efectos de regulación que afecten el crecimiento de las cepas. En consecuencia, los efectos de regulación ocasionados por la eliminación de *ppc* deben ser estudiados en detalle. Así mismo, la inactivación del sistema PTS y el uso de un transportador de glucosa no dependiente del uso de PEP como donador de grupos fosforilo, podría incrementar la cantidad de PEP disponible para ser utilizado como precursor de ácido succínico en la vía propuesta en este estudio, lo cual podría mejorar la capacidad de producción de ácido succínico.

12. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Ashworth, J. M., Kornberg, H. L. (1966). The anaplerotic fixation of carbon dioxide by *Escherichia coli*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 165 (999), 179–188.
- Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252(5013), 1668–1675.
- Cassey, B., Guest, J. R., Attwood, M. M. (1998). Environmental control of pyruvate dehydrogenase complex expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 159(2), 325–329.
- Centeno-Leija, S., Huerta-Beristain, G., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A. (2014). Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 687–696.
- Cheng, K., Wang, G., Zeng, J., Zhang, J. (2013). Improved succinate production by metabolic engineering. *BioMed Research International*, 2013 (2013).
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.
- Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J. J., Zygorakis, K., Campbell, P., Gonzalez, R. (2009). Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(1), 148–161.
- Fernández-Sandoval, M. T. (2012). Producción de etanol en presencia de acetato con *Escherichia coli* etanológica en cultivos en lote y continuos utilizando mezclas glucosa-xilosa e hidrolizados de hemicelulosa. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Goldie, A.H., Sanwal, B.D. (1980). Genetic and physiological characterization of *Escherichia coli* mutants deficient in phosphoenolpyruvate carboxykinase activity. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1115–1121.
- Gosset, G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 4(14), 1–11.
- Guettler, M.V., Jain, M.K., Rumler, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods of obtaining variants. Patent US 5,573,931.
- Hong, S., Lee, S. (2001). Metabolic flux analysis for succinic acid production by recombinant *Escherichia coli* with amplified malic enzyme activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(2), 89–95.
- Izui, K., Taguchi, M. K., Morikawa, M., Katsuki, H. (1981). Regulation of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. II Kinetic studies with a reaction system containing physiological concentrations of ligands. *The Journal of Biochemistry*, 90(5), 1321–1331.
- Jain, R., Huang, J., Yuan, Q., Yan, Y. (2015). Engineering microaerobic metabolism of *E. coli* for 1,2-propanediol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(7), 1049–1055.

- Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2008). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5), 1140–1153.
- Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2010). Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Jensen, K. F. (1993). The *Escherichia coli* K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *Journal of bacteriology*, 175(11), 3401–3407.
- Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K., Izui, K. (1999). Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 823-828.
- Kameshita, I., Tokushige, M., Izui, K., Katsuki, H. (1979). Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Affinity labeling with bromopyruvate. *The Journal of Biochemistry*, 86(5), 1251–1257.
- Kim, P., Laivenieks, M., Vieille, C., Zeikus, J.G. (2004). Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2) 1238–1241.
- Krebs, A., Bridger, W.A. (1980). The kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Biochemistry*. 58(4), 309-318.
- Kwon, Y. D., Lee, S. Y., Kim, P. (2016). Influence of gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* under high bicarbonate condition. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(9), 1448–1452.
- Lee, S.J., Song, H., Lee, S.Y. (2006). Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1939–1948.
- Li, Q., Wu, H., Li, Z., Ye, Q. (2016). Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology*, 218, 217–223.
- Li, Y., Li, M., Zhang, X., Yang, P., Liang, Q., Qi, Q. (2013). A novel whole-phase succinate fermentation strategy with high volumetric productivity in engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 149, 333–340.
- Li, Y., Huang, B., Wu, H., Li, Z., Ye, Q., Zhang, Y. P. (2016). Production of succinate from acetate by metabolically engineered *Escherichia coli*. *American Chemical Society Synthetic Biology*, 5(11):1299-1307.
- Liang, Q., Zhang, F., Li, Y., Zhang, X., Li, J., Yang, P., Qi, Q. (2015). Comparison of individual component deletions in a glucose-specific phosphotransferase system revealed their different applications. *Scientific Reports*, 5.
- Lin, H., Bennett, G. N., San, K. (2005). Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and

- achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metabolic engineering*, 7(2), 116–127.
- Litsanov, B., Kabus, A., Brocker, M., Bott, M. (2012). Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 116–128.
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H.M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O.T., Encarnación, S., Bolívar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbón recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*, 11, 46.
- Martínez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Romano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29(3), 397-404.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., Zeikus, J. G. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 727–740.
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., Soucaille, P. (2007). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(1), 129–135.
- Millard, C. S., Chao, Y., Liao, J. C., Donnelly, M. I. (1996). Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1808–1810.
- Nikel, P. I., Zhu, J., San, K., Me, B. S., Bennett, G. N. (2009). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli creB* and *arcA* mutants reveals shared control of carbon catabolism under microaerobic growth conditions. *Journal of Bacteriology*, 191(17), 5538–5548.
- Ogawa, T., Mori, H., Tomita, M., Yoshino, M. (2007). Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 158(2), 159–163.
- Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4):475-80.
- Palmeros, B., Wild, J., Szybalski, W., Le Borgne, S., Hernández-Chavez, G., Gosset, G., Valle, F., Bolívar, F. (2000). A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene*, 247(1-2), 255-264.
- Peng, L., Arauzo-bravo, M. J., Shimizu, K. (2004). Metabolic flux analysis for a *ppc* mutant *Escherichia coli* based on C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiology Letters*, 235(1), 17–23.
- Sabido, A., Martínez, L. M., Anda, R. De, Martínez, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2013). A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain. *Plasmid*, 69(1), 16–23.
- Sabido, A. (2014a). Caracterización fisiológica y transcripcional de cepas de *Escherichia coli ptsHlcr*-modificadas en el nodo PEP-PYR. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

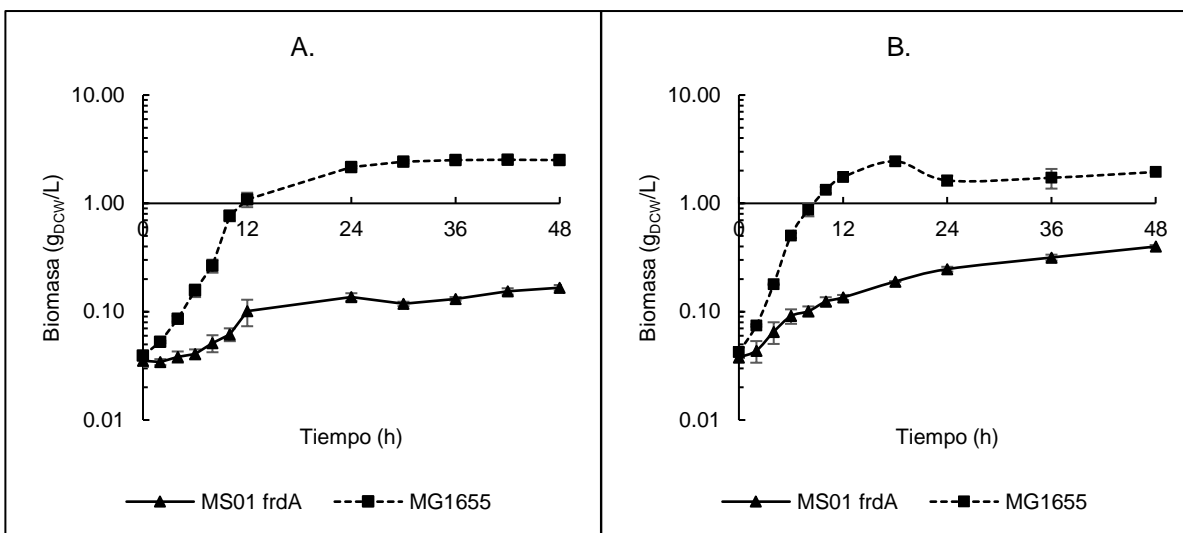
- Sabido, A., Sigala, J. C., Hernández, G., Gosset, G., Bolívar, F. (2014b). Physiological and transcriptional characterization of *Escherichia Coli* strains lacking interconversion of phosphoenolpyruvate and pyruvate when glucose and acetate are coutilized. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(6), 1150–1160.
- Sánchez, A.M., Bennett, G.N., San, K. (2005). Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an *Escherichia coli* alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnology Progress*, 21(2), 358-365.
- Song, H., Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 352–361.
- Steinsiek, S., Frixel, S., Stagge, S., Bettenbrock, K. (2011). Characterization of *E. coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* mutants at various aerobiosis levels. *Journal of Biotechnology*, 154, 35–45.
- Tan, Z., Zhu, X., Chen, J., Li, Q. (2013). Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of succinate production. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4838–4844.
- 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.
- Utrilla, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., Martinez, A. (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, 14(2012), 469–476.
- Utrilla, J., Vargas-Tah, A., Trujillo-Martínez, B., Gosset, G., Martínez, A. (2016). Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology*, 220(2016), 208–214.
- Vargas-Tah, A., Moss-Acosta, C. L., Trujillo-Martínez, B., Tiessen, A., Lozoya-Gloria, E., Orenco-Trejo, M., Gosset, G., Martínez, A. (2015). Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresource Technology*, 198, 611–618.
- Vélez-Izquierdo, A., Guevara-Hernández, F., Castro-Gómez, H., Ovando-Cruz, J., Hellin, J., Espinosa-García, J. A., Sonder, K., Rodríguez-Larramendi, L.A., Reyes-Muró, L., Fonseca-Flores, M.A., Ocaña-Grajales, M.J., Borja-Bravo, M., Pinto-Ruiz, R., Camacho-Villa, T.C., Beuchelt, T.D., Hernández-Rodríguez, V. M. (2013). Rastrojos: Manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico Núm. 7. Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. i-viii, 1-242 pp.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. (2002a). Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1715-1727.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. (2002b) Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (2002) 28, 325 –332.

- Wang, Q., Wu, C., Chen, T., Chen, X., Zhao, X. (2006). Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. *Biotechnology Letters*, 28(2), 89–93.
- Kurzrock, T., Weuster-botz, D. (2010). Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnology Letters*, 32(3), 331–339.
- Wong, M. S., Li, M., Black, R. W., Le, T. Q., Puthli, S., Campbell, P., Monticello, D. J. (2014). Microaerobic conversion of glycerol to ethanol in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3276–3282.
- Wu, Y., Shen, X., Yuan, Q., Yan, Y. (2016). Metabolic engineering strategies for co-utilization of carbon sources in microbes. *Bioengineering*, 3(1), 10.
- Xia, T., Altman, E., Eiteman, M. A. (2015). Succinate production from xylose-glucose mixtures using a consortium of engineered *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 65–72.
- Yang, J., Wang, Z., Zhu, N., Wang, B., Chen, T., Zhao, X. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* and in silico comparing of carboxylation pathways for high succinate productivity under aerobic conditions. *Microbiological Research*, 169(5–6), 432–440.
- Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009). Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), 20180–20185.

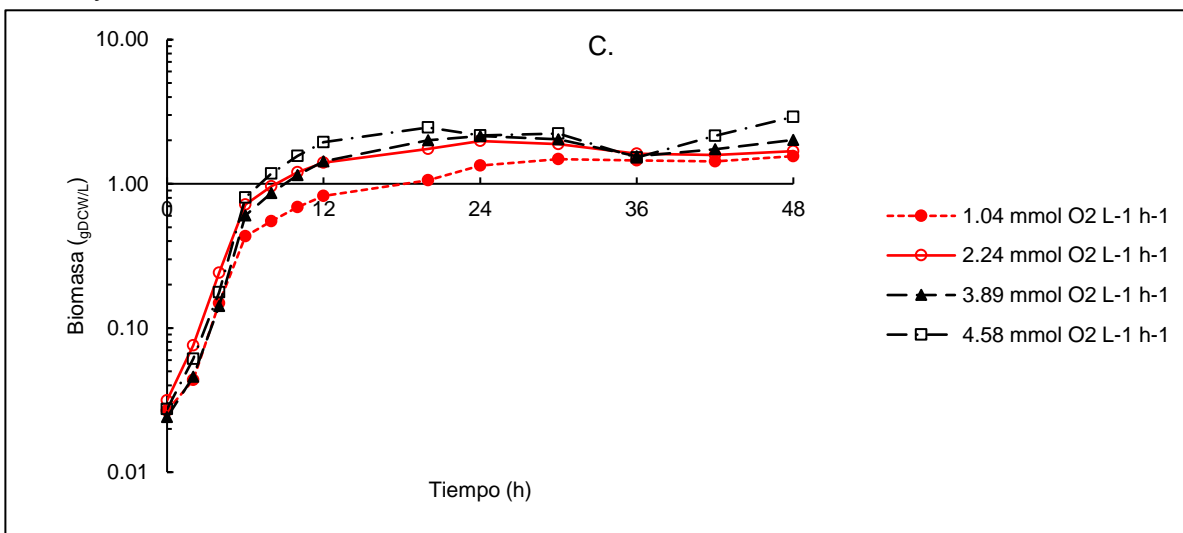
13. ANEXOS

13.1 Curvas de crecimiento durante las evaluaciones en minifermentador y biorreactor.

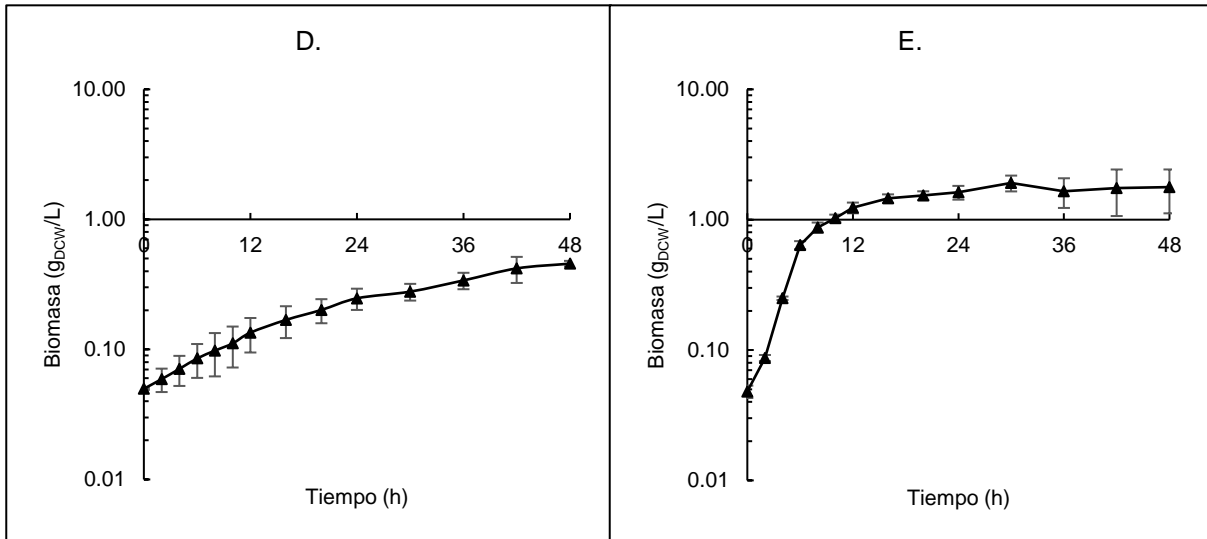
- A. Cepa MS01 *frdA* y MG1655, minifermentador, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, control de pH con KOH 2M.
- B. Cepa MS01 *frdA* y MG1655, minifermentador, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, control de pH con KOH 4M y K_2CO_3 .



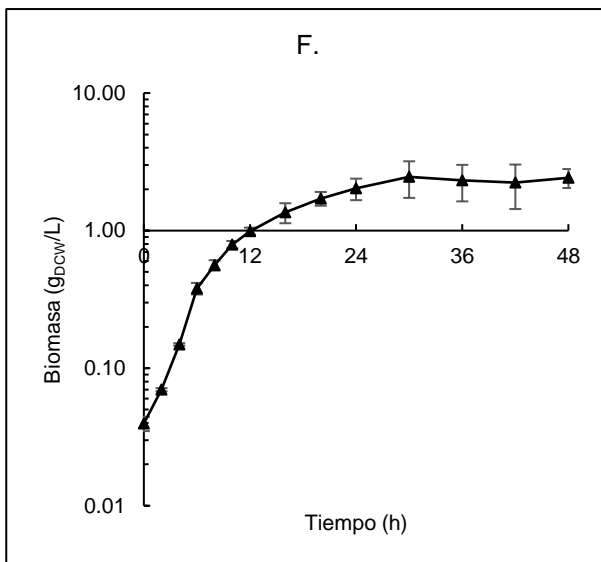
- C. Evaluación de diferentes OTR. Cepa MS01 *frdA*, biorreactor, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm, control de pH con KOH 4 M y K_2CO_3 .



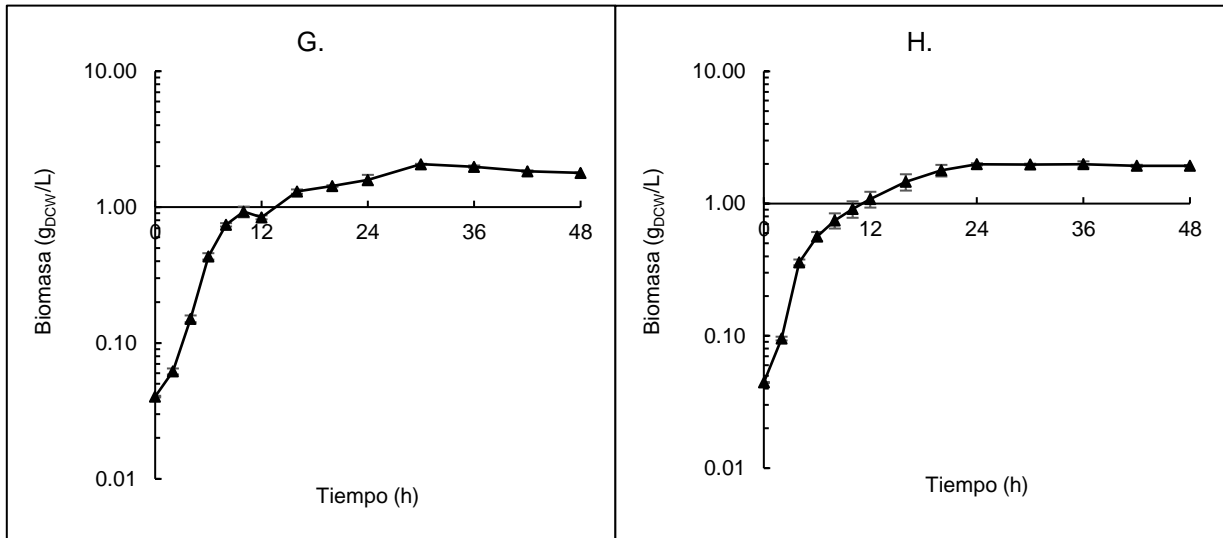
- D. Cepa MS01 *frdA P, minifermentador, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹), bicarbonato de potasio (4 g L⁻¹) a 37 °C, 150 rpm, control de pH con KOH 4 M y K₂CO₃.*
- E. Cepa MS01 *frdA P, biorreactor, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹), bicarbonato de potasio (4 g L⁻¹) a 37 °C, 400 rpm, control de pH con KOH 4 M y K₂CO₃.*



- F. Cepa MS01 *frdA P, biorreactor, medio AM1 suplementado con glucosa (40 g L⁻¹), ácido cítrico (0.1 g L⁻¹), acetato de sodio (2 g L⁻¹), bicarbonato de potasio (4 g L⁻¹) a 37 °C, 400 rpm, control de pH con KOH 4 M y K₂CO₃.*



- G. Cepa MS01 *frdA Ptrc pck Δppc*, biorreactor, medio AM1 suplementado con xilosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm, control de pH con KOH 4 M y K_2CO_3 .
- H. Cepa MS01 *frdA Ptrc pck Δppc*, biorreactor, medio AM1 suplementado con glucosa-xilosa (40 g L^{-1}), ácido cítrico (0.1 g L^{-1}), acetato de sodio (2 g L^{-1}), bicarbonato de potasio (4 g L^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 400 rpm, control de pH con KOH 4 M y K_2CO_3 .





XVII
CONGRESO NACIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.
otorga la presente

Constancia

A

Mariana Martínez Valenzuela, Alejandra Vargas-Tah, Andrea Sabido Ramos,
Georgina Hernández Chávez, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez Jiménez

por su participación con la Presentación Oral

**INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE SUCCINATO EN UNA
CEPA DE *Escherichia coli* NO FERMENTATIVA**

Puerto Vallarta, Jal., 25 al 30 de junio de 2017.



Dr. Carlos Regalado González
Presidente de la SMBB 2016 - 2018



Dr. Adolfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Organizador 2016 - 2018



Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Presidente del Comité Científico 2016 - 2018



INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE SUCCINATO EN UNA CEPA DE *Escherichia coli* NO FERMENTATIVA

Mariana Martínez Valenzuela, Alejandra Vargas-Tah, Andrea Sabido Ramos, Georgina Hernández Chávez, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez Jiménez. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor., México, 62210, marianam@ibt.unam.mx

Palabras clave: Escherichia coli, succinato, glucosa.

Introducción. El ácido succínico, empleado en la industria de los alimentos, agrícola y farmacéutica, posee potencial para ser utilizado como punto de partida para la síntesis de diversos compuestos de importancia industrial, aditivos alimenticios, bioplásticos y biosolventes, principalmente. En la actualidad existe interés en producir succinato con microorganismos en condiciones anaeróbicas o aeróbicas a partir de fuentes renovables [1]. En trabajos previos, por ingeniería metabólica, se generó una cepa de *Escherichia coli* no fermentativa [2]. Con el fin de obtener una cepa productora de succinato, en condiciones de limitación de oxígeno, es importante acoplar la síntesis de este ácido orgánico a la producción de ATP, otros metabolitos esenciales para el crecimiento y mantener el balance redox.

El objetivo de este estudio fue generar una cepa de *E. coli* con capacidad de producir succinato a partir de glucosa en condiciones de baja transferencia de oxígeno.

Metodología. Se reintegró en cromosoma el gen *frdA* que codifica para la fumarato reductasa en la cepa de *E. coli* no fermentativa MS01 (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta frdA$, Δldh , $\Delta adhE$, $\Delta xyfGH$, Δreg 27.3 kb, $gatCS184L$, $\Delta midarpa$) [2] empleando recombinación homóloga doble. Se seleccionaron las transformantes por viabilidad en medio mineral [2] suplementado con glucosa (20 g/L) en condiciones anaerobias. Se evaluó la producción de succinato en medio mineral con 40 g/L de glucosa en condiciones de anaerobias (por triplicado) y microaerobias (por duplicado) en biorreactores.

Resultados. Se generó la cepa MS01 con la reintegración del gen *frdA* en cromosoma, esta cepa fue denominada MS01 *frdA*. Con esta cepa en condiciones anaerobias, se observó poca formación de biomasa (0.5 g/L) y baja producción de succinato (0.87 g/L), consumiéndose solo el 15% de la glucosa disponible a las 48 h (Tabla 1). Este comportamiento se atribuye a una regeneración de cofactores deficiente, asociada a un flujo de carbono reducido de oxalacetato a succinato, reacción enzimática en la cual se regenera NAD⁺. Con el fin de solventar dicha deficiencia, en biorreactor (0.75 L, 400 rpm, 37 °C, con un inóculo de 0.037 g_{DCW}/L) se evaluó la producción de succinato a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno 1.04, 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹, correspondientes a 0.05, 0.15, 0.27 y 0.32 vvm, respectivamente. En estos cultivos, a pesar de que se suministra aire, se generaron condiciones de limitación de oxígeno: el nivel de oxígeno disuelto en el medio fue cero después de 4-6 h de iniciados los cultivos y hasta que se agotó la glucosa. En la Fig. 1 se observa que al valor de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ ($k_{La}=10.4$ h⁻¹) se maximiza la producción de succinato. En estas condiciones se consumen los 40 g/L de glucosa en 36 h; se duplica el rendimiento producto/sustrato; y el título final de succinato es 10.9 veces mayor a lo que se obtiene en condiciones anaerobias.

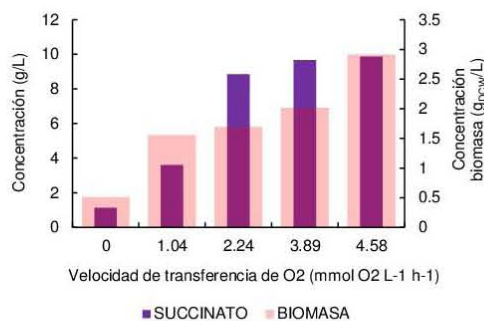


Fig. 1. Concentración de biomasa y succinato generados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno en la cepa MS01 *frdA*.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y producción con la cepa MS01 *frdA*, a las 48 horas de cultivo en cultivo anaerobio, medio mineral adicionado con glucosa (40 g/L).

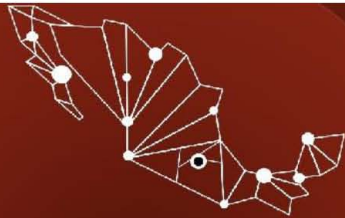
Condiciones de cultivo	Biomasa (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Succinato (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Y_{ps}
Anaerobio	0.513	0.126	0.87	6.98	0.124
2.24 O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹ ($k_{La}=10.4$ h ⁻¹)	1.393	0.486	9.44	38.62	0.244

Conclusiones. El empleo de aireación de manera limitada fomenta el mantenimiento del balance redox y la generación de ATP en la célula. Con una velocidad de transferencia de oxígeno a 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ ($k_{La}=10.4$ h⁻¹) se favorece la producción de succinato. [3]. Lo observado en este estudio, confirma que es posible producir compuestos de interés industrial en medio mínimo, utilizando glucosa como única fuente de carbono, y combinando estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo.

Agradecimiento. Al apoyo otorgado por CONACYT-FONCICYT ERANet-LAC Proyecto SMIBIO C0013-248192.

Bibliografía.

- Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2010). *J Biomed Biotechnol.* 2010 (761042). 18 páginas.
- Fernández-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A. (2012). *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(5), 1291–1300.
- Wong, M.S., Li, M., Black, R.W., Le, T.Q., Puthli, S., Campbell, P., Monticello, D.J. (2014). *Appl Environ Microbiol.* 80(10). 3276-3282.



IV REUNIÓN NACIONAL

DE LA RED TEMÁTICA EN BIOENERGÍA
XIII DE LA RED MEXICANA DE BIOENERGÍA

3ER TALLER SMIBIO: BIORREFINERÍAS DE
PEQUEÑA ESCALA PARA EL DESARROLLO
RURAL EN AMÉRICA LATINA Y EUROPA

TALLER POLÍTICAS PÚBLICAS PARA EL
DESARROLLO DE LA BIOENERGÍA EN
ÁREAS RURALES DE CUBA Y MÉXICO

MORELOS

13, 14 & 15 DE NOVIEMBRE 2017

La Red Temática de Bioenergía y La Red Mexicana de Bioenergía
Otorga la presente

CONSTANCIA

A: MARIANA MARTÍNEZ VALENZUELA, ALEJANDRA VARGAS-TAH, ANDREA
SABIDO RAMOS, GEORGINA HERNÁNDEZ CHÁVEZ, GUILLERMO GOSSET,
ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

POR SU PARTICIPACIÓN EN LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO:

PRODUCCIÓN DE SUCCINATO EN BIORREACTOR EN
CONDICIONES DE BAJA TRANSFERENCIA DE
OXÍGENO

M. en I. Rodolfo Díaz Jiménez
Presidente REMBIO

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Presidente del Comité Organizador

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya
Representante Técnico RTB



RED TEMÁTICA DE
BIOENERGÍA



IV REUNIÓN NACIONAL DE LA RED TEMÁTICA DE BIOENERGÍA
XIII REUNIÓN NACIONAL DE LA RED MEXICANA DE BIOENERGÍA
PRODUCCIÓN DE SUCCINATO EN BIORREACTOR EN CONDICIONES DE BAJA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Mariana Martínez Valenzuela, Alejandra Vargas-Tah, Andrea Sabido Ramos, Georgina Hernández Chávez, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez Jiménez. Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología- Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor., México, 62210, marianam@ibt.unam.mx

Palabras clave: bioplásticos, fermentación, glucosa.

Introducción. El ácido succínico, empleado en la industria de los alimentos, agrícola y farmacéutica, posee potencial para ser utilizado como punto de partida para la síntesis de diversos compuestos de importancia industrial, bioplásticos y biosolventes, principalmente. En la actualidad existe interés en producir succinato con microorganismos en condiciones anaeróbicas o aeróbicas a partir de fuentes renovables [1]. Con el fin de obtener una cepa productora de succinato, en condiciones de limitación de oxígeno, es importante acoplar la síntesis de este ácido orgánico a la producción de energía metabólica y otros metabolitos esenciales para el crecimiento.

El objetivo de este estudio fue la producción de succinato a partir de glucosa en condiciones de baja transferencia de oxígeno en medio mineral.

Metodología. Se evaluó la producción de succinato de la cepa de *Escherichia coli* productora de succinato y denominada MS01 *frdA* [2] en medio mineral con 40 g/L de glucosa en condiciones de anaerobias (por triplicado) y microaerobias (por duplicado) en biorreactores.

Resultados. En condiciones anaerobias, se observó poca formación de biomasa (0.5 g/L) y baja producción de succinato (0.87 g/L), consumiéndose solo el 15% de la glucosa disponible a las 48 h (Tabla 1). Este comportamiento se atribuye a una regeneración de cofactores deficiente, asociada a un flujo de carbono reducido de oxalacetato a succinato, reacción enzimática en la cual se regenera NAD⁺. Con el fin de solventar dicha deficiencia, en biorreactor (0.75 L, 400 rpm, 37 °C, con un inóculo de 0.037 g_{DCW}/L) se evaluó la producción de succinato a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno 1.04, 2.24, 3.89 y 4.58 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹, correspondientes a 0.05, 0.15, 0.27 y 0.32 vvm, respectivamente. En estos cultivos, a pesar de que se suministra aire, se generaron condiciones de limitación de oxígeno: el nivel de oxígeno disuelto en el medio fue cero después de 4-6 h de iniciados los cultivos y hasta que se agotó la glucosa. En la Fig. 1 se observa que al valor de 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ (K_{La}=10.4 h⁻¹) se maximiza la producción de succinato. En estas condiciones se consumen los 40 g/L de glucosa en 36 h; se duplica el rendimiento producto/sustrato; y el título final de succinato es 10.9 veces mayor a lo que se obtiene en condiciones anaerobias.

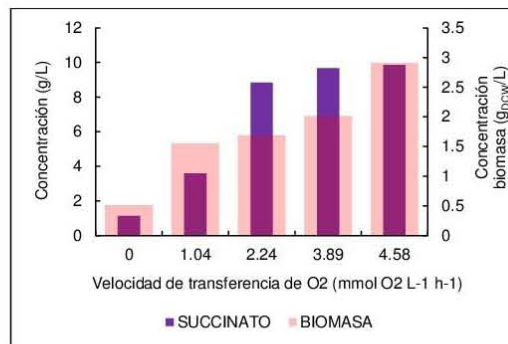


Fig. 1. Concentración de biomasa y succinato generados a diferentes velocidades de transferencia de oxígeno en la cepa MS01 *frdA*.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento y producción con la cepa MS01 *frdA*, a las 48 horas de cultivo en medio mineral adicionado con glucosa (40 g/L).

Condiciones de cultivo	Biomasa (g _{DCW} /L)	μ (h ⁻¹)	Succinato (g/L)	Consumo glucosa (g/L)	Y_{ps}
Anaerobio	0.513	0.126	0.87	6.98	0.124
2.24 O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹ (K _{La} =10.4 h ⁻¹)	1.393	0.486	9.44	38.62	0.244

Conclusiones. El empleo de aireación de manera limitada fomenta el mantenimiento del balance redox y la generación de ATP en la célula. Con una velocidad de transferencia de oxígeno a 2.24 mmol O₂ L⁻¹ h⁻¹ (K_{La}=10.4 h⁻¹) se favorece la producción de succinato [3]. Lo observado en este estudio, confirma que es posible producir compuestos de interés industrial en medio mínimo, utilizando glucosa como única fuente de carbono.

Agradecimiento. A CONACYT-FONCICYT ERANet-LAC Proyecto SMIBIO C0013-248192.

Bibliografía.

- Jarboe, L. R., Zhang, X., Wang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2010). *J Biomed Biotechnol.* 2010 (761042). 18 páginas.
- Fernández-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martínez, B., Bustos, P., González, V., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A. (2012). *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(5), 1291–1300.
- Wong, M.S., Li, M., Black, R.W., Le, T.Q., Puthli, S., Campbell, P., Monticello, D.J. (2014). *Appl Environ Microbiol.* 80(10). 3276-3282.



RED TEMÁTICA DE
BIOENERGÍA



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

