



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

EVALUACIÓN DE *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* COMO NUEVO MODELO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
ALMA YOLANDA ALVA AVILES

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. José Adelfo Escalante Lozada  
[Instituto de Biotecnología - UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Gloria Soberón Chávez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM](#)

Dr. José Utrilla Carreri  
[Centro de Ciencias Genómicas - UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Diciembre, 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 desarrolló bajo la tutoría del Dr. José Adelfo Escalante Lozada en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Durante la realización del proyecto se contó con la Beca Nacional para maestría del CONACYT. Se agradece el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia de congresos.

Este trabajo conto con el financiamiento del proyecto PAPIIT IN209618, del cual se otorgó una beca para la conclusión de tesis de maestría.

### **MIEMBROS DEL JURADO:**

<b>Presidente:</b> Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología - UNAM
<b>Secretario:</b> Dr. Gerardo Corzo Burguete	Instituto de Biotecnología - UNAM
<b>Vocal:</b> Dr. Víctor Manuel González Zúñiga	Centro de Ciencias Genómicas - UNAM
<b>Vocal:</b> Dra. Claudia Martínez Anaya	Instituto de Biotecnología - UNAM
<b>Vocal:</b> Dr. Víctor Humberto Bustamente Santillán	Instituto de Biotecnología - UNAM

## AGRADECIMIENTOS.

Este proyecto no pudo haberse llevado a cabo sin el apoyo técnico, consejos y retroalimentación del Dr. Adelfo Escalante, Dr. Alfredo Martínez, Dr. Guillermo Gosset, Dr. Luis Caspeta, Dra. Noemí Flores, Dr. Francisco Bolívar, M. en C. Georgina Hernández, Ql. Luz María Martínez, Biol. Manuel Salcedo y Aurelia González.

Agradezco enormemente a Alejandra Abigail González y al Dr. Miguel Cocotl Yanez, miembros del grupo de la Dra. Gloria Soberón, por el asesoramiento en las inactivaciones y donación de los plásmidos utilizados durante el proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Gloria Soberón y Dr. José Utrilla, quienes siempre estuvieron en toda la disposición de apoyarnos en el proyecto.

Pasando a algo más personal, quiero agradecer a mis padres y abuelos, no solo por su apoyo durante la realización de mi maestría y los cambios que ha conllevado, si no por todo lo que han hecho por mí y Mariana a lo largo de estos 25 años, el camino no ha sido fácil, pero con esfuerzo constante hemos tenido grandes recompensas.

Al Dr. Adelfo Escalante, por toda su confianza y oportunidades que me ha brindado, gracias por dejarme estar en este proyecto que, para mí, representó mucho retos y momentos agrídulces a lo largo de la maestría, no pude haberlo logrado sin usted.

A quienes me han inspirado para seguir en el área académica: Dr. Adelfo Escalante y M. en B. Martha Giles, gracias por apoyarme, confiar en mí y aconsejarme en lo académico y personal desde hace ya varios años.

A Fabián Moreno y Julián Torres, por todos sus consejos y apoyo desde que llegué al IBt, siempre valoraré esas largas pláticas (en persona y por video llamada) sobre todo lo que podemos hacer con “nuestro bicho”, el pulque y lo que sigue después del IBt.

A mis amigos del laboratorio de IVM, los que se fueron y los que aún siguen, siempre hicieron del laboratorio un lugar más ameno el cual, siempre echaré de menos.

A mis amigos del IBt y a los que conozco desde hace años, porque, aunque algunos no estén físicamente cerca, siempre logran sacarme una sonrisa.

A la familia Brito Alarcón, por hacerme un miembro más de su familia y estar siempre dispuestos a ayudarnos, incluso, con nuestras ideas más alocadas.

A Eduardo Brito, en poco tiempo me has visto caer y siempre me has ayudado a levantarme, para mí, representas un cambio total en mi vida, sin duda, el mejor que ha tenido. El camino que nos espera es aún más retador y lleno de incertidumbres, no pude haber encontrado mejor persona para recorrerlo. **La magia empieza donde la zona de confort termina.**

## ÍNDICE.

1. Índice de figuras.....	8
2. Índice de tablas.....	9
3. Resumen.....	10
4. Abstract.....	11
5. Introducción.....	12
5.1. Ácido shikímico.....	12
5.1.1. Producción de ácido shikímico.....	13
5.1.1.1. Síntesis química.....	13
5.1.1.2. Extracción a partir de plantas.....	13
5.1.1.3. Producción a partir de bacterias.....	14
6. Antecedentes.....	16
6.1. Vía del ácido shikímico en <i>E. coli</i> .....	16
6.2. Ingeniería de vías metabólicas para la sobre-producción de ácido shikímico.....	18
6.2.1. Aumento de la disponibilidad de PEP.....	18
6.2.2. Aumento de la disponibilidad de E4P.....	19
6.2.3. Optimización de la vía del ácido shikímico.....	19
6.2.4. Nuevos modelos para la producción de ácido shikímico.....	20
6.3. <i>Pseudomonas</i> spp.....	21
6.3.1. Generalidades y ventajas.....	21
6.3.2. Metabolismo central de carbono.....	23
6.3.3. Herramientas moleculares disponibles para <i>Pseudomonas</i> spp.....	25
6.3.4. Producción de metabolitos de interés.....	27
6.4. <i>Pseudomonas chlororaphis</i> .....	29
6.4.1. Vía metabólica para la producción de ácido shikímico.....	29
7. Justificación.....	32
8. Hipótesis.....	32
9. Objetivos.....	32
9.1. General.....	32
9.2. Particulares.....	32
10. Material y metodología.....	33

<b>10.1.</b>	Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	33
<b>10.2.</b>	Evaluación de la resistencia a antibióticos de <i>P. chlororaphis</i> ATCC 9446.....	35
<b>10.3.</b>	Obtención de material genético.....	35
<b>10.3.1.</b>	Extracción de DNA cromosomal.....	35
<b>10.3.2.</b>	Extracción de DNA plasmídico.....	35
<b>10.4.</b>	Electrotransformación.....	36
<b>10.4.1.</b>	Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	36
<b>10.4.2.</b>	Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación en <i>P. chlororaphis</i> .....	36
<b>10.5.</b>	Generación de herramientas moleculares.....	37
<b>10.5.1.</b>	Plásmido pFLP2Tc.....	37
<b>10.6.</b>	Inactivación de los genes <i>aroK</i> , <i>pykA</i> y <i>ttuE</i> . ....	37
<b>10.6.1.</b>	Overlap Extension PCR.....	37
<b>10.6.2.</b>	Ligación del fragmento de OE PCR al plásmido pEX18Gm.....	38
<b>10.6.3.</b>	Selección de mutantes.....	39
<b>10.6.4.</b>	Comprobación fenotípica.....	39
<b>10.6.5.</b>	Comprobación por PCR de colonia.....	39
<b>10.6.6.</b>	Secuenciación de las mutantes generadas.....	40
<b>10.6.7.</b>	Eliminación del cassette de resistencia en las cepas mutantes.....	40
<b>10.7.</b>	Sobre-expresión de la vía del SA.....	40
<b>10.7.1.</b>	Determinación del número de copias del plásmido pUCP24A5.....	42
<b>10.7.2.</b>	Extracción de RNA, cDNA y RT-qPCR.....	42
<b>10.8.</b>	Evaluación de la capacidad de crecimiento y producción de los metabolitos intermediarios de la vía del shikimato.....	43
<b>10.8.1.</b>	Evaluación de las cepas en matraces de 250 mL. ....	43
<b>10.8.2.</b>	Evaluación de las cepas en fermentadores de 1 L.....	43
<b>10.8.3.</b>	Cuenta en placa.....	43
<b>10.8.4.</b>	Cuantificación de metabolitos y aminoácidos aromáticos.....	44
<b>10.8.5.</b>	Cálculos y análisis estadístico.....	44
<b>11.</b>	Resultados y discusión.....	46
<b>11.1.</b>	Evaluación de la resistencia natural a antibióticos de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC	

9446.....	46
<b>11.2.</b> Plásmido pFLP2Tc.....	47
<b>11.3.</b> Obtención del fondo genético: Inactivación de los genes <i>aroK</i> , <i>pykA</i> y <i>ttuE</i> .....	48
<b>11.4.</b> Sobre-expresión de la vía del ácido shikímico.....	51
<b>11.4.1.</b> Determinación del número de copias del plásmido pUCP24A5.....	53
<b>11.4.2.</b> RT-qPCR.....	54
<b>11.5.</b> Evaluación de la capacidad de crecimiento y producción de ácido shikímico de las cepas generadas.....	56
<b>11.5.1.</b> Evaluación de la cinética de crecimiento en matraces de 250 mL.....	56
<b>11.5.2.</b> Evaluación cinética y producción en fermentadores de 1 L.....	58
<b>11.5.2.1.</b> Obtención de fondo genético.....	58
<b>11.5.2.2.</b> Sobre-expresión de la vía del ácido shikímico.....	64
<b>12.</b> Conclusiones.....	71
<b>13.</b> Perspectivas. ....	71
<b>14.</b> Referencias. ....	72
<b>Anexo I</b> .....	77
<b>Anexo II</b> .....	79
<b>Anexo III</b> .....	80
<b>Anexo IV</b> .....	80
<b>Anexo V</b> .....	81



## 1. ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Estructura química del ácido shikímico.....	12
<b>Figura 2.</b> Vías involucradas en la síntesis de ácido shikímico en <i>E. coli</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> Vías involucradas en las síntesis de ácido shikímico en <i>P. chlororaphis</i> ATCC 9446.....	31
<b>Figura 4.</b> Diagrama general de la metodología experimental.....	33
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la resistencia a antibióticos de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> .....	46
<b>Figura 6.</b> Construcción del plásmido pFLP2Tc.....	48
<b>Figura 7.</b> Amplicones, diagramas <i>in silico</i> y resultados de la secuenciación de las cepas WT mutantes. ....	49
<b>Figura 8.</b> Capacidad de crecimiento de las cepas en medio mínimo.....	51
<b>Figura 9.</b> Diagrama general de los plásmidos pTrcAro6, pCR®-XL-TOPO-Aro5 y pUCP24A5.....	52
<b>Figura 10.</b> Patrones de restricción y secuenciación del plásmido pUCP24A5.....	53
<b>Figura 11.</b> Número de copias del plásmido pUCP24A5 en las cepas A25 y A35.....	54
<b>Figura 12.</b> Resultados de RT-qPCR de las cepas A25 y A35 en medio King con glucosa o glicerol.....	55
<b>Figura 13.</b> Cinéticas de crecimiento de las cepas WT, A1, A2, A3, A25 y A35 en matraces de 250 mL. ....	56
<b>Figura 14.</b> Comparación de las velocidades de crecimiento entre las cepas parentales y cepas transformantes.....	57
<b>Figura 15.</b> Títulos de CAT obtenidos después de 24 h de incubación de las cepas A25 y A35.....	58
<b>Figura 16.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa silvestre.....	59
<b>Figura 17.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A1.....	61
<b>Figura 18.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A2 y A3.....	62
<b>Figura 19.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A25.....	65
<b>Figura 20.</b> Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A35.....	66
<b>Figura 21.</b> Cuenta en placa en medio King con su respectiva fuente de carbono.....	68
<b>Figura 22.</b> Consumo de aminoácidos de las cepas A25 y A35.....	69

## 2. ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Contenido de SA en diferentes plantas.....	14
<b>Tabla 2.</b> Principales cepas sobre-productoras de ácido shikímico.....	15
<b>Tabla 3.</b> Características de algunos vectores utilizados en <i>Pseudomonas</i> spp.....	26
<b>Tabla 4.</b> Metabolitos obtenidos a partir de cepas del género <i>Pseudomonas</i> .....	28
<b>Tabla 5.</b> Cepas y plásmidos utilizados.....	34
<b>Tabla 6.</b> Concentración de antibióticos utilizados.....	35
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la amplificación por PCR de los fragmentos 5', 3', Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> y OE PCR.....	38
<b>Tabla 8.</b> Comprobación por PCR de las cepas mutantes.....	40
<b>Tabla 9.</b> Condiciones para la amplificación del operón Aro5.....	41
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos y de producción determinados a partir de las cinéticas de crecimiento realizadas en fermentadores de 1 L.....	70

### 3. RESUMEN.

El ácido shikímico (SA) es un intermediario de la vía del shikimato la cual, se encuentra de manera natural en plantas, hongos, bacterias y algunos parásitos. El SA puede ser implementado como precursor para la síntesis de antivirales, antitumorales, antibióticos, etc., razón por la cual se han desarrollado diferentes metodologías para obtenerlo, siendo unas de las principales su extracción a partir de plantas y bacterias.

*Escherichia coli* normalmente es utilizada como modelo para la sobre-producción de SA, sin embargo, el mayor rendimiento obtenido en una cepa derivada es del 42 %, cerca del 50 % del máximo teórico. Considerando lo anterior, tanto para este como para otros metabolitos de interés, se ha comenzado la búsqueda de nuevos modelos que de manera natural sean capaces de producir compuestos de interés industrial, tomando en consideración sus características para así, disminuir los costos y tiempo de investigación.

En este proyecto se planteó la evaluación de *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 como nuevo modelo para la producción de SA, ya que al ser un microorganismo ubicuo del ambiente, es capaz de crecer en condiciones tanto nutricional como fisicoquímicamente adversas, así como utilizar diferentes fuentes de carbono como el glicerol, además, hay reportes de microorganismos pertenecientes a este género que son capaces de producir fenazinas y otros metabolitos de interés biotecnológico. Debido a que en la actualidad no existe ningún reporte en el que se utilice a este microorganismo para la síntesis de SA, se siguieron algunas de las estrategias implementadas en *E. coli* y metodologías para incrementar la producción de fenazinas en *Pseudomonas*.

Nuestra primera estrategia consistió en inactivar la enzima shikimato cinasa para interrumpir el flujo del SA hacia corismato, producto final de la vía del shikimato, así mismo, se sobre-expresaron los genes de la vía del shikimato y de las pentosas fosfato (*aroB*, *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroE*, *aroD* y *tktA*) para evitar cuellos de botella y favorecer la acumulación de eritrosa-4-fosfato. Por otro lado, para incrementar la cantidad de fosfoenol-piruvato disponible, se inactivaron de manera independiente los genes que codifican para las enzimas piruvato cinasa, codificadas por los genes *pykA* y *ttuE* para determinar si al igual que en *E. coli*, existen diferencias en el efecto de la inactivación sencilla de estas enzimas.

El impacto de las modificaciones genéticas realizadas sobre la producción de SA se evaluó mediante cultivos en medio King modificado, utilizando como fuente de carbono glucosa o glicerol en biorreactores de 1 L. Al evaluar la cepa silvestre se observó que es incapaz de acumular SA, sin embargo, las cepas derivadas lograron acumular hasta 0.1 g/L de SA y 1.16 g/L de compuestos aromáticos totales (dehidroquinato, dehidroshikimato y SA) existiendo diferencias dependiendo de la fuente de carbono utilizada y la piruvato cinasa inactivada, demostrando así que estas presentan diferente actividad y/o regulación.

#### 4. ABSTRACT.

Shikimic acid (SA) is an intermediate of the shikimate pathway which is naturally found in plants, fungi, bacteria and some parasites. SA is used as a precursor for different pharmaceutical products such as antivirals, antitumorals and antibiotics. There are various strategies to obtain these compounds, being extraction from plants and bacteria the principal sources.

The main microorganism studied for the overproduction of SA has been *E. coli* but, after many years of study, the maximum yield obtained has been 42 %, almost 50 % of the theoretical maximum yield. Considering this, there are different groups focusing in finding and selecting better options for the overproduction of different metabolites considering their natural abilities and characteristics to minimize costs and time of research.

In this project, we propose *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 as a potential microorganism for the overproduction of SA; *P. chlororaphis* is an innocuous and ubiquitous microorganism able to grow in nutritional and physicochemical non-favorable conditions and also, it utilizes alternative carbon sources such as glycerol. Different strains of *P. chlororaphis* have been used to overproduce aromatic compounds such as phenazines and other biotechnological metabolites. Until now, there are not reports for the production of SA or any intermediate of the shikimate pathway studied in *Pseudomonas* spp. Therefore, we developed our strategy resembling the methodologies applied in *E. coli* and for the overproduction of phenazines in *Pseudomonas*.

Our first approach was to inactivate the enzyme shikimate kinase to avoid the flux from SA to shikimate-3-phosphate and to interrupt its flux to chorismate, the final product of the shikimate pathway; we also overexpress some genes of the shikimate pathway and pentose phosphate (*aroB*, *aroG<sup>fb</sup>*, *aroE*, *aroD* and *tktA*) to avoid bottlenecks and increase the production of eritrose-4-phosphate. Finally, to increase the availability of phosphoenolpyruvate, we inactivated one of the two pyruvate kinases (codified by *pykA* and *ttuE* in *P. chlororaphis*) to evaluate if there are any difference between them as it happens in *E. coli*.

We evaluated all the strains in a modified King medium changing the carbon source (glucose or glycerol) in 1 L bioreactors. We found that the wild type strain couldn't overproduce SA but, some of the derived strains were able to accumulate up to 0.1 g/L of SA and 1.16 g/L of total aromatic compounds (dehydroquinone, dehydroshikimate and SA), we observed differences between the carbon sources and the inactive pyruvate kinase, confirming that differences exist in the activity and/or regulation of these enzymes.

## 5. INTRODUCCIÓN.

### 5.1. Ácido shikímico.

El ácido shikímico (ácido 3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexeno-1-carboxílico) (SA) es un compuesto con 3 centros quirales y un grupo funcional carboxilo (Figura 1), características que hacen a esta molécula un compuesto versátil y atractivo para diferentes industrias. Fue aislado por primera vez de la flor japonesa *Illicium anisatum* y puede ser sintetizado químicamente u obtenido de diferentes plantas, bacterias, hongos, algas y algunos parásitos del grupo Apicomplexa, ya que tienen la capacidad de producirlo mediante la vía del shikimato a partir de la cual, los diferentes organismos son capaces de producir aminoácidos aromáticos, sideróforos, compuestos acarreadores de electrones y metabolitos secundarios como son pigmentos y compuestos antimicrobianos (Rawat et al. 2013; Díaz Quiroz et al. 2014; Bilal et al. 2018).

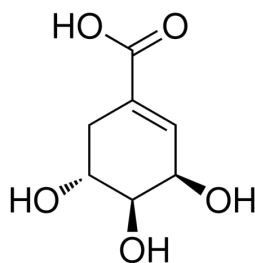


Figura 1. Estructura química del ácido shikímico.

Debido a que este compuesto es principalmente utilizado para la síntesis del oseltamivir fosfato (Tamiflu®), el cual inhibe a la enzima neuraminidasa de los virus de influenza tipo A y B, el virus de influenza aviar H5N1 y el virus de influenza humana H1N1, se ha buscado la optimización de los procesos químicos y biotecnológicos para lograr abastecer su demanda y disminuir su costo, ya que después de la pandemia de influenza AH1N1 reportada en el 2009, el precio del ácido shikímico aumentó de \$40 USD/kg hasta \$700 USD/kg. Adicionalmente, el ácido shikímico también ha llamado la atención de diferentes industrias debido a que, a partir de él se pueden obtener indol y derivados, alcaloides, productos dermo-cosméticos, exfoliantes, antipiréticos, antioxidantes, anticoagulantes, anti-inflamatorios y anticancerígenos (Rawat et al. 2013; Martínez et al. 2015).

### 5.1.1. Producción de ácido shikímico.

#### 5.1.1.1. Síntesis química.

La síntesis química del ácido shikímico comenzó a partir de la década de 1960 empleando diferentes metodologías. Una de las primeras reacciones exitosas utilizadas fue la de Diels-Alder en la cual el rendimiento obtenido era menor al 15 %; con el paso de los años, esta reacción fue optimizada hasta lograr obtener un rendimiento del 55 % (Rawat et al. 2013).

Otra de las alternativas que se han seguido para la producción química del ácido shikímico y sus diferentes enantiómeros, es la producción a partir de ácido quínico y diferentes azúcares como son la D-arabinosa, D-ribosa y D-manosa siendo este último una de las síntesis más simplificadas (5 pasos) con un rendimiento de hasta el 25 % (Zhang et al. 2018).

A pesar de que se han logrado optimizar las reacciones antes mencionadas éstas no son utilizadas a nivel industrial debido al costo y la generación de residuos contaminantes, por lo que se han buscado diferentes alternativas para su obtención como son, la extracción a partir de plantas y la generación de microorganismos sobre-productores de ácido shikímico (Rawat et al. 2013).

#### 5.1.1.2. Extracción a partir de plantas.

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido shikímico es un intermediario en la vía del shikimato y es utilizado por las plantas como precursor para la síntesis aminoácidos aromáticos, ácido salicílico, taninos, antocianinas y cumarinas. Además, se ha observado que actúa en la detoxificación por metales y en la movilización del fósforo (Xu et al. 2017).

El anís estrellado japonés (*Illicium anisatum*) fue la primera planta a partir de la cual se logró obtener ácido shikímico, sin embargo, la mayoría de las especies pertenecientes a este género sintetizan la toxina anisatina. Esto promovió la búsqueda de otras alternativas como son extracciones a partir de diferentes órganos del liquidámbar (*Liquidambar styraciflua*, rendimiento del 3.7 % w/w) y el pino (*Pinus sylvestris*, rendimiento del 1.6 % w/w). Actualmente, el anís estrellado Chino (*Illicium verum*) es una de las principales fuentes de extracción de ácido shikímico por su alto contenido de SA (Tabla 1). No obstante, se ha observado que algunos compuestos pueden llegar a ser tóxicos para los infantes y los rendimientos obtenidos no sobrepasan una producción de 1 kg de ácido shikímico por cada 30 kg del fruto seco (Ghosh et al. 2012; Bilal et al. 2018).

**Tabla 1. Contenido de SA en diferentes plantas.** Modificado de Díaz Quiroz et al. (2014).

Planta	Tejido con mayor porcentaje de SA	Contenido de SA (% peso/peso)
<i>Illicium religiosum</i>	Fruto	24.05 – 24.8
<i>Illicium verum</i> Hook. f.	Fruto	17.14 – 17.77
<i>Illicium lanceolatum</i> A.C. Smith	Fruto	16.19 – 16-35
<i>Terminalia arjuna</i>	Fruto	15.64
<i>Pistacia lentiscus</i>	Planta entera	13.28
<i>Symphytum officinale</i>	Hojas	12.53
<i>Alangium salvifollum</i>	Raíz	11.77

Las metodologías de obtención se han basado en una extracción sólido-líquido empleando diferentes alcoholes, formación de complejos, extracción asistida por microondas, sonicación y extracción con agua (150 °C y una presión de 15 MPa), sin embargo, en todos los casos uno de los principales problemas para la extracción del ácido shikímico es la solubilización de la biomasa de la planta (generalmente celulosa, hemicelulosa y lignina), por lo que en años recientes se han utilizado diferentes líquidos iónicos (Xu et al. 2017).

A pesar de los esfuerzos realizados para la extracción del ácido shikímico a partir de plantas, se ha reportado que es necesario un mínimo de 6 años para que el shikimato pueda ser extraído, además, la cantidad máxima presente en el anís estrellado Chino puede variar dependiendo del órgano del que se obtenga y de la época del año en la cual se realice este procedimiento, aunado a esto, el género *Illicium* necesita condiciones ambientales específicas para su crecimiento, por lo que hasta ahora solo es cultivada de manera eficiente en China, EUA y Brasil (Rawat et al. 2013; Zhang et al. 2018)

En la actualidad, las plantas siguen siendo la principal fuente de ácido shikímico en el mundo, sin embargo, los procedimientos tienden a ser caros, largos y generan una gran cantidad de desechos contaminantes (Rawat et al. 2013; Xu et al. 2017).

### **5.1.1.3. Producción a partir de bacterias.**

Dado los inconvenientes mencionados para la obtención del ácido shikímico mediante síntesis química y extracción a partir de plantas, se ha optado por su producción a partir de microorganismos recombinantes que sean capaces de generar este metabolito

de manera eficiente y barata, con la finalidad de abastecer la demanda de las diferentes industrias sin generar residuos contaminantes (Rawat et al. 2013).

Los enfoques que han tenido diversos estudios en el mejoramiento de cepas sobre-productoras son la optimización en el consumo de sustrato, la robustez y tolerancia a metabolitos tóxicos y las condiciones de cultivo; generalmente, esto se logra mediante la eliminación de vías metabólicas que compitan por el sustrato, desregulación de la o las vías a nivel transcripcional y enzimático y la sobre-expresión enzimática para evitar la generación de cuellos de botella (Martínez et al. 2015).

Además de la vía del shikimato presente en los microorganismos, algunos de ellos son capaces de biotransformar el ácido quínico (o quinato) en ácido shikímico, dentro de los cuales destacan los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aspergillus* y *Neurospora*, ya que son capaces de transformarlo en uno de los intermediarios de la vía (3-dehidroquinato) mediante la utilización de la enzima quinato deshidrogena (Ghosh et al. 2012).

Algunos de los microorganismos más estudiados para la producción de shikimato son *Citrobacter sp*, *Bacillus sp* y *E. coli*, siendo este último el más utilizado y con una gran variedad de herramientas moleculares disponibles para su modificación genética. En la tabla 2 se presentan algunos ejemplos de las cepas obtenidas mediante ingeniería genética para la producción de ácido shikímico.

**Tabla 2. Principales cepas sobre-productoras de ácido shikímico.**

Cepa	Características	Condiciones de fermentación	Título (g/L)	Rendimiento (% mol AS/mol glc)
<i>E. coli</i> SP1.1pts-/pSC6.090B (Chandran et al. 2003)	Expresión heteróloga de los genes <i>glf</i> y <i>glk</i> de <i>Zymomonas mobilis</i>	Cultivo alimentado (10 L). 55-170 mM Glc y 15 g/L EL	87	36
<i>E. coli</i> AR36 (Rodríguez et al. 2013)	Sobre-expresión constitutiva de los genes <i>aroB</i> , <i>tktA</i> , <i>aroG<sup>fbr</sup></i> , <i>aroE</i> , <i>aroD</i> y <i>zwf</i> .	Cultivo en lote (1 L). 100 g/L Glc y 15 g/L EL	41.8	42
<i>E. coli</i> SK5/pSK6 (Lee et al. 2017)	Promotor de <i>aroK</i> dependiente de la fase de crecimiento y expresión de la enzima DHQ-SDH proveniente de <i>Populus trichocarpa</i>	Cultivo en lote (25 mL). Medio de producción para AS suplementado con glicerol (25 g/L) y EL (15 g/L)	5.33	NR
<i>Citrobacter freundii</i> (Tripathi et al. 2013)	Optimización del medio y condiciones de cultivo	Cultivo alimentado (10 L). 5 % Glc, 4.5 % asparagina, 2 % CaCO <sub>3</sub>	9.11	19



<i>Bacillus megaterium</i> (Ghosh et al. 2016)	Inactivación del gen <i>aroK</i> y prueba con diferentes fuentes de carbono	Cultivo en lote (10 L). Medio LB con 4 % de fructosa	6.02	NR
<i>Corynebacterium glutamicum</i> SKM7 (Kogure et al. 2016)	Inactivación del sistema PTS y el gen <i>aroK</i> ; sobre-expresión de la vía del shikimato, la vía de las pentosas fosfato y el transportador de mio-inositol	Cultivo en lote (1 L) a partir de células en arresto	141	51

Modificado de Martínez et al. (2015). EL= Extracto de levadura; Glc= Glucosa; NR= No reportado.

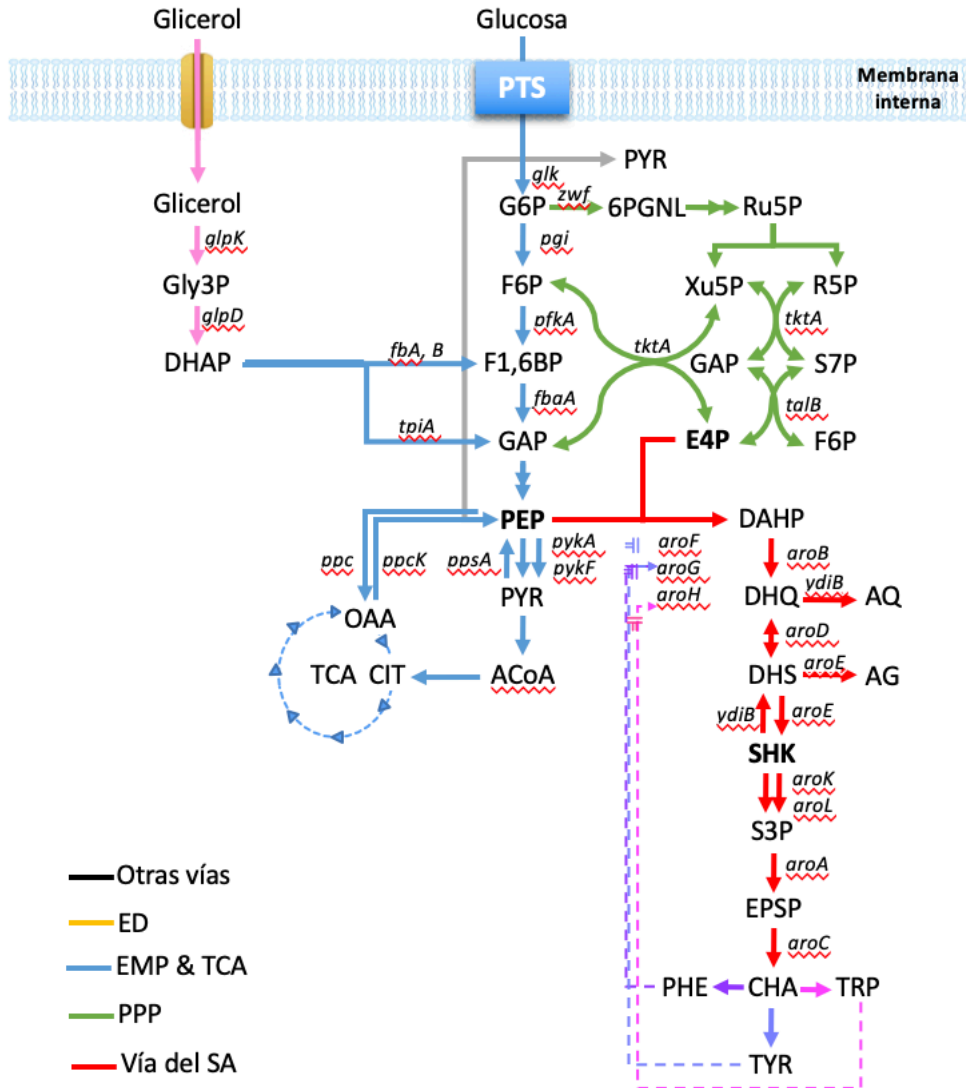
## 6. ANTECEDENTES.

### 6.1. Vía del ácido shikímico en *E. coli*.

En *E. coli*, la vía del shikimato se compone de 7 reacciones obteniendo como producto final el corismato, el cual es utilizado como precursor para la síntesis de aminoácidos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y otros compuestos aromáticos. El primer paso de esta vía comienza con la condensación del fosfoenolpiruvato (PEP; proveniente de la glucólisis) y la eritrosa-4-fosfato (E4P; proveniente de la vía de las pentosas fosfato) para generar 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP), esta reacción es catalizada por las isoenzimas AroG, AroF y AroH, las cuales están reguladas mediante un mecanismo de control alostérico por fenilalanina, tirosina y triptófano respectivamente. Cabe mencionar que estas enzimas también están reguladas transcripcionalmente por los represores *tyrR* (*aroG* y *aroF*) y *trpP* (*aroH*) y se sabe que la isoenzima AroG genera alrededor del 80 % de DAHP (Martínez et al. 2015).

La siguiente reacción de la vía esta catalizada por la enzima DHQ sintasa (*aroB*) y genera ácido 3-dehidroquinico (DHQ) que, tras una deshidratación catalizada por la DHQ deshidratasa (*aroD*), genera ácido 3-dehidroshikímico (DHS), posteriormente el DHS es convertido a SA mediante la shikimato deshidrogenasa (*aroE*); este intermediario es convertido a ácido shikímico-3-fosfato mediante las isoenzimas shikimato cinasa I y II (*aroK* y *aroL* respectivamente), este a su vez es convertido a 5-enoil-piruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) por la EPSP sintasa (*aroA*) y finalmente, el EPSP es convertido a corismato (CHA) por la enzima CHA sintasa (*aroC*) (Figura 2). En cuanto a la regulación de las enzimas antes mencionada se sabe que las enzimas DHQ sintasa, DHQ deshidratasa y SA deshidrogenasa se expresan constitutivamente mientras que, las DAHP y la SA cinasa II están reguladas transcripcionalmente. Otro de los metabolitos que se pueden obtener a partir de esta vía es el ácido quinico (AQ), el cual se genera mediante la transformación del DHQ catalizado

por la enzima SA deshidrogenasa/quinato deshidrogenasa (*ydiB*) y el ácido gálico (AG) a partir del DHS empleando la enzima SA deshidrogenasa (*aroE*) (Díaz Quiroz et al. 2014; Martínez et al. 2015).



**Figura 2. Vías involucradas en la síntesis de ácido shikímico en *E. coli*.**

**Intermediarios en el transporte de glicerol:** Gly3P, glicerol-3-fosfato; DHAP, dehidroxiacetona fosfato. **Intermediarios en la vía Embden-Meyerhof-Parnas ciclo de los ácidos tricarbóxicos (EMP y TCA):** PTS, sistema de fosfotransferasa PEP: glucosa; Glc6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; F1,6BP, fructosa-1,6-bifosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; ACoA, acetil-CoA; OAA, oxalacetato; CIT, citrato. **Intermediarios en la vía de las pentosas fosfato (PPP):** 6PGNL, 6-fosfo-D-glucono-1,5-lactona; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; S7P, pseudoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato. **Intermediarios de la vía del ácido shikímico:** DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; AQ, ácido quínico; DHS, 3-dehidroshikimato; AG, ácido gálico; AS, ácido shikímico; S3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato; CHA, corismato; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Trp, triptófano.

\*Las líneas discontinúas indican regulación por control alostérico. Modificado de Rodríguez et al. 2013.

## 6.2. Ingeniería de vías metabólicas para la sobre-producción de ácido shikímico.

Las principales estrategias utilizadas para obtener cepas sobre-productoras de ácido shikímico están enfocadas en aumentar la disponibilidad de los precursores de la vía del shikimato (PEP y E4P), así como interrumpir el flujo del mismo hacia corismato mediante la inactivación de la enzima shikimato cinasa. Se ha calculado que el rendimiento teórico máximo de una cepa optimizada para la producción de ácido shikímico mediante la inactivación del sistema PTS es del 86 % (mol/mol) (Chandran et al. 2003; Martínez et al. 2015).

### 6.2.1. Aumento de la disponibilidad de PEP.

Uno de los principales problemas que se han tenido para aumentar la cantidad de PEP en *E. coli* son otras vías y sistemas que compiten por este sustrato, dentro de los cuales destaca el sistema PTS (carbohydrate phosphotransferase system), ya que utiliza el 50 % de PEP para llevar a cabo la translocación y fosforilación de diferentes azúcares como la glucosa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucósidos, aminoglucósidos y polialcoholes provenientes del ambiente extracelular, además, este sistema participa en la regulación de la expresión de genes codificantes para el transporte de carbohidratos mediante los procesos de IEI (Inducer Exclusion Inhibition) y CCR (Catobolite Control Repression) lo cual, dependiendo de las fuentes de carbono, imposibilita a las células para utilizar dos o más fuentes de carbono al mismo tiempo, esto ha conllevado a optar por la inactivación del sistema PTS, sin embargo, se ha observado que esta inactivación causa problemas para que el microorganismo pueda utilizar la glucosa como fuente de carbono, impactando negativamente en su velocidad de crecimiento (Carmona et al. 2015; Martínez et al. 2015).

Para obtener una cepa de *E. coli* PTS<sup>-</sup> que crezca de manera similar a una cepa PTS<sup>+</sup>, se han utilizado diferentes estrategias como, la expresión heteróloga de un transportador de glucosa (Glf) de *Zymomonas mobilis* (Chandran et al. 2003) y la evolución adaptativa de la cepa *E. coli* PB11 (PTS<sup>-</sup>: inactivación de los componentes citoplasmáticos del operón *ptsHIcrr*) en un cultivo continuo, utilizando glucosa como única fuente de carbono hasta obtener una cepa evolucionada *E. coli* PB12: PTS<sup>-</sup>, glc<sup>+</sup> (*E. coli* PB12), capaz de transportar al carbohidrato eficientemente al citoplasma celular, la caracterización genómica de este microorganismo demostró que existía una sobre-expresión de los genes *galP*, *glk* y *pgi*, los cuales codifican para la galactosa permeasa, glucocinasa y fosfoglucosa isomerasa respectivamente, además, se encontró una mutación en el gen *arcB* que codifica para una parte del sistema ArcAB involucrado en la adaptación a condiciones anaerobias. Se ha demostrado que este sistema puede expresarse de manera basal en presencia de oxígeno, por lo que al ser inactivado provoca una sobre-expresión de los genes que codifican para

las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) permitiendo así, una mayor capacidad respiratoria y metabólica en la cepa (Flores et al. 2007).

Otra alternativa que se ha seguido para incrementar la disponibilidad de PEP en *E. coli* ha sido la inactivación de los genes *pykA* o *pykF*, los cuales codifican para las isoenzimas piruvato cinasa A y F respectivamente. Inactivaciones sencillas de estos genes han sido realizadas en nuestro grupo utilizando como fondo genético la cepa *E. coli* PB12  $\Delta$ *aroK*  $\Delta$ *aroL* y los genes *aroG<sup>fbr</sup>*, *tktA* y *aroE* sobre-expresados en dos plásmidos diferentes; los resultados obtenidos demostraron que la inactivación del gen *pykF* aparentemente favorece la acumulación de PEP logrando un incremento en la producción de ácido shikímico sin comprometer la viabilidad de la célula al permitir que parte del PEP generado sea dirigido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), por otro lado, la inactivación *pykA* no favoreció la acumulación de ácido shikímico bajo las condiciones analizadas (Escalante et al. 2010).

### **6.2.2. Aumento de la disponibilidad de E4P.**

El incremento en la disponibilidad de E4P se ha logrado mediante la sobre-expresión de algunos de los genes que codifican para las enzimas participantes en la vía de las pentosas fosfato dentro de los que destacan *tktA*, gen que codifica para la enzima transcetolasa I y promueve la conversión de F6P en E4P, aumentando así el título y rendimiento de shikimato (Escalante et al. 2010; Rodriguez et al. 2017; Bilal et al. 2018).

Otro de los genes que se han sobre-expresado es *zwf* que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, esta enzima es crucial para desviar el flujo de carbono hacia la vía PPP, ya que es la primera reacción de dicha vía; cabe mencionar que estudios recientes realizados en nuestro grupo han demostrado que la sobre-expresión de este gen en *E. coli* AR36 afecta positivamente su velocidad de crecimiento, además, al sobre-expresar este gen se espera que haya una mayor disponibilidad de NADPH, el cual es utilizado por la enzima shikimato deshidrogenasa (Rodriguez et al. 2013; Rodriguez et al. 2017).

### **6.2.3. Optimización de la vía del ácido shikímico.**

Para obtener cepas recombinantes capaces de acumular ácido shikímico es necesario bloquear su flujo hacia corismato mediante la inactivación de las isoenzimas shikimato cinasa I y II (codificadas por los genes *aroK* y *aroL* respectivamente), sin embargo, al realizar estas inactivaciones se generan cepas auxótrofas a aminoácidos aromáticos y a otros compuestos derivados del corismato, por lo que es necesario utilizar medios ricos (generalmente con extracto de levadura) o medios mínimos suplementados con

fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido 2,3-dihidroxibenzoico, lo que aumenta el costo de producción y dificulta un posterior análisis por metabolómica, proteómica o fluxómica. Debido a esto, se han buscado alternativas a la inactivación total de los genes como, estrategias de expresión regulada dependientes de la fase de crecimiento del microorganismo utilizando RNA de interferencia (iRNA) o diferentes promotores inducibles; este tipo de metodologías permite una mayor generación de biomasa en menor tiempo implementando medios mínimos la cual, al llegar a la fase estacionaria, el gen *aroK* o *aroL* es inactivado para que la cepa sea capaz de acumular el ácido shikímico (Lee et al. 2017).

Para evitar la generación de cuellos de botella al aumentar la cantidad de PEP y E4P disponible en la célula, se han sobre-expresado diferentes genes de la vía del shikimato dentro de los cuales destacan *aroG* y *aroF*, ya que se ha observado que catalizan aproximadamente el 80 y 20 % de las reacciones para generar DAHP respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas encargadas de generar el DAHP son inhibidas por un mecanismo de control alostérico causado por la presencia de fenilalanina, tirosina y triptófano, por lo que para contender contra este problema, se ha optado por modificar dichas enzimas para evitar la regulación mediante este mecanismo (Martínez et al. 2015).

Rodríguez et al. (2013) sobre-expresó los genes *aroB*, *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroE* y *aroD* mediante su clonación en un plásmido (pTrc) utilizando como fondo genético la cepa *E. coli* PB12 *aroK*, *aroL*, *pykF* y *lacI*, para aumentar la capacidad metabólica de la célula en la generación de ácido shikímico, logrando así obtener el rendimiento de este metabolito más alto reportado hasta ahora (42 %) en una cepa de *E. coli*.

Finalmente, se ha propuesto la eliminación del transportador SA codificado por el gen *shiA*, ya que se ha observado que a través de este, el ácido shikímico puede re-ingresar a la célula provocando una acumulación, la cual inhibe a las enzimas DHQ sintasa y shikimato deshidrogenasa mediante un mecanismo de control alostérico, provocando que el flujo de carbono se desvíe hacia la generación de ácido quínico, ácido gálico y ácido protocatecuico (Escalante et al. 2010).

#### **6.2.4. Nuevos modelos para la producción de ácido shikímico.**

A pesar de que *E. coli* es un microorganismo ampliamente utilizado para la producción de metabolitos de interés debido al conocimiento fenotípico, genotípico y disponibilidad de herramientas moleculares que existen, se ha calculado mediante análisis estequiométricos (considerando una cepa PTS<sup>-</sup> con un transporte de glucosa dependiente

de Glf) que el rendimiento teórico máximo de ácido shikímico es del 86 % (mol/mol) utilizando como fuente de carbono a la glucosa, sin embargo, a pesar de las diferentes estrategias utilizadas a lo largo de los años, el mayor rendimiento obtenido hasta ahora en *E. coli* es del 42 % (Chandran et al. 2003; Rodriguez et al. 2013). Tomando como referencia lo anterior y a la disponibilidad de información y metodologías actuales, diferentes grupos han comenzado la búsqueda de modelos de producción para este y otros compuestos, más robustos y capaces de utilizar medios de cultivo baratos.

La selección del organismo a utilizar es crucial y se deben de tener en consideración factores técnicos, económicos, títulos, productividad y rendimientos para la obtención de compuestos de interés. La generación de modelos a escala genómica y la facilidad para generar herramientas moleculares, han permitido que la selección de los microorganismos se base en sus características naturales como son una buena capacidad y versatilidad metabólica para utilizar diferentes fuentes de carbono; resistencia a condiciones estresantes (físicoquímicas y nutricionales); estabilidad fisiológica y genética; facilidad para realizar modificaciones genéticas y resistencia a las condiciones normales de operación en un biorreactor con buenas velocidades de crecimiento. De forma ideal, un microorganismo que reúna estas características puede reducir de manera considerable la cantidad de modificaciones genéticas que se deben realizar y, como consecuencia, la inversión necesaria para la obtención de cepas sobre-productoras de metabolitos de interés (Nikel et al. 2014; Gustavsson & Lee 2016).

Es importante mencionar que dentro de los modelos más recientes utilizados para la producción de ácido shikímico se encuentra el caso de una cepa de *Corynebacterium glutamicum*, a la cual le fueron inactivados los genes *ldh*, *aroK*, *qsuB*, *qsuD*, *ptsH*, *hdpA* y sobre-expresados los genes *tkt*, *tal*, *aroG*<sup>S180F</sup>, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *iolT1*, *glk1*, *glk2*, *ppgk*, *gapA* logrando obtener un título de 141 g/L y un rendimiento del 51 % (mol/mol) (Kogure et al. 2016) (Tabla 2). Este y otros trabajos han despertado el interés de nuestro grupo en buscar nuevos modelos bacterianos que puedan llegar a presentar una buena capacidad para la biosíntesis no solo de ácido shikímico sino también, de otros metabolitos de interés biotecnológico como son las fenazinas.

### **6.3. *Pseudomonas* spp.**

#### **6.3.1. Generalidades y ventajas**

El género *Pseudomonas* es considerado como ubicuo de la naturaleza y se encuentra en la superficie de plantas, rizosfera, agua, petróleo, insectos y humanos. Está dividido en 5 grupos y comprende 213 especies diferentes que pertenecen al grupo de las  $\gamma$ -

Proteobacterias; se caracterizan por ser microorganismos aerobios, Gram-negativos, no generadores de esporas y con presencia de flagelos polares (Nikel et al. 2014).

Si bien, dentro de este género existen algunas cepas patógenas para mamíferos y plantas (como es el caso de *P. aeruginosa* y *P. syringae* respectivamente), existen muchas otras que se distinguen por ser inocuas, adaptarse a diferentes condiciones fisicoquímicas y nutricionales, presentar una alta resistencia contra el estrés endógeno y exógeno, así como una capacidad para producir diferentes compuestos de interés biotecnológico como es el caso de *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. chlororaphis*. La versatilidad de este género se ha atribuido a diferentes mutaciones, transferencia horizontal de genes y procesos de recombinación, ya que el tamaño de su genoma puede variar desde 3.7 Mb (*P. stutzeri*), hasta 7.1 Mb (*P. aeruginosa*) (Nikel et al. 2014; Martínez-García & de Lorenzo 2017).

A pesar de que *Pseudomonas* spp apenas está siendo utilizado como modelo para la producción de compuestos con interés biotecnológico, se han observado diversas ventajas para la producción de diferentes metabolitos de interés, dentro de las cuales destacan:

- Producción natural de diferentes metabolitos secundarios como, moléculas de bajo peso molecular, biopolímeros, proteínas, entre otros.
- Alta tolerancia a condiciones adversas, entre las que destacan el estrés oxidativo, temperatura, pH, presencia de toxinas y solventes.
- Transporte de carbohidratos independiente del sistema PTS, excepto en el caso de la fructosa.
- Capacidad para utilizar al mismo tiempo algunas fuentes de carbono como, diferentes compuestos aromáticos hidrocarbonados, compuestos derivados del petróleo, polialcoholes, ácidos orgánicos y diferentes carbohidratos.
- Capacidad para degradar una gran variedad de compuestos químicos (salicilato, benzoato, tolueno, xileno, naftaleno, etc.) e integrarlos como intermediarios en alguna de las vías del metabolismo central de carbono.
- Presencia de una gran variedad de proteínas intermembranales capaces de exportar solventes tóxicos (Rojo 2010; Kahlon 2016; Martínez-García & de Lorenzo 2017).

Un punto que también es importante considerar es que diferentes grupos que trabajan con este género (especialmente con *P. putida* y *P. chlororaphis*) ya han comenzado a “optimizar” al microorganismo generando cepas con genomas reducidos, con la finalidad de disminuir el flujo de carbono hacia metabolitos no deseados o dispensables así como, con la modificación de diferentes mecanismos de regulación como, el sistema de dos componentes y aquellos que están mediados por GMP cíclico (Martínez-García & de Lorenzo 2017; Shen et al. 2017).

### 6.3.2. Metabolismo central de carbono.

En cuanto a su metabolismo, *Pseudomonas* spp obtiene la mayor parte de la energía y precursores necesarios para la biosíntesis de moléculas a partir de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la vía Entner-Doudoroff (ED), la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la vía de los ácidos tricarboxílicos (TCA), las cuales pueden actuar de manera conjunta dependiendo de la cepa, los sustratos utilizados y de las condiciones fisicoquímicas y ambientales en las que se encuentre (Nikel et al. 2016).

Bacterias de este género son capaces de codificar para la mayoría de las enzimas que usualmente participan en las vías antes mencionadas, sin embargo, se caracteriza por carecer de la enzima glicolítica 6-fosfofructocinasa I (Pfk) que cataliza la reacción de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato impidiendo que la glucosa sea catabolizada mediante la vía EMP, por lo que debe ser transformada a 6-fosfogluconato para que pueda ser utilizada por las vías ED (96 %) y PPP (4 %) (Nikel et al. 2016).

Para contender con esta deficiencia, diferentes estudios han demostrado que *Pseudomonas* spp presenta un ciclo llamado EDEMP, el cual, recibe este nombre ya que están involucradas la vía ED, partes de la vías EMP (en modo gluconeogénico) y PPP, lo cual favorece la generación de NADPH en la célula (Nikel et al. 2016). En el caso específico de *P. putida*, al utilizar como única fuente de carbono a la glucosa, cerca del 10 % del carbono (en forma de triosas fosfatadas) es reciclado a glucosa-6-fosfato mientras que el resto es metabolizado para la síntesis de acetil-coenzima A, a partir del cual, se genera poder reductor y los precursores necesarios para generar biomasa (Nikel et al. 2015).

La vía ED tiene como principales enzimas a la 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa, quienes se encargan de transformar el 6-fosfogluconato a gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. El rendimiento total de esta vía por molécula de glucosa es de 1 molécula de ATP, 1 de NADH y 1 de NADPH, sin embargo, debido a la capacidad del ciclo EDEMP en *Pseudomonas*, la generación de poder reductor puede aumentar de manera considerable debido al reciclaje de las triosas fosfatadas generadas (Kahlon 2016; Nikel et al. 2016).

La vía PPP y ED se conectan mediante el 6-fosfogluconato del cual cerca del 90 % es dirigido hacia la vía ED mientras que el resto sigue la vía PPP. En la parte oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, el 6-fosfogluconato es oxidado a D-ribulosa-5-fosfato, posteriormente, dentro de la parte no-oxidativa se generan 3 metabolitos precursores para la síntesis de nucleótidos y aminoácidos aromáticos (D-ribosa-5-fosfato, D-pseudoheptulosa-7-fosfato y D-eritrosa-4-fosfato), además, esta vía es de suma importancia para la generación de poder reductor en forma de NADPH, el cual es el principal



donador de electrones para la síntesis de ácidos grasos, sideróforos y el control del estrés oxidativo (Nikel et al. 2015; Kahlon 2016).

Por último, el TCA se encarga de generar energía, poder reductor y precursores para la biosíntesis de diferentes compuestos empleando como precursor al acetil-coA a partir del cual, se genera CO<sub>2</sub>, NADH, NADPH, quinol y GTP. El NADH, NADPH y quinol son utilizados como donadores de electrones para generar ATP mediante la fosforilación oxidativa, sin embargo, cuando el NADH se acumula debido a la limitación de oxígeno o nitrato como último aceptor de electrones, la célula mantiene su equilibrio redox al generar fenazinas que actúan como aceptores de electrones. Se sabe que *P. putida* y *P. fluorescens* son capaces de utilizar acetato como fuente de carbono así como el resto de los intermediarios del TCA, presentando una fase lag al cambiar de una fuente a otra debido a la necesidad de sintetizar diferentes permeasas necesarias para su transporte (Kahlon 2016).

El género se caracteriza por metabolizar de manera eficiente diferentes fuentes de carbono como, fructosa, manosa, galactosa, glicerol, hidrocarburos derivados del petróleo, benzoatos, tolueno, etc., los cuales pueden integrarse a las vías antes mencionadas para la obtención de energía y esqueletos de carbono. A pesar de que *Pseudomonas spp* es un microorganismo aerobio estricto, este es capaz de crecer en ausencia de oxígeno siempre y cuando existan sales nitrogenadas (especialmente nitratos y nitritos) que puedan ser utilizadas como último aceptor de electrones (Kahlon 2016).

El transporte de la mayoría de los nutrientes hacia el citoplasma de la célula está mediado principalmente por 4 porinas sustrato-selectivas (OprD, OprP, OprO y OprB) y en su minoría, por sistemas de transporte activo y el sistema PTS (solo para fructosa). En el caso específico de la glucosa, es transportada a través de la membrana interna mediante la vía oxidativa y la vía fosforilativa dependiente de nucleótidos, en la primera, la glucosa es oxidada a gluconato y posteriormente en 2-cetogluconato en el espacio periplásmico, los cuales son transportados al citoplasma a través de la gluconato permeasa (GntP) y la 2-cetogluconato transferasa (KguT) respectivamente, en la segunda vía, la glucosa es transportada mediante un sistema ABC; una vez que está en el citoplasma, la glucosa es metabolizada a glucosa-6-fosfato. De estas dos posibilidades que tiene el microorganismo, se sabe que hay un mayor flujo de carbono por la ruta oxidativa (cerca del 80 %) mientras que el resto utiliza la vía fosforilativa (Nikel et al. 2015; Kahlon 2016)

La regulación del catabolismo de la glucosa, a diferencia de otros organismos, está mediada principalmente por sistemas de un componente (OCSs) como son HexR, PtxS, PtxR y GntR. HexR actúa como un represor a nivel transcripcional de los operones *zwf/pgl/eda* y *edd/glk/gltR-2*, hasta que reconoce y se une con la molécula 2-ceto-3-deoxi-6-

fosfogluconato (KDPG), por otro lado, PtxS y PtxR regulan transcripcionalmente los genes involucrados en el catabolismo del gluconato como son *kgu* y *gad*, siendo el 2-cetogluconato un efector solo para PtxS; finalmente, GntR se encarga de regular los genes *gnuK*, *gntP* y *gntZ*, perdiendo su efecto negativo sobre los genes en presencia de gluconato y 6-fosfogluconato (Udaondo et al. 2018).

Por otro lado, al usar glicerol como única fuente de carbono se sabe que los genes necesarios (locus *glp*), para que *Pseudomonas* pueda metabolizarlo están regulados de manera transcripcional por la proteína GlpR la cual, es inhibida por la presencia del gliceraldehído-3-fosfato y, en contraparte, estudios en *P. putida* han demostrado que la utilización de este sustrato aumenta considerablemente con la presencia del glicerol-3-fosfato (intermediario de la vía de metabolización). Este polirol es difundido por GlpF al interior de la célula y, una vez dentro, es fosforilado por GlpK generando glicerol-3-fosfato, el cual es deshidrogenado a dehidroxiacetona-fosfato por GlpD, este último puede ser utilizado por la vía EMP para generar fructosa-1,6-bifosfato o gliceraldehído-3-fosfato (Nikel et al. 2015; Kahlon 2016).

El glicerol no solo tiene como ventaja ser una fuente de carbono barata, en *P. putida* se ha demostrado que al utilizarlo como única fuente de carbono se usan de manera simultánea vías glicolíticas y gluconeogénicas, hay buena eficiencia en la conversión del polirol a biomasa, hay operación de componentes específicos de la cadena respiratoria y un menor estrés fisiológico (Nikel et al. 2014).

### **6.3.3. Herramientas moleculares implementadas en *Pseudomonas* spp.**

Gracias a la secuenciación y anotación del genoma de diversas cepas de *Pseudomonas*, se han logrado desarrollar distintas metodologías para su modificación genética. Dentro de las estrategias más utilizadas para generar cepas con fines biotecnológicos destacan, al igual que en otros modelos, la inactivación y sobre-expresión génica, así como la expresión heteróloga de uno o varios genes.

La modificación genética de *Pseudomonas* puede llevarse a cabo de diversas maneras, en el caso de la expresión heteróloga o sobre-expresión de algún gen, se pueden utilizar plásmidos que se introducen a las células mediante metodologías de transducción y conjugación (utilizado especialmente para *P. aeruginosa*) y de manera más amplia la electrotransformación (Filloux, 2014).

Los vectores normalmente utilizados en *Pseudomonas* spp son plásmidos de amplio número de hospederos (BHR por sus siglas en inglés), los cuales también pueden ser replicados en otras cepas como *E. coli*, tal es el caso de los vectores derivados del RSF1010,

replicón RK2, pSa, R388 y pBBR1 (Tabla 3) (Martínez-García & de Lorenzo 2017). Si bien, los plásmidos usados en *E. coli* tienen sitios de origen de replicación diferentes pero compatibles con *Pseudomonas* como son ColE1, se ha observado que para su replicación en *Pseudomonas* se necesita que en el mismo vector este presente un sitio OriV pRO1600 y una proteína que sea capaz de replicarlo, razón por la cual West y colaboradores (1994) desarrollaron unos plásmidos denominados pUCP que cumplen con las características antes mencionadas.

**Tabla 3. Características de algunos vectores utilizados en *Pseudomonas* spp.**

Plásmido	Tamaño (kbp)	Origen de replicación	Marcador de selección	Número de copias
RSF1010 (Bagdasarian et al. 1981; Frey et al. 1992)	8.9	RSF1010 Requiere las proteínas Rep A/B/C para su replicación	Resistencia a estreptomicina - sulfonamida	<i>E. coli</i> : Bajo <i>Pseudomonas</i> spp: Alto
pBBR1 (Antoine & Loch 1992)	2.6	pBBR1 Requiere proteína Rep pBBR1 para su replicación	Resistencia a Cloranfenicol	Mediano número de copias
pUCP24 (West et al. 1994)	4.0	pRO1600 / ColE1 Requiere la proteína pRO1600 para su replicación en <i>Pseudomonas</i> spp	Resistencia a gentamicina	<i>E. coli</i> : Alto <i>Pseudomonas</i> spp: Variable
pSEVA221 (Silva-Rocha et al. 2013)	3.8	RK2 Requiere de la proteína TrfA para su replicación	Resistencia a Kanamicina	Bajo número de copias

Al igual que con otros modelos utilizados, los plásmidos desarrollados presentan diferentes características como son los marcadores de selección y promotores inducibles, en el caso de *Pseudomonas*, estos últimos usualmente son  $P_m$ ,  $P_{sal}$ ,  $P_{rhab}$ ,  $P_{araB}$ ,  $P_{tet}$  y  $P_{lac}$  (inducidos con 3-metilbenzoato, salicilato, ramnosa, arabinosa, tetraciclina e IPTG, respectivamente), obteniendo niveles de inducción diferentes dependiendo del sistema que se esté utilizando así como de la concentración de inductor, dicha concentración, en el caso de los  $P_{Trc}$  y  $P_{lac}$  tiende a ser mayor con respecto a la utilizada en *E. coli* (Cook et al. 2018).

El “knock-in” de uno o varios genes en el cromosoma de *Pseudomonas* generalmente se realiza mediante metodologías basadas en el uso de los transposones Tn5

y Tn10 y, en caso de que la inserción se deseé en un sitio específico, se seleccionan o diseñan transposones (generalmente se busca similitud nucleotídica con las secuencias attTn7 ya que están naturalmente en el cromosoma) que sean capaces de insertarse en una región específica del genoma, o bien, se implementan estrategias basadas en el uso de integrasas que sean capaces de encontrar sitios específicos en el genoma (Nikel et al. 2014).

La eliminación de genes en *Pseudomonas* spp mediante la inserción de productos de PCR (Datsenko & Wanner, 2000) no es eficiente en este género, sin embargo, se ha descrito una metodología similar, en la cual se sustituye el gen a inactivar por un cassette de resistencia a antibióticos mediado por un mecanismo de doble recombinación, finalmente, dicho cassette puede ser escindido con el uso de plásmidos que codifiquen para la recombinasa FLP (Choi & Schweizer 2005). Tanto la estrategia mencionada anteriormente como aquellas basadas en el sistema *Cre-loxP*, han presentado buenas eficiencias en *Pseudomonas* pero tienen la desventaja de generar cicatrices *FRT* o *loxP* respectivamente, lo cual puede llegar a ser una limitante cuando se desean hacer varias eliminaciones secuenciales (Cook et al. 2018).

El sistema CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente utilizado en diferentes áreas para realizar modificaciones genéticas precisas, y en la actualidad ya existen reportes de la utilización de este sistema para la edición de genomas de diversos microorganismos dentro de las cuales está el caso de *P. putida*. La ventaja de este sistema sobre los antes mencionados es que, si bien, aún está siendo optimizado, ha permitido la generación de cepas mutantes en un menor número de pasos, con una mayor eficiencia y sin la presencia de cicatrices (Cook et al. 2018).

#### **6.3.4 Producción de metabolitos de interés.**

Debido a la diversidad y capacidad metabólica que presentan las diferentes especies del género *Pseudomonas*, estas han comenzado a ser explotadas con fines médicos, ambientales, agrícolas y biotecnológicos, ya que pueden realizar biotransformaciones, sintetizar compuestos quirales, producir biopolímeros y surfactantes, degradar compuestos orgánicos, entre otros; la producción de estos compuestos de manera natural ayuda al microorganismo en la competencia y defensa en su ambiente natural. En los últimos años, las especies más utilizadas han sido *P. putida*, *P. fluorescens* y recientemente *P. chlororaphis* en las cuales se han realizado diferentes inactivaciones génicas, sobre-expresiones y expresiones heterólogas de diferentes proteínas (Kahlon 2016). En la tabla 4 se presentan algunos ejemplos de las aplicaciones más relevantes que han tenido algunas especies en los últimos años.

**Tabla 4. Metabolitos obtenidos a partir de cepas del género *Pseudomonas*.**

Cepa	Metabolito	Modificación genética	Condiciones de fermentación	Título
<i>P. chlororaphis</i> (Gunther et al. 2005)	Mono-ramnolípidos (Con cadenas C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>12:1</sub> , y C <sub>14:1</sub> )	Ninguna	Cultivo en lote (matraz) temperatura ambiente. Medio mineral con 2 % glucosa.	1 g/L
<i>P. putida</i> S12 (Wierckx et al. 2005)	Fenol	Expresión heteróloga del gen <i>tpl</i> proveniente de <i>Pantoea agglomerans</i> , sobre-expresión del gen <i>aroF1</i> (por transposones) y mutagénesis al azar ( <i>oprB</i> ).	Sistema bifásico: medio mínimo + Glc - Octanol	58 mM
<i>P. putida</i> KT2440 (Borrero-de Acuña et al. 2014)	Polihidroxicanoatos de cadena mediana	Sobre-expresión del gen <i>acoA</i> e inactivación del gen <i>gcd</i>	Cultivo en lote (1.5 L). Medio M9 con 18.5 g/L de glucosa.	0.11 g/g
<i>P. chlororaphis</i> GP72 (K. Liu et al. 2016)	2-hidroxifenazina	Sobre-expresión de los genes <i>ppsA</i> , <i>tktA</i> , <i>phzC</i> , <i>aroB</i> , <i>aroD</i> y <i>aroE</i> e inactivación de <i>pykF</i> , <i>rpeA</i> , <i>rsmE</i> e <i>lon</i>	Cultivo en lote (matraz). Medio King's B.	450.4 mg/L
<i>P. chlororaphis</i> GP72 (Hu et al. 2017)	Ácido trans-2,3-dihidro-hidroxiantranílico	Sobre-expresión de los genes <i>ppsA</i> y <i>tktA</i> e inactivación de <i>phzF</i> , <i>rpeA</i> y <i>pykF</i> .	Cultivo en lote (matraz). Medio King's B.	4.98 g/L
<i>P. chlororaphis</i> HT66 (Yao et al. 2018)	Fenazina-1-carboxiamida (PCN)	Inactivación de los genes <i>lon</i> , <i>parS</i> y <i>prsA</i>	Cultivo en lote (matraz). Medio King's B.	4.10 g/L

#### **6.4. *Pseudomonas chlororaphis***

*P. chlororaphis* se encuentra de manera natural en la rizosfera de diferentes plantas como es el caso del pimiento verde, arroz, soya y tomate. Se sabe que este microorganismo juega un papel importante para el crecimiento de las plantas antes mencionadas debido a la producción de compuestos que impiden el crecimiento de hongos, insectos, bacterias patógenas y nematodos debido a su capacidad para producir antibióticos, fenazinas, quitinasas, entre otros. (Liu et al. 2016; Anderson 2018). El cromosoma de diferentes cepas de esta especie varía entre 5.59 – 7.07 Mpb, con un rango de genes codificantes para proteína entre 5,597 – 6,223; al igual que otras especies pertenecientes a este género, el contenido de GC es relativamente alto (60 – 64%) (Calderón et al. 2015).

Dentro de las principales características reportadas para esta especie destacan su capacidad para fijar nitrógeno, generar pigmentos fluorescentes, generación de levana a partir de sacarosa y la utilización de diferentes fuentes de carbono como, el manitol, manosa, sacarosa, trealosa,  $\alpha$ -cetogluconato, m-inositol, triptófano entre otros (Nishimori et al. 2000).

La utilización de ciertas especies de *P. chlororaphis* se ha visto favorecida debido a que desde 1990 ha sido implementada como biopesticida, promotora de crecimiento de plantas y reservorio de genes para la generación de maíces y tomates genéticamente modificados, tal es el caso del gen *ipd072Aa* que al ser expresado en maíz codifica una proteína que es capaz de proteger los cultivos de plagas de escarabajos (*Coleopteran*) (Anderson et al. 2018). Aunado a esto, las características fenotípicas y genotípicas de este microorganismo han promovido su uso para la síntesis de otros compuestos de interés biotecnológico como es el caso de ramnolípidos y fenazinas.

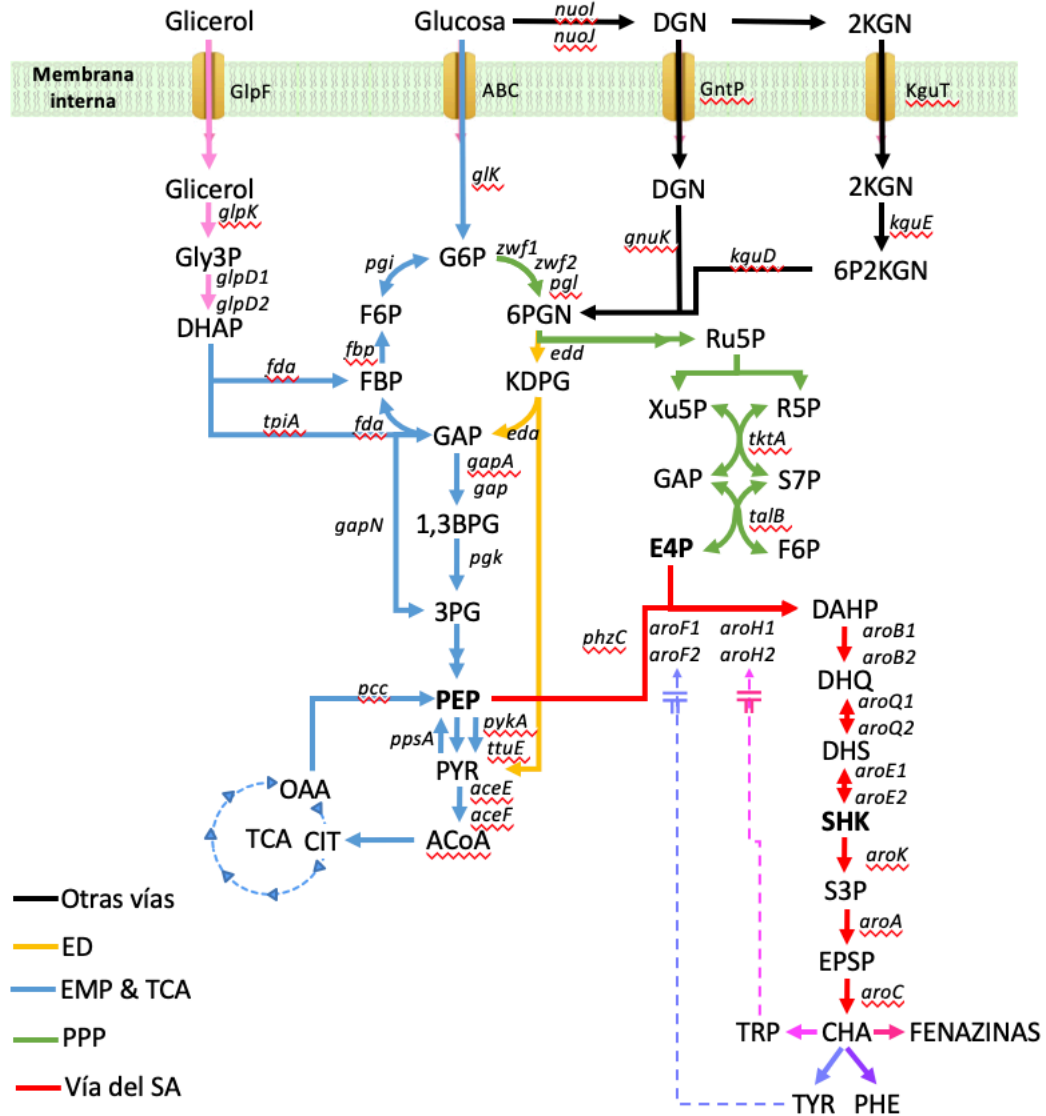
##### **6.4.1. Vía metabólica para la producción de ácido shikímico.**

Tomando como referencia la secuencia y anotación de *P. chlororaphis* ATCC 9446 depositada en la base de datos del GenBank (Moreno-Avitia et al. 2017), se determinó cuáles y cuantos son los genes que participan en la síntesis del ácido shikímico en este microorganismo (Figura 3). Al igual que en *E. coli*, la vía está compuesta por 7 reacciones obteniendo como producto final al corismato, a partir del cual se sintetizan aminoácido aromáticos, algunos cofactores, enzimas, fenazinas y sideróforos (Hu et al. 2017). Las principales diferencias observadas con respecto a *E. coli* son la utilización de la vía ED, la presencia de dos copias de los genes *aroF* y *aroH* y la ausencia de los genes *aroG* y *aroL*.

Una diferencia que llamó la atención fue que solo uno de los genes (*pykA*) que codifican para las isoenzimas piruvato cinasas presenta similitud con el gen reportado para

*E. coli*, sin embargo, el otro gen (*ttuE*) presenta una mayor similitud con la piruvato cinasa de *Agrobacterium vitis*, esto puede marcar una diferencia con respecto a *E. coli* al realizar las inactivaciones de estos genes en cuanto a su efecto en la capacidad de crecimiento y producción de *P. chlororaphis*.

Por otro lado, *P. chlororaphis* presenta 2 genes codificantes para las isoenzimas 3-dehidroquinato sintasa, 3-dehidroquinato deshidratasa así como un gen extra para una DAHP sintasa (*phzC*), este último se encuentra dentro del operón *phz* y se sabe que su regulación está dada a nivel transcripcional (Bilal et al. 2017).



**Figura 3. Vías involucradas en la síntesis de ácido shikímico en *P. chlororaphis* ATCC 9446.**  
**Intermediarios en el transporte de glicerol:** DHAP, dehidroxiacetona fosfato; Gly3P, glicerol-3-fosfato.  
**Intermediarios en el transporte de glucosa, en la vía de glucólisis y ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA):**  
 DGN, gluconato; 2KGN, 2-ceto-D-gluconato; 6P2KGN, 6-P-2-ceto-D-gluconato; KDPG, 6-P-2-ceto-deoxi-D-gluconato; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; ACoA, acetil-CoA; OAA, oxalacetato; CIT, citrato.  
**Intermediarios en la vía de las pentosas fosfato (PPP):** 6PGN, 6-fosfogluconato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; S7P, pseudoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa-4-fosfato.  
**Intermediarios de la vía del ácido shikímico:** DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato; DHQ, 3-dehidroquinato; AQ, ácido quínico; DHS, 3-dehidroshikimato; AG, ácido gálico; AS, ácido shikímico; S3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato; CHA, corismato; TRP, triptófano; TYR, tirosina; PHE, fenilalanina. Las líneas discontinúas indican regulación por control alostérico. \*Mapa metabólico construido tomando como referencia la anotación de Moreno-Avitia et al. 2017.



## 7. JUSTIFICACIÓN.

El interés industrial sobre el ácido shikímico ha llevado a diferentes grupos de investigación a la generación de microorganismos recombinantes capaces de producirlo de una manera eficiente y a bajo costo, sin embargo, no se ha realizado ningún estudio relacionado con *P. chlororaphis* ATCC 9446. Se ha reportado que este microorganismo puede asimilar diversas fuentes de carbono al mismo tiempo, es capaz de producir de manera natural diferentes metabolitos de interés como, las fenazinas y presenta cierta tolerancia a condiciones extremas, lo cual podría favorecer el uso de este modelo para la producción de ácido shikímico.

## 8. HIPÓTESIS.

Se obtendrán cepas derivadas de *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 sobre-productoras de ácido shikímico al interrumpir la vía del shikimato, aumentando la disponibilidad de los precursores del metabolismo central de carbono (PEP y E4P) y mediante la sobre-expresión de los genes que participan en la vía (*aroB*, *aroD*, *aroE* y *aroG<sup>fbr</sup>*).

## 9. OBJETIVOS.

### 9.1. General:

Evaluar la capacidad de producción de ácido shikímico en cepas derivadas de *P. chlororaphis* empleando medio rico con diferentes fuentes de carbono.

### 9.2. Particulares:

- Generar una cepa de *P. chlororaphis* capaz de acumular ácido shikímico mediante la inactivación del gen que codifica la enzima shikimato cinasa (*aroK*).
- Comparar el efecto de la inactivación de uno de los genes que codifican para la enzima piruvato cinasa (*pykA* y *ttuE*) en la cepa *P. chlororaphis*  $\Delta$ *aroK* sobre el crecimiento y la producción de ácido shikímico.
- Sobre-expresar los genes que participan en la vía del ácido shikímico (*aroB*, *aroD*, *aroE*, *aroG*), así como el gen *tktA*.
- Evaluar la capacidad de producción de ácido shikímico en sistemas de fermentación empleando medio rico con glucosa, glicerol y una mezcla de ambos.

## 10. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

En la figura 4, se muestra un diagrama general de la metodología experimental seguida durante el proyecto de maestría.

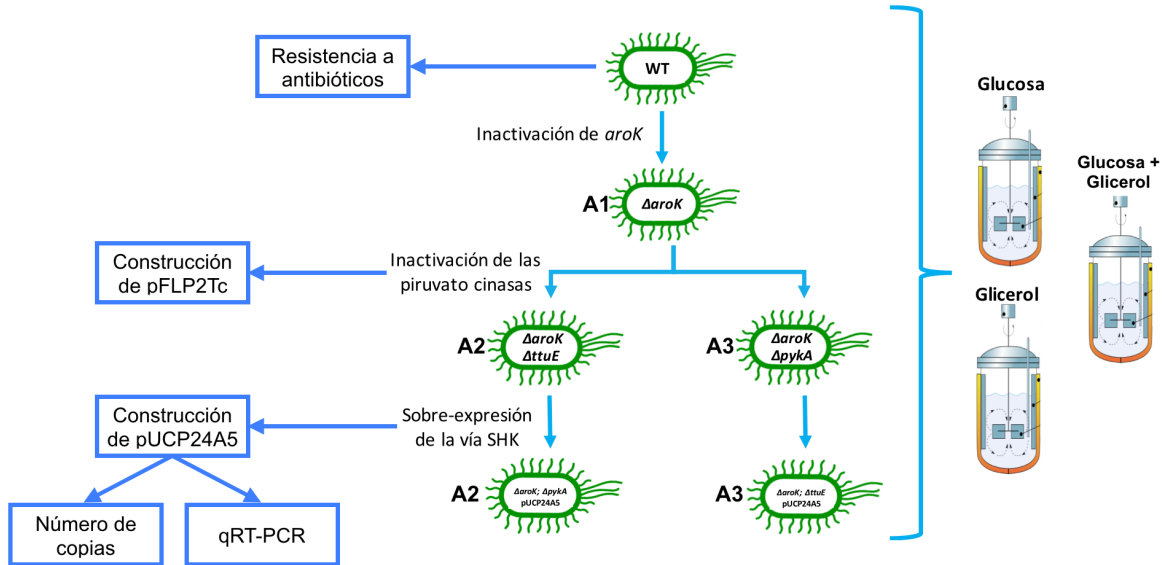


Figura 4. Diagrama general de la metodología experimental.

### 10.1. Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento.

Las cepas y plásmidos utilizados se enlistan en la tabla 5. La propagación de las cepas derivadas de *E. coli* y *P. chlororaphis* se realizó en medio Luria-Bertani (LB; Triptona 1 %, Extracto de levadura 0.5 % y NaCl 0.5 %) con una temperatura de incubación de 37 y 30 °C, respectivamente. En caso de ser necesario, a los cultivos de *E. coli* se añadió carbenicilina (Cb, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), gentamicina (Gm, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kanamicina (Km, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o tetraciclina (Tc, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mientras que, para *P. chlororaphis* se utilizó gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tetraciclina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las concentraciones antes mencionadas fueron utilizadas en todos los experimentos a menos que se indique lo contrario.

**Tabla 5. Cepas y plásmidos utilizados.**

Cepa/Plásmido	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	-	-
<i>P. chlororaphis</i> ATCC 9446	Cepa silvestre	-
<i>P. chlororaphis</i> A1	Cepa $\Delta$ aroK::Km	Este trabajo
<i>P. chlororaphis</i> A11	Cepa $\Delta$ aroK; Km <sup>S</sup>	Este trabajo
<i>P. chlororaphis</i> A2	Cepa $\Delta$ aroK $\Delta$ pykA::Km	Este trabajo
<i>P. chlororaphis</i> A3	Cepa $\Delta$ aroK $\Delta$ ttuE::Km	Este trabajo
<i>P. chlororaphis</i> A25	Cepa $\Delta$ aroK $\Delta$ pykA::Km; pUCP24A5	Este trabajo
<i>P. chlororaphis</i> A35	Cepa $\Delta$ aroK $\Delta$ ttuE::Km; pUCP24A5	Este trabajo
Plásmidos		
pKD4	Cassette de resistencia para Km flanqueado por sitios <i>FRT</i>	Datsenko & Wanner 2000
pEX18Gm	Vector suicida en <i>P. chlororaphis</i>	Hoang et al. 1998
pBR322	Contiene cassette de resistencia para Tc	Bolivar et al. 1977
pFLP2	Codifica para la recombinasa FLP y resistencia a Ap	Hoang et al. 1998
pTrcAro6	Contiene el operón que codifica para los genes <i>aroB</i> , <i>tktA</i> , <i>aroG<sup>fbr</sup></i> , <i>aroE</i> , <i>aroD</i> y <i>zwf</i>	Rodriguez et al. 2013
pCR-XL-TOPO®	Vector de clonación TOPO®, codifica para la resistencia a kanamicina y zeocina, sitio <i>ori pUC</i>	Invitrogen®
pUCP24	Vector BHR (sitios <i>ori ColE1</i> y <i>pRO1600</i> ), codifica gen de resistencia a Gm	West et al. 1994
pFLP2Tc	Codifica para la recombinasa FLP y resistencia a Tc	Este trabajo
pEX18Gm: $\Delta$ aroK	Vector suicida en <i>P. chlororaphis</i> para la inactivación del gen <i>aroK</i>	Este trabajo
pEX18Gm: $\Delta$ pykA	Vector suicida en <i>P. chlororaphis</i> para la inactivación del gen <i>pykA</i>	Este trabajo
pEX18Gm: $\Delta$ ttuE	Vector suicida en <i>P. chlororaphis</i> para la inactivación del gen <i>ttuE</i>	Este trabajo
PCR-XL-TOPO-Aro5	Vector pCR-XL-TOPO® con los genes <i>aroB</i> , <i>tktA</i> , <i>aroG<sup>fbr</sup></i> , <i>aroE</i> , <i>aroD</i> provenientes del plásmido pTrcAro6	Este trabajo
pUCP24 Aro5	Vector pUCP24 con los genes <i>aroB</i> , <i>tktA</i> , <i>aroG<sup>fbr</sup></i> , <i>aroE</i> , <i>aroD</i> provenientes del plásmido pTrcAro6	Este trabajo

## 10.2. Evaluación de la resistencia a antibióticos de *P. chlororaphis* ATCC 9446.

Para las pruebas realizadas se partió de colonias aisladas crecidas previamente en agar LB (Tryptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.5 % y agar bacteriológico 2 %), las cuales fueron estriadas por triplicado en agar LB con la respectiva concentración de antibiótico (Tabla 6). El crecimiento fue evaluado después de 24 h de incubación a 30 °C.

**Tabla 6. Concentración de antibióticos utilizados.**

Antibiótico	Concentración (µg/mL)
Acromicina	50
Carbenicilina	100
Cloranfenicol	30
Espectomicina	50
Estreptomina	100
Gentamicina	50
Kanamicina	50
Tetraciclina	50
Zeocina	100

## 10.3. Obtención de material genético.

### 10.3.1. Extracción de DNA cromosomal.

La extracción de DNA cromosomal fue realizada con el kit UltraClean™ Microbial DNA isolation (MOBIO®), siguiendo las instrucciones de uso del proveedor (Anexo II).

### 10.3.2. Extracción de DNA plasmídico.

Se siguió la metodología miniprep por lisis alcalina (Ausubel et al, 1999), por lo que cultivos saturados fueron alicuotados en micro tubos de centrifuga de 1.5 mL los cuales se centrifugaron a 13,200 rpm/2 min. El paquete celular se re-suspendió en 1 mL de la solución I fría (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, sacarosa al 8 %, pH = 8), se centrifugó de la misma manera, se retiró el sobrenadante y se añadieron 150 µL de la solución I fría, 5 µL de RNasa y 350 µL de la solución II (SDS al 1 % y NaOH 0.02 M), se mezcló por inversión y se incubó en hielo 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 250 µL de la solución III fría (acetato de sodio 3 M, pH = 5.2), se homogeneizó por inversión y se incubó en hielo 30 min. Esta mezcla se centrifugó a 13,200 rpm/5 min, el sobrenadante obtenido se colocó en un

micro tubo de centrífuga nuevo al cual se le agregó 1 mL de isopropanol y se centrifugó de la misma manera, la pastilla resultante se disolvió en 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se secó a 30 °C/10 - 15 min, este último se re-suspendió en 50 µL de buffer TE (Tris-KCl 10 mM, EDTA 1 mM y pH=8) y fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

## **10.4 Electrotransformación.**

### **10.4.1. Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación en *E. coli* DH5α.**

A partir de un cultivo saturado de la cepa se inocularon 250 µL en 50 mL de medio YENB (extracto de levadura 0.75 % y caldo nutritivo 0.80 %) hasta obtener una densidad óptica (OD<sub>600nm</sub>) entre 0.6 - 0.9 (aproximadamente de 3 a 4 h). El inóculo se centrifugó a 4 °C/8,000 rpm/5 min, el sobrenadante fue desechado y las células fueron lavadas 2 veces con 20 y 10 mL de agua bidestilada fría respectivamente. El “pellet” obtenido fue re-suspendido en 1 mL de glicerol al 10 % y colocado en tubos de 1.5 mL los cuales, se centrifugaron a 13,200 rpm/1 min, el sobrenadante fue desechado y se añadieron 300 µL de glicerol al 10 %, finalmente, se alicuotaron 50 µL de la suspensión en tubos de 1 mL; las células obtenidas fueron almacenadas a -70 °C.

La electrotransformación se llevó a cabo con 50 µL de células y de 2 -4 µL de DNA (10 – 500 ng), utilizando un pulso eléctrico de 1,800 V (cubetas de electroporación de 0.1 cm) o 2,500 V (cubetas de electroporación de 0.2 cm); las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC (Tryptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.058 %, MgSO<sub>4</sub> anhidro 0.12 %, NaCl.6H<sub>2</sub>O 0.2 %, KCl 1.25 mM y glucosa 20 mM) e incubadas a 37 °C/300 rpm/2 h. La selección de las colonias se realizó plaqueándolas en agar LB con las respectivas concentraciones de antibióticos.

### **10.4.2. Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación en *P. chlororaphis*.**

A partir de un criovial almacenado a -70 °C, se inoculó una asada en 4 mL de medio LB, el cual se incubó a 30 °C/300 rpm/18 h, se transfirió 1.5 mL de medio a 2 micro tubos de centrífuga y se centrifugó a 13,200 rpm/2 min, transcurrido el tiempo, se desechó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 1 mL de sacarosa 300 mM. Finalmente, las células se re-suspendieron en 100 µL de la misma solución. Se agregó de 2 a 4 µL de DNA (100 – 500 ng) a 50 µL de células y, por último, a la mezcla le fue aplicado un pulso eléctrico

de 1,800 V (cubetas de electroporación de 0.1 cm) o 2,500 V (cubetas de electroporación de 0.2 cm).

De igual manera, las células fueron recuperada en medio SOC a 30 °C/300 rpm/2 h, y fueron plaqueadas en agar LB con su respectivo antibiótico.

## **10.5. Generación de herramientas moleculares.**

### **10.5.1. Plásmido pFLP2Tc.**

El cassette de resistencia a tetraciclina fue amplificado del plásmido pBR322 utilizando la polimerasa KAPA HiFi (KAPA BIOSYSTEMS®) siguiendo las recomendaciones del proveedor, las condiciones de reacción se encuentran descritas en la tabla 5. Los “primers” PfoIFw y AhdIRv (Anexo I) contienen los sitios de corte para las enzimas de restricción *Pfo* I y *Ahd* I en los extremos 5´ y 3´, respectivamente. El amplicón fue purificado a partir de un gel de electroforesis siguiendo las instrucciones del proveedor (GeneJET Gel Extraction, Thermo Scientific®, Anexo III).

Tanto el producto de PCR purificado como el plásmido pFLP2 fueron digeridos durante toda la noche (Buffer tango 1X; DNA 1 µg; *Pfo* I 0.5 U; *Ahd* I 1 U) y, finalmente, fueron ligados durante toda la noche con la ligasa T4 (ThermoScientific®) siguiendo las instrucciones del proveedor y una relación inserto:vector 3:1. El producto obtenido fue electrotransformado en *E. coli* DH5α (10 – 100 ng). Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante la extracción del plásmido y la digestión del mismo.

## **10.6. Inactivación de los genes *aroK*, *pykA* y *ttuE*.**

### **10.6.1. Overlap Extension PCR.**

Por cada gen inactivado se utilizaron un total de 3 pares de “primers” (Anexo I); el primer par amplifica de 200 a 400 pb río arriba del extremo 5´ del gen a inactivar, el segundo par amplifica el cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios *FRT* del plásmido pKD4 mientras que el tercero, amplifica de 200 a 400 pb río abajo del extremo 3´ del gen de interés. Las secuencias que fueron utilizadas como molde para el diseño de los “primers” provienen de la anotación del genoma reportado por Moreno-Avitia et al. 2017, excepto para el gen *aroK*, en el cual se utilizó una secuencia consenso obtenida a partir de los alineamientos de 500 pb río arriba y río abajo del gen de interés de las cepas *P. chlororaphis* PA23 y *P. chlororaphis* O6.

Las amplificaciones se realizaron utilizando 0.5 U de DNA polimerasa KAPA™ HiFi (KAPA BIOSYSTEMS®), KAPA HiFi buffer Fidelity (1X), KAPA dNTP Mix (0.3 mM de cada uno),

“primers” correspondientes (0.3  $\mu$ M de cada uno), 10-100 ng de DNA y 1 % DMSO en caso de usar DNA cromosomal como templado; las condiciones de reacción se encuentran descritas en la tabla 7.

**Tabla 7. Condiciones para la amplificación por PCR de los fragmentos 5', 3', Km<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup> y overlap PCR.**

Temperatura / Tiempo		Número de ciclos	
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C/3 min	1	
<b>Desnaturalización</b>	98 °C/20 s	30	
<b>Alineamiento</b>	Inactivación de <i>aroK</i> , <i>pykA</i> , <i>ttuE</i> y overlap		63.3 °C/30 s
	Cassette de resistencia (Km y Tc)		64 °C/30 s
<b>Amplificación</b>	Fragmentos 5' y 3' de <i>aroK</i> , <i>pykA</i> , <i>ttuE</i>		72 °C/1.5 min
	Cassette de resistencia (Km y Tc), overlap		72 °C/1.5 min
<b>Extensión final</b>	72 °C/5 min	1	

Para la reacción de overlap extension PCR (OE PCR) se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 7 y la mezcla de reacción antes mencionada, ajustando la concentración de cada fragmento a 15 ng. Los primeros 3 ciclos de PCR se realizaron en ausencia de primers y después, la reacción continuó por 27 ciclos más con los pares de “primers” *aroK*5'FHindIII y *aroK*3'RHindIII para la inactivación del gen *aroK*; *PykI*5'FHindIII y *PykI*3'RHindIII para la inactivación del gen *pykA* y *Pyk25*'FHindIII y *Pyk23*'RHindIII para la inactivación del gen *ttuE*.

#### 10.6.2. Ligación del fragmento de OE PCR al plásmido pEX18Gm.

El fragmento obtenido de la reacción de OE PCR se purificó a partir del gel de electroforesis con el kit mencionado anteriormente y, fue digerido con la enzima *Hind* III (ThermoScientific®) durante 3 h a 37 °C, empleando la mezcla de reacción recomendada por el proveedor (Buffer R 1X; DNA 1  $\mu$ g; *Hind* III 0.5 U), el producto obtenido fue ligado al vector pEX18Gm (previamente digerido bajo las mismas condiciones) con la ligasa T4 como se ha descrito anteriormente.

### 10.6.3. Selección de mutantes.

El producto de ligación obtenido fue electrotransformado en *E. coli* DH5 $\alpha$  y, una vez que la secuencia del plásmido fue comprobada mediante patrones de restricción, este fue electrotransformado en *P. chlororaphis*.

Las colonias obtenidas después de la electrotransformación en *P. chlororaphis* fueron inoculadas en agar LB + Km, agar LB + Gm y agar LB + Km + 5 % de sacarosa, las cajas se incubaron a 30 °C/24 h. Aquellas colonias que no crecieron en el medio con gentamicina, pero sí crecieron en los medios con kanamicina con y sin sacarosa, fueron seleccionadas para comprobar la inactivación genotípicamente mediante PCR y secuenciación. En el caso de que todas las colonias obtenidas crecieran en el medio con Gm, estas fueron re-inoculadas en medio LB + Km + sacarosa (10 %) e incubadas a 30 °C/300 rpm/24 h, posteriormente, fueron plaqueadas en agar LB + Km + sacarosa (5 %) en cuadrante radial para obtener colonias aisladas, las cuales fueron de nuevo inoculadas en los medios con Gm, Km y Km + sacarosa (5 %); este procedimiento se realizó hasta obtener colonias que presentaran el fenotipo deseado en los medios mencionados.

### 10.6.4. Comprobación fenotípica.

La cepa mutante *P. chlororaphis*  $\Delta$ aroK generada, así como sus derivadas son auxótrofas a aminoácidos aromáticos y a otros compuestos derivados del corismato, por lo que una manera sencilla de comprobar este fondo genético fue inoculando a las posibles colonias mutantes en medio mínimo (mezcla de sales M9 1X, glucosa 0.4 %, MgSO<sub>4</sub> 1 mM y CaCl<sub>2</sub> 0.3 mM) e incubándolas a 30 °C/300 rpm/ 24 h. Aquellas colonias cuyos inóculos no crecieron en este medio fueron seleccionadas para comprobar la inactivación por PCR.

### 10.6.5. Comprobación por PCR de colonia.

Las colonias seleccionadas fueron re-suspendidas en medio LB con kanamicina, así como en 30  $\mu$ L de agua bidestilada, estas últimas se colocaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, se centrifugaron a 13,200 rpm/2 min y se recuperó el sobrenadante, el cual fue utilizado como templado para la reacción de PCR con la enzima Taq DNA polimerasa (recombinante) de Thermo Scientific®. La mezcla de reacción contenía DMSO (10 %), Taq Buffer con KCl (1X), dNTP Mix (0.2 mM de cada uno), “primer forward” y “reverse” utilizados para realizar el overlap PCR de cada mutante (0.1  $\mu$ M de cada uno), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), Taq DNA polimerasa recombinante (2 U) y de 10 – 100 ng de DNA molde. El programa de PCR se encuentra descrito en la tabla 8.



**Tabla 8. Comprobación por PCR de las cepas mutantes.**

	Temperatura / Tiempo	Número de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C/3 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95 °C/30 s	30
<b>Alineamiento</b>	68.4 °C/30 s	
<b>Amplificación</b>	$\Delta aroK$ : 72 °C/1.5 min $\Delta pykA$ y $\Delta ttuE$ : 72 °C/3 min	
<b>Extensión final</b>	72 °C/5 min	1

#### 10.6.6. Secuenciación de las mutantes generadas.

Una vez identificadas por electroforesis en gel de agarosa que presentaban el patrón de bandeo deseado fueron enviadas a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología. La mezcla de reacción para secuenciación se preparó en 16  $\mu$ L conteniendo 100 ng de producto de PCR y 10 pmoles de primer.

#### 10.6.7. Eliminación del cassette de resistencia en las cepas mutantes.

La cepa  $\Delta aroK$  fue electrotransformada con el plásmido pFLP2Tc como se describió anteriormente y recuperada en 1 mL de medio SOC durante 1 h/30 °C. El volumen total fue plaqueado en agar LB + Tc (125  $\mu$ g/mL), el cual se incubó a 30 °C/48 h. Las colonias obtenidas fueron inoculadas en agar LB + Tc (125  $\mu$ g/mL) y LB + Km e incubadas bajo las mismas condiciones. Aquellas colonias que crecieron en el medio con Tc, pero no en el medio con Km, fueron re-inoculadas en medio LB + sacarosa (10 %) e incubadas a 30 °C/24 h/300 rpm. Este cultivo se re-inoculó en cuadrante radial en agar LB + sacarosa (5 %) y se incubó a 30 °C/24 h; las colonias aisladas obtenidas se inocularon en medio LB + Tc (125  $\mu$ g/mL) y medio LB + sacarosa (5 %) y, aquellas que presentaron sensibilidad al antibiótico, fueron seleccionadas para comprobar la eliminación del cassette de resistencia por PCR y secuenciación como se describió anteriormente.

#### 10.7. Sobre-expresión de la vía del SA.

La sobre-expresión de la vía del ácido shikímico se realizó tomando como vector de expresión al plásmido pUCP24, al cual le fueron subclonados en el sitio de clonación múltiple los genes *aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fbt</sup>*, *aroE* y *aroD*; la amplificación de este operón (operón

Aro5) fue realizada utilizando como molde al plásmido pTrcAro6 (10 – 100 ng), 0.02 U de la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific®), buffer Phusion HF (1X), dNTPs (200 µM c/u) y primers (BamAro5F y XbaAro5R, 0.5 µM de cada uno); las condiciones de reacción se encuentran descritas en la tabla 9.

El amplicón obtenido se purificó por gel y se poliadeniló en el extremo 3' incubándolo en un volumen de 10 µL con Taq buffer (1X), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dATP y 1 U de Taq DNA polymerase durante 30 min a 72 °C. El producto obtenido fue ligado al vector pCR-XL-TOPO® siguiendo las instrucciones del kit TOPO® XL PCR Cloning (Anexo IV).

**Tabla 9. Condiciones para la amplificación del operón Aro5.**

	Temperatura / Tiempo	Número de ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	98 °C/30 s	1
<b>Desnaturalización</b>	98 °C/10 s	25
<b>Alineamiento</b>	61.8 °C/30 s	
<b>Amplificación</b>	72 °C/3 min	
<b>Extensión final</b>	72 °C/10 min	1

La construcción obtenida fue electrotransformada en *E. coli* DH5α, a partir de las cuales se extrajo el plásmido y se comprobó el resultado mediante patrones de digestión con las enzimas *BamH* I y *Xba* I (Buffer Tango 1X; DNA 2 µg; *BamH* I 0.5 U; *Xba* I 0.5 U; ThermoScientific®).

Posteriormente, el operón fue subclonado en el plásmido pUCP24, para lo cual el plásmido fue digerido de manera secuencial con las enzimas *BamH* I y *Xba* I durante 3 h cada uno (utilizando la mezcla de reacción descrita anteriormente) y, posteriormente, purificado a partir de un gel de agarosa, por otro lado, el plásmido pCR®-XL-TOPO®-Aro5 fue digerido y purificado bajo las mismas condiciones. El operón Aro5 y el plásmido pUCP24 fueron ligados como se ha descrito anteriormente. Las células electrotransformada con el producto de ligación fueron seleccionadas utilizando agar LB + Gm + IPTG (20 mM) + X-gal (80 µg/mL).

La comprobación de esta construcción se realizó mediante patrones de digestión con las enzimas *BamH* I y *Xba* I, mediante la amplificación por PCR del operón, así como por secuenciación de todo el operón, para lo cual, se diseñaron y usaron “primers” que amplificaran de 1,200 a 1,400 pb (primers descritos en el Anexo I), dichos amplicones fueron obtenidos con la mezcla de reacción y condiciones descritas anteriormente en esta sección, cambiando únicamente la temperatura de alineamiento (66.7 °C) y el tiempo de extensión

(1 min). Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar siguiendo las instrucciones de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt, UNAM (descritas en la sección 6.6.6.).

Para obtener información acerca del número de copias del plásmido pUCP24A5 se realizaron ensayos de qPCR mientras que, por RT-qPCR se determinó el nivel de expresión de los genes presentes en el operón (*aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fb</sup>*, *aroD* y *aroB*) en cada una de las cepas y medios probados.

#### **10.7.1. Determinación del número de copias del plásmido pUCP24A5.**

El número de copias se determinó por qPCR utilizando tres cultivos independientes en fase estacionaria temprana, crecidos en medio King modificado (glicerol o glucosa 15 g/L, extracto de levadura 20 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/L) + Gm con su respectiva fuente de carbono (glucosa o glicerol). Las muestras se ajustaron a una densidad óptica de 0.6 y se realizaron diluciones decimales seriadas hasta que estuvieran dentro del rango dinámico. La reacción de qPCR se llevó a cabo bajo las condiciones descritas por Aguilar et al. (2012), utilizando el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific®), las placas Axygen® PCR-96M2-HS-C, el equipo 7300 Real Time PCR System y el software ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Thermo Scientific®).

Los datos obtenidos fueron analizados por método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (Livak & Schmittgen 2001), utilizando como gen de referencia a *aacC1* (resistencia a gentamicina, presente en el plásmido) y a *rpoD* para normalizar los datos.

#### **10.7.2. Extracción de RNA, cDNA y RT-qPCR.**

Se realizaron extracciones de RNA total a partir de 50 mL de muestra con 1 mL de RNAlater (Invitrogene®), colectadas de los cultivos en fermentadores de 1 L cuando estos tenían una OD<sub>600nm</sub> de 1 (fase exponencial temprana); las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm / 5 min y la pastilla resultante fue almacenada a -70 °C hasta su tratamiento.

El RNA se obtuvo utilizando la metodología de fenol caliente (Aguilar et al. 2012); su integridad fue evaluada mediante un gel de agarosa al 2 % mientras que la concentración y pureza se determinó con el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®). El producto obtenido fue tratado con TURBO DNA-free kit (Ambion Inc. USA) a 37 °C durante 1 h para eliminar el DNA cromosomal contaminante.

El cDNA se obtuvo siguiendo las indicaciones del proveedor del kit RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific®), utilizando 5 µg de RNA y una mezcla

de los “primers reverse” (“b”, 10 pmol /  $\mu$ L) específicos para los genes de interés (Anexo I), finalmente, la reacción de qPCR se realizó como se describió en la sección anterior.

## **10.8. Evaluación de la capacidad crecimiento y producción de los metabolitos intermediarios de la vía del shikimato.**

### **10.8.1. Evaluación de las cepas en matraces de 250 mL.**

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matraces de 250 mL con 50 mL de medio King modificado hasta el inicio de la fase estacionaria (10 – 12 h). Para ello, se utilizaron pre-cultivos con 4 mL de medio King modificado (utilizando glucosa como fuente de carbono), incubados a 30 °C/300 rpm/12 h (cepa silvestre) o 24 h (cepas mutantes) a partir de los cuales se inóculo 1 mL en los matraces.

Para el caso de los cultivos de las cepas A25 y A35, al medio se le agregó 1 mM de IPTG y 50  $\mu$ g/mL de gentamicina desde el pre-inóculo y, después de 24 h de incubación, se analizó el sobrenadante por HPLC como se describe en la siguiente sección.

### **10.8.2. Evaluación de las cepas en fermentadores de 1 L.**

Estas evaluaciones fueron realizadas al menos por triplicado en jarras autoclaveables de 1 L (Applikon®) conectados a los controladores Applikon ADI 1010 BioController y ADI 1025, para monitorear temperatura, pH, agitación (rpm) y oxígeno disuelto.

Se utilizaron 500 mL de medio King modificado, 0.6 vvm y de 600 – 900 rpm (manteniendo la concentración de oxígeno disuelto arriba del 30 %), en todos los casos se utilizaron pre-inóculos como se describe anteriormente, a partir de los cuales se transfirió 1 mL del cultivo en matraces de 250 mL con 50 mL del mismo medio y, se incubó bajo las mismas condiciones hasta que las células estuvieran en fase de crecimiento exponencial (de 4 a 8 h), a partir de este último, se utilizó el volumen necesario para ajustar la OD<sub>600nm</sub> de cada fermentador a 0.1. Durante 24 h se tomaron muestras del cultivo para determinar la OD<sub>600nm</sub>, realizar cuenta en placa y, posteriormente analizar el sobrenadante por HPLC.

### **10.8.3. Cuenta en placa.**

Para comprobar que las cepas A25 y A35 mantenían el plásmido pUCP24A5 a lo largo de las fermentaciones, se tomaron 100  $\mu$ L de cultivo, los cuales se diluyeron en solución salina isotónica (SSI), a partir de esta dilución se realizaron diluciones decimales seriadas para que el número de colonias por placa estuviera en el rango de 15 a 200 colonias. El

plaqueo se realizó por duplicado en medios con y sin gentamicina y el número de colinas se determinó después de 24 h de incubación a 30 °C.

#### **10.8.4. Cuantificación de metabolitos y aminoácidos aromáticos.**

El análisis de HPLC fue realizado con un sistema Waters, Millford, MA. que cuenta con una bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción de 2410 y detector de arreglo de diodos (996). Las muestras previamente filtradas (filtros de 0.45  $\mu\text{m}$ ) fueron separadas en una columna de ácidos Aminex C-18 de BioRad®; el tiempo de corrida de cada muestra fue de 35 min y los compuestos determinados fueron glucosa (Glc), glicerol (Gly), ácido acético (AA), ácido shikímico (AS), ácido dehidroshikímico (DHS), ácido quínico (AQ), ácido gálico (AG) y ácido dehidroquínico (DHQ).

Para la cuantificación de aminoácidos aromáticos se utilizó el sistema Agilent HPLC system (Agilent Technologies) como lo describe Martínez-Gómez et al. (2012).

#### **10.8.5. Cálculos y análisis estadístico.**

Todos los resultados obtenidos fueron analizados de manera independiente y promediados al final. Para obtener la biomasa a partir de la información de la  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  obtenida durante la cinética, se utilizó la ecuación:  $\text{Biomasa} = 0.52 * \text{OD}_{600\text{nm}}$ , este factor de conversión fue obtenido por Moreno-Avitia (no publicado) mediante curvas de peso seco vs  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ . La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se obtuvo mediante la linealización ( $R^2 > 0.98$ ) de las curvas de crecimiento durante la fase exponencial con la ecuación  $\text{Ln}X = \text{Ln}X_0 + \mu * t$  ( $X$ = biomasa;  $X_0$ = biomasa inicial;  $t$ =tiempo).

El rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ) fue determinado al graficar la concentración de la fuente de carbono vs la biomasa en cada punto durante la fase exponencial, es importante mencionar que al utilizar medio rico, no toda la biomasa es generada solo por el uso de la fuente de carbono, por lo que este cálculo se realizó solo para aquellas cinéticas cuyo valor de  $R^2$  fuera mayor a 0.95, por otro lado, la velocidad específica de consumo en la fase exponencial ( $q_{S_{\text{exp}}}$ ) se determinó con la ecuación  $q_{S_{\text{exp}}} = \mu / Y_{X/S}$ .

Para comparar los efectos que tenían las modificaciones genéticas de cada una de las cepas, se determinaron los títulos y rendimientos en la producción de compuestos aromáticos totales (CAT) y SA. Para el rendimiento de CAT ( $Y_{\text{CAT}/C}$ ), se utilizó aquel punto en el que la suma de DHQ, DHS y SA fuera mayor, mientras que, para el rendimiento de shikimato ( $Y_{\text{SA}/C}$ ) solo se consideró el punto de mayor producción de este metabolito, estos valores fueron divididos por la cantidad de fuente de carbono consumida en ese momento.

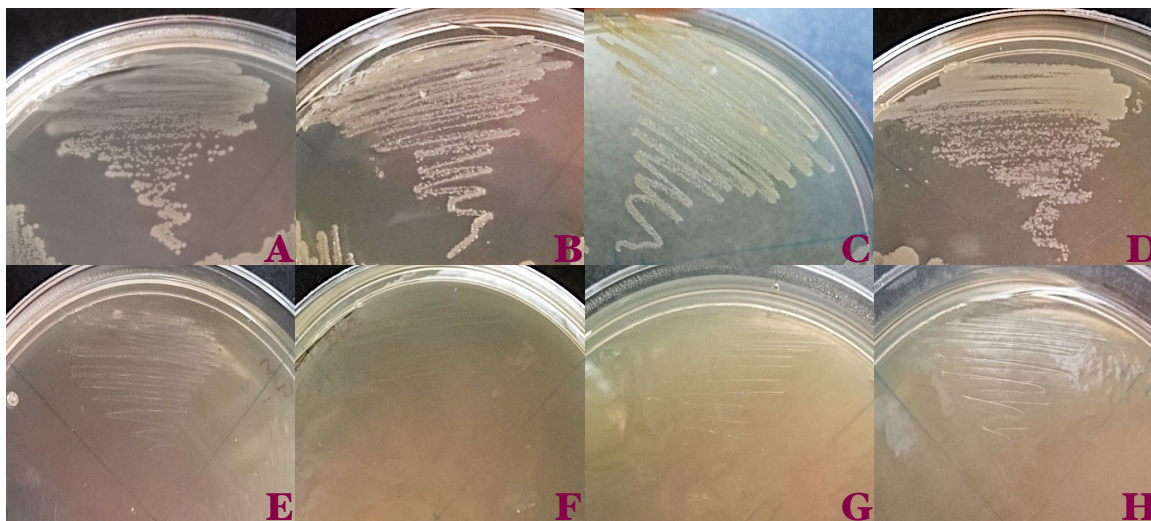
Para la determinación de las UFC/mL de la cuenta en placa se utilizó la siguiente ecuación:  $\text{UFC} / \text{V. plaqueado} * \text{factor dilución}$  (UFC= Unidades Formadoras de Colonias; V plaqueado= Volumen plaqueado). Finalmente, el análisis estadístico se realizó con Prism 7, GraphPad Software, Inc. (Versión 7.0e).

## 11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 11.1. Evaluación de la resistencia natural a antibióticos de *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446.

Debido a que el género *Pseudomonas* presenta de manera natural resistencia a diferentes antibióticos, se decidió evaluar a la cepa en este aspecto para determinar las herramientas moleculares que podrían utilizarse durante el proyecto. Este género es resistente a diferentes antibióticos ya que le confiere una ventaja en su nicho ecológico; esta característica se atribuye en parte, a la ausencia de porinas poco selectivas capaces de difundir pequeños compuestos hidrofílicos como es el caso de OmpF en *E. coli*. En su lugar, se ha visto que *Pseudomonas* spp tiene porinas OprG cuya expresión depende de las condiciones de crecimiento como son, la presencia de antibióticos (norfloxacina, tetraciclina y kanamicina) o altas concentraciones de nutrientes (micronutrientes e hidrocarburos), además, su genoma codifica para diferentes porinas capaces de transportar moléculas tóxicas al exterior de la célula como son OprM, OpmG, OpmH y Opml (Kahlon 2016).

Dentro de los antibióticos probados, se observó que *P. chlororaphis* es resistente a carbenicilina, cloranfenicol, estreptomina, spectomicina y zeocina, mientras que es sensible a gentamicina, apramicina, tetraciclina y kanamicina (Figura 5).



**Figura 5. Evaluación de la resistencia a antibióticos de *Pseudomonas chlororaphis*.**  
A. Carbenicilina; B. Cloranfenicol; C. Estreptomina; D. Espectomicina; E. Gentamicina;  
F. Apramicina; G. Kanamicina; H. Tetraciclina

La carbenicilina es una penicilina semi-sintética y se sabe que la resistencia a este antibiótico está dada por la síntesis de  $\beta$ -lactamasas o mutaciones en las transpeptidasas y/o transglicolasas involucradas en la síntesis del peptidoglicano (Walsh 2000). De acuerdo

con la anotación del genoma de *P. chlororaphis*, este microorganismo tiene la capacidad de sintetizar  $\beta$ -lactamasas lo que le confiere resistencia a este antibiótico.

El cloranfenicol puede difundir a través de la pared celular de los microorganismos y unirse de manera reversible a la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo así su actividad de peptidil transferasa, lo que evita que la cadena polipeptídica se elongue. Dentro de los mecanismos reportados para la resistencia a este antibiótico se encuentra la expresión de las cloranfenicol-acetiltransferasas, conocidas como CATs, que unen covalentemente uno o dos grupos acetilo a los grupos hidroxilo del cloranfenicol para que no pueda unirse a la unidad ribosomal (Munita & Arias, 2016).

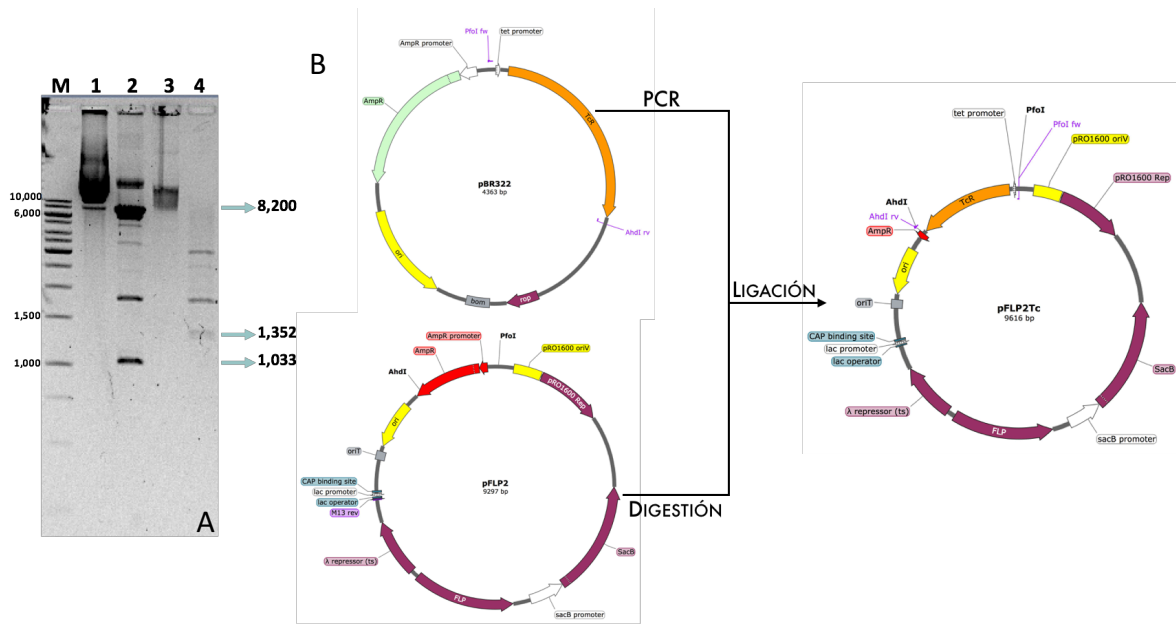
Por último, la estreptomomicina y la espectomicina pertenecen al grupo de los aminoglucósidos y su efecto antimicrobiano es debido a su unión con la subunidad ribosomal 30S, lo que evita la interacción entre el ribosoma y el mRNA. Los posibles mecanismos de resistencia a este tipo de antibióticos se fundamentan en la capacidad de los microorganismos para sintetizar acetilasas, fosforilasas y adenilasas capaces de modificar químicamente a estos antibióticos y así, evitar un efecto adverso en la célula (Munita & Arias, 2016).

## 11.2. Plásmido pFLP2Tc

Debido a que *P. chlororaphis* ATCC 9446 es intrínsecamente resistente a ampicilina, los plásmidos que contengan este marcador de selección no pueden ser utilizados para la selección de colonias mutantes. El plásmido pFLP2 (utilizado para eliminar cassettes de resistencia flanqueados por sitios FRT, Hoang et al. 1998) presenta como gen de selección la resistencia a la ampicilina, razón por la cual fue necesario reemplazarlo por un gen que le confiera a la cepa resistencia a tetraciclina. Este gen se amplificó del plásmido pBR322 y se ligó al plásmido pFLP2 como se describe en la metodología. Cabe mencionar que el gen de resistencia a ampicilina fue eliminado con la finalidad de que este no presentara un tamaño mayor, lo cual podría afectar la eficiencia de transformación de las cepas mutantes.

En la figura 6A, se muestra el perfil de restricción del plásmido pFLP2, el cual presentó una banda de un tamaño aproximado a 8,200 pb correspondiente al vector sin el inserto y una banda de 1,100 pb correspondiente al gen de resistencia a ampicilina; por otro lado, el perfil de restricción del plásmido pFLP2Tc presentó una banda de un tamaño de 1,300 pb correspondiente al gen que confiere resistencia a la tetraciclina. Junto a los patrones de bandeos obtenidos se muestran los mapas de cada uno de los plásmidos utilizados (Figura 6B).





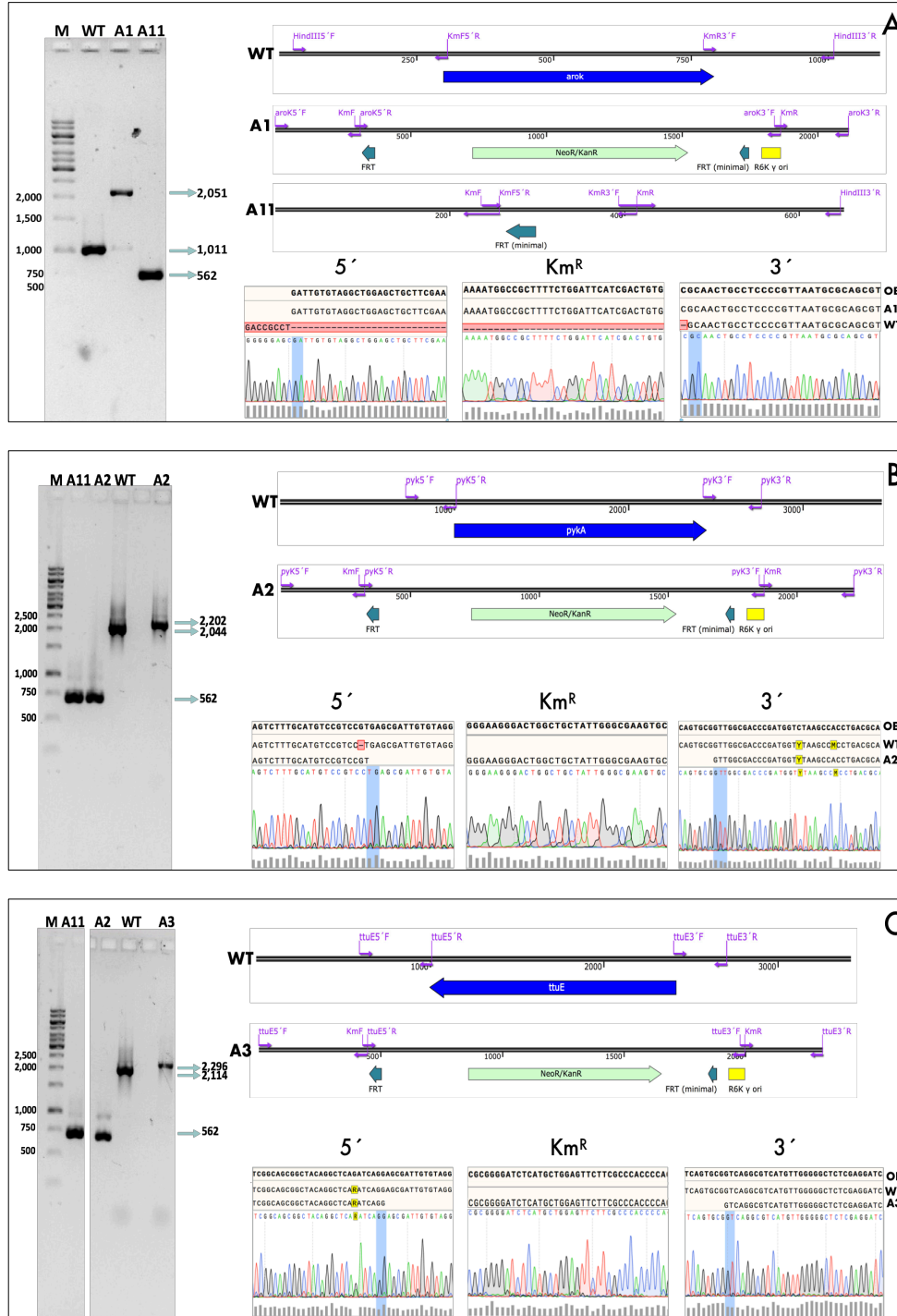
**Figura 6. Construcción del plásmido pFLP2Tc: Electroforesis en gel de agarosa y diseño *in silico*.**

**A.** Electroforesis en gel de agarosa (1 %, 100 V). M. Marcador de peso molecular (1 kbp DNA ladder O'GeneRuler™ ThermoScientific®); 1. pFLP2; 2. Perfil de restricción con las enzimas *Pfo* I y *Ahd* I del plásmido pFLP2; 3. pFLP2Tc; 4. Perfil de restricción con las enzimas *Pfo* I y *Ahd* I del plásmido pFLP2Tc. **B.** Mapas de los plásmidos utilizados.

### 11.3. Obtención del fondo genético: Inactivación de los genes *aroK*, *pykA* y *ttuE*.

Las inactivaciones genéticas se realizaron siguiendo una metodología basada en la doble recombinación reportada por Choi & Schweizer (2005), para la cual es necesario amplificar de 200 – 600 pb río arriba y río abajo de los genes a inactivar, así como un cassette de resistencia (en este caso Km flanqueado por sitios FRT) unido entre los dos extremos mediante OE PCR. Este fragmento, con ayuda de los mecanismos naturales de la cepa para recombinar, es integrado al DNA cromosomal en un sitio específico.

En la figura 7, se muestra esquemáticamente la región del genoma, en la cual se realizaron las inactivaciones de los genes *aroK* (6A), *pykA* (6B) y *ttuE* (6C), los amplicones obtenidos, así como los resultados de secuenciación de cada cepa. Cabe mencionar que el gen *aroK* fue el primero en ser inactivado, ya que a partir de esta cepa se realizaron las inactivaciones independientes de los genes *pykA* o *ttuE*.



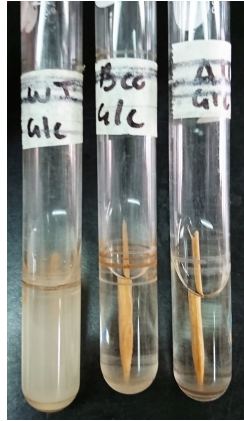
**Figura 7. Amplicones, diagramas *in silico* y resultados de secuenciación de las cepas WT y mutantes.**  
**A.** Inactivación del gen *aroK*. Carril 1: WT; 2: A1; 3: Cepa A11. **B.** Inactivación del gen *pykA*. Carril 1: A11 (amplificación de *aroK*); 2: A2 (amplificación de *aroK*); 3: WT (amplificación de *pykA*); 4: A2 (amplificación de *pykA*). **C.** Inactivación del gen *ttuE*. Carril 1: A11 (amplificación de *aroK*); 2: A3 (amplificación de *aroK*); 3: WT (amplificación de *ttuE*); 4: A3 (amplificación de *ttuE*). M= Marcador de peso molecular (1 kbp DNA ladder O'GeneRuler™ ThermoScientific®).

El carril 1 de la figura 7A muestra el amplicón obtenido desde 274 pb río arriba hasta 219 pb río abajo del gen *aroK* (1,011 pb en total), el siguiente carril corresponde a la amplificación del gen interrumpido por el cassette de resistencia a Km (2,051 pb) mientras que, el último carril corresponde a la cepa A11, la cual en el lugar del gen *aroK* presenta un sitio FRT como consecuencia de la eliminación de la resistencia utilizando la recombinasa FLP. Los resultados de secuenciación concordaron con el diseño *in silico* diseñado previamente, así como con la longitud del gen silvestre e inactivado.

Las inactivaciones de los genes que codifican para las isoenzimas piruvato cinasas (*pykA* y *ttuE*) se realizaron de manera independiente para determinar cuál era el efecto de cada una ellas en la capacidad de producción y crecimiento de las cepas. Si bien, no hay reportes que describan el posible efecto que puede tener una u otra inactivación en el *P. chlororaphis*, se sabe que en *E. coli* las 2 piruvato cinasas que están codificadas en su genoma alteran de manera diferente la capacidad del microorganismos para crecer y/o producir metabolitos derivados de la vía para la síntesis de aminoácidos aromáticos (Escalante et al. 2010).

La interrupción de los genes *pykA* (2,044 pb) y *ttuE* (2,114 pb) por el cassette de resistencia a Km se comprobó por el aumento de tamaño en la región de inserción. En la figura 7B se muestran estas diferencias obteniendo bandas de un tamaño aproximado de 2,220 pb y 2,314 pb respectivamente (Figura 7B y 7C). Una vez obtenidas las cepas mutantes, la inactivación del gen *aroK* fue corroborada y comparada con la cepa parental (A11). De igual manera, los genes de interés en cada cepa fueron secuenciados y, después de analizar los alineamientos se corroboró la inactivación de los genes.

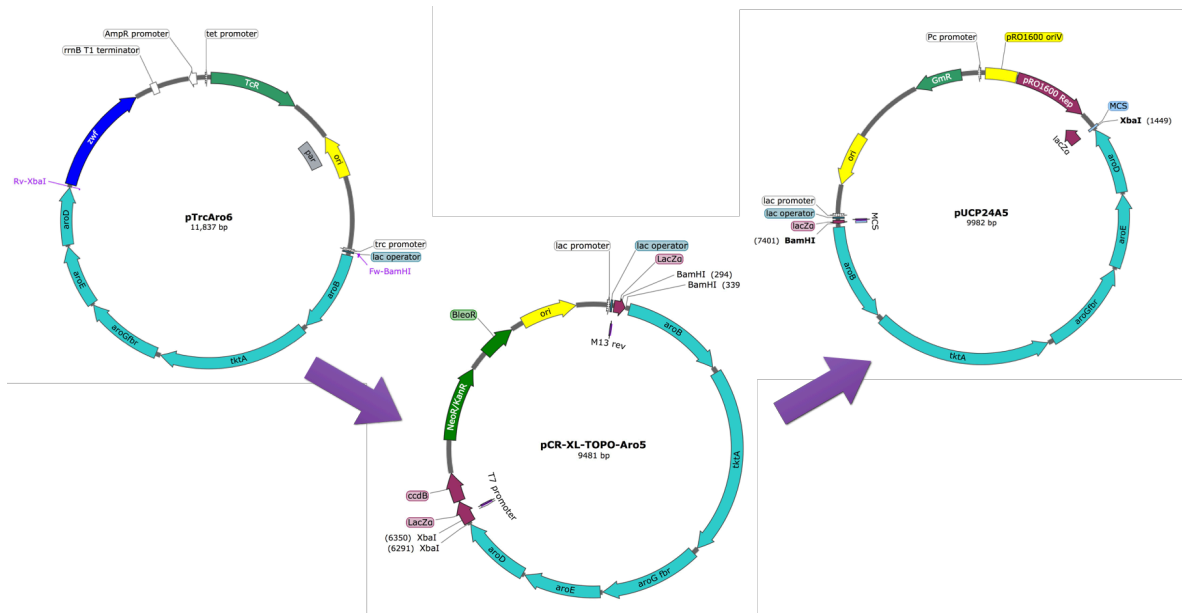
Para descartar la posibilidad de que las cepas generadas pudieran tener otro gen que codificara para la enzima shikimato cinasa, se realizaron pruebas fenotípicas en medio mínimo, ya que las cepas que son incapaces de seguir con la vía del ácido shikímico se vuelven auxótrofas a aminoácidos aromáticos y a otros compuestos derivados del corismato (Martínez et al. 2015). Como se esperaba, la cepa silvestre fue capaz de crecer en dicho medio utilizando como fuente de carbono glucosa o glicerol, sin embargo, las cepas A1 y sus derivadas fueron incapaces de crecer medio mínimo por la auxotrofia antes mencionada (Figura 8).



**Figura 8. Capacidad de crecimiento de las cepas en medio mínimo.** De izquierda a derecha: *P. chlororaphis* ATCC 9446, blanco del medio de cultivo y *P. chlororaphis*  $\Delta$ aroK.

#### 11.4. Sobre-expresión de la vía del ácido shikímico.

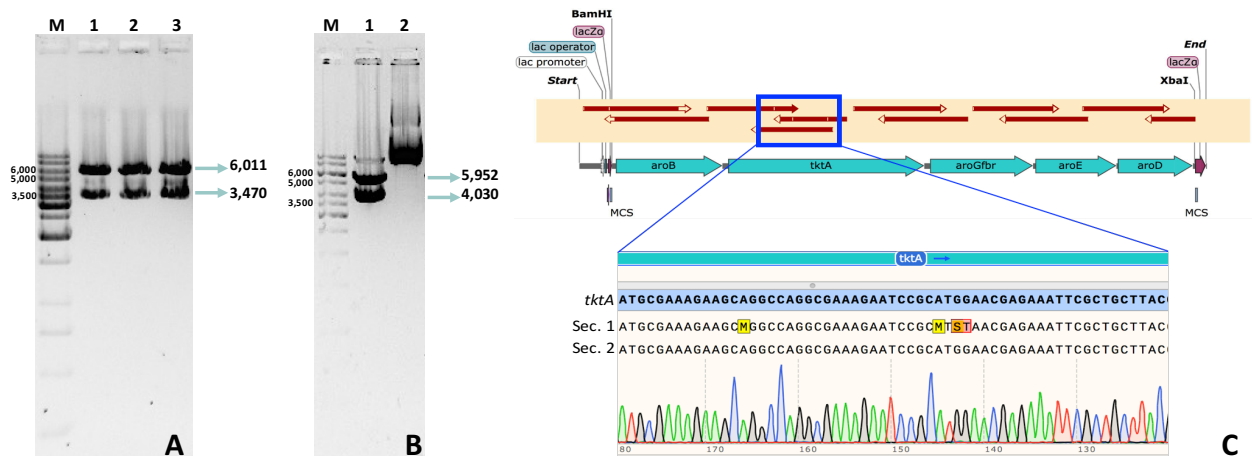
Durante años, nuestro laboratorio de IVM (Ingeniería de Vías Metabólicas) ha buscado diferentes estrategias para aumentar el título y el rendimiento de ácido shikímico en *E. coli*, por lo que se han generado diferentes plásmidos que contienen varios de los genes presentes en la vía del shikimato, uno de los que ha presentado mejores resultados es el plásmido pTrcAro6, el cual fue desarrollado por Rodriguez et al. (2013), a pesar de los buenos resultados de este plásmido en *E. coli*, no fue posible utilizarlo en *P. chlororaphis* ya que es incapaz de replicar plásmidos que solo contengan como origen de replicación a ColE1/pMB1/pBR322/pUC (West et al. 1994). Este impedimento nos condujo a amplificar por PCR y clonar un operón con los genes *aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fb</sup>*, *aroE* y *aroD* provenientes de pTrcAro6 en el vector pUCP24 (*ori* ColE1/pMB1/pBR322/pUC, pRO1600 *oriV*, pRO1600 *rep*, *Gm<sup>R</sup>*, *P<sub>lac</sub>*), sin embargo, a pesar de que se añadieron los sitios de restricción necesarios para clonar el operón en el plásmido, este no pudo ser ligado directamente, por lo que el fragmento fue ligado en plásmido pCR<sup>®</sup>-TOPO-XL<sup>®</sup> y, posteriormente, subclonado en el vector de interés (Figura 9).



**Figura 9. Diagrama de los plásmidos pTrcAro6, pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO-Aro5<sup>®</sup> y pUCP24A5.**

La figura 10A indica los patrones de restricción obtenidos en el vector pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO-Aro5 extraído de las colonias candidatas al ser digerido con las enzimas *BamHI* I y *XbaI* I, los fragmentos generados corresponden al tamaño del operón (5.9 kb) y al vector pUCP24 (3.4). A pesar del bajo número de colonias obtenido todas contenían el inserto de interés, lo que podría indicar que la clonación directa al plásmido pUCP24 no fue posible por una baja eficiencia de las enzimas de restricción para cortar los extremos del amplicón.

En la figura 10B se encuentran los patrones de digestión el plásmido pUCP24 con el operón de interés, las bandas obtenidas corresponden al operón (6 kb) y al resto del plásmido (4 kb). Así mismo, antes de transformar este vector en *P. chlororaphis*, se corroboró la construcción mediante PCR y secuenciación de todo el operón (Figura 10C); cabe mencionar que la secuenciación correspondiente a la región del gen *tkTA* presentó algunos nucleótidos sin resolver, sin embargo, al secuenciar la región con otro primer, la secuencia pudo ser corroborada.



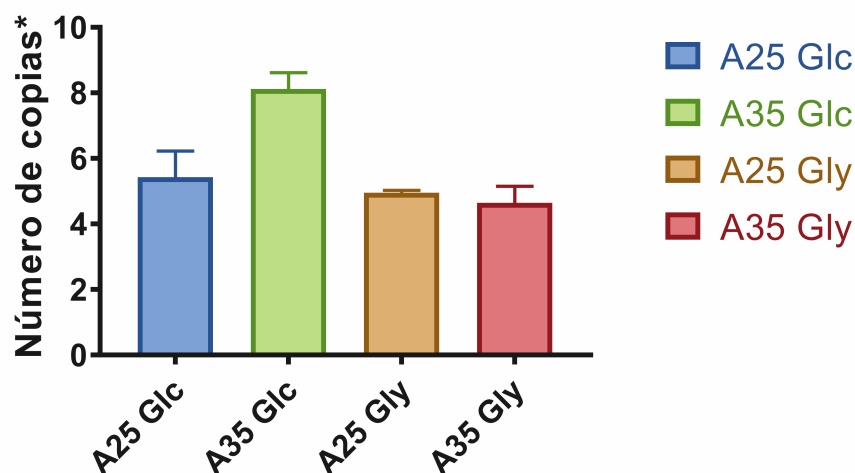
**Figura 10. Patrones de restricción y secuenciación del plásmido pUCP24A5.**

**A.** Patrones de restricción obtenidos con las enzimas *BamH* I y *Xba* I del plásmido pCR-TOPO-XL-Aro5. **B.** Patrones de restricción obtenidos con las enzimas *BamH* I y *Xba* I del plásmido pUCP24A5. **C.** Alineamiento entre los resultados de secuenciación y el plásmido pTrcAro6.

#### 11.4.1. Determinación del número copias del plásmido pUCP24A5.

El plásmido pUCP24 fue desarrollado desde hace ya varios años (West et al. 1994), sin embargo, no existen muchos reportes en los que lo utilicen como un vector de expresión o reporten su comportamiento en el género *Pseudomonas* (Silva-Rocha et al. 2013). Los plásmidos pUCP son de amplio número de hospederos por lo que pueden ser replicados por diferentes microorganismos debido a la presencia de dos sitios *ori* (ColE1 y pRO1600). Se sabe que los plásmidos pUCP presentan un alto número de copias en *E. coli* el cual está determinado por el sitio ColE1, sin embargo, en *Pseudomonas* spp este valor varía dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo, ya que depende de la región pRO1600 (Silva-Rocha et al. 2013).

Los resultados de qPCR mostraron que el plásmido es de bajo número de copias (de 5 a 8 copias) en las cepas A25 y A35, además, este valor no depende de la cepa ni de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo (Figura 11).



**Figura 11. Número de copias del plásmido pUCP24A5 en las cepas A25 y A35.**

Determinado mediante qPCR. Cepas cultivadas en medio King con glucosa o glicerol. \*El valor se determinó utilizando como control interno (house-keeping) al gen *rpoD* y como referencia al gen *aacC1* (resistencia a gentamicina).

#### 11.4.2. RT-qPCR.

La expresión de los genes controlados por el promotor *lac* tiende a ser elevada en cepas de *E. coli*, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no existen muchos reportes en los que se caracterice este promotor en el género *Pseudomonas*. En general,  $P_{lac}$  presenta una menor fuerza de expresión en *Pseudomonas* en comparación con *E. coli*. Estudios sugieren que esto se debe a que al menos en *P. putida*, la expresión del gen *lacl* es muy elevada, por lo que la concentración de inductor necesaria para la expresión de los genes controlados bajo este promotor es mayor (10 veces con respecto a *E. coli*) (Cook et al. 2018).

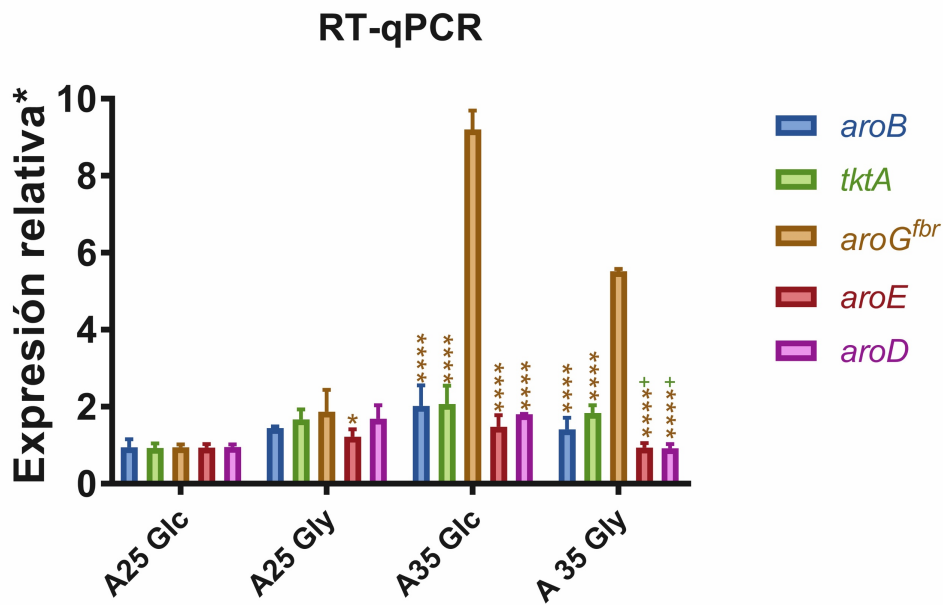
Los genes *aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroE* y *aroD*, presentes en el plásmido pUCP24A5 están regulados bajo el promotor  $P_{lac}$  (Figura 9), considerando lo anterior, nos interesaba saber si estos genes se estaban expresando, si existía una expresión diferencial y, por último, determinar posibles diferencias entre cepas y los medios utilizados.

Los resultados de RT-qPCR indican que, los genes del operón se están expresando diferencialmente bajo todas las condiciones probadas, ya que los valores de Ct (Anexo V) de todos los genes en las cepas A25 y A35 están en un rango de 15 a 20 ciclos, mientras que este valor en la cepa silvestre es mayor a 28 ciclos (al igual que los blancos), este resultado es indicativo de la expresión génica. Sin embargo, no se les puede asignar un valor relativo por varias razones, una de ellas es que los genes son totalmente heterólogos, por lo que no se tiene un gen en el cromosoma con el cual se pueda comparar, por otro lado, si se toman

como referencia los genes equivalentes en *P. chlororaphis*, las aproximaciones podrían variar, ya que están regulados por diferentes promotores y la cepa presenta de 1 a 2 copias en el cromosoma de cada uno de los genes presentes en el operón A5.

Comparando los resultados obtenidos de la expresión génica con la cepa A25 cultivada en medio King con glucosa es claro que existe una expresión diferencial de los genes del operón respecto a *aroG<sup>fbr</sup>* siendo el mayor en todos los casos (Figura 12). La expresión del resto del operón no resultó ser significativa excepto en la cepa A35 al utilizar glicerol como fuente de carbono; en la comparación de *tktA* vs *aroE* y *tktA* vs *aroD*, los genes pertenecientes a la vía del shikimato mostraron una menor expresión, lo que podría deberse a que *P<sub>lac</sub>* no es lo suficientemente fuerte como para favorecer la transcripción de estos dos últimos genes.

Al ser *aroG<sup>fbr</sup>* el que presenta una mayor expresión relativa, se espera que el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la vía del shikimato sea buena, ya que la enzima que codifica este gen, se encarga de condensar al PEP y E4P, sin embargo, al haber una expresión diferencial en el resto de los genes (especialmente en *aroE* y *aroD*), podrían generarse cuellos de botella lo que podría limitar la acumulación de shikimato.



**Figura 12. Resultados de RT-qPCR de las cepas A25 y A35 en medio King con glucosa o glicerol.**

\*Expresión relativa tomando como referencia los genes en el plásmido pUCP24A5 de la cepa A25 cultivada en medio King con glucosa. Análisis estadístico realizado en cada condición con la prueba de Tukey. El asterisco (\*) indica una diferencia significativa respecto al gen *aroG<sup>fbr</sup>* mientras que el símbolo de suma (+) indica una diferencia significativa respecto al gen *tktA* en cada una de las con.

Un símbolo indica un *p value* <0.05 y cuatro símbolos indica un *p value* <0.001.



## 11.5. Evaluación de la capacidad crecimiento y producción de ácido shikímico de las cepas generadas.

### 11.5.1. Evaluación de la cinética de crecimiento en matraces de 250 mL.

Estas evaluaciones cinéticas se hicieron para determinar el tiempo necesario para que las cepas llegaran a la fase exponencial en presencia de glucosa y así, utilizarlo como inóculo para los biorreactores. Esto permite evitar que una vez en el fermentador las cepas presenten una fase lag prolongada.

La figura 13 muestra que la cepa silvestre alcanza la fase exponencial después de 2 a 4 h de cultivo mientras que las cepas mutantes tardan de 6 a 8 h. En el caso de las cepas mutantes, la inactivación del gen *aroK* resultó ser la mutación que generó un mayor decremento en cuanto su producción de biomasa y la velocidad de crecimiento, reduciendo esta última en aproximadamente un 50 % con respecto a la cepa silvestre (WT=  $1.23 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$ ; A1=  $0.55 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ ).

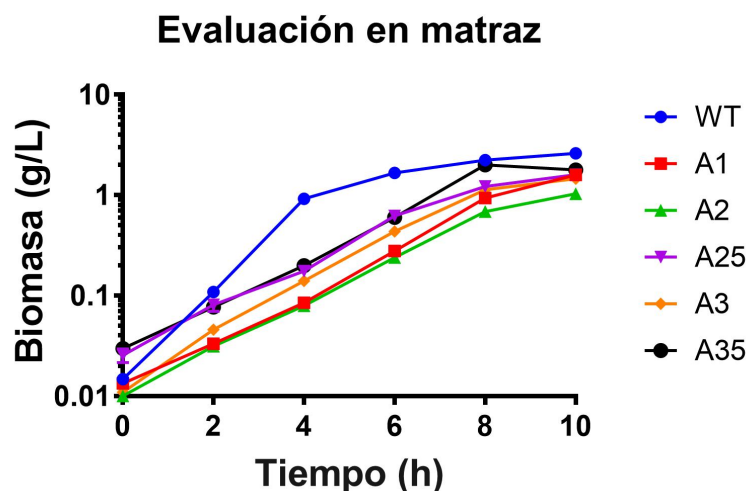
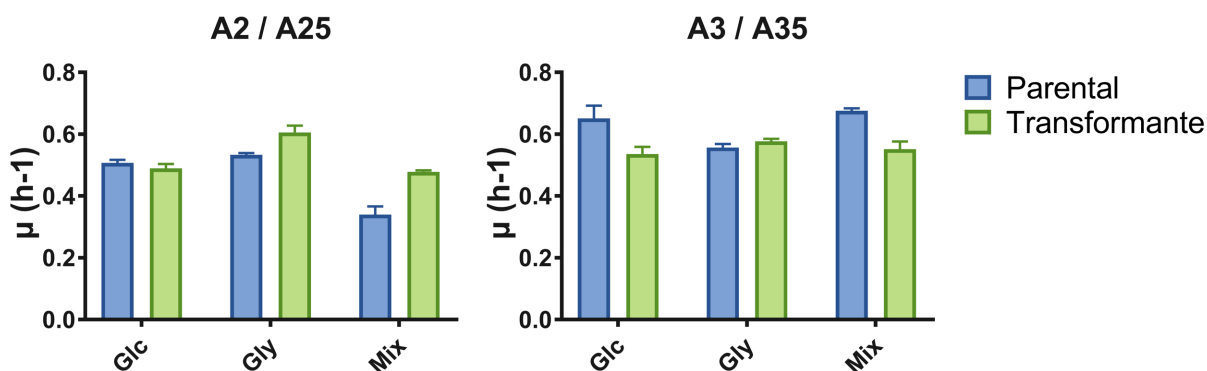


Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas WT, A1 ( $\Delta aroK$ ), A2 ( $\Delta aroK, \Delta pykA$ ), A3 ( $\Delta aroK, \Delta ttuE$ ), A25 ( $\Delta aroK, \Delta pykA/pUCP24A5$ ) y A35 ( $\Delta aroK, \Delta ttuE/pUCP24A5$ ) en matraces de 250 mL. Volumen de trabajo de 50 mL de medio King con glucosa. Condiciones de incubación: 30 °C/300 rpm.

Si bien, no hay reportes en los que la vía del shikimato haya sido bloqueada en *P. chlororaphis*, se ha visto que, tanto en *E. coli* (Chen et al. 2012) como en *Bacillus megaterium* (Ghosh et al. 2016), el bloqueo del flujo de shikimato a corismato afecta de manera negativa tanto la velocidad de crecimiento como la biomasa generada, debido a la incapacidad de sintetizar aminoácidos y otros compuestos derivados de esta vía. En el caso particular de *Pseudomonas*, es probable que este decremento también se deba a que al

bloquear la vía del shikimato, se impide la biosíntesis de fenazinas las cuales, además de ayudar al microorganismo a colonizar raíces y a competir con otros organismos en su nicho ecológico, se ha propuesto que pueden actuar como aceptores de electrones para la generación de energía y el mantenimiento del balance redox de la célula mediante la re-oxidación de NADH (Price-Whelan et al. 2006).

La figura 14 muestra un comparativo de las velocidades de crecimiento de las cepas A2, A3, A25 y A35 (las dos últimas inducidas con IPTG desde el pre-inóculo) al utilizar medio King con glucosa, glicerol y una mezcla 1:1 de glucosa:glicerol. Estos resultados demostraron que el plásmido no presentó un efecto drástico en cuanto a su velocidad de crecimiento respecto a las cepas parentales e incluso, este parámetro incrementó en la cepa A2 al utilizar glicerol y la mezcla de fuentes de carbono. Este comportamiento, a pesar de parecer contradictorio, ya había sido reportado en *E. coli* por Rodríguez, et al (2013), quien atribuyó el incremento a la velocidad de crecimiento a una mejor distribución del carbono, impidiendo así la acumulación de moléculas regulatorias (como el PEP) dentro de la célula.

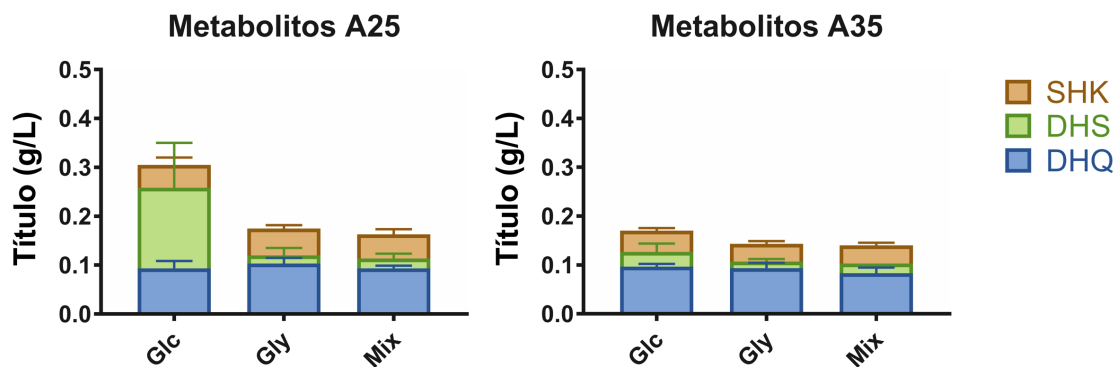


**Figura 14. Comparación de las velocidades de crecimiento entre las cepas parentales (A2 y A3) y las cepas transformantes (A25 y A35).**

Cultivadas en medio King con diferentes fuentes de carbono. Condiciones de incubación: 30 °C/300 rpm. Glc= Glucosa; Gly= Glicerol; Mix= Mezcla glucosa: glicerol.

Para determinar si alguna de las fuentes de carbono favorecía la sobre-producción de shikimato, se compararon los títulos obtenidos de CAT (Compuestos aromáticos totales: DHQ, DHS y SA) por las cepas A25 y A35 después de 24 h de incubación bajo las condiciones antes descritas (Figura 15). Los resultados demostraron que, para ambas cepas, la utilización de la glucosa favorece la producción de CAT (DHQ DHS y SA) seguido del glicerol y la mezcla de fuentes de carbono, razón por la cual se decidió no seguir evaluando esta última condición. Las diferencias en los títulos obtenidos en cada una de las cepas indican

que, las piruvato cinasas codificadas por los genes *pykA* y *ttuE* presentan una diferente actividad y/o regulación que se discutirá más adelante.



**Figura 15. Títulos de CAT obtenidos después de 24 h de incubación de las cepas A25 y A35.** Inducción con 1 mM de IPTG en medio King con diferentes fuentes de carbono. Condiciones de incubación: 30 °C/300 rpm. Glc= Glucosa; Gly= Glicerol; Mix= Mezcla glucosa:glicerol; SHK= ácido shikímico; DHS= ácido dehidroshikímico; DHQ= ácido dehidroquinico.

## 11.5.2. Evaluación cinética y de producción en fermentadores de 1 L.

### 11.5.2.1. Obtención del fondo genético

El metabolismo central de *P. chlororaphis*, así como las enzimas involucradas en la vía del ácido shikímico difieren con respecto a los principales organismos utilizados para la sobre-producción de shikimato como son *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* y *Bacillus* spp, sin embargo, los precursores para la vía de síntesis son los mismos (PEP y E4P), por lo que la metodología planteada en este proyecto abarca estrategias utilizadas para aumentar la disponibilidad de los precursores en otros microorganismos y que en general han presentado buenos resultados.

Para tener una referencia con la cual determinar el efecto de las modificaciones genéticas realizadas en *P. chlororaphis*, se caracterizó a la cepa silvestre en cuanto su capacidad de crecimiento y producción de metabolitos implementando medio King modificado con glucosa o glicerol. Las fermentaciones realizadas (Figura 16, Tabla 10) mostraron que el microorganismo es capaz de crecer hasta 1.4 veces más rápido al utilizar como fuente de carbono la glucosa ( $1.23 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$  contra  $0.89 \pm 0.06 \text{ h}^{-1}$ ), sin embargo, tanto la generación de biomasa, así como el  $Y_{X/S}$ , se ven favorecidos durante el crecimiento de la cepa en glicerol. Estas observaciones concuerdan con lo reportado para otras cepas de *Pseudomonas*, como es el caso de *P. putida* KT2440, en donde se ha demostrado que esta diferencia se debe a que al utilizar glicerol la cepa presenta un menor estrés oxidativo

debido a que el consumo del glicerol es más lento y tiende a desperdiciar menos carbono en forma de  $\text{CO}_2$  y/o otros co-productos como el ácido acético (Nikel et al. 2014).

Por otro lado, las fuentes de carbono fueron consumidas por el microorganismo de manera diferente, si bien, el extracto de levadura aporta diferentes componentes que pueden estar siendo consumidos al mismo tiempo, se pueden realizar aproximaciones acerca de la velocidad de consumo de cada sustrato durante el crecimiento exponencial. Los resultados muestran que el  $q_{s_{\text{exp}}}$  de la glucosa fue casi 6 veces mayor que el del glicerol ( $134.59 \pm 18.50 \text{ mmol}_C / \text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}$  contra  $20.04 \pm 2.49 \text{ mmol}_C / \text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}$ ), esto concuerda con lo representado en las gráficas, ya que la glucosa es consumida en su totalidad alrededor de las 8 h del cultivo, mientras que el glicerol es consumido totalmente 12 h después de haber iniciado la fermentación.

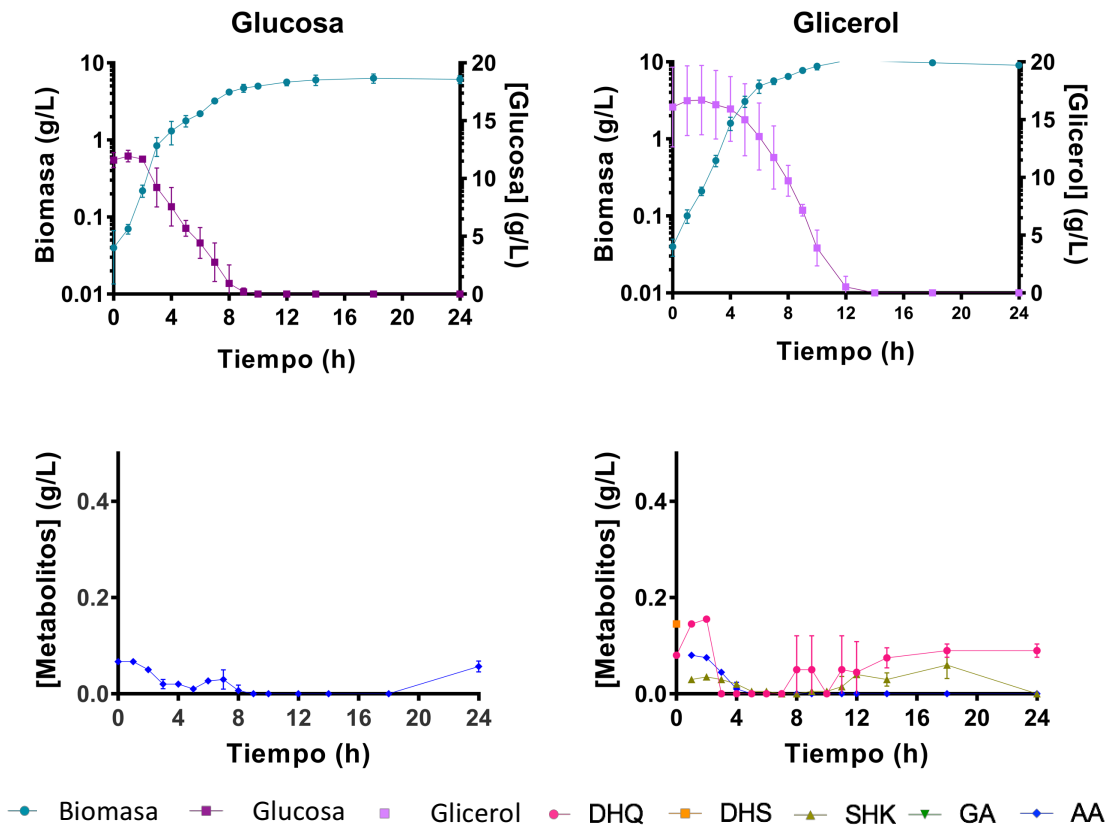


Figura 16. Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa silvestre.

En el medio con glucosa no se detectó en el sobrenadante ningún intermediario de la vía del shikimato, mientras que, al utilizar glicerol, el microorganismo produjo CAT con un rendimiento del  $0.001 \pm 0.000 \text{ mmol}_{\text{CAT}}/\text{mmol}_C$ , siendo el DHQ el más abundante.

Estudios metabolómicos en la cepa *P. chlororaphis* HT66 utilizando como fuente de carbono glicerol, han demostrado que de los metabolitos de la vía del shikimato, el DHQ es el que se encuentra en mayor concentración seguido del DHS, SA y DAHP (Yao et al. 2018).

La primera mutación realizada involucra al gen *aroK* (cepa A1) que como se ha demostrado en experimentos anteriores, genera cepas auxótrofas a aminoácidos aromáticos y a otros compuestos derivados del corismato, lo que indica que es el único gen que codifica para la enzima shikimato cinasa. Al igual que los resultados en matraces de 250 mL, se observó un decremento tanto en la velocidad de crecimiento como en la biomasa generada con respecto a la cepa silvestre sin importar la fuente de carbono utilizada (Figura 17, Tabla 10). Esta disminución en la velocidad de crecimiento es de alrededor de un 50 % y el efecto fue más notorio al utilizar glucosa como fuente de carbono. A diferencia de la cepa silvestre, la mutante A1 no presentó una gran diferencia en cuanto la biomasa máxima generada en glucosa o glicerol, lo cual se explica debido a que su crecimiento está delimitado principalmente por la cantidad de aminoácidos aromáticos y/o otros sustratos aromáticos que pudieran estar presentes en el medio de cultivo.

De igual manera que en la cepa silvestre, la velocidad de consumo de la glucosa ( $43.68 \pm 6.97 \text{ mmol}_C / \text{g}_{\text{DCW}} * \text{h}$ ) fue más alta que con glicerol ( $7.02 \pm 1.34 \text{ mmol}_C / \text{g}_{\text{DCW}} * \text{h}$ ). Sin embargo, estos valores disminuyeron en la cepa mutante alrededor de 2.5 veces, esto también se ve reflejado en el incremento del tiempo necesario para que la cepa consumiera toda la glucosa (24 h) y el glicerol, el cual, después de 24 h aún estaba presente en medio.

Otra diferencia notable con respecto a la cepa silvestre es que la cepa A1 produjo una mayor cantidad de ácido acético, sin embargo, este no llegó a acumularse como en el caso de *E. coli* debido a la preferencia de consumo que tiene de *P. chlororaphis* por los ácidos orgánicos (Rojo 2010).

Con esta inactivación se logró que el microorganismo pudiera acumular CAT en el medio con glucosa, con un rendimiento de  $0.002 \pm 0.000 \text{ mmol}_{\text{CAT}}/\text{mmol}_C$ , sin embargo, los resultados al utilizar glicerol fueron 10 veces mejores ( $0.02 \pm 0.00 \text{ mmol}_{\text{CAT}}/\text{mmol}_C$ ; 20 veces más con respecto a la cepa silvestre); al utilizar glucosa, el metabolito que presentó una mayor acumulación fue el DHS, mientras que el DHQ fue el más abundante al utilizar como fuente de carbono el glicerol.

Como se ha mencionado anteriormente, el metabolismo de la glucosa y del glicerol son totalmente distintos lo que puede traer como consecuencia las diferencias observadas, a pesar de ello, no hay estudios que profundicen en los cambios que puede haber en el metabolismo secundario al utilizar una u otra fuente de carbono.

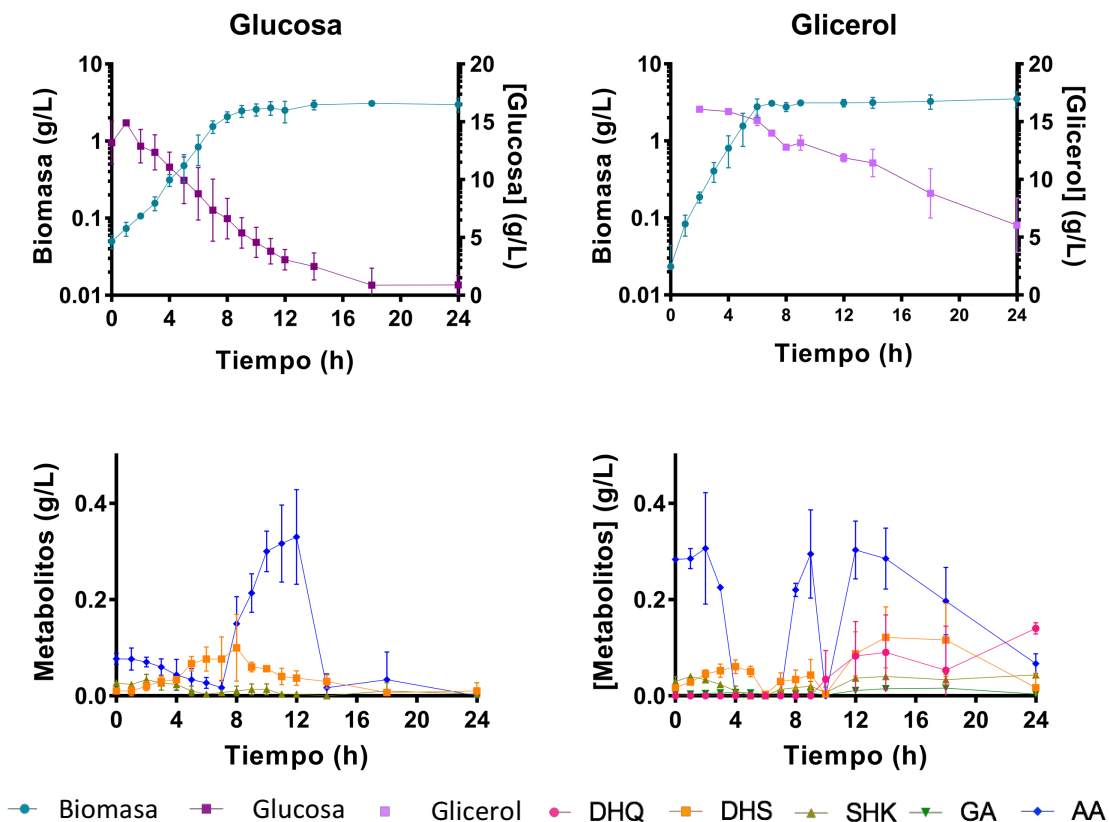


Figura 17. Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A1 (*aroK*-).

Las inactivaciones sencillas de las enzimas piruvato cinasas sobre el fondo genético *aroK* mostraron diferencias en su velocidad de crecimiento y el rendimiento  $Y_{X/S}$  obtenido en cada uno (Figura 18, Tabla 10). La cepa *aroK pykA*<sup>-</sup> (A2) tuvo un ligero aumento en su velocidad de crecimiento con respecto a la cepa parental al ser cultivada en el medio con glucosa ( $0.74 \pm 0.09 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que con glicerol, su velocidad de crecimiento ( $0.49 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$ ) decayó cerca un 30 % con respecto a la cepa parental en el mismo medio, esta tendencia también fue observada con la cepa *aroK ttuE*<sup>-</sup> (A3), cuyas velocidades de crecimiento en glucosa y glicerol fueron  $0.61 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$  y  $0.55 \pm 0.12 \text{ h}^{-1}$  respectivamente.

Otra consecuencia de las inactivaciones independientes de las enzimas piruvato cinasas es que su rendimiento  $Y_{X/S}$  disminuyó con respecto a la cepa parental sin importar la fuente de carbono utilizada, este efecto también se ha visto en cepas derivadas de *E. coli*, y es generado por que al bloquear una de las enzimas, el flujo de carbono hacia el TCA disminuye y en teoría, la cantidad de PEP disponible aumenta, favoreciendo su utilización por otras vías (Escalante et al. 2010).

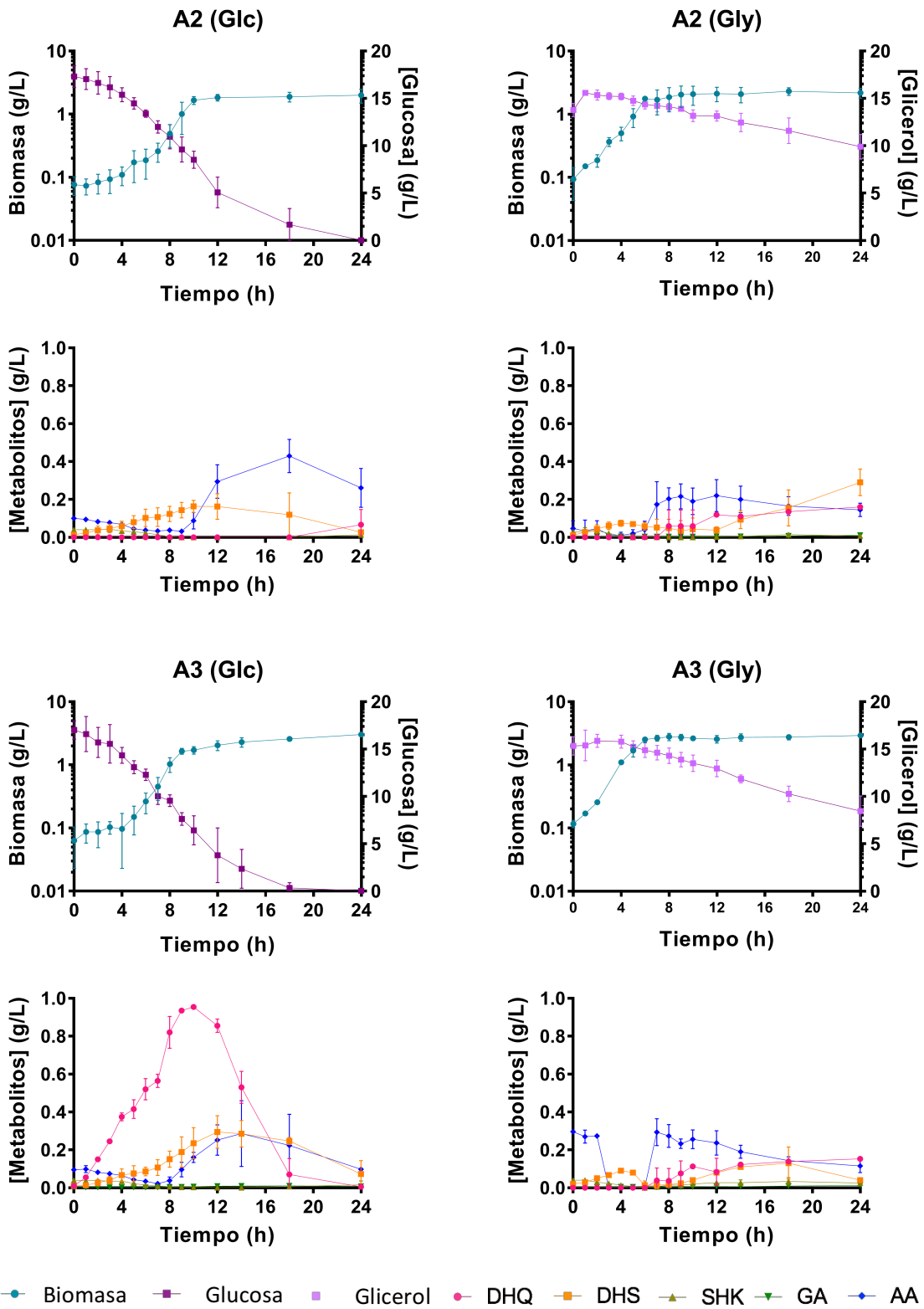


Figura 18. Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A2 (*aroK pykA*) y A3 (*aroK ttuE*).

En contraparte a la disminución del rendimiento  $Y_{x/s}$ , los títulos y rendimientos de CAT incrementaron en ambas cepas debido a una mayor disponibilidad de PEP; al utilizar glicerol como fuente de carbono, la cepa A2 (*aroK pykA*) presentó un mayor título de CAT que la cepa A3 (*aroK ttuE*). Por otro lado, esta tendencia se invirtió al utilizar glucosa como fuente de carbono, lo cual remarca aún más las diferencias en el metabolismo para catabolizar los sustratos. Cabe resaltar que la cepa A3 bajo estas condiciones tuvo uno de los títulos más altos de CAT obtenidos en este proyecto ( $1.16 \pm 0.03$ ), a pesar de ello no fue posible detectar shikimato en el sobrenadante, lo que sugiere la presencia de cuellos de botella en la vía del SA.

Las diferencias entre las dos cepas se atribuyen a que al igual que en *E. coli*, las piruvato cinasas codificadas por estos genes tienen diferentes características, desde su actividad hasta su regulación, lo que puede impactar de diversas maneras la velocidad de crecimiento, generación de biomasa y sobre-producción de metabolitos de interés (Ponce et al. 1995; Zhao et al. 2017); desafortunadamente, este tipo de comparaciones no han sido ampliamente estudiadas en el género *Pseudomonas*, por lo que se conoce poco acerca de estas enzimas, así como de las posibles consecuencias que podrían tener al ser inactivadas. Un reporte de Wang et al. (2018) muestra que no existen diferencias en los niveles de expresión de los genes *pykF* y *pykA* en una cepa silvestre de *P. chlororaphis* HT66, sin embargo, al inactivar el gen *phzE* que codifica para la enzima antranilato sintasa, encargada de desviar el corismato hacia la síntesis de fenazina-1-carboxiamida, el gen *pykF* y *pykA* presenta una expresión diferencial, siendo este último el que presentó un mayor incremento al utilizar como fuente de carbono glicerol. Tomando como referencia lo anterior, es probable que la cepa utilizada en este proyecto tenga un comportamiento similar a *P. chlororaphis* HT66 en cuanto a la sobre-expresión de una de las piruvato cinasas al inactivar uno de los genes involucrados en la síntesis de fenazinas, razón por la cual existen diferencias en la producción de CAT entre las cepas A2 y A3, sin embargo, esto tiene que ser corroborado mediante ensayos de RT-qPCR.

Después de las inactivaciones realizadas hasta este punto, se esperaba una mayor acumulación de shikimato, sin embargo, este fue indetectable por HPLC en la mayoría de los casos. Este resultado puede atribuirse a diferentes causas que involucran sistemas de regulación, actividades enzimáticas y vías competitivas por lo que aún es necesario realizar más estudios para determinar el paso limitante.



### 11.5.2.2. Sobre-expresión de la vía del ácido shikímico

Una estrategia que ya ha sido utilizada para la producción de shikimato es sobre-expresar los genes presentes en su vía de síntesis, siendo el plásmido pTrcAro6 uno de los que ha presentado mejores resultados en *E. coli*.

Las cepas A25 y A35 contienen parte del operón del plásmido pTrcAro6 exceptuando el gen *zwf*, el cual decidimos no incluirlo debido al tamaño del operón completo así como, por las capacidades metabólicas de *Pseudomonas chlororaphis* ya que de acuerdo a la anotación, la cepa tiene al menos 2 copias de este gen (Pablo I. Nikel et al. 2014). La eliminación del gen *zwf* conllevó a la generación del operón Aro5, el cual codifica para los genes *aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroE* y *aroD*; con esta estrategia se espera contrarrestar la regulación por control alostérico para la síntesis de DAHP a partir de PEP y E4P con la enzima *aroG<sup>fbr</sup>*, evitar la generación de cuellos de botella al sobre-expresar los genes que codifican para las enzimas que catalizan las tres primeras reacciones de la vía del shikimato y aumentar la disponibilidad de E4P con la sobre-expresión del gen *tktA*.

Es importante mencionar que los genes del operón son totalmente heterólogos (provenientes de *E. coli*) y con porcentajes de GC muy diferentes a los de *Pseudomonas*, esto podría estar delimitando de manera importante la capacidad que tiene la cepa para traducir los mRNA a proteínas y, por lo tanto, su capacidad de producción.

En la figura 19 se encuentran los resultados de las fermentaciones realizadas con las cepas A25 al ser inducidas con 1 mM de IPTG. Las velocidades de crecimiento (Tabla 10), variaron entre un 20 y 30 % con respecto a la cepa parental en los medios respectivos, existiendo un decremento al utilizar glucosa como fuente de carbono ( $0.59 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$  vs  $0.74 \pm 0.09 \text{ h}^{-1}$ ) y un aumento al utilizar glicerol ( $0.68 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  vs  $0.49 \pm 0.15 \text{ h}^{-1}$ ).

Los parámetros cinéticos determinados corroboraron de nuevo las diferencias en el metabolismo que tiene la cepa al utilizar una u otra fuente de carbono, ya que al utilizar glucosa, el  $Y_{X/S}$  no cambia con respecto a la cepa parental y existe un incremento en la cantidad de CAT producidos, sin embargo, al utilizar glicerol el  $Y_{X/S}$  incrementó ( $0.03 \pm 0.01$  vs  $0.18 \pm 0.07$ ) y la producción de CAT fue considerablemente menor a lo obtenido al utilizar glucosa, esto sugiere que el carbono proveniente del glicerol, en lugar de ser desviado preferencialmente hacia la vía del SA, está siendo utilizado para generar biomasa y/o otros compuestos no determinados.

Es claro que al utilizar glucosa hay una dependencia de la producción con el crecimiento de la cepa ya que el DHQ se acumula durante la fase exponencial y una vez que esta termina, el metabolito no se vuelve a acumular, aunado a esto, el DHS presentó una acumulación durante la fase exponencial y parte de la fase estacionaria, sin embargo, al

igual que el DHQ, su concentración empieza a decaer después de las 16 h de fermentación. El comportamiento de la acumulación de DHQ es apreciable al utilizar glicerol como fuente de carbono, pero, a diferencia de la utilización de glucosa, el DHS no presentó una acumulación si no que se mantuvo prácticamente constante a lo largo de la cinética.

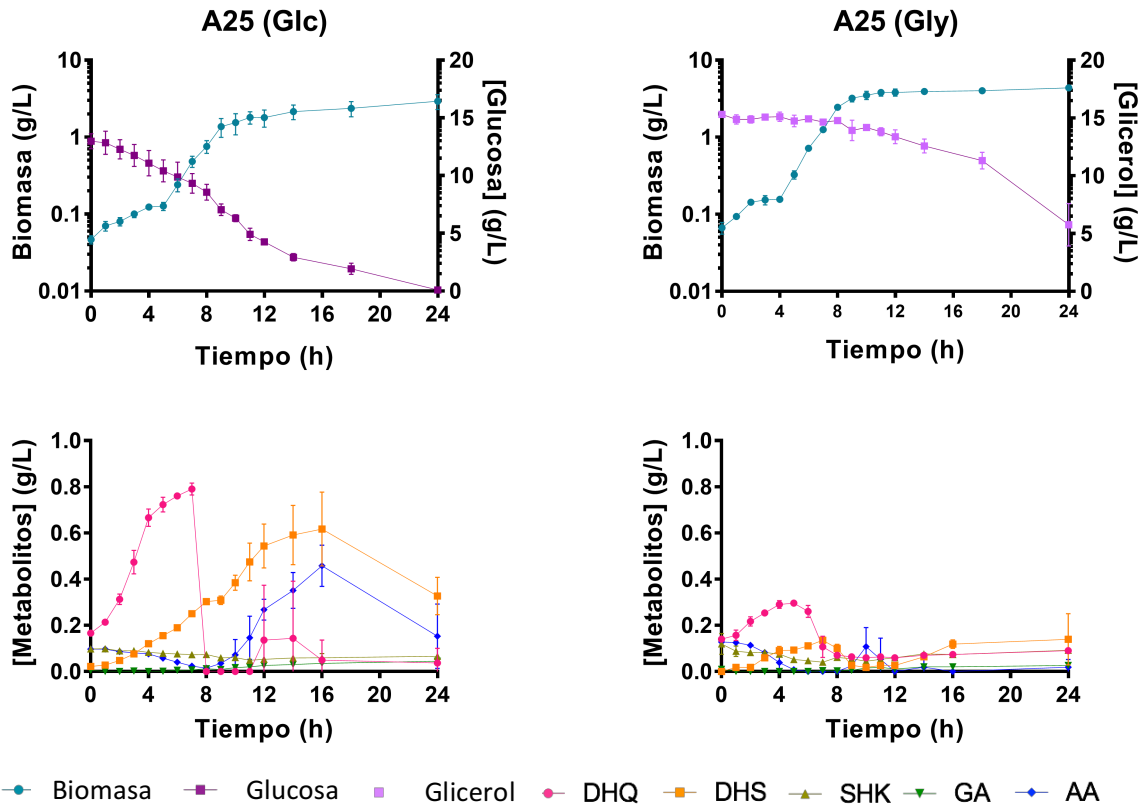


Figura 19. Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A25 (*aroK pykA*<sup>-</sup>, pUCP24A5)

Por otro lado, los resultados de la evaluación de la cepa A35 se encuentran en la figura 20 y la tabla 10. En este caso, las velocidades de crecimiento con respecto a las cepas parentales no variaron más de un 20 % en los respectivos medios de cultivo, además, el  $Y_{x/s}$  tanto en el medio con glucosa o glicerol incrementó, siendo más notable al utilizar glucosa, a pesar de ello, en este medio se obtuvieron los mejores títulos de TAC con esta cepa y, de igual manera, existe una dependencia entre la producción y el crecimiento del microorganismo. Si bien, no hay reportes que describan un comportamiento similar, se sabe que *Pseudomonas* presenta diferentes sistemas de regulación para la síntesis de metabolitos secundarios como son los sistemas de dos componentes, *quorum sensing*, snRNA, entre otros (Bilal et al. 2017).

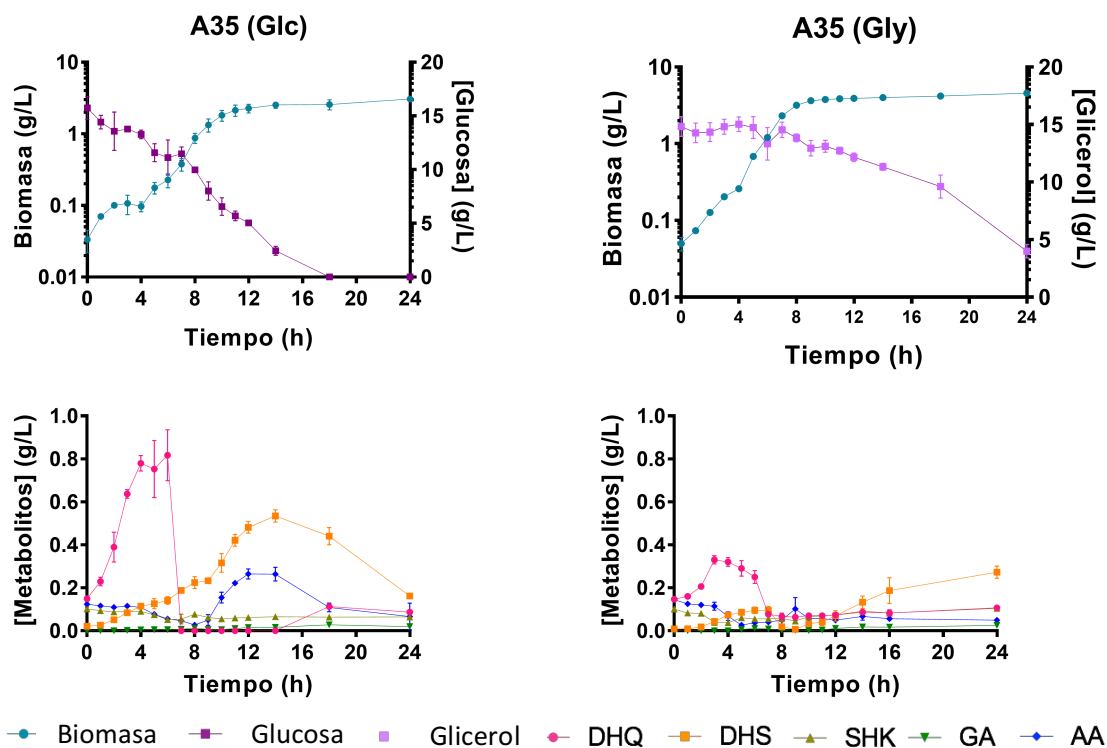


Figura 20. Cinéticas de crecimiento y producción de la cepa A35 (*aroK ttuE*, pUCP24A5)

En general, estas cepas produjeron una mayor cantidad de DHQ, lo que podría sugerir que se está generando un cuello de botella para la síntesis de DHS y, por lo tanto, de SA. Recordando los resultados de RT-qPCR, los genes *aroE* y *aroD* son los que tienen una menor expresión relativa, lo cual puede deberse a varias razones, una de ellas es que el promotor no es lo suficientemente fuerte como para favorecer la transcripción de estos dos últimos genes, o bien, existen mecanismos regulatorios propios de la cepa que impiden una sobre-producción de SA, ya que en investigaciones realizadas para generar cepas sobre-productoras de alguna fenazina o algún otro producto derivado de corismato, se observan cambios significativos hasta que se realizan inactivaciones en diferentes genes regulatorios como son *phzI/phzR*, *lon*, *parS*, *psrA*, *rsmA*, entre otros. (Selin et al. 2014; Yao et al. 2018).

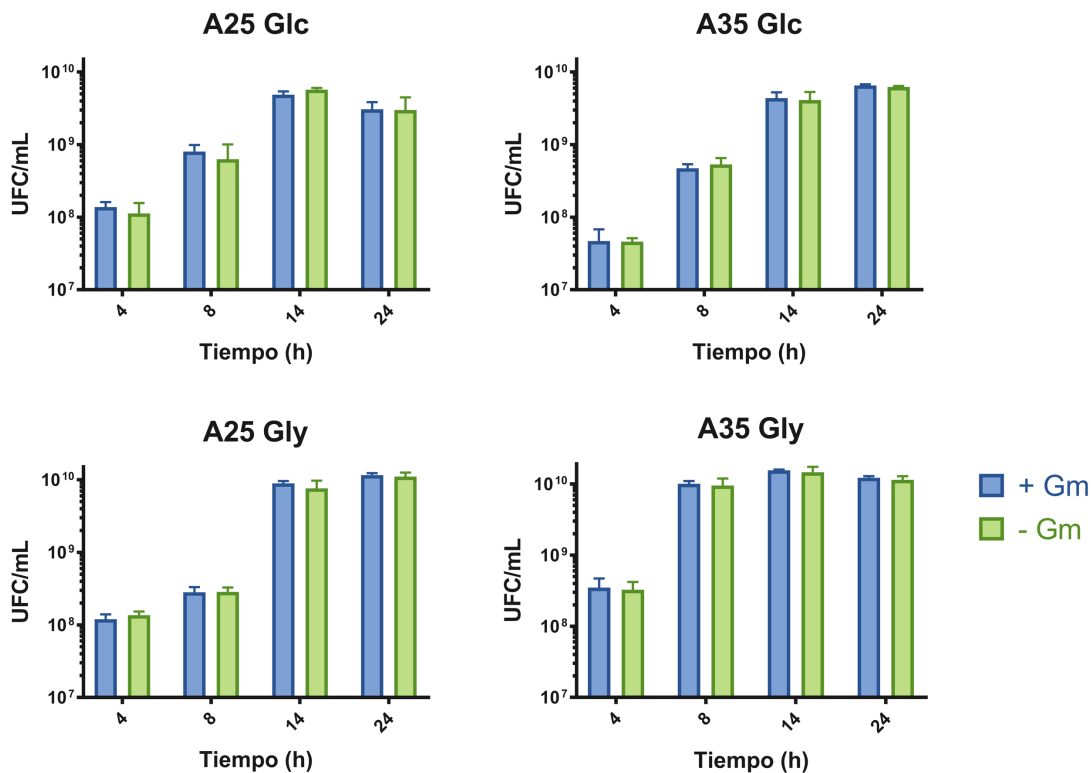
Los reguladores mencionados anteriormente actúan en diferentes niveles y de diferente manera, por ejemplo, la proteína Lon reprime al sistema de dos componentes GacA/GacS que es considerado el regulador maestro del metabolismo secundario, ya que controla de manera positiva la expresión de ncRNAs como son *RsmX*, *RsmY* y *RsmZ*, los cuales se unen a las proteínas RsmA/E, evitando así que estas últimas se unan al RNA y bloqueen la traducción del RNA. Por otro lado, el sistema de *quorum sensing* (QS) PhzR/PhzI es activado al interactuar una N-acil homoserin lactona (AHL, producida por PhzI) con PhzR

formando así, un complejo que se une de manera específica al motivo *phz* box ubicado río arriba del operón *phz*, favoreciendo su expresión. Este sistema de QS, a su vez, puede ser afectado de manera negativa por el regulador *PsrA*, el cual evita la síntesis de AHL lo que inactiva el sistema QS (Venturi 2006; Bilal et al. 2017; Yu et al. 2018; Yao et al. 2018).

Tanto la cepa A25 como la A35 presentaron una mayor acumulación de CAT al utilizar la glucosa como fuente de carbono, sin embargo, la producción de shikimato se ve favorecida al utilizar glicerol. La cepa A25 logró la mayor producción de CAT ( $1.12 \pm 0.05$  g/L) al utilizar glucosa, sin embargo, la producción de ácido shikímico solo fue de  $0.07 \pm 0.005$  g/L; por otro lado, la cepa que acumuló una mayor cantidad de SA fue la A35 ( $0.10 \pm 0.01$ ) al utilizar como fuente de carbono el glicerol con un título de CAT de  $0.51 \pm 0.05$ . Si bien, el título de shikimato no es elevado, es notable el efecto del plásmido pUCP24A5, ya que sin él, el shikimato no puede ser detectado en el sobrenadante de las cepas A2 y A3 sin importar la fuente de carbono utilizada.

Para descartar que los títulos de shikimato obtenidos no se debieran a una pérdida del plásmido a lo largo de la fermentación, se realizaron cuentas en placa en agar King con y sin antibiótico (Figura 21) mostrando que después de 24 h, las cepas aún lo conservan.

Cabe señalar que cuando las cepas llegan a la fase estacionaria, el número de UFC debería de mantenerse constante, ya que no existen los suficientes nutrientes en el medio para suplementar la auxotrofia y generar más células, lo que es notable al comparar la cuenta en placa de las muestras tomadas a las 14 h y 24 h de la fermentación. Sin embargo, al finalizar el experimento, la biomasa incrementa cerca de un 50 % con respecto a la biomasa que se tenía al término de la fase exponencial. Este incremento se debe a una probable interferencia de algún metabolito producido por la cepa, lo que hace que el valor se sobre-estime, mientras que por otro lado, las células pueden estar acumulando otros compuestos en forma de gránulos lo que genera células de mayor tamaño y, consecuentemente, estas interfieren de manera diferente al medir la  $OD_{600nm}$ . Cualquiera que sea el caso, es importante determinar cuáles son esos posibles metabolitos para evitar que se desvíe el flujo de carbono hacia su síntesis.



**Figura 21. Cuenta en placa en medio King con su respectiva fuente de carbono.**  
Muestras plaquedas con o sin antibiótico en agar King con su respectiva fuente de carbono.

Debido a que se cree que el medio utilizado puede ser una limitante para las cepas como consecuencia de su auxotrofia y a la carga metabólica extra que tienen, se analizó el consumo de aminoácidos aromáticos en el medio en diferentes puntos de las cinéticas de crecimiento de las cepas A25 y A35. Como se observa en la Figura 22, el triptófano es el aminoácido limitante para que las cepas puedan seguir en crecimiento exponencial, ya que éste se agota del medio entre las 8 y 9 h del cultivo, es importante observar que las cepas al ser crecidas en glicerol consumen de manera más rápida y al mismo tiempo (después de 4 h de cultivo) los 3 aminoácidos, por otro lado, al utilizar glucosa hay una diferencia de tiempo al comenzar a consumir triptófano y fenilalanina (después de 4 h), y finalmente la tirosina (después de 12 h), lo cual indica que hay diferentes mecanismos de regulación para el catabolismo de las fuentes de carbono, así como el resto de los componentes presentes en el extracto de levadura.

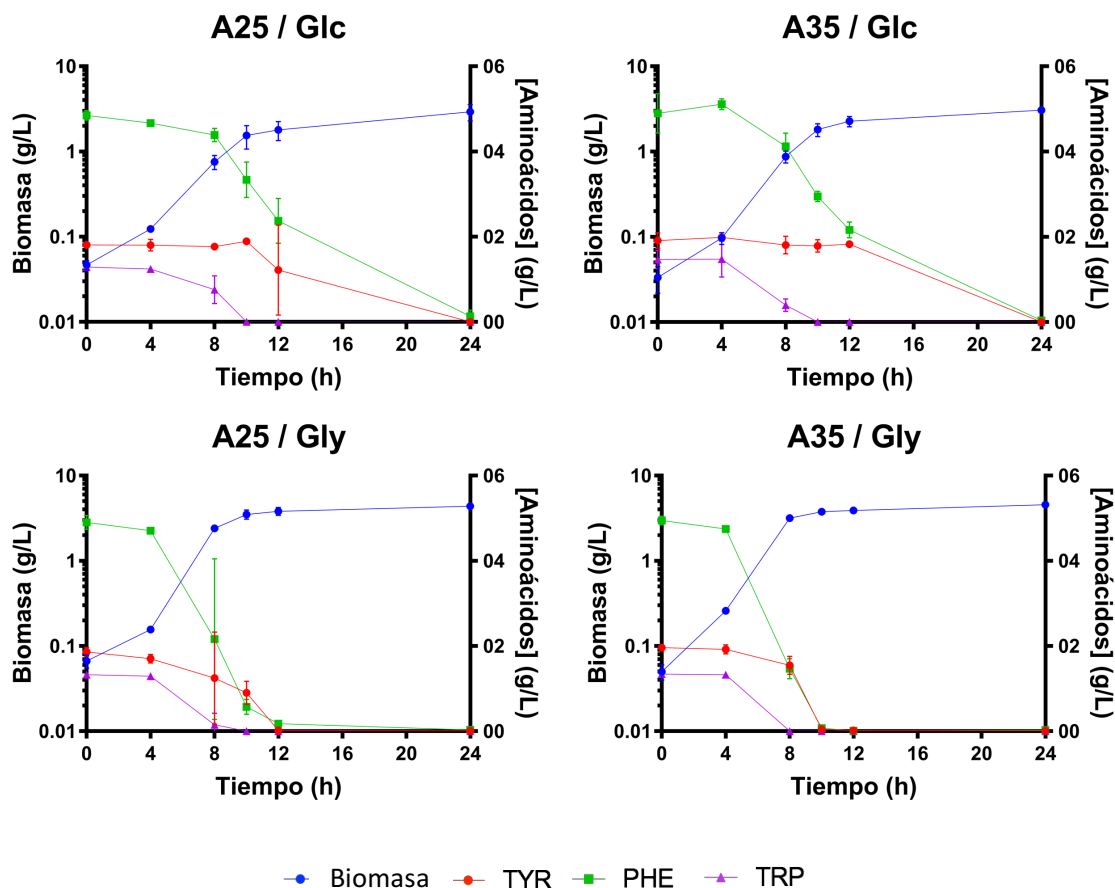


Figura 22. Consumo de aminoácidos aromáticos de las cepas A25 y A35.

Los resultados obtenidos durante este proyecto mostraron que es posible obtener cepas derivadas de *P. chlororaphis* capaces de acumular SA y otros intermediarios de la vía del shikimato, si bien, al comparar los títulos obtenidos con los resultados de cepas derivadas de *E. coli*, *P. chlororaphis* ATCC 9446 aún necesita optimizaciones en el re-direccionamiento del flujo de carbono, así como un mayor conocimiento sobre su metabolismo central y secundario. Con este primer acercamiento se lograron elucidar diferencias entre las fuentes de carbono utilizadas, así como el rol de las isoenzimas piruvato cinasas, esta información, además de ayudar a plantear otras estrategias para incrementar la síntesis de SA, puede ser utilizada para mejorar la sobre-producción de fenazinas o de algún otro metabolito que tenga como precursor al corismato.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos y de producción de SA y CAT determinados a partir de las cinéticas de crecimiento en fermentadores de 1

Cepa	Fuente de carbono	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> $Y_{X/S}$ (g <sub>DCW</sub> /mmol C)	$q_{S_{exp}}$ (mmol <sub>C</sub> /g <sub>DCW</sub> *h)	<sup>b</sup> Título SA (g/L)	<sup>b</sup> $Y_{SA/C}$ (mmol SA/mmol C)	<sup>c</sup> Título de CAT (g/L)	<sup>c</sup> $Y_{CAT/C}$ (mmol CAT/mmol C)
WT	Glc	1.23 ± 0.10	0.01 ± 0.00	134.59 ± 18.50	ND	ND	ND	ND
WT	Gly	0.89 ± 0.06	0.05 ± 0.01	20.04 ± 2.49	ND	ND	0.09 ± 0.01	0.001 ± 0.000
A1	Glc	0.62 ± 0.06	0.01 ± 0.00	43.68 ± 6.97	ND	ND	0.09 ± 0.00	0.002 ± 0.000
A1	Gly	0.73 ± 0.09	0.09 ± 0.02	7.02 ± 1.34	0.04 ± 0.00	0.0008 ± 0.0002	0.35 ± 0.02	0.02 ± 0.00
A2	Glc	0.74 ± 0.09	0.01 ± 0.00	62.37 ± 6.03	ND	ND	0.17 ± 0.03	0.003 ± 0.000
A2	Gly	0.49 ± 0.15	0.03 ± 0.01	14.31 ± 2.23	ND	ND	0.46 ± 0.07	0.02 ± 0.00
A25	Glc	0.59 ± 0.04	0.01 ± 0.00	54.09 ± 5.57	0.07 ± 0.00	0.0009 ± 0.0000	1.12 ± 0.05	0.05 ± 0.00
A25	Gly	0.68 ± 0.02	0.18 ± 0.07	4.23 ± 1.67	0.09 ± 0.01	0.002 ± 0.000	0.35 ± 0.13	0.007 ± 0.004
A3	Glc	0.61 ± 0.05	0.003 ± 0.000	227.39 ± 28.99	ND	ND	1.16 ± 0.03	0.02 ± 0.004
A3	Gly	0.55 ± 0.12	0.05 ± 0.07	9.17 ± 0.43	ND	ND	0.29 ± 0.10	0.008 ± 0.004
A35	Glc	0.51 ± 0.03	0.01 ± 0.00	37.32 ± 10.26	0.08 ± 0.01	0.002 ± 0.000	1.02 ± 0.14	0.06 ± 0.01
A35	Gly	0.57 ± 0.01	0.09 ± 0.01	6.65 ± 0.68	0.10 ± 0.01	0.002 ± 0.000	0.51 ± 0.05	0.008 ± 0.002

ND: No determinado; a. Determinado durante la fase exponencial; b. Determinados en el punto de mayor producción de shikimato; c. Determinados en el punto de mayor producción de CAT.

## 12. CONCLUSIONES.

Se determinaron los niveles basales de producción de DHQ, DHS, SA, AQ y AG de la cepa *P. chlororaphis* ATCC 9446 en biorreactores de 1 L, obteniendo únicamente concentraciones detectables en el sobrenadante al utilizar glicerol como fuente de carbono.

Las inactivaciones realizadas conllevaron a la generación de tres cepas, las cuales tienen inactivado el gen *aroK* (A1 y A11), los genes *aroK* y *pykA* (A2) y los genes *aroK* y *ttuE* (A3), teniendo como consecuencia un decremento en su velocidad de crecimiento, pero un aumento en la producción de compuestos aromáticos totales con respecto a la cepa silvestre utilizando como fuentes de carbono glucosa o glicerol.

La inactivación sencilla de las piruvato cinasas conllevó a diferentes fenotipos, lo que comprueba que cada una presenta una actividad y/o regulación diferente bajo las condiciones probadas.

La sobre-expresión de los genes *aroB*, *tktA*, *aroG<sup>fbr</sup>*, *aroE* y *aroD* favoreció aún más la producción de DHQ, DHS y SHK, sin embargo, nuestro metabolito de interés fue el que tuvo en menor título y rendimiento mientras que, el DHQ fue el más abundante.

Existen diferencias en los parámetros cinéticos determinados al utilizar glucosa o glicerol como fuente de carbono. El medio con glucosa presentó mejores resultados para la síntesis de los intermediarios de la vía (DHQ, DHS y en su minoría SA) mientras que, con glicerol se obtuvieron mayores títulos de SA. Las mejores cepas obtenidas para la síntesis de SA fueron las cepas A35 (0.10 g/L) y A25 (0.09 g/L) al utilizar medio King con glicerol.

## 13. PERSPECTIVAS.

1. Implementar diferentes estrategias de cultivo en las cepas A25 y A35, así como evaluar diferentes medios de cultivo para la producción shikimato
2. Valorar si la traducción de los genes presentes en el plásmido pUCP24A5 no se está viendo afectada por la diferencia en la utilización de codones, o bien, por mecanismos regulatorios propios de la cepa.
3. Probar diferentes vectores de expresión que contengan promotores más fuertes, así como determinar el mejor orden de los genes presentes en el operón A5 para minimizar los cuellos de botella.
4. Determinar el posible flujo de carbono en las cepas A25 y A35 mediante la cuantificación de mRNA por RT-qPCR de algunos genes involucrados en la síntesis de ácido shikímico y en el metabolismo central de carbono.
5. Determinar el posible efecto de algunos reguladores del metabolismo secundario presentes en *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446.



## 14. REFERENCIAS.

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K., 1999. Short protocols in molecular biology. Cuarta edición. Michigan: Wiley.
- Aguilar, C. et al., 2012. Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics*, 13(1), p.385.
- Anderson Jamie Staley Mary Challender Jamie Heuton, J.A., 2018. Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. *Transgenic Research*, 27(1), pp.103–113.
- Antoine, R. & Loch, C., 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad host range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram positive organisms. *Molecular Microbiology*, 6(13), pp.1785–1799.
- Bagdasarian, M.M. et al., 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16(1–3), pp.237–247.
- Bilal, M. et al., 2017. Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), p.191.
- Bilal, M. et al., 2018. Metabolic engineering strategies for enhanced shikimate biosynthesis: current scenario and future developments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp.1–15.
- Bolivar, F. et al., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, 2, pp.95–113.
- Borrero-de Acuña, J. et al., 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), p.88.
- Calderón, C.E. et al., 2015. Comparative Genomic Analysis of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 Reveals New Insight into Antifungal Compounds Involved in Biocontrol. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 28(3), pp.249–260.
- Carmona, S.B. et al., 2015. Inactivation of the PTS as a Strategy to Engineer the Production of Aromatic Metabolites in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(2–3), pp.195–208. A
- Cattoir, V., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance Mechanisms of Antibiotic Resistance. *The University of Oklahoma Health Sciences Center*, 23(5), pp.1–45.
- Chandran, S.S. et al., 2003. Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*, 19(3), pp.808–814.
- Chen, K. et al., 2012. Deletion of the *aroK* gene is essential for high shikimic acid accumulation through the shikimate pathway in *E. coli*. *Bioresource Technology*, 119, pp.141–147.
- Choi, K.-H. & Schweizer, H.P., 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC microbiology*, 5(1), p.30.
- Cook, T.B. et al., 2018. Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pp.1–11.

- 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), pp.6640–5.
- Díaz Quiroz, D.C. et al., 2014. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, (4), pp.35–46.
- Escalante, A. et al., 2010. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial cell factories*, 9(Ccm), p.21.
- Filloux, A., Ramos Juan-Luis 2014. *Pseudomonas: Methods and protocols*. Springer, New York.
- Flores, N. et al., 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering*, 7(2), pp.70–87.
- Flores, N. et al., 2007. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permeas. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1–3), pp.105–116.
- Frey, J., Bagdasarian, M.M. & Bagdasarian, M., 1992. Replication and copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 113(1), pp.101–106.
- García, S. et al., 2017. The Role of the *ydiB* Gene, Which Encodes Quinate/Shikimate Dehydrogenase, in the Production of Quinic, Dehydroshikimic and Shikimic Acids in a PTS- Strain of *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 27(1), pp.11–21.
- Ghosh, S. et al., 2016. Studies on the production of shikimic acid using the *aroK* knockout strain of *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), pp.1–11.
- Ghosh, S., Chisti, Y. & Banerjee, U.C., 2012. Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*, 30(6), pp.1425–1431.
- Gunther IV, N.W. et al., 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), pp.2288–2293.
- Gustavsson, M. & Lee, S.Y., 2016. Prospects of microbial cell factories developed through systems metabolic engineering. *Microbial Biotechnology*, 9(5), pp.610–617.
- Hoang, T.T. et al., 1998. A broad-host-range F<sub>1</sub>p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212(1), pp.77–86.
- Hu, H. et al., 2017. Production of trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilic acid by engineered *Pseudomonas chlororaphis* GP72. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Kahlon, R.S., 2016. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*, Springer, Switzerland.
- Kogure, T. et al., 2016. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate

- overproduction by growth-arrested cell reaction. *Metabolic Engineering*, 38, pp.204–216.
- Lee, M.Y., Hung, W.P. & Tsai, S.H., 2017. Improvement of shikimic acid production in *Escherichia coli* with growth phase-dependent regulation in the biosynthetic pathway from glycerol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), p.25.
- Liu, K. et al., 2016. Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-Hydroxyphenazine. *Microbial Cell Factories*, 15(1), p.131.
- Liu, X.L. et al., 2016. Enhanced production of shikimic acid using a multi-gene co-expression system in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(4), pp.286–293.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. *METHODS*, 25, pp.402–408. A
- Martínez-García, E. & de Lorenzo, V., 2017. Molecular tools and emerging strategies for deep genetic/genomic refactoring of *Pseudomonas*. *Current Opinion in Biotechnology*, 47, pp.120–132.
- Martínez-Gómez, K. et al., 2012. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*, 11(1), p.46.
- Martínez, J.A., Bolívar, F. & Escalante, A., 2015. Shikimic Acid Production in *Escherichia coli*: From Classical Metabolic Engineering Strategies to Omics Applied to Improve Its Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(September), p.145.
- Moreno-Avitia, F. et al., 2017. crossm Draft Genome Sequence of *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 , a Nonpathogenic Bacterium with Bioremediation and Industrial Potential. *Genome announcements*, 5(23), pp.1–2.
- Nikel, P.I. et al., 2016. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, pp.20–29.
- Nikel, P.I., Chavarría, M., et al., 2015. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp.25920–25932.
- Nikel, P.I. et al., 2015. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), pp.25920–25932.
- Nikel, P.I., Romero-Campero, F.J., et al., 2015. The Glycerol-Dependent Metabolic Persistence of *Pseudomonas putida* KT2440 Reflects the Regulatory Logic of the GlpR Repressor. *mBio*, 6(2), pp.e00340-15.
- Nikel, P.I., Kim, J. & de Lorenzo, V., 2014. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 16(1), pp.239–254.
- Nikel, P.I., Martínez-García, E. & de Lorenzo, V., 2014. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nature reviews. Microbiology*, 12(5), pp.368–79.

- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. & Wakabayashi, H., 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), pp.83–89.
- Ponce, E. et al., 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: The relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 177(19), pp.5719–5722.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P. & Newman, D.K., 2006. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, 2(2), pp.71–78.
- Rawat, G., Tripathi, P. & Saxena, R.K., 2013. Expanding horizons of shikimic acid: Recent progresses in production and its endless frontiers in application and market trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), pp.4277–4287.
- Rodriguez, A. et al., 2013. Constitutive expression of selected genes from the pentose phosphate and aromatic pathways increases the shikimic acid yield in high-glucose batch cultures of an *Escherichia coli* strain lacking PTS and pykF. *Microbial cell factories*, 12(1), p.86.
- Rodriguez, A. et al., 2017. Plasmid-encoded biosynthetic genes alleviate metabolic disadvantages while increasing glucose conversion to shikimate in an engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(6), pp.1319–1330.
- Rojo, F., 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), pp.658–684.
- Selin, C. et al., 2014. Expression of the *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 Rsm system is under control of GacA, RpoS, PsrA, quorum sensing and the stringent response. *BIOLOGICAL CONTROL*, 69, pp.24–33.
- Shen, X. et al., 2017. Developing genome-reduced *Pseudomonas chlororaphis* strains for the production of secondary metabolites. *BMC Genomics*, 18(1), p.715.
- Silva-Rocha, R. et al., 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, 41(D1).
- Tripathi, P. et al., 2013. Fermentative production of shikimic acid: A paradigm shift of production concept from plant route to microbial route. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11), pp.1665–1673.
- Udaondo, Z. et al., 2018. Regulation of carbohydrate degradation pathways in *Pseudomonas* involves a versatile set of transcriptional regulators. *Microbial Biotechnology*, 11(3), pp.442–454.
- Venturi, V., 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), pp.274–291.
- Walsh, C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), pp.775–781.
- Wang, S. et al., 2018. Development of a plasmid-free biosynthetic pathway for enhanced muconic acid production in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synthetic Biology*,

p.acssynbio.8b00047.

- West, S.E.H. et al., 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 148(1), pp.81–86.
- Wierckx, N.J.P. et al., 2005. Engineering of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 for bioproduction of phenol from glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp.8221–8227.
- Xu, S. et al., 2017. Total quantification and extraction of shikimic acid from star anise (*Illicium verum*) using solid-state NMR and cellulose-dissolving aqueous hydroxide solutions. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5, pp.115–121.
- Yao, R. et al., 2018. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source *Biotechnology for Biofuels*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(11).
- Yu, J.M. et al., 2018. An upstream sequence modulates phenazine production at the level of transcription and translation in the biological control strain *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 L. Leoni, ed. *PLOS ONE*, 13(2), p.e0193063.
- Zhang, X. et al., 2018. Global ecological regionalization of 15 *Illicium* species: nature sources of shikimic acid. *Chinese Medicine*, 13(1), p.31.
- Zhao, C. et al., 2017. Reexamination of the Physiological Role of PykA in *Escherichia coli* Revealed that It Negatively Regulates the Intracellular ATP Levels under Anaerobic Conditions R. E. Parales, ed. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), pp.e00316-17.

## Anexo I: Primers utilizados.

Nombre	Secuencia (5'→3')
<b>Inactivación del gen <i>aroK</i></b>	
aroK5'FHindIII	ATC CGG AAG CTT CCG CCG ATC AAG AAG AAC GA
aroK5'RKmF	CTC CAG CCT ACA CAA TCG CTC CCC CAT TGG CCC AAC AAG AA
aroK3'FKmR	CTC TAA GGG CTT CTC AGT GCG CAA CTG CCT CCC CGT TAA TG
aroK3'RHindIII	ATC CGG AAG CTT CCG GTC CAA CAA ACC TTC GC
<b>Inactivación del gen <i>pykA</i></b>	
Pyk15'FHindIII	ATC CGG AAG CTT CAT CAC CCG TTC GCA GTT GC
Pyk15'RKmF	CTC CAG CCT ACA CAA TCG CTC ACG GAC GGA CAT GCA AAG AC
Pyk13'FKmR	CTC TAA GGG CTT CTC AGT GCG GTT GGC GAC CCG ATG GTC T
Pyk13'RHindIII	ATC CGG AAG CTT GCG CAA GGT GAT CGA GGA G
<b>Inactivación del gen <i>ttuE</i></b>	
Pyk25'FHindIII	ATC CGG AAG CTT CCG TTG TAG CTG AAC AGC CC
Pyk25'RKmF	CTC CAG CCT ACA CAA TCG CTC CTG ATC TGA GCC TGT AGC CG
Pyk23'FKmR	CTC TAA GGG CTT CTC AGT GCG GTC AGG CGT CAT GTT GGG G
Pyk23'RHindIII	ATC CGG AAG CTT CGC AAT GCC GAG TTC CTC CT
<b>Cassettes de resistencia</b>	
KmF	GAG CGA TTG TGT AGG CTG GAG
KmR	CGC ACT GAG AAG CCC TTA GAG
PfoIFw	AGC TTT TCC GGG ACG TAT CAC GAG GCC CTT TCG
AhdIRv	AGC TTT GAC TCC CCG TCG GAG TGG TGA ATC CGT TAG C
<b>Operón Aro5</b>	
BamAro5Fw	CGG GAT CCC GCA CAC AGG AAA CAG ACC ATG
XbaAro5Rv	GCT CTA GAG CCC GGG TAC CGA GCT CTT ATG
<b>Secuenciación del operón Aro5</b>	
Fwd Xba	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TT
Rv Xba	CCA CTC CTT TCC CTG GAC TG
Fw sec1	CTG ATG CCA CTG GAT GTT GC
Rv sec1	AGG GCT GAT TAA CGA TCC GC
Fw sec2	GCT CAT CAG GTC AGC GAG AT
Rv sec2	CTA CGG TGT TCG CGA GTT CG
Fw sec3	CAT CAG GAA GGT GGA GGT GT
Rv sec3	CTC AAG CGG GCT GGG TTA CC
Fwd Bam	GCA TCT CTC CCG CAA GGA CT
Rv Bam	TAC CGC CTT TGA GTG AGC TG
FW tktA	CGA TAG CAT TCT GAG ACG CT
<b>qPCR y RT-qPCR</b>	
rpoD a	GGC AGT GGA AAC CGA CAT TG
<b>REFERENCIA</b>	
Este trabajo	

rpoD b	TTT CGA TTT CGC CTT CAC GT	Este trabajo
aacC1 a	TGG CGG TAC TTG GGT CGA TA	Flores (No publicado)
aacC1 b	CGT GCA AGC AGA TTA CGG TG	Flores (No publicado)
aroB a	GTT ATC CTC CCT GAC GGC G	García et al. 2017
aroB b	ACC AGC GTA GTA TCG CGA CC	García et al. 2017
tktA a	AGT CCT GTG GCG TGA TTT CC	Flores et al. 2005
tktA b	AGA TCA GCA TGG AGC CGT G	Flores et al. 2005
aroG a	GTC GGC TTC AAA AAT GGC AC	García et al. 2017
aroG b	CCC CAT TTC GTT ACG GAC AG	García et al. 2017
aroD a	AGC CGA AGA AAT CAT TGC CC	García et al. 2017
aroD b	ACG TCA GCA CAT CGC TGG TA	García et al. 2017
aroE a	AAT CCG ATA GCC CAC AGC AA	García et al. 2017
aroE b	TCA TTG ATG GGT GCC AAC AC	García et al. 2017

En morado se muestra la secuencia añadida a los primers para realizar la digestión con HindIII, en rojo la secuencia de homología con el extremo 5' del cassette de resistencia a kanamicina y en verde para el extremo 3'.

**Anexo II: Metodología para la extracción de ADN cromosomal con el kit UltraClean™ Microbial DNA isolation (MOBIO®).**

1. Se centrifugó a 10,000 rpm/1 min 1.8 mL de la suspensión saturada del microorganismo al que se le realizó la extracción de ADN cromosomal.
2. El “pellet” se resuspendió en 300 µL de la solución “MicroBead”, se mezcló con el vórtex y se transfirió todo el volumen al tubo “MicroBead”.
3. Se agregaron 50 µL de la solución “MD1” al mismo tubo y se mezcló en el vórtex a máxima velocidad por 10 minutos.
4. Se centrifugó a 10,000 rpm/30 s y el sobrenadante se transfirió a un tubo colector de 2 mL.
5. Se añadieron 100 µL de la solución “MD2” al sobrenadante y se homogeneizó en el vórtex por 5 segundos. La solución se incubó a 4 °C/5 min.
6. Se centrifugó a 10,000 rpm/1 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo colector de 2 mL.
7. Se agregaron 900 µL de la solución “MD3” y se mezcló en el vórtex durante 5 segundos.
8. Se transfirió 700 µL dentro del tubo “Spin Filter” y se centrifugó a 10,000 rpm/ 30 s. Se descartó el sobrenadante, se repitió este paso con el resto del volumen de la solución anterior.
9. Se añadieron 300 µL de la solución “MD4”, se centrifugó a 10,000 rpm/30 s y se descartó el sobrenadante.
10. Se centrifugó de nuevo la solución a 10,000 rpm/1 min y se descartó el sobrenadante. El filtro de este tubo se transfirió a un tubo colector nuevo de 2 mL.
11. Se agregaron 50 µL de la solución “MD5” en el centro del filtro y se centrifugó a 10,000 rpm/30 s.
12. Se descartó el filtro y se almacenó la solución con ADN a -20 °C.



**Anexo III: Metodología para la purificación de DNA con el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific®).**

1. Se cortó la banda de interés a partir del gel electroforesis la cual, se colocó en tubos de 1.5 mL.
2. Se agregó un volumen equivalente (relación peso:volumen) del buffer de unión y se incubó durante 10 min a 60 °C durante 10 min.
3. Se transfirió hasta 800 µL de la solución a la columna “GeneJET purification”, se centrifugó durante 1 min a 13,200 rpm y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta pasar todo el volumen de la primera solución por la columna.
4. Se agregaron 700 µL de la solución de lavado a la columna y se centrifugó dos veces bajo las condiciones anteriores desechando el sobrenadante.
5. La columna se colocó en un tubo nuevo, se agregaron 50 µL del buffer de elución y se centrifugó a 13,200 rpm/2 min.
6. El sobrenadante obtenido contiene el DNA purificado y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

**Anexo IV: Metodología de clonación implementando el kit TOPO® XL PCR cloning (Invitrogen™).**

1. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 4 µL del amplicón purificado y 1 µL del vector pCR-XL-TOPO® y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.
2. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 µL de la solución 6X TOPO® Cloning Stop Solution.
3. La mezcla obtenida fue electrotransformada en *E. coli* DH5α.

## Anexo V: Resultados de RT-qPCR.

Muestra	Ct
WtGlc1 aroB	28.5211
WtGlc2 aroB	28.2164
WtGlc3 aroB	28.4835
WtGly1 aroB	28.2262
WtGly2 aroB	27.9205
WtGly3 aroB	28.2913
A25Glc1 aroB	22.0343
A25Glc2 aroB	22.4574
A25Glc3 aroB	22.312
A25Gly1 aroB	21.5191
A25Gly2 aroB	21.8863
A25Gly3 aroB	19.2462
A35Glc1 aroB	24.168
A35Glc2 aroB	20.4035
A35Glc3 aroB	20.4408
A35Gly1 aroB	20.5798
A35Gly2 aroB	21.8783
A35Gly3 aroB	21.4407
WtGlc1 tktA	28.0873
WtGlc2 tktA	29.0308
WtGlc3 tktA	28.997
WtGly1 tktA	29.012
WtGly2 tktA	28.5245
WtGly3 tktA	29.3363
A25Glc1 tktA	20.1843
A25Glc2 tktA	20.4514
A25Glc3 tktA	20.175
A25Gly1 tktA	19.397
A25Gly2 tktA	19.3807

A25Gly3 tktA	17.2337
A25Glc1 tktA	22.0836
A25Glc2 tktA	18.3807
A25Glc3 tktA	18.486
A35Gly1 tktA	18.3353
A35Gly2 tktA	19.3122
WtGlc1 aroG	28.0919
WtGlc2 aroG	28.2719
WtGlc3 aroG	28.2915
WtGly1 aroG	28.0262
WtGly2 aroG	28.3614
WtGly3 aroG	28.2859
A25Glc1 aroG	19.4065
A25Glc2 aroG	19.55
A25Glc3 aroG	18.7757
A25Gly1 aroG	19.0889
A25Gly2 aroG	18.423
A25Gly3 aroG	16.2224
A35Glc1 aroG	20.5767
A35Glc2 aroG	15.9989
A35Glc3 aroG	15.9021
A35Gly1 aroG	15.9502
A35Gly2 aroG	16.641
A35Gly3 aroG	16.1079
WtGlc1 aroD	30.2506
WtGlc2 aroD	29.5082
WtGlc3 aroD	31.2313
WtGly1 aroD	29.7225
WtGly2 aroD	30.8701
WtGly3 aroD	29.5437

A25Glc1 aroD	17.1331
A25Glc2 aroD	17.2144
A25Glc3 aroD	17.0329
A25Gly1 aroD	16.4921
A25Gly2 aroD	16.2896
A25Gly3 aroD	14.4697
A35Glc1 aroD	18.9258
A35Glc2 aroD	16.0291
A35Glc3 aroD	15.6173
A35Gly1 aroD	16.0936
A35Gly2 aroD	16.9944
A35Gly3 aroD	16.5786
WtGlc1 aroE	29.1307
WtGlc2 aroE	29.5409
WtGlc3 aroE	29.5779
WtGly1 aroE	29.1607
WtGly2 aroE	29.788
WtGly3 aroE	29.1296
A25Glc1 aroE	17.7804
A25Glc2 aroE	16.3631
A25Glc3 aroE	17.3255
A25Gly1 aroE	17.5679
A25Gly2 aroE	17.4767
A25Gly3 aroE	15.5355
A35Glc1 aroE	20.2358
A35Glc2 aroE	16.9005
A35Glc3 aroE	16.7258
A35Gly1 aroE	16.8326
A35Gly2 aroE	17.4456