



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efecto de la eliminación de los genes *pykA* y *pykF* en la  
producción de ácido *p*-hidroxicinámico (pHCA), en cepas  
modificadas de *Escherichia coli*, utilizando glicerol como  
fuente de carbono

*TESIS*

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

DANIEL ABNER ROSAS RIVERA

GUILLERMO GOSSET LAGARDA  
ENRIQUE MERINO PÉREZ  
LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos**

Este proyecto no podría haber sido realizado sin la ayuda y tutoría de las siguientes personas:

### **A mi tutor:**

Dr. Guillermo Gosset Lagarda, jefe de grupo del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **A mi comité tutorial:**

Dr. Enrique Merino Pérez, jefe de grupo, departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM y del Consorcio de Investigación del Golfo de México.

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, jefe de grupo, departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM y del Consorcio de Investigación del Golfo de México.

### **A los miembros de mi jurado**

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dra. Gloria Saab Rincón

Dr. Daniel Genaro Segura González

Dr. José Utrilla Carreri

Dr. Ernesto Ortiz Suri

### **A los Investigadores del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas:**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez, jefe de grupo, departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Dr. Luis Caspeta Guadarrama, departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Dr. José Adelfo Escalante Lozada, departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Presidente de la Mesa Directiva Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

### **A los técnicos académicos del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas:**

Dra. Noemí Flores Mejía

Q. Luz María Martínez Mejía

M.C. Georgina Teresa Hernández Chávez

### **Al personal Administrativo del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas:**

Biol. Manuel Saucedo Ramírez

C.P. Rubí Margarita Robledo López

Aurelia González Guzmán

### **Al personal de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN**

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín, Jefe de la unidad.

M.C. Eugenio López Bustos

### **Al personal de la Unidad de Docencia y Formación de Recursos Humanos**

Lic. J. Antonio Bolaños Guillen

Gloria Villa Herrera



## ÍNDICE

RESUMEN.....	4	Productividades .....	25
INTRODUCCIÓN.....	5	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases.....	26
ANTECEDENTES .....	6	RESULTADOS .....	27
Fenilpropanoides .....	6	Comprobación del fondo genético..	27
Glicerol como fuente de carbono para la producción de pHCA. ....	8	Obtención y comprobación de las cepas <i>pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup></i> y <i>pheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup></i> ....	30
Metabolismo central de carbono en <i>Escherichia coli</i> .....	10	Caracterización cinética de las mutantes sencillas .....	32
Sistema PTS.....	10	Obtención y comprobación de la cepa <i>pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup></i> .....	36
Piruvato cinasas .....	11	Caracterización cinética y modelo a escala genómica.....	38
Vía de las Pentosas fosfato .....	12	Cinéticas de producción .....	41
Vía del Shikimato .....	13	Estrategia de cultivo para mejorar los parámetros cinéticos en la cepa doble mutante .....	46
Integración e ingeniería metabólica	14	Comparación de los resultados finales .....	50
Integración metabólica .....	14	Shikimato y 3-dehidroxishikimato .	54
Inactivación de genes en un solo paso, utilizando productos de PCR (Datsenko) .....	17	DISCUSIÓN.....	57
Estrategias para el control dinámico de la expresión .....	17	CONCLUSIONES.....	64
Control por fuente de carbono	17	PERSPECTIVAS .....	65
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18	RNAs Antisentido .....	66
HIPÓTESIS .....	18	BIBLIOGRAFÍA.....	71
OBJETIVOS.....	18	ANEXOS .....	75
Objetivo general .....	18	Condiciones de PCR.....	75
Objetivos específicos.....	18	Primers y tamaños esperados.....	77
METÓDICA .....	19	Mapas de plásmidos .....	79
Construcción de las cepas.....	19	Medios de cultivo .....	83
Inactivación de genes .....	19	Condiciones para cromatografía (HPLC y GC).....	84
Cepas productoras .....	20	Modelo a escala genómica.....	85
Caracterización de las cepas.....	21	Curvas de crecimiento en fuentes de carbono alternativas.....	92
Cultivos y cinéticas.....	21		
Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y biomasa.....	22		
Rendimientos .....	24		

## RESUMEN

La producción heteróloga de ácido cumárico (pHCA) en cepas de *Escherichia coli* no es algo nuevo, sin embargo, existe poca información acerca del uso del glicerol como fuente de carbono para la producción de este metabolito. En este trabajo se plantea el diseño de tres cepas distintas: *W3110 pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*, *W3110 pheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* y *W3110 pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*, las cuales pueden utilizar glicerol como fuente de carbono y producir pHCA con mejores parámetros cinéticos que la cepa WT.

Las cepas de este trabajo tienen disminuido el flujo de la reacción que convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato (Pir) y utilizan una fuente de carbono que no es transportada por el sistema PTS, estas estrategias resultan en un aumento de la disponibilidad del PEP, mismo que es precursor de la síntesis del pHCA.

Durante la realización del estudio se encontraron características fenotípicas inesperadas, ya que la cepa *W3110 pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* es capaz de crecer en una fuente de carbono no PTS, es decir, a pesar de no tener una fuente obvia de Pir. Se realizó un análisis *in silico*, para buscar explicación al fenómeno observado; encontrando dos posibles vías que explican el fenotipo observado, la desaminación de la serina y la desaminación del aspartato (misma que resulta en la síntesis de fumarato).

Después de la caracterización y estudio de las cepas obtenidas, se planearon y ejecutaron estrategias de cultivo para la mejora de los parámetros cinéticos de producción, incrementando de manera significativa los parámetros cinéticos, al compararlos con la cepa silvestre: título de 10.7 a 54.6 mg/l,  $Y_{p/s}$  de 4.86 a 15.37 mg pHCA/g glicerol,  $Q_{pHCA}$  de 0.45 a 2.28 mg pHCA/Lh.

Adicional a los objetivos originales, se diseñaron y sintetizaron genes sintéticos que codifican para RNAs Antisentido (asRNAs). Estas construcciones podrán ser utilizadas para generar cepas con el mismo fenotipo que las de este estudio, pero con un control dinámico de la expresión. Así mismo se probaron otras fuentes de carbono no PTS: xilosa, arabinosa y ribosa, encontrando que la cepa *W3110 pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* puede crecer en xilosa y arabinosa.

## INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos aromáticos son moléculas de gran interés para la biotecnología, ya que a partir de ellos se pueden sintetizar numerosos metabolitos secundarios de utilidad industrial; este estudio se enfocará en el ácido cumárico (también llamado ácido *p*-hidroxicinámico o pHCA).

Derivado de la importancia industrial de estos compuestos, se han diseñado varios microorganismos capaces de sintetizar ácido cumárico, utilizando diversos carbohidratos (glucosa principalmente) como fuente de carbono, sin embargo, existen pocos estudios usando glicerol como fuente única de carbono.

Para este estudio, se plantea la eliminación de los genes *pykA*, *pykF* y *pheA*, además de la sobreexpresión de genes esenciales para la producción de aminoácidos aromáticos (vía de las pentosas fosfato y vía del shikimato), acompañado de la expresión heteróloga de la enzima responsable de la síntesis del pHCA (enzima proveniente del hongo *R. glutinis*). Esto para mejorar la producción (utilizando glicerol como única fuente de carbono) de pHCA en *Escherichia coli* sin comprometer la tasa de crecimiento.

Se sabe que el glicerol es una fuente de deshecho de industrias como el biodiesel y el jabón, por lo tanto, aprovechar este compuesto y darle una aplicación industrial supone un efecto benéfico para el medio ambiente.

## ANTECEDENTES

### Fenilpropanoides

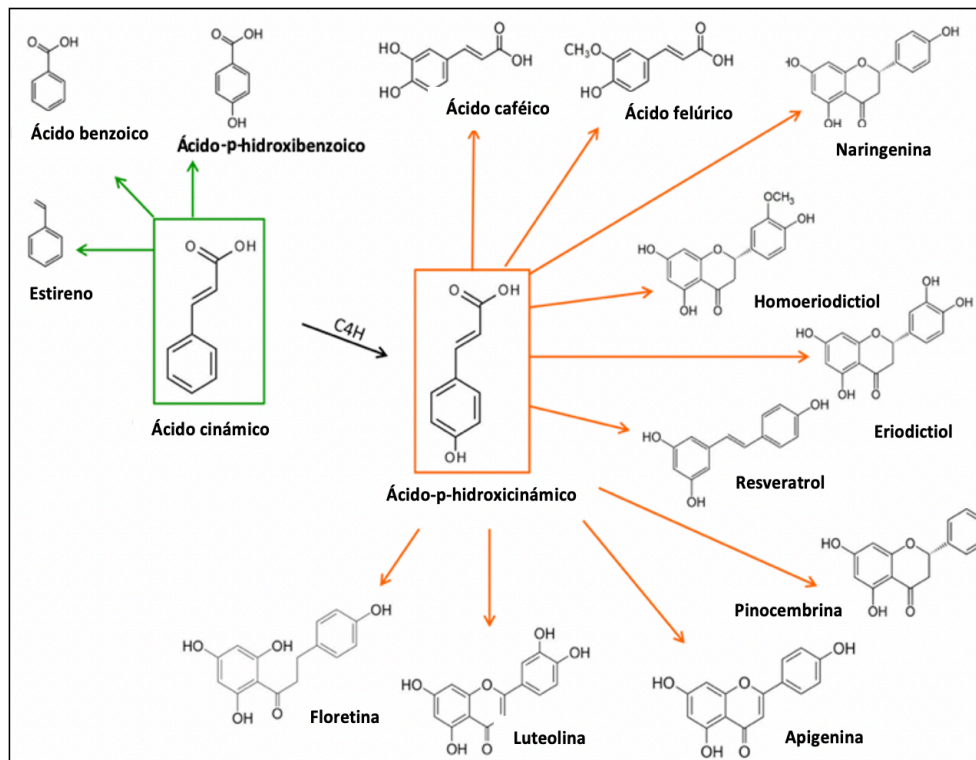
Los fenilpropanoides son un grupo de moléculas muy diversas, comparten la característica de ser derivados de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina (F) y L-tirosina (Y); estos metabolitos secundarios son sintetizados a partir de la vía del shikimato, y al igual que muchos de los intermediarios de esta vía, se caracterizan por tener una gran variedad de actividades biológicas; posiblemente el ejemplo más conocido es la síntesis de oseltamivir (Escalante, Calderón, Valdivia, Anda, et al. 2010) (inhibidor de la neuraminidasa de los virus de la familia *Orthomyxoviridae*) a partir del ácido shikímico. No obstante, existen muchas más moléculas de importancia farmacéutica e industrial (flavonoides, cumarinas, ácido salicílico, etc. )(Vogt 2010).

Todas estas moléculas son producidas de manera natural en plantas y algunos hongos, sin embargo, la extracción y purificación de los compuestos de interés es compleja, costosa, contaminante y generalmente con rendimientos bajos (Vargas-Tah and Gosset 2015), esto debido a las bajas concentraciones de los metabolitos y a la dificultad de su purificación por la similitud entre ellos.

Otra opción es la síntesis orgánica, no obstante, los rendimientos siguen siendo bajos y este método implica el uso de solventes orgánicos los cuales son sumamente contaminantes; ante esta problemática, se han propuesto soluciones biotecnológicas las cuales utilizan microorganismos recombinantes, mismos que producen los compuestos de interés (Pontrelli et al. 2018).

Dentro de los fenilpropanoides destaca el ácido cumárico (también conocido como p-hidroxicinámico o pHCA), cuyos derivados son de gran interés para la industria farmacéutica, cosmética y de termoplásticos (ver figura 1).





**FIGURA 1** Ejemplo de algunas moléculas derivadas del CA y pHCA: Derivados de CA y pHCA de interés industrial. Para el ácido cafeico en particular, solo se requiere de la adición de un grupo oxhidrilo en la posición *meta* del anillo aromático (Vargas-Tah and Gosset 2015).

La revisión de la literatura muestra que se han diseñado diversos microorganismos mutantes capaces de producir fenilpropanoides (Lee et al., 2017; Vargas-Tah et al., 2015; Weiner, et al., 2014); los resultados incluyen rendimientos variables, numerosas especies productoras y diversas fuentes de carbono. Sin embargo, la información existente relacionada con la producción de este metabolito, utilizando glicerol como fuente de carbono única, sigue siendo menor que la existente en glucosa.

Uno de los problemas más grandes que tiene la humanidad actualmente es el cambio climático, y la contaminación medioambiental, es por esto que una de las responsabilidades de la biotecnología es buscar alternativas y diseñar procesos que minimicen el daño, que remedien el deterioro y que reutilicen desechos (Aerni et al. , 2016).

## **Glicerol como fuente de carbono para la producción de pHCA.**

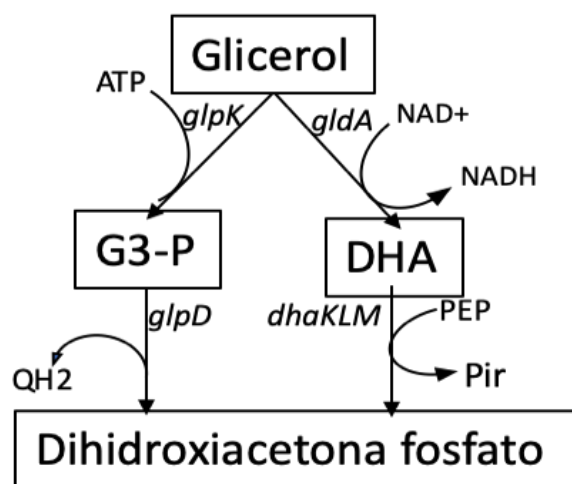
El glicerol es un producto de deshecho de la elaboración de biodiesel, así como de la industria productora de jabón, entre otros. La fabricación de este combustible ha ido en aumento en años recientes (Chuah et al. 2017) y por ende la cantidad de glicerol disponible ha aumentado, disminuyendo también su precio.

El uso del glicerol como fuente de carbono supone tres principales ventajas sobre las fuentes de carbono tradicionales (carbohidratos): primero, el glicerol tiene un costo aproximado de 0.13-0.24 USD por Kg (Nicol et al. 2012) comparado con los más de 0.80 USD por Kg de D-Glucosa; segundo, utilizar un producto de desecho como fuente de carbono implica un impacto positivo en el medio ambiente. Por último, el utilizar glicerol se traduce en un aumento en la disponibilidad intracelular de fosfoenolpiruvato (PEP), que como veremos más adelante, es un precursor indispensable para la producción de pHCA.

*E. coli* puede utilizar glicerol como única fuente de carbono (Aslan, Noor, and Bar-Even 2017). Este metabolito puede ingresar a la célula por transporte pasivo, ya sea por difusión simple o por difusión facilitada (permeasas). Una vez internalizado puede seguir dos vías distintas (ver figura 2) que convergen en el intermediario dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Estas dos vías se activan en condiciones opuestas de oxigenación (Zhu and Tang 2017).

En la primera ruta (condiciones aerobias) el glicerol intracelular es fosforilado por la enzima GlpK (glicerol cinasa), consumiendo un ATP y produciendo glicerol-3-P. Esta molécula es oxidada, por la enzima GlpD (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa subunidad D), a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). En este paso se genera una molécula de ubiquinol (ubiquinona +2e<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> → ubiquinol), misma que compensa el gasto de ATP del paso inicial (en la cadena de transporte de electrones). Debido a las condiciones de cultivo de este trabajo (aerobiosis), esta es la vía que *E. coli*, utilizará para crecimiento y producción.

Adicionalmente, existe una segunda vía, que se activa en condiciones de anaerobiosis. En esta ruta, el glicerol intracelular es reducido por la enzima GldA (glicerol deshidrogenasa) a dehidroxiacetona (produciendo  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ). Posteriormente, esta molécula es fosforilada por la enzima DhaKLM (dihidroxiacetona cinasa, subunidades K,L y M), consumiendo una molécula de PEP y produciendo Piruvato (Pir) y DHAP. Debido a que el PEP es esencial para la síntesis de pHCA esta vía es desfavorable, no obstante, esta ruta solo es activa en condiciones anaeróbicas, por lo que no supone una desventaja para el proyecto.



**FIGURA 2** Metabolismo del glicerol en *Escherichia coli*: en esta figura se muestran las dos vías por las cuales *E. coli* puede metabolizar el glicerol (dependiendo de las condiciones de aeración) (modificado de M. Blankschien-2010).

Las vías metabólicas que están implicadas directa o indirectamente en la síntesis de los fenilpropanoides involucran rutas del metabolismo central del carbono, como la vía de Embden-Mayerhoff-Parnas (EMP), la vía de las pentosas fosfato (PPP), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), además de la vía del shikimato.

La interacción y la regulación de las vías involucradas es compleja y está lejos de ser obvia. Investigaciones previas han ayudado a elucidar cuáles enzimas pueden ser modificadas (y de qué forma) para generar cepas sobreproductoras de fenilpropanoides y aminoácidos aromáticos, no obstante, sigue siendo limitada la información relacionada con algunas enzimas y algunas fuentes de carbono, (Meza et al., 2012; Olvera et al., 2009).

## **Metabolismo central de carbono en *Escherichia coli***

La vía de Embden-Mayerhoff-Parnas, también conocida como vía de la glicólisis, es la vía inicial en el metabolismo oxidativo de la glucosa. En esta ruta metabólica, la glucosa es fosforilada dos veces (consumiendo ATP) y oxidada (consumiendo  $\text{NAD}^+$ ) hasta transformarse en piruvato, el cual es el paso final de la vía y el inicio del Ciclo de Krebs.

Cuando se utilizan fuentes de carbono gluconeogénicas, como el glicerol, la célula requiere de la vía de la gluconeogénesis, la cual tiene como finalidad la síntesis de glucosa a partir de precursores distintos a los carbohidratos. Es importante recordar que, a pesar de compartir la mayoría de las reacciones con la vía EMP. La gluconeogénesis no es simplemente la vía opuesta a la glicólisis. A pesar de compartir siete de las diez reacciones, al inicio de la gluconeogénesis se requiere de la síntesis de oxalacetato a partir de Pir, a partir del oxalacetato se sintetiza PEP; al final de la vía se requieren fosfatasas que permitan eliminar el grupo fosfato de las moléculas: fructosa-1-6-bifosfato y glucosa-6-fosfato.

### *Sistema PTS*

Se sabe que el principal transportador de glucosa en *E. coli* es el sistema de fosfotransferasas (PTS) (Meza et al, 2012). Este sistema consume la mitad del PEP (proveniente de la vía EMP), asimismo es la principal fuente de Pir de la célula (Ponce et al. 1995). No obstante, existen otras dos enzimas que pueden producir Pir a partir de PEP (PykA y PykF); esto quiere decir que hay una redundancia en este, el paso final de la vía EMP.

La enzima I (E1) del sistema PTS, la cual es la responsable de la reacción terminal del sistema y encargada de la conversión de PEP a Pir ha demostrado que tiene un flujo inverso (Pir a PEP) responsable hasta de un 65% del PEP tanto en condiciones gluconeogénicas como glicolíticas (Long et al. 2017).

A demás de ser responsable del transporte de glucosa y otros carbohidratos (como manitol, manosa, fructosa) el sistema PTS también es responsable del consumo preferente de fuentes de carbono (represión catabólica). Este mecanismo requiere que la enzima IIA active a la adenilato ciclasa, formando AMP cíclico (cAMP). Finalmente, el cAMP activa al factor transcripcional CRP, regulando la transcripción de los genes requeridos para el transporte de carbohidratos.

### *Piruvato cinasas*

En *E. coli*, existen dos enzimas (que son parte de la vía EMP) que transforman el PEP en Pir (ver figura 3), PykA y PykF, (codificadas por los genes con el mismo nombre). Esta reacción es un paso limitante tanto para la vía de EMP como en la síntesis de aminoácidos aromáticos, ya que el PEP es precursor de la síntesis de aminoácidos aromáticos. El PEP, en conjunto con la eritrosa-4-fosfato (E4P) son el sustrato de la enzima fosfo-2-dehidro-3-deoxyheptonato aldolasa (DAHPS), iniciando la vía del shikimato (esta vía se describe con mayor detalle más adelante).

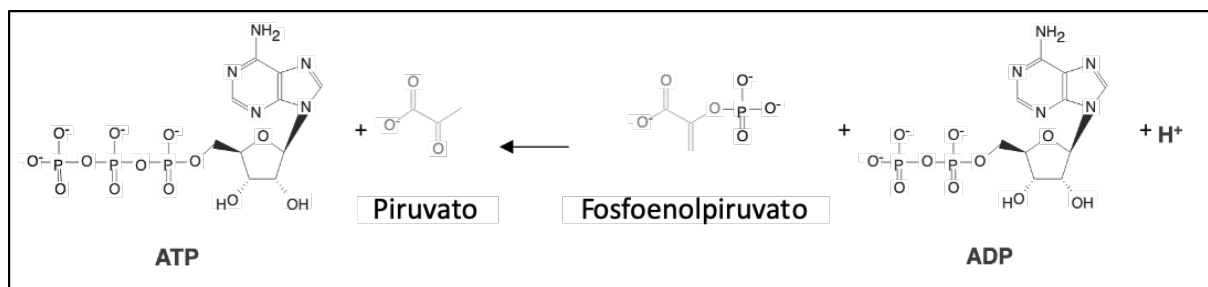
Las piruvato cinasas tienen distintos reguladores alostéricos:

- PykF: fructosa 1.6-bifosfato (positivo) ATP, GTP, succinil-CoA (negativos).
- PykA: AMP y carbohidratos de la vía PPP como: ribosa 5-fosfato, xilulosa 5-fosfato, gluconato 6-fosfato (positivos), succinil-CoA (negativo).

Ambos genes se encuentran bajo el control del regulador transcripcional global *Cra* (*FruR*) (Ramseier et al. 1995). Adicionalmente, estas enzimas tienen efectos regulatorios: se sabe que el PEP tiene control sobre varias enzimas del metabolismo central de carbono, regulando negativamente la actividad de las enzimas: glucoquinasa (Glk), glucosa-6-P-isomerasa (Gpi), fosfofructoquinasa (Pfk), todas estas involucradas en los primeros pasos de la glicólisis. Así mismo, regulan positivamente a las enzimas: fosfato acetiltransferasa (Pta), la cual cataliza la reacción:  $\text{acetil-CoA} + \text{Pi} \rightarrow \text{CoA} + \text{acetil-P}$ .

El PEP y el Pir son moléculas fundamentales para el crecimiento y el metabolismo celular, por lo que es posible que la alteración en la disponibilidad y proporción de estos metabolitos tenga efectos pleiotrópicos.

El gen *pykA* se encuentra en el *locus* [1,939,363 → 1,940,805] (41.74 centisoms, 150°), y tiene un tamaño de 1443pb (480 aa) (Ecocyc 2018); mientras que el gen *pykF* se encuentra en el *locus* [1,757,412 → 1,758,824] (37.82 centisomes, 136°) y tiene un tamaño de 1413pb (470aa) (Ecocyc 2019). Esto quiere decir que ente ambos genes existe una separación de aproximadamente 180Kpb.



**FIGURA 3, Reacción catalizada por las piruvato cinasas:** En esta figura se muestra la reacción de desfosforilación del PEP, para formar Pir y ATP, en *E. coli*, esta reacción puede ser catalizada por cualquiera de las dos isoenzimas (PykA o PykF). Esta reacción está termodinámicamente favorecida ( $\Delta G^{\circ} = -7.5$  kcal/mol).

### Vía de las Pentosas fosfato

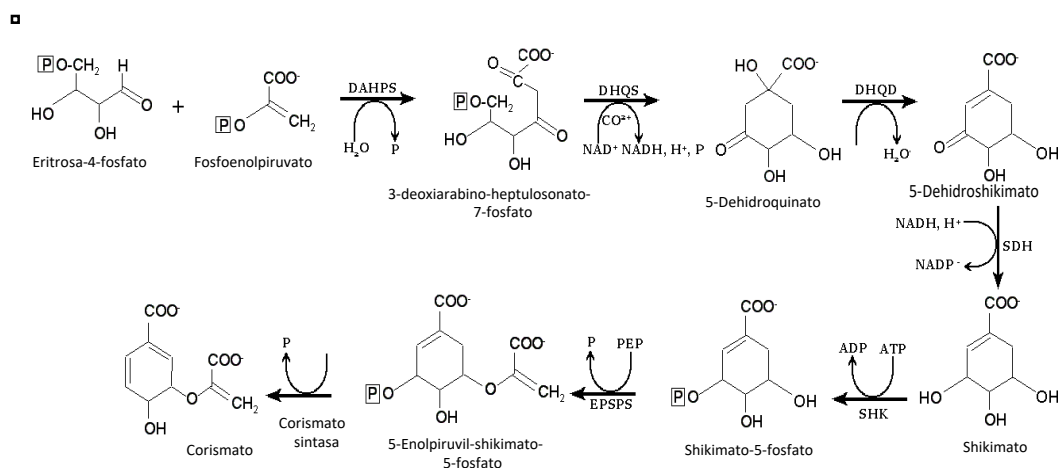
La ruta de las pentosas-fosfato, es una vía paralela a la EMP, y tiene la función de generar NADPH, así como pentosas de utilidad para el crecimiento celular, como la ribosa-5-fosfato, necesaria para la síntesis de nucleótidos. Esta vía se divide en dos fases, la oxidativa (la cual reduce el  $\text{NADP}^+$  a NADPH) y la no oxidativa, la cual produce pentosas utilizadas en la generación de biomasa. Para dar inicio a la vía, se requiere de glucosa-6-fosfato, con este metabolito comienza la fase oxidativa. Uno de los intermediarios de la fase no oxidativa es la eritrosa-4-fosfato, que es precursor de la vía de del shikimato.

En el catabolismo aerobio, uno de los procesos esenciales para el crecimiento celular es el Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA). En esta ruta se genera la mayor parte del poder reductor (NADH) necesario para la síntesis de ATP en la cadena de transporte

de electrones y fosforilación oxidativa. Esto implica que, en condiciones aerobias, estos procesos son la fuente principal de energía para la célula (ATP) y por ende, cualquier alteración que disminuya el flujo de carbono hacia estas vías, tendrá un impacto negativo en el crecimiento celular.

### Vía del Shikimato

La vía del shikimato tiene la finalidad de sintetizar aminoácidos aromáticos L-tirosina (L-Tyr), L-fenilalanina (L-Phe) y L-triptofano (L-Trp). La vía comienza con la condensación de la eritrosa-4-fosfato (E4P), proveniente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato (PEP), cuyo origen principal es la vía EMP. Esta reacción está catalizada por las isoenzimas DAHP sintetasa (codificada por los genes *aroG*, *aroH* y *aroF*, siendo *aroG* la enzima principal) y da como producto el 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) (ver figura 4). Este producto se somete a siete reacciones enzimáticas posteriores que finalizan con la síntesis del corismato (CHO). Esta molécula es el precursor común a partir del cual se sintetizan los tres aminoácidos aromáticos (Y, F y W).

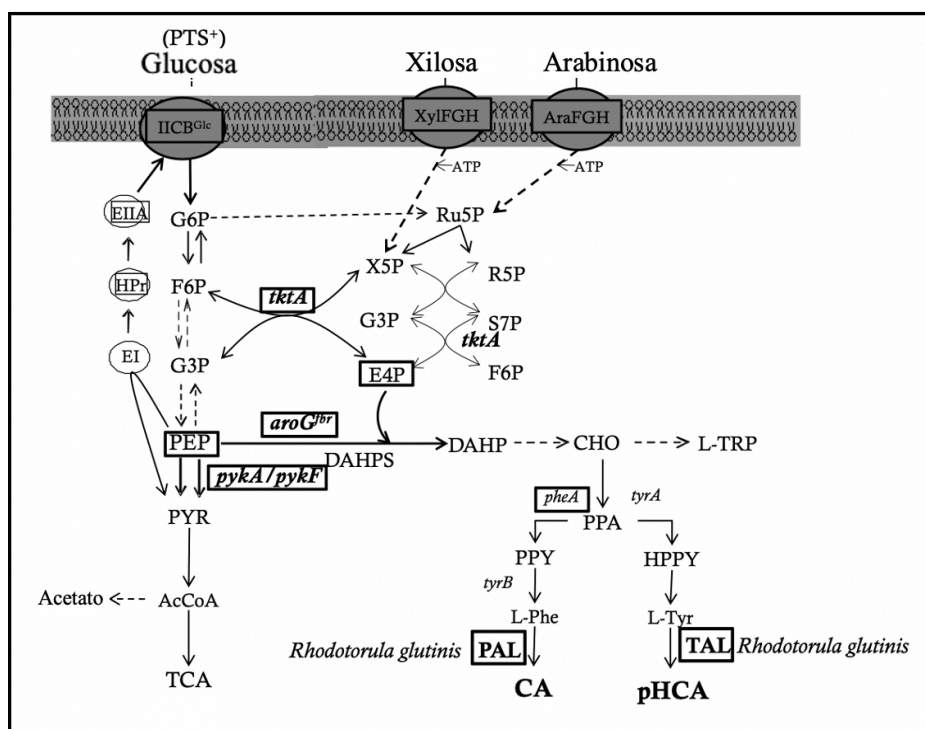


**FIGURA 4, Vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos o vía del Shikimato:** esta figura ilustra los siete pasos (a partir de la condensación de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato) que dan como resultado al precursor común de los tres aminoácidos aromáticos, el corismato.

## Integración e ingeniería metabólica

### Integración metabólica

Para la síntesis de L-Tyr y L-Phe se requiere de la actividad de los genes *tyrA*, *tyrB* y *pheA* (ver figura 5). Posteriormente estos aminoácidos pueden ser transformados en pHCA y cinámico (CA) (respectivamente) en una reacción catalizada por el grupo de enzimas denominado PAL/TAL (Fenilalanina Amonio Liasa/Tirosina Amonio Liasa). Para estas enzimas es importante señalar que debido a la similitud estructural entre la L-Phe y la L-Tyr, las enzimas son altamente promiscuas, es decir, no es posible separar las actividades de PAL y TAL (Vargas-Tah et al. 2015).



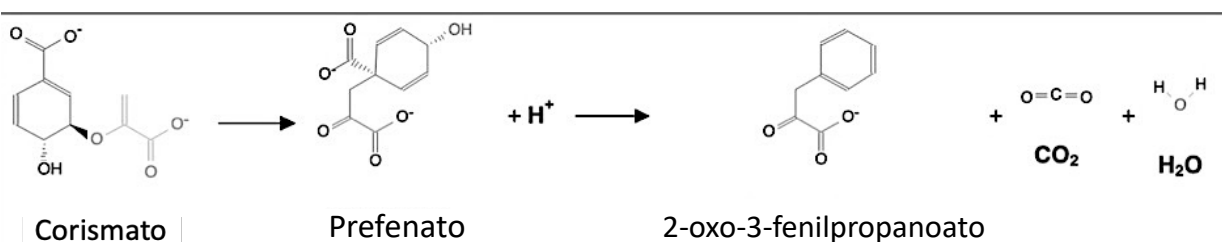
**FIGURA 5, Integración metabólica y transporte de carbohidratos implicados en la síntesis de CA y pHCA:** En esta figura se resumen las vías de las pentosas fosfato y glicólisis, mismas que son esenciales para la producción de PEP y E4P. Al producirse ambos metabolitos la enzima DAHPS (gen *aroG*) da inicio a la vía del shikimato que concluye con la síntesis del CHO, mismo que es transformado en pefenato (PPA). Este es el sitio en el cual se bifurca la vía pudiendo formar L-Phe o L-Tyr.



Debido a la actividad PAL/TAL, se sabe que no se puede tener una cepa que solamente produzca, pHCA o CA, siempre hay una mezcla de los dos metabolitos.

Al final de la vía del shikimato (CHO), la enzima PheA, codificada por el gen con el mismo nombre, cataliza dos reacciones simultaneas (figura 6), mismas que comprometen el flujo de carbono hacia la síntesis de L-Phe (el análogo *tyrR* compromete la vía hacia L-Tyr). Al eliminar *pheA*, el flujo se redireccióna hacia la síntesis de L-Tyr, es por esto que la eliminación de este gen es suficiente para incrementar la producción de pHCA en más de 8 veces (Vargas-Tah and Gosset 2015).

Diferentes organismos poseen diversas variedades de la enzima PAL (diferentes parámetros cinéticos). Se decidió utilizar la enzima proveniente del hongo *Rodotorula glutinis* porque se sabe que tiene preferencia por L-Tir ( $K_m=560\mu\text{M}$ ) en vez de L-Phe ( $K_m=1340\mu\text{M}$ ) (Vargas-Tah and Gosset 2015).

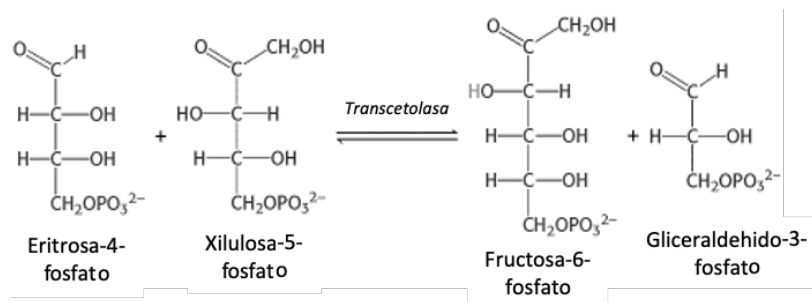


**FIGURA 6, Reacciones catalizadas por la enzima PheA:** En esta figura se esquematizan las dos reacciones consecutivas catalizadas por la enzima pheA (prefenato deshidratasa y corismato mutasa).

La cepa W3110 con la expresión heteróloga de PAL/TAL proveniente de *R. glutinis*, es capaz de producir en glucosa, 7.0 mg/L de pHCA (a las 24hr) (Vannelli et al. 2007). Al eliminar el gen *pheA*, esta cepa produjo 58.4 mg/L (a las 18hr, y con una DO de 1) en una mezcla de carbohidratos (Vargas-Tah et al. 2015)

Como se menciona anteriormente el glicerol es una molécula que es transportada por *E. coli* sin consumir energía, esto implica que su utilización como fuente de carbono única, es equivalente (al menos metabólicamente) a tener una cepa PTS<sup>-</sup>. Como se menciona anteriormente, el sistema PTS, en glucosa, consume la mitad del PEP generado por la vía EMP; el utilizar una fuente de carbono que no sea transportada por este sistema supone un aumento importante en la disponibilidad del PEP. Adicionalmente, se espera que la eliminación de *pykA* o *pykF* aumente aún mas la disponibilidad del PEP, necesario para iniciar la vía del shikimato.

Otra estrategia utilizada para mejorar la producción del pHCA, es la sobreexpresión de la transcetolasa (TktA). Esta enzima cataliza la reacción que sintetiza eritrosa-4-fosfato y xilulosa-5-fosfato, a partir de gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato (ver figura 7), que como se menciona anteriormente, la E4P es un precursor de la vía de aminoácidos aromáticos.



**FIGURA 7, Reacción catalizada por la enzima transcetolasa:** En esta figura se muestra la síntesis de la eritrosa-4-fosfato, catalizada por la enzima transcetolasa (gen *tktA*), reacción parte de la fase no oxidativa de la vía de las pentosas fosfato.

Adicional al método involucrando la sobreexpresión de la enzima *tktA*, otra estrategia común para mejorar la producción de fenilpropanoides y derivados de la vía del shikimato es la sobreexpresión de *aroG*, en particular, existe una versión de esta enzima, la cual fue modificada para no ser inhibida por su producto (*aroG<sup>fbr</sup>*). Con estas dos estrategias (sobreexpresión de la enzima TktA y *aroG<sup>fbr</sup>*) se ha logrado incrementar el título final de producción en casi 10 veces (de 42.4µM a 356µM).

El pHCA, es un metabolito tóxico para *E. coli*, y se sabe que a una concentración de 10 mM (1.64 g/L) la tasa de crecimiento se reduce en un 10% (Vargas-Tah et al. 2015).

### *Inactivación de genes en un solo paso, utilizando productos de PCR (Datsenko)*

Uno de los métodos más utilizados, en la ingeniería genética de *E. coli*, para la inactivación cromosomal de genes es el método de inactivación por recombinación de productos de PCR utilizando el sistema lambda Red, mejor conocido como método de Datsenko (Datsenko and Wanner 2000) este procedimiento permite cambiar un gen (que se quiera inactivar), por un marcador de selección (en este caso un casete de resistencia a algún antibiótico). Para la recombinación es necesario que la cepa contenga un plásmido (pKD46) con las recombinasas del fago Lambda, además de otras proteínas reguladoras (Exo, Beta y Gam).

El sistema de Datsenko ha demostrado ser un método eficaz y relativamente sencillo, es por esto que es una de las estrategias más comunes para la inactivación de genes en *E. coli* (Pontrelli et al. 2018).

### *Estrategias para el control dinámico de la expresión*

#### Control por fuente de carbono

El glicerol, al ser una fuente de carbono que no es transportada por el sistema PTS, tiene la característica de generar Pir a partir de la reacción catalizada por las enzimas PykA y PykF. Una cepa de *e. coli* doble mutante en los genes *pykA* y *pykF* no tiene una fuente de Pir (Weiner et al. 2014). Sin embargo, se esperaría que la producción específica aumente de manera considerable (por el aumento en la disponibilidad de PEP). Esto implica que se puede diseñar un proceso en el cual se utilice glucosa (en concentraciones bajas), permitiendo así el crecimiento de la doble mutante y, una vez consumida la glucosa, el glicerol será utilizado para producción del metabolito de interés. Al generar biomasa con la glucosa y dirigir la mayoría del PEP, generado a partir del glicerol, hacia producción de pHCA; se esperaría que el título volumétrico aumente, manteniendo los valores de los rendimientos.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las eliminaciones de los genes *pykA* o *pykF* podrán modificar el flujo de carbono permitiendo que aumente la disponibilidad de PEP, que en conjunto con la E4P mejorará la tasa de producción de DAHP y por consecuencia la producción del metabolito pHCA, esto sin afectar de manera importante las vías esenciales para el crecimiento de la cepa?

## HIPÓTESIS

La eliminación de los genes *pykA* y *pykF* aumentará la disponibilidad de PEP que posteriormente será transformado en pHCA. Asimismo, la modificación de puntos específicos de las vías metabólicas involucradas y las estrategias de control dinámico permitirán tener cepas que muestren altas tasas volumétricas y específicas de producción.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Diseñar cepas de *Escherichia coli*, eliminando los genes de las enzimas PykA o PykF, para obtener información de cómo estos genes modifican el flujo de carbono de la cepa, así como su relación con la producción del metabolito pHCA, empleando una fuente de carbono ecológicamente responsable (glicerol).

### Objetivos específicos

- Eliminar los genes *pykA* y *pykF* en *E. coli* W3110 con la finalidad de redireccionar el flujo de carbono hacia la síntesis de aminoácidos.
- Transformar las cepas mutantes con los plásmidos de producción (pJLBaroGtktA,pTrcPALRg).
- Caracterizar las cepas W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykA*<sup>-</sup> pJLBaroGtktA,pTrcPALRg, la cepa W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup> pJLBaroGtktA,pTrcPALRg y la cepa W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup> pJLBaroGtktA,pTrcPALRg mediante la medición de parámetros cinéticos de producción (tasa de crecimiento, título, rendimientos y productividades).
- Diseñar e implementar estrategias de control dinámico que permitan mejorar los parámetros cinéticos.

## METÓDICA

### Construcción de las cepas

Para el diseño experimental, se tomó como molde la cepa de *Escherichia coli* W3110, esta cepa es derivada de K-12 (ATCC 27325) y tiene las siguientes características:

- F<sup>-</sup> (no porta plásmido F).
- λ<sup>-</sup> (resistente a fago lambda).
- INV(rrnD-rrnE)1 (inversión cromosomal de los genes ribosomales, solo afecta el crecimiento bajo condiciones de cultivo que requieren transiciones repetidas de fase estacionaria a crecimiento rápido).
- Mutación en rph-1 (niveles sub óptimos de pirimidinas en medio mínimo, lo cual disminuye la tasa de crecimiento, al compararlas con otras derivadas de la K-12 (Bachmann 1972; Hill and Harnish 1981).

### Inactivación de genes

A esta cepa se le eliminó el gen *pheA* utilizando el método de recombinasas Lambda Red (trabajo de Vargas-Tah). Partiendo de esta cepa se utilizó nuevamente el método de Lambda Red para construir las cepas *pykA*<sup>+</sup>/*pykF*<sup>-</sup>, *pykA*<sup>-</sup>/*pykF*<sup>+</sup> y *pykA*<sup>-</sup>/*pykF*<sup>-</sup> utilizando como templado los plásmidos pKD3 (con resistencia a cloranfenicol) y pKD4 (resistencia a kanamicina) resultando en las cepas:

- W3110 *pheA*::*FRT*, *pykA*::*Cm*
- W3110 *pheA*::*FRT*, *pykF*::*Cm*
- W3110 *pheA*::*FRT*, *pykF*::*Cm*, *pykA*::*Km*

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron con polimerasa “Taq” de la marca Thermo-Fisher con las condiciones descritas en el anexo. Las electroforesis se realizaron con geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y utilizando el marcador “Gene Ruler 1kb DNA Ladder” de la marca Thermo-Fisher.

Este método se basa en la recombinación homóloga; para llevarse a cabo se requieren de 4 pasos (Datsenko and Wanner 2000)

1. Diseño de primers: sección de homología al gen que se planea inactivar (50 nt) y homología al plásmido que se utilizará como templado (20 nt).
2. Amplificación por PCR del gen de resistencia a algún antibiótico flanqueado por sitios de homología al gen que se planea inactivar y por sitios *FRT*.
3. Purificación del producto de PCR.
4. Transformación de las cepas utilizando el DNA del paso 3 (en cepas transformadas previamente con el plásmido pKD46).
5. Eliminación del pKD46 (incubación a 37°C).

### *Cepas productoras*

Para la generación de las mutantes sobreproductoras se utilizarán los plásmidos:

- pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tkta*: plásmido derivado del pACYC184, gen *aroG*<sup>fbr</sup> (resistente a la inhibición por producto) con el promotor *lacUV5*, gen *tktA*, Ori *p15A* (18-22 copias) y resistencia a tetraciclina.
- pTrcPALRg: gen de la enzima PAL de *Rhodotorula glutinis*, clonado en pTrc99A, Ori *colE1* (15-20 copias), con resistencia a carbenicilina.

Los mapas de los plásmidos se encuentran en el anexo

Estos plásmidos se incorporaron a la célula empleando la técnica de transformación por electroporación (2500V), resultando en las cepas:

- W3110 /pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tkta*, pTrcPALRg
- W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykA*<sup>-</sup>/pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tkta*, pTrcPALRg
- W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup>/pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tkta*, pTrcPALRg
- W3110 *pheA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup>, *pykA*<sup>-</sup>/pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tkta*, pTrcPALRg

## Caracterización de las cepas

### *Cultivos y cinéticas*

Los cultivos se realizaron en tres etapas:

1. **Pre-inóculo:** se inocula (a partir de los crioviales a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) 4 ml de medio caldo de lisogenia (LB) + el antibiótico correspondiente, en tubos de ensaye de 16 x 150 mm y se cultivan  $\sim 12$  h a  $37^{\circ}\text{C}$  y 300 RPM.
2. **Inóculo:** del pre-inóculo se toma una alícuota con la que se inoculan 25 ml de medio, en matraces bafleados de 250 mL; la concentración final (en el matraz) deberá de ser de  $\sim 0.1$  OD<sub>600</sub>, se cultivaron en las mismas condiciones que el paso 1.
3. **Cultivo:** midiendo la OD<sub>600</sub> final del paso 2, se calcula la alícuota requerida para iniciar el cultivo a 0.1 OD<sub>600</sub>, y fueron cultivados en las mismas condiciones que el paso 1.

La medición de la densidad óptica se realizó tomando una alícuota del cultivo a los siguientes tiempos: 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 y 24h. Estas muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro con una  $\lambda=600\text{nm}$ .

Para el análisis por HPLC, se tomaron muestras de 1mL a los siguientes tiempos: 0,2,4,6,8,10,12 y 24h las muestras fueron centrifugadas, descartando el pellet y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La inducción de los plásmidos se realizó a las 2 horas del cultivo con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.1mM.

Los medios de cultivo para el paso 3, son medio mineral M9 suplementado con L-Phe (concentración final= 0.3mM) y 10 g/L de glicerol (para las cepas WT, *pykA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup> y doble mutante en *pyk*), para la cepa *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>. Se agregó, en un experimento distinto, glucosa a una concentración final de 2g/L (adicionales a los 10 g/L de glicerol).

### *Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y biomasa*

Para medir el crecimiento de los cultivos se utilizó un método de conteo de totales espectrofotométrico (con fundamento en la ley de Lambert-Beer). En esta técnica se toma una muestra del cultivo a tiempos determinados, y se mide la absorbancia a 600nm ( $OD_{600}$ ). Con los datos obtenidos se grafica la  $OD_{600}$  en función del tiempo, obteniendo una curva de crecimiento. En las curvas de crecimiento se observan, típicamente, tres comportamientos:

- **Fase lag:** fase de adaptación al medio, crecimiento mínimo o nulo (velocidad  $\approx 0$ ).
- **Fase exponencial:** fase de duplicación celular, en esta etapa la velocidad de crecimiento es constante (cinética de 1<sup>er</sup> orden).
- **Fase estacionaria:** fase de equilibrio entre la velocidad de crecimiento y la de muerte, por esto la velocidad de crecimiento aparente es cero.

Para realizar la caracterización de las cepas uno de los parámetros esenciales es la constante de crecimiento ( $\mu$ ); para su cálculo se necesita realizar una medición de la  $OD_{600}$  conociendo con exactitud el tiempo de muestreo.

Durante la fase exponencial la velocidad de crecimiento es constante, esto quiere decir que sigue una cinética de 1er orden, es decir puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$\ln[A] = \ln[A]_o + k\Delta t$$

En donde:

- $[A] = OD_{600}$
- $k = \mu$



Al despejar  $\mu$  queda que:

$$\mu = \ln \left( \frac{OD_{6002}}{OD_{6001}} \right) \frac{1}{\Delta t}$$

Para conocer la biomasa (en g de células/L) a partir de la  $OD_{600}$ , se parte del hecho de que para *E. coli*:

$$1 OD_{600} = 8 \times 10^8 \text{ células/mL}$$

Además de esto se sabe que una DO equivale a 0.37 g/L de peso seco para la cepa W3110 (Soini, Ukkonen, and Neubauer 2008):

$$1 OD_{600} = 0.37 \text{ g/L}$$

Con esta equivalencia se puede calcular, fácilmente, la biomasa (en g/L) y el número de células a cualquier valor de densidad óptica.

## *Rendimientos*

Los rendimientos son parámetros cinéticos que permiten normalizar los títulos de producción a una cantidad de biomasa específica o visualizar la relación de cuánto sustrato es convertido en producto. Para calcularlos es necesario conocer (durante la misma fase de cultivo) el título del producto, la biomasa y el consumo de la fuente de carbono de producción.

Para este trabajo se calcularon dos tipos de rendimiento(Y):

- Y producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ )
- Y producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ )

Para el Y producto/sustrato, es necesario conocer el consumo total de la fuente de carbono de producción (glicerol), la concentración del pHCA y hacer la relación entre los dos valores.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta[pHCA]}{\Delta[glicerol]}$$

El Y producto/biomasa, es la normalización del título de pHCA con la biomasa (ya sea en número de células/L o en g/L).

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta[pHCA]}{\Delta biomasa(g/L)}$$

## Productividades

Las productividades (“Q” si es volumétrica, “q” si es específica), son el resultado de dividir los títulos y los rendimientos, respectivamente, entre una unidad de tiempo.

Se calcularon las siguientes productividades:

- $Q_{pHCA}$ : productividad volumétrica del pHCA, es el cambio de la concentración con respecto al tiempo.

$$Q_{pHCA} = \frac{\Delta[pHCA]}{\Delta t}$$

- $q_{p/s}$ : productividad producto/sustrato: es la relación de producto y sustrato por unidad de tiempo.

$$q_{p/s} = \frac{\Delta[pHCA]}{\Delta[glicerol]\Delta t}$$

- $q_{p/x}$ : productividad producto/biomasa: es la cantidad de pHCA producido por unidad de tiempo y una cantidad conocida de células (puede ser expresado en número de células o en g/L).

$$q_{p/x} = \frac{\Delta[pHCA]}{\Delta[biomasa]\Delta t}$$

### *Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases*

Para estas mediciones se utilizó el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Este método se basa en las interacciones de las moléculas de la muestra con la fase estacionaria de la columna cromatográfica y con la fase móvil.

Para la cuantificación de glucosa y ácido acético se utilizó una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (poliestireno divinilbenceno) utilizando una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM) y acetonitrilo.

Para la cuantificación de glicerol, se utilizó un cromatógrafo de gases (especificaciones detalladas en el anexo).

Para la cuantificación de pHCA se utilizó un equipo de HPLC con una columna de fase reversa (C18) y un gradiente de ácido trifluoroacético (TFA) en metanol y de TFA en agua. La información de los equipos de HPLC y las condiciones de presión, temperatura y las concentraciones de las fases móviles se describen a detalle en el anexo.

## RESULTADOS

### Comprobación del fondo genético

Con la finalidad de poder realizar eliminaciones cromosomales subsecuentes, el proyecto inició eliminando el casete de resistencia de la cepa W3110 *pheA::Km* (tomada de los trabajos de la Dra. Alejandra Vargas Tah) utilizando el método de flipasas *FRT/FLP*, con el plásmido pCP-20 (Cb<sup>R</sup>).

El plásmido PCP-20 es termo sensible, esto quiere decir que se puede eliminar a 37°. Este proceso dio como resultado la cepa W3110 *pheA::FRT*. Esta eliminación se comprobó fenotípicamente, observando que la cepa no crecía en LB+Km, ni en LB+Cb y genotípicamente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando primers que alinean por fuera del gen *pheA* (secuencia y características descritas en el anexo), esperando tamaños de 2042 pb para las cepas que sean *pheA*, 2357 pb para las cepas que sean *pheA::Km* y por último 957 pb para las cepas que sean *pheA::FRT*.

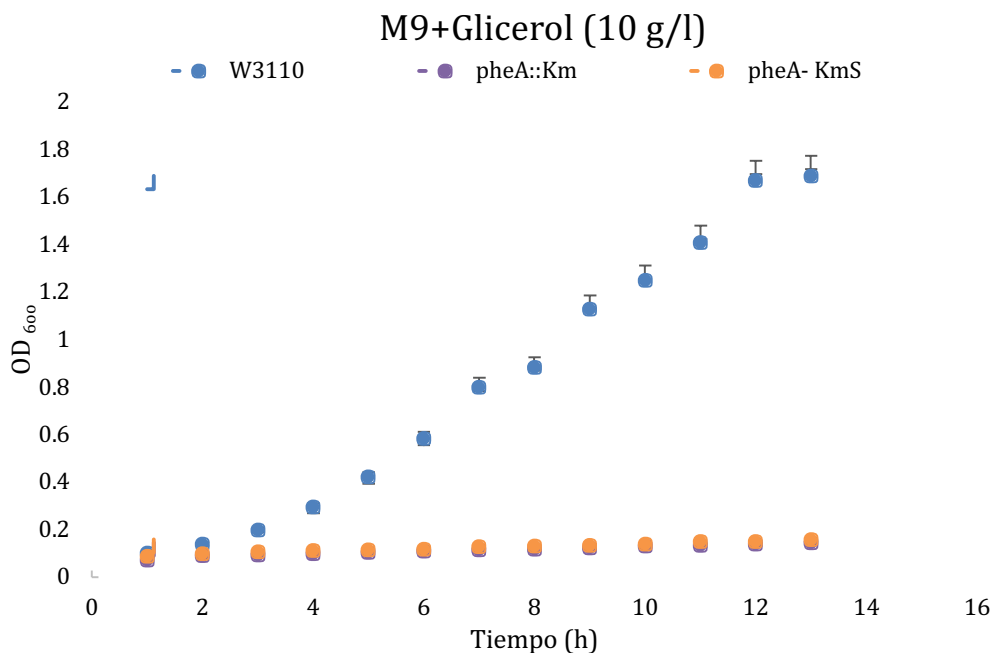
Al mismo tiempo, para asegurar que la cepa inicial fuera la correcta, se comprobó el fondo genético (cepa W3110) por PCR (secuencia y características de los primers descritas en el anexo), esto se logró debido a que esta cepa tiene una secuencia de inserción (IS) de 1195 pb entre los genes *flhD* (*locus* 42.6 centisomas, 153°) y *yecG* (*locus* 42.65 centisomas, 154°), gracias a esta característica, al amplificar por PCR (condiciones especificadas en el anexo), la zona intergénica de la cepa W3110 produce un amplificado de 1858 pb mientras que el resto de las cepas de *E. coli* que no sean derivadas de la W3110 (ej. MG1655) producen un tamaño de 667 pb.

Los resultados de la comprobación genotípica de la cepa se observan en la figura 8. En esta figura se observa que se eliminó el casete de resistencia y que el fondo genético era el correcto, obteniendo la cepa W3110 *pheA::FRT*.



**FIGURA 8 Comprobación del fondo genético:** gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa el control de cepa W3110, en el carril 2 la cepa *pheA::Km* (de los trabajos de Vargas-Tah), mientras que en los carriles 3 y 4 las candidatas, (cepas *pheA::FRT*). En el carril 5 se encuentra el control de cepa W3110 y en el carril 6 el control de cepa MG1655 *wild type*, en los carriles 7 y 8 se encuentran las candidatas (cepas *pheA::FRT*). Con esta electroforesis queda comprobada que las candidatas. (carriles 3, 4, 7, 8) son cepas *W3110 pheA<sup>-</sup>*.

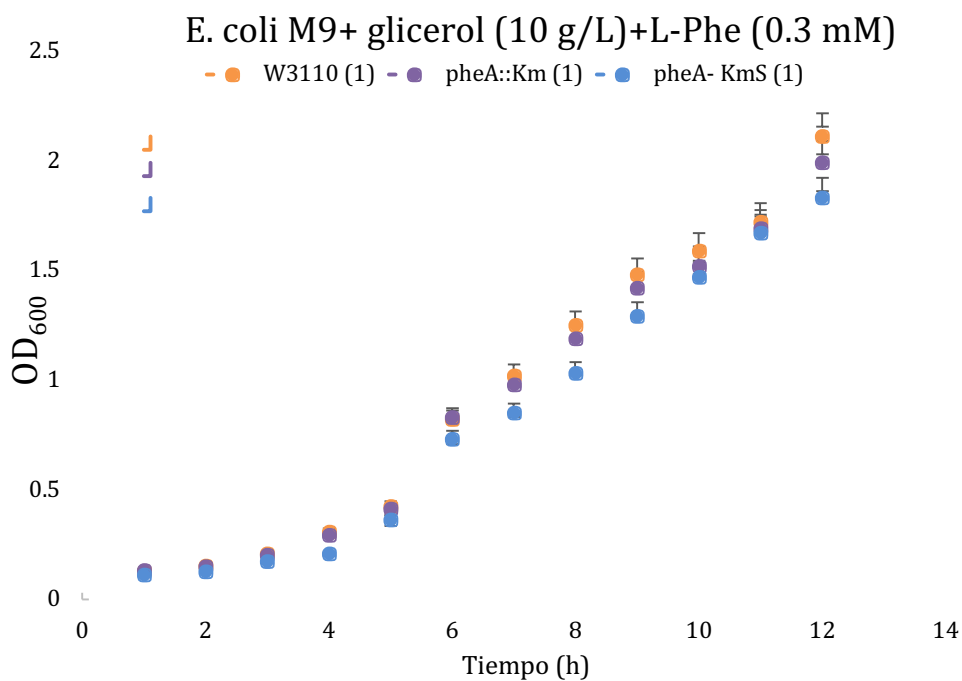
Una vez comprobadas las cepas se realizó una cinética de crecimiento, por duplicado, utilizando medio mineral (mínimo) M9 + glicerol (10 g/L), con la finalidad de comprobar fenotípicamente que las cepas *pheA<sup>-</sup>* son auxótrofas a L-Phe (ver gráfica 1).



**GRÁFICA 1, Curva de crecimiento de *E. coli* en medio M9+glicerol:** en este gráfico se observa que las cepas con la eliminación del gen *pheA*, no son capaces de crecer en el medio de cultivo. En contraste, la cepa *wild type*, muestra un crecimiento esperado.

Posteriormente se repitió la cinética de crecimiento (por triplicado), suplementando el medio con L-Phe (M9 + glicerol 10 g/L + L-Phe 0.3 mM), en esta cinética no se observan diferencias entre los comportamientos cinéticos de las cepas (ver gráfica 2).

A partir de las mediciones de OD<sub>600</sub> en medio suplementado con L-Phe se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), esto utilizando el modelo de cinética de primer orden (descrito en el apartado de metódica).



**GRÁFICA 2, Curva de crecimiento de *E. coli* en medio M9+glicerol+L-Phe:** En esta cinética de crecimiento se muestra cómo, al suplementar el medio con L-Phe 3 mM, las tres cepas muestran el mismo comportamiento.

Con los datos obtenidos de esta cinética se obtuvieron los siguientes parámetros de crecimiento:

**TABLA 1, Parámetros cinéticos de crecimiento:** Esta tabla muestra los parámetros: tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación para las cepas W3110 *wild type*, *pheA::Km* y *pheA*<sup>-</sup>.

	<b>W3110</b>	<b><i>pheA::Km</i></b>	<b><i>pheA</i><sup>-</sup></b>
<b><math>\mu</math> promedio (h<sup>-1</sup>)</b>	0.38	0.38	0.39
<b><math>\sigma</math></b>	0.01	0.01	0.02
<b>%CV</b>	2.63	2.63	5.12
<b>t de duplicación (min)</b>	109	109	107

En esta tabla se puede observar como la tasa de crecimiento y los tiempos de duplicación, son iguales para las tres cepas en un medio de cultivo M9 con glicerol (10g/L) y L-Phe (0.3mM).

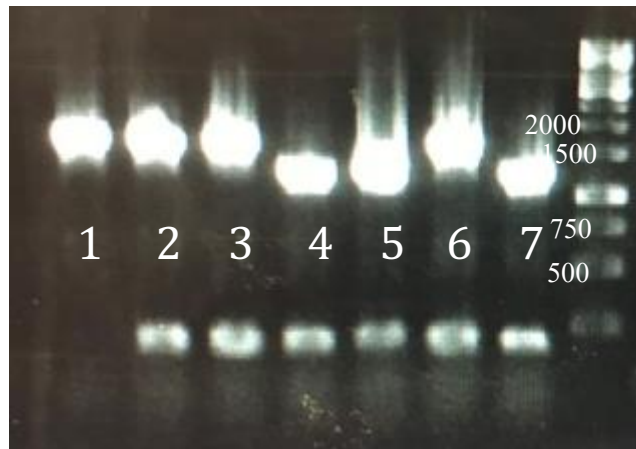
#### **Obtención y comprobación de las cepas *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> y *pheA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>**

Una vez comprobado el fondo genético y obtenidos los parámetros cinéticos, se inició el procedimiento de eliminación de los genes *pykA* y *pykF* utilizando el método de recombinación Lambda Red (Datsenko and Wanner 2000), para esto se diseñaron primers (secuencia y características descritas en el anexo). Con estos primers se amplificó por PCR (condiciones especificadas en el anexo) el gen de resistencia a cloranfenicol y a kanamicina y se transformaron las cepas W3110 *pheA*<sup>-</sup>

Para comprobar la eliminación de los genes, se amplificaron, por PCR, los *loci* de los genes inactivados, utilizando primers que amplifican tanto los genes nativos como los mutados (esto debido a que alinean por fuera del *locus* buscado); para *pykA*, se espera un tamaño de 1759 pb mientras que para *pykA::Cm* 1349 pb. Asimismo, el producto de PCR esperado de *pykF* es de 1773 y la mutante *pykF::Cm* 1400 pb.

Después de las transformaciones se probaron (por PCR) siete “candidatas” de la cepa *pykA::Cm* y tres candidatas de la cepa *pykF::Cm*, los resultados se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente.





**FIGURA 9, Comprobación de las candidatas *pykA::Cm*:** gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En los carriles 1,2,3 y 6 se observa un tamaño aproximado de 1700 pb, lo que indica que esas candidatas son *pykA*, los carriles 4, 5 y 7 muestran un tamaño aproximado de 1400 pb, esto comprueba que en esos carriles se encuentran las cepas *pykA::Cm*.



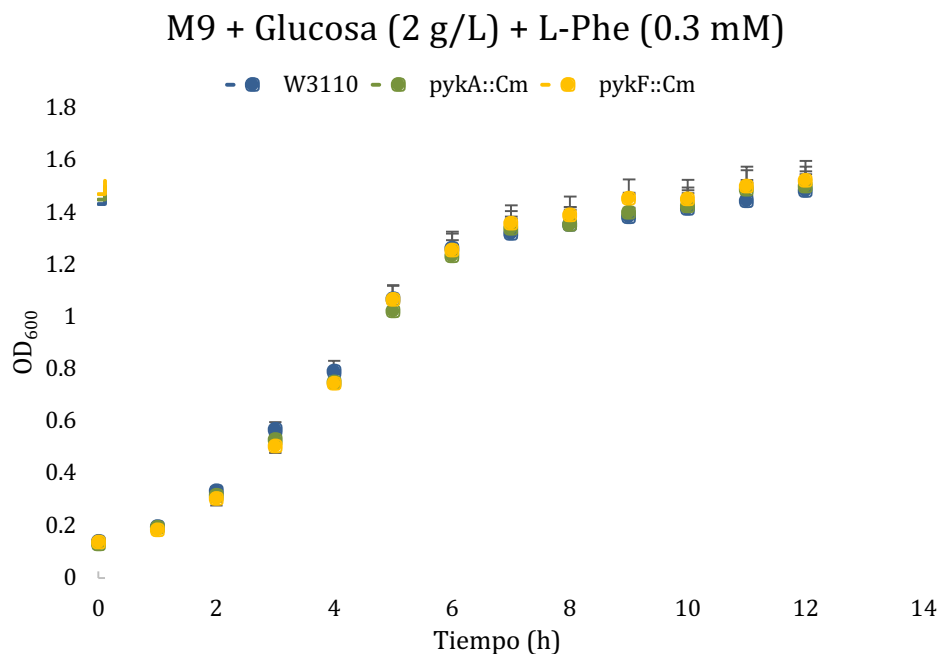
**FIGURA 10, Comprobación de las candidatas *pykF::Cm*:** gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra una banda de aproximadamente 1400 pb, tamaño que es el esperado para la cepa *pykF::Cm*, comprobando así, que la candidata 1 es la mutante. Los carriles 2 y 3 tienen bandas de aproximadamente 1600 pb, esto indica que esas candidatas son cepas *pykF*.

Para continuar el trabajo experimental, se eligió la candidata 3 (de las cepas *pykA::Cm*) y la candidata 1 (de las cepas *pykF::Cm*), a partir de estas cepas se generó un banco con 3 crioviales de cada una, más un criovial de trabajo, mismo que fue utilizado para los experimentos siguientes.

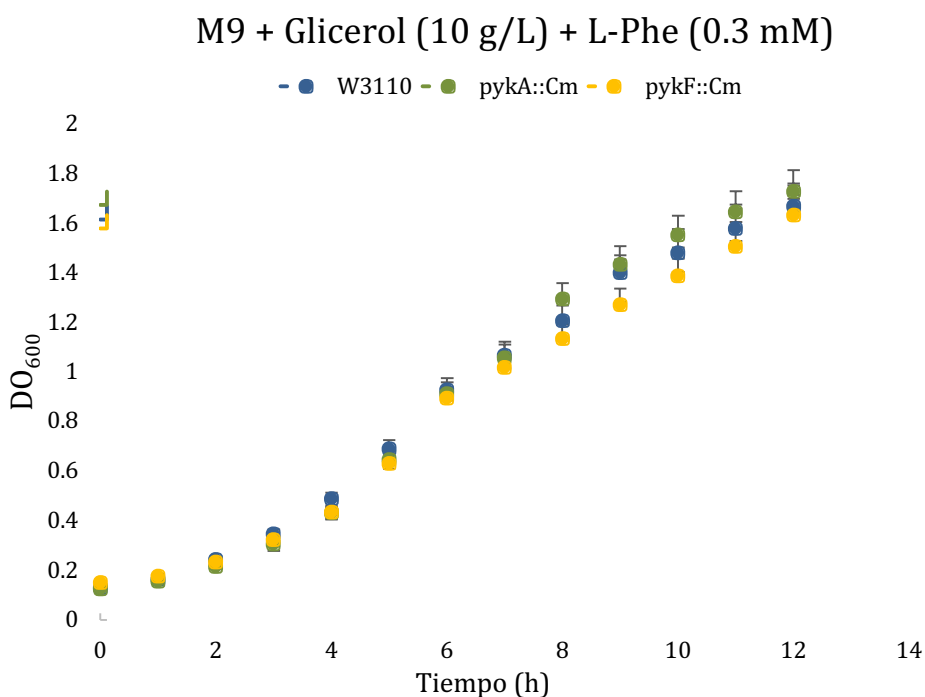
### Caracterización cinética de las mutantes sencillas

Posterior a la comprobación genotípica por PCR de las cepas, se realizaron curvas de crecimiento para determinar los parámetros cinéticos de las cepas generadas. Estas curvas se realizaron por triplicado, en medio mineral M9 + Glicerol 10 g/L + L- Phe 0.3 mM y en M9 + Glucosa 2 g/L+ L- Phe 0.3 mM, ambos medios adicionados con el antibiótico correspondiente.

Los resultados de las cinéticas en glucosa y en glicerol se muestran en las gráficas 3 y 4, respectivamente.



**GRÁFICA 3, Curva de crecimiento de *E. coli* en medio M9+glucosa+L-Phe:** En esta gráfica se muestran los comportamientos cinéticos de las cepas W3110 *wild type*, *pykA::Cm* y *pykF::Cm*.



**GRÁFICA 4, Curva de crecimiento de las cepas en medio M9+glicerol+L-Phe:** En esta gráfica se muestran los comportamientos cinéticos de las cepas W3110 *wild type*, *pykA::Cm* y *pykF::Cm*.

Con las gráficas 3 y 4 se calcularon los parámetros  $\mu$  y tiempo de duplicación, para los medios con glucosa y glicerol, estos parámetros se muestran en las tablas siguientes:

**TABLA 2, Parámetros cinéticos de crecimiento en Glucosa:** Esta tabla muestra los parámetros: tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación para las cepas W3110 *wild type*, *pykA::cm* y *pykF::Cm*.

	<b>W3110</b>	<b><i>pykA::Cm</i></b>	<b><i>pykF::Cm</i></b>
<b><math>\mu</math> promedio (<math>h^{-1}</math>)</b>	0.408	0.412	0.410
<b><math>\sigma</math></b>	0.013	0.001	0.018
<b>%CV</b>	3.19	0.24	4.39
<b>t de duplicación (min)</b>	102	101	101

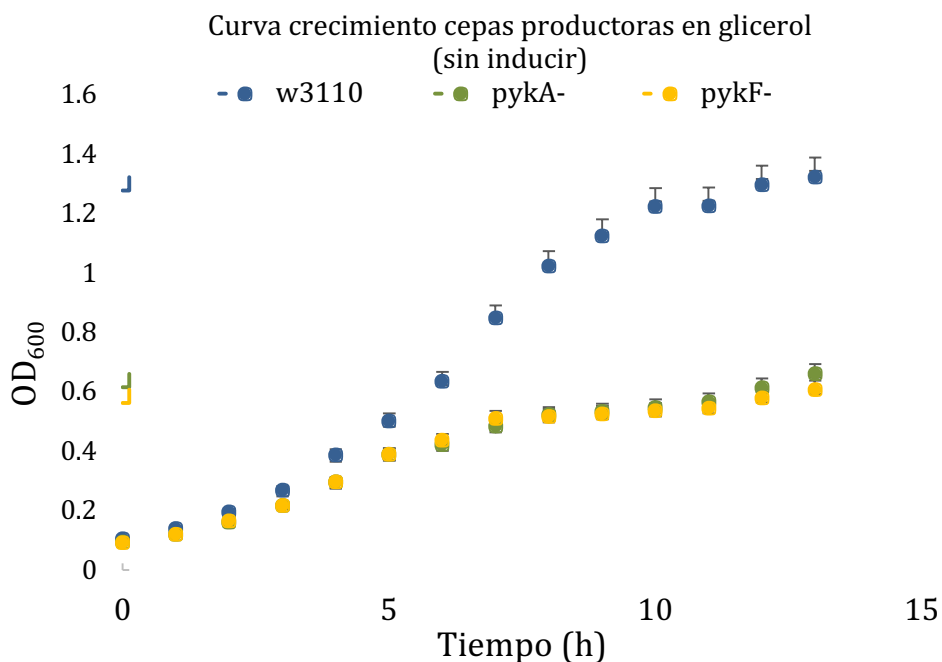
**TABLA 3, Parámetros cinéticos de crecimiento en Glicerol:** Esta tabla muestra los parámetros: tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación para las cepas W3110 *wild type*, *pykA::Cm* y *pykF::Cm*.

	<b>W3110</b>	<b><i>pykA::Cm</i></b>	<b><i>pykF::Cm</i></b>
<b><math>\mu</math> promedio (<math>h^{-1}</math>)</b>	0.345	0.353	0.325
<b><math>\sigma</math></b>	0.028	0.009	0.010
<b>%CV</b>	8.12	2.55	3.08
<b>t de duplicación (min)</b>	120	118	126

Las curvas de crecimiento, el cálculo de la tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de las cepas W3110, W3110 *pykA::Cm* y W3110 *pykF::Cm*, muestran que no existe una diferencia significativa en el crecimiento de estas cepas, a pesar de las mutaciones realizadas

Posterior a la comprobación, se transformaron las tres cepas con el plásmido pTrcPALRg (Cb<sup>r</sup>), y con el plásmido pJLB *aroG<sup>br</sup>tktA* (Tc<sup>r</sup>), con el protocolo de transformación por electroporación en células electrocompetentes, esto con la finalidad de obtener las cepas productoras.

Una vez transformadas las mutantes con los plásmidos de producción, se realizaron cinéticas de crecimiento por triplicado sin adicionar el inductor (IPTG), esto con la finalidad de observar la carga metabólica de los plásmidos *per se*. La curva de crecimiento de las cepas productoras sin inducir se muestra a continuación:



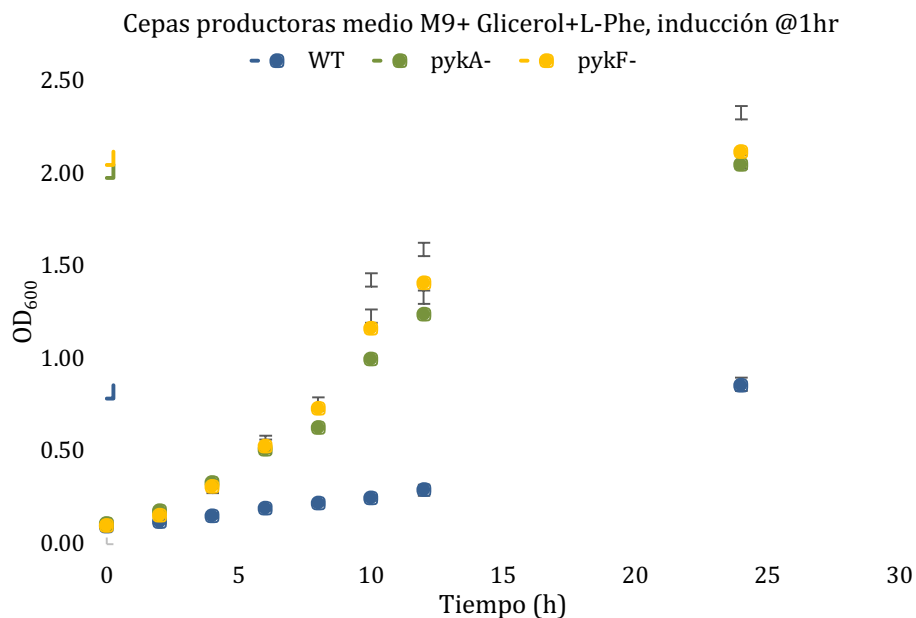
**GRÁFICA 5, Curva de crecimiento de las cepas en medio M9+glicerol+L-Phe:** en esta curva de crecimiento se puede observar que existe una diferencia significativa entre la cepa *wild type* y las cepas mutantes.

Con los datos obtenidos de la curva de crecimiento, se realizaron los cálculos de la  $\mu$  y el tiempo de duplicación (ver tabla 4)

**TABLA 4, Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas productoras sin inducir:** en esta tabla se muestra la constante de crecimiento y el tiempo de duplicación de las cepas productoras en medio mineral M9+ 10g/L de glicerol y L-Phe 0.3mM sin inducir, se puede observar que hay una disminución en los parámetros de crecimiento, además de haber diferencia significativa entre las mutantes y la cepa WT.

	W3110	<i>pykA::Cm</i>	<i>pykF::Cm</i>
$\mu$ promedio ( $h^{-1}$ )	0.301	0.233	0.239
$\sigma$	0.044	0.092	0.239
%CV	14.86	39.18	32.83
t de duplicación (min)	137	178	174

Después de observar el efecto de la carga metabólica del plásmido sin inducir, se realizó una cinética de las cepas productoras, ahora induciendo después de una hora de cultivo con IPTG 0.1mM, los resultados de esta cinética se ven en la siguiente gráfica:



**GRÁFICA 6, Curva de crecimiento de las cepas en medio M9+glicerol+L-Phe e IPTG:** en esta curva de crecimiento se adicionó IPTG 0.1mM para inducir la expresión de los plásmidos de producción, se puede observar como la OD<sub>600</sub> máxima de la WT cae drásticamente, al compararla con la gráfica 5, adicionalmente la velocidad de crecimiento también se ve disminuida.

Con los datos obtenidos de la curva de crecimiento, se realizaron los cálculos de la  $\mu$  y el tiempo de duplicación (ver tabla 5)

**TABLA 5, Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas productoras induciendo a una hora del inicio:** en esta tabla se puede observar una disminución en la  $\mu$  de todas las cepas (siendo la WT la más afectada), esto corresponde con el aumento en los tiempos de generación.

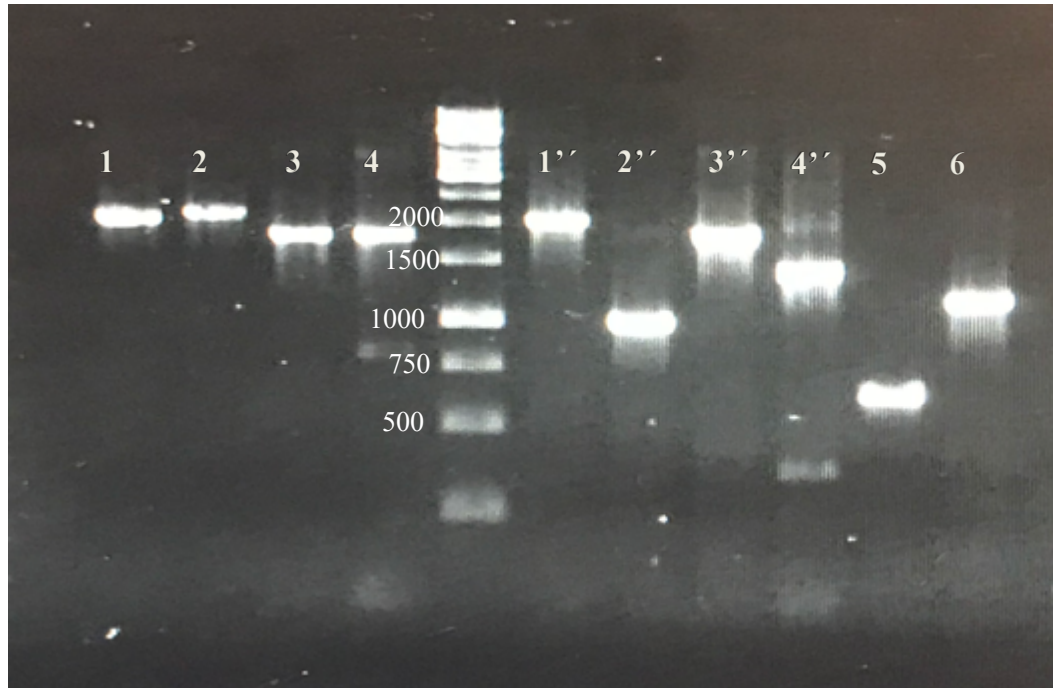
	<b>W3110</b>	<b><i>pykA::Cm</i></b>	<b><i>pykF::Cm</i></b>
<b><math>\mu</math> promedio (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	0.1	0.21	0.22
<b><math>\sigma</math></b>	0.017	0.065	0.056
<b>%CV</b>	1.7	31	25.4
<b>t de duplicación (min)</b>	415	198	189

De literatura, se sabe que la enzima PykF es aproximadamente 15 veces más activa que la enzima PykA. Sin embargo, los datos obtenidos en las curvas de crecimiento con y sin el inductor (IPTG), muestran que no hay diferencia entre los comportamientos de las mutantes sencillas.

### **Obtención y comprobación de la cepa *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>***

Una vez caracterizadas las cepas de producción (mutantes sencillas), y al observar que no existía diferencia entre las mutantes sencillas, se decidió crear la cepa W3110 *pheA<sup>-</sup>, pykA<sup>-</sup>, pykF<sup>-</sup>* (doble mutante) utilizando la misma estrategia que para las mutantes sencillas (Datsenko and Wanner 2000); esto con la finalidad de obtener una cepa con un flujo todavía menor en la reacción:  $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pir} + \text{ATP}$ . Para poder realizar esta mutación es necesario tener marcadores de selección compatibles (resistencias a antibióticos diferentes), por lo que la eliminación cromosomal de la segunda *pyk* se realizó introduciendo el casete de resistencia a kanamicina (pKD4).

Una vez realizadas la inactivación se comprobó el fondo genético de la doble mutante por PCR (ver figura 11). Debido a la similitud entre los tamaños del gen *pykA* y de la mutación *pykA::Km*, se utilizaron primers internos para la resistencia a kanamicina (K1 y K2).

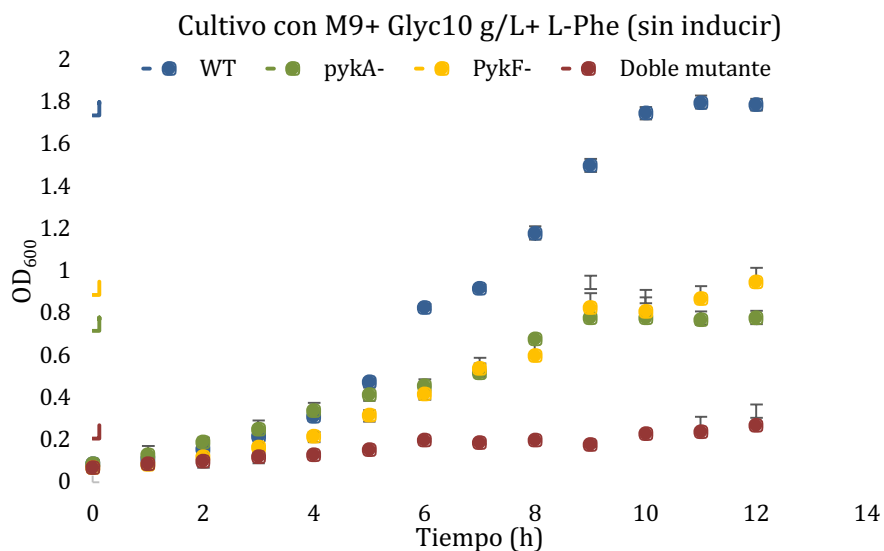


**FIGURA 11, Comprobación de la doble mutante:** gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. A la izquierda del marcador de peso molecular se encuentra el control W3110 WT, y a la derecha la cepa doble mutante. En los carriles 1 se muestran las bandas correspondientes a una cepa W3110 (1858pb) en los carriles 2 se muestran las bandas para el gen *pheA* (2042pb para el gen nativo y 850pb para las cepas *pheA::FRT*), en los carriles 3, se muestran las bandas de los genes *pykA*, para el gen nativo el tamaño es de 1759pb y 1817pb para la mutante *pykA::Km*, en los carriles 4, se encuentran las bandas correspondientes a *pykF*, con tamaños de 1773pb para el gen nativo y 1400pb para la mutante *pykF::Cm*. Debido a la similitud de tamaños entre las cepas *pykA* y *pykA::Km*, se utilizaron pares de oligos que incluyen sitios internos al casete de kanamicina, en el carril 5 se muestra el oligo interno K1 con el primer forward de *pykA* dando el tamaño esperado de 608pb, finalmente en el carril 6, se encuentra la combinación de K2 y *pykA* reverse, dando el tamaño esperado de 1119pb. Con estas PCRs se comprueba genotípicamente que la cepa es W3110, *pheA::FRT*, *pykF::Cm* y *pykA::Km*.

Una vez obtenida la cepa doble mutante y después de comprobar el genotipo de la cepa, se realizó el protocolo de transformación por electroporación, en células electrocompetentes, incorporando a la doble mutante los plásmidos de producción pTrcPALRg (Cb<sup>r</sup>) y pJLBaroG<sup>br</sup>tktA (Tc<sup>r</sup>), obteniendo así la cepa productora con ambas *pyk* eliminadas. Después de esto, la cepa fue caracterizada fenotípicamente.

### Caracterización cinética y modelo a escala genómica

Está reportado en la literatura que las cepas de *E. coli* con genotipo, *pykF*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> no crecen en fuentes de carbono no PTS (Weiner et al., 2014; Ponce et al., 1995) (esto debido a que no tienen una fuente obvia de piruvato) así que, después de comprobar el fondo genético de la doble mutante y de realizar las transformaciones con los plásmidos de producción, se realizó un a prueba (cultivo a 12 horas) para comprobar el fenotipo de la mutación, los resultados del cultivo se muestran en la gráfica 7.



**GRÁFICA 7, Curva de crecimiento de las cepas productoras en medio M9+glicerol+L-Phe:** En esta gráfica se muestra el crecimiento de las cuatro cepas resultantes de este trabajo, mostrando que existe una disminución en la tasa de crecimiento en las mutantes sencillas; en la doble mutante, a pesar de estar en glicerol como fuente única de carbono, su tasa de crecimiento, si bien muy baja, no fue cero.

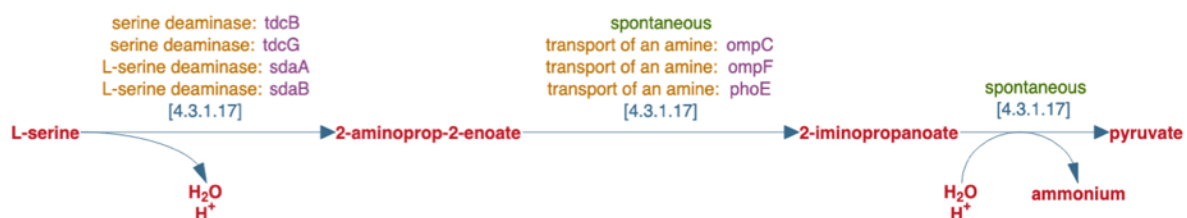


Al caracterizar la doble mutante se observó que la tasa de crecimiento fue muy baja, sin embargo, no fue cero (como lo fue en el caso de las cepas auxótrofas de fenilalanina). Esto fue un resultado inesperado. Debido al comportamiento no esperado de la cepa, se decidió buscar rutas metabólicas que pudieran dar una fuente adicional de piruvato.

Como parte de la búsqueda, se utilizó como herramienta, *in silico*, un modelo a escala genómica de *E. coli*; el modelo fue descargado de la página de Bigg models (<http://bigg.ucsd.edu/models>). El modelo (correspondiente a *Escherichia coli* cepa K-12, sub cepa MG1655) contiene 1668 metabolitos, 2382 reacciones y 1261 genes, y puede ser encontrado en la página con el nombre de “iAF1260”.

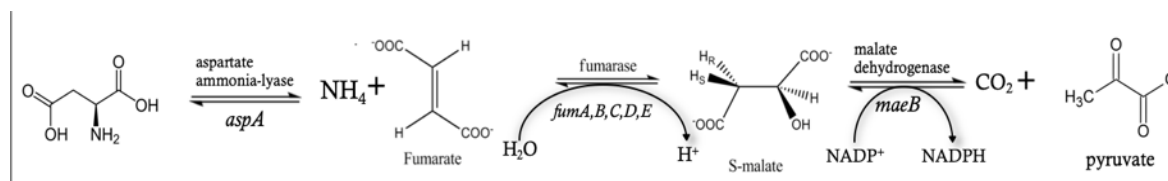
Este modelo fue interpretado por el módulo de Python “COBRA”, con el que se modeló una cepa con el genotipo de la doble mutante, y medio mínimo con glicerol como única fuente de carbono. Sorpresivamente, el modelo predecía el crecimiento de la doble mutante en glicerol como única fuente de carbono, el código completo del modelo se encuentra en la parte de anexos.

El modelo predecía, como fuente principal de Pir, la desaminación de la serina, la cual se lleva a cabo en tres pasos y es catalizada por las enzimas serin deaminasas (codificadas por los genes *tdcG*, *sdaA*, *sdaB* y *tdcB*) (fuente:Biocyc, Escherichia coli K-12 substr. W3110 Pathway: L-serine degradation, consultado, marzo 2019)(Alföldi, Raskó y Kerekes 1968), la reacción se muestra en la figura siguiente:



**Figura 12 reacción de desaminación de la serina:** en esta imagen se muestran las reacciones involucradas en la conversión de la L-Serina en piruvato, misma que es propuesta por el modelo a escala genómica como una explicación al crecimiento de la doble mutante en glicerol como fuente de carbono.

Adicionalmente, se realizó la eliminación de esta vía, esperando que el modelo señalara la inviabilidad de la cepa, no obstante, el modelo seguía prediciendo crecimiento, esta vez por la Aspartato amonio liasa y la malato deshidrogenasa (figura 13).



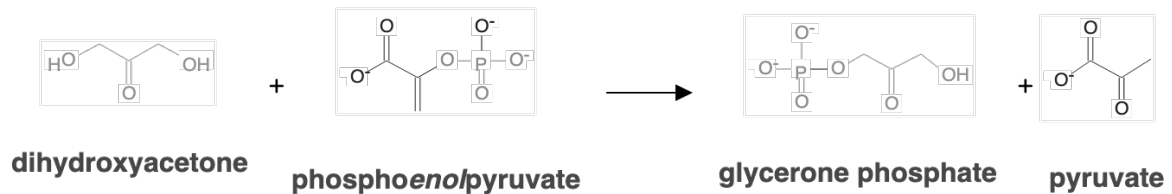
**Figura 13 reacción de desaminación del aspartato:** en esta imagen se muestra la segunda reacción propuesta por el modelo para la obtención de piruvato, la vía comienza con la desaminación del aspartato, resultando en fumarato, mismo que es hidroxilado para formar malato, el malato es convertido en piruvato ( esta reacción requiere de la reducción de una molécula de  $\text{NADP}^+$ ) La reacción resumida se ve de la siguiente forma:  $\text{Asp} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{NH}_4 + \text{H}^+ + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{Pir}$ .

Contrario a lo esperado, los modelos *in silico*, muestran que *E. coli* tiene vías que le permiten generar piruvato de manera independiente al sistema PTS o a las piruvato cinasas. Este modelo predice el mismo crecimiento en otros carbohidratos no PTS como la xilosa y la arabinosa.

Adicionalmente se realizó el mismo experimento *in silico*, con tres modelos adicionales, esto con la finalidad de utilizar modelos mas actualizados y de comparar modelos (fondos genéticos) distintos. Los modelos utilizados fueron los siguientes:

- iEC1364 (*E. coli* W): 1927 metabolitos, 2764 reacciones y 1364 genes ([http://bigg.ucsd.edu/models/iEC1364\\_W](http://bigg.ucsd.edu/models/iEC1364_W)).
- iML1515 (modelo mas reciente de *E. coli* K-12 sub. MG1655): 1877 metabolitos, 2712 reacciones y 1516 genes. (<http://bigg.ucsd.edu/models/iML1515>).
- iJO1366 (interacción entre el modelo iAF1260 y el iML1515): 1805 metabolitos, 2583 reacciones y 1367 genes (<http://bigg.ucsd.edu/models/iJO1366>).

Todos los modelos anteriores confirman las vías mencionadas anteriormente (desaminación de la serina y desaminación del aspartato). Adicional a estas dos vías, los modelos mas recientes incluyen una vía nueva, la cual muestran como fuente principal de Pir. Esta vía se muestra en la figura siguiente:

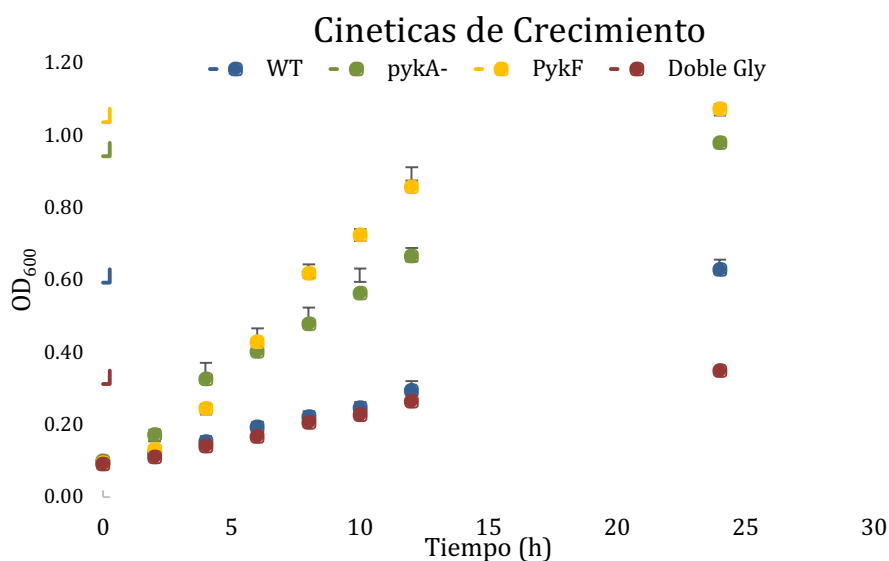


**Figura 14 reacción de transferencia de grupo fosfato:** En esta imagen se muestra la reacción principal predicha por los modelos a escala genómica mas recientes. Esta reacción es catalizada por la enzima dihidroxiacetona cinasa.

Con estos nuevos modelos se confirma, la predicción hecha por el primer modelo; adicionalmente, se encuentra una nueva vía capaz de sintetizar piruvato, misma que cuenta con evidencia experimental (Jin RZ et al., 1984).

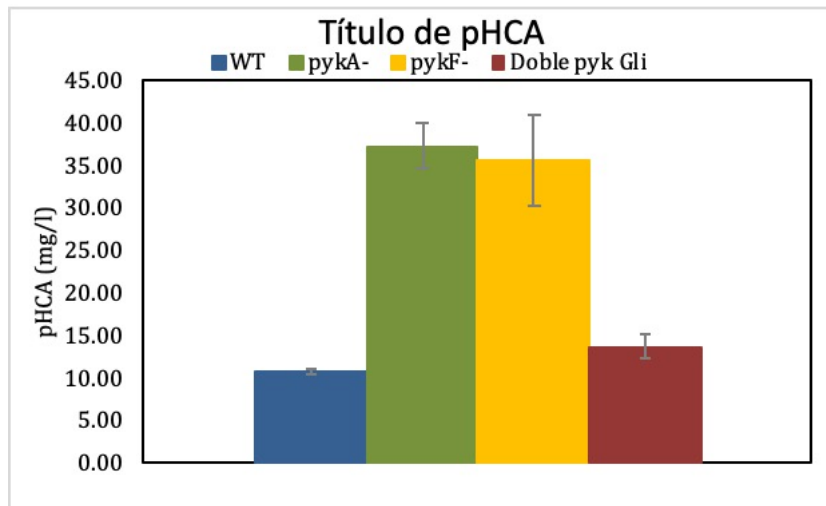
### Cinéticas de producción

Con las cuatro cepas transformadas con los plásmidos de producción, se realizaron cultivos, por triplicado, en medio M9 + glicerol 10 g/L y L- Phe, induciendo con IPTG 1 h después de iniciado el cultivo, la gráfica de crecimiento se muestra a continuación:



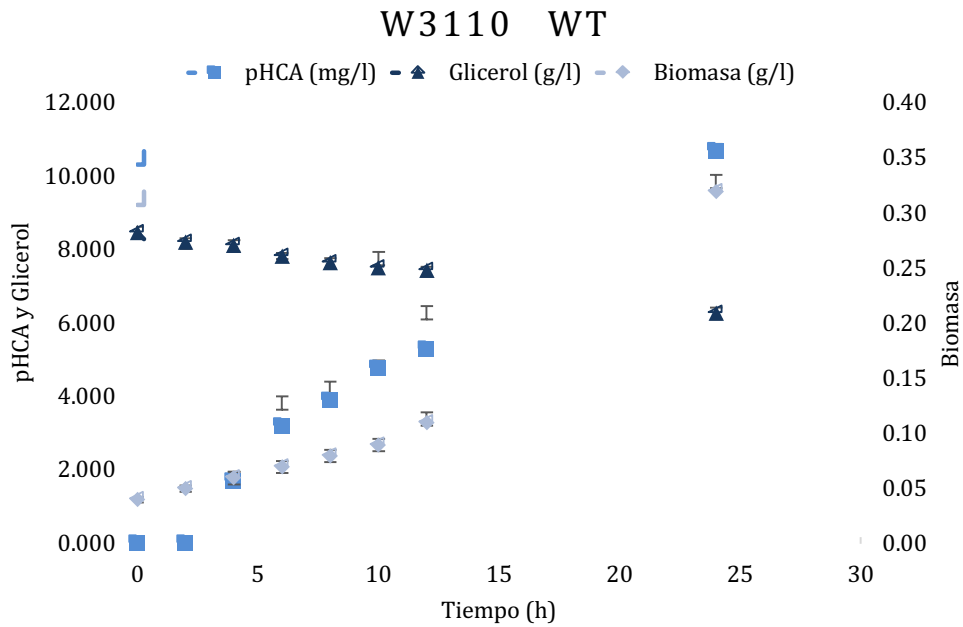
**GRÁFICA 8, Curva de crecimiento de las cepas productoras en medio M9+glicerol+L-Phe e IPTG:** En esta gráfica se muestra la carga metabólica causada por la inducción de los plásmidos.

En estos cultivos se tomaron muestras que fueron analizadas por HPLC para medir la producción del metabolito de interés, los resultados del análisis cromatográfico se muestran en la gráfica siguiente:

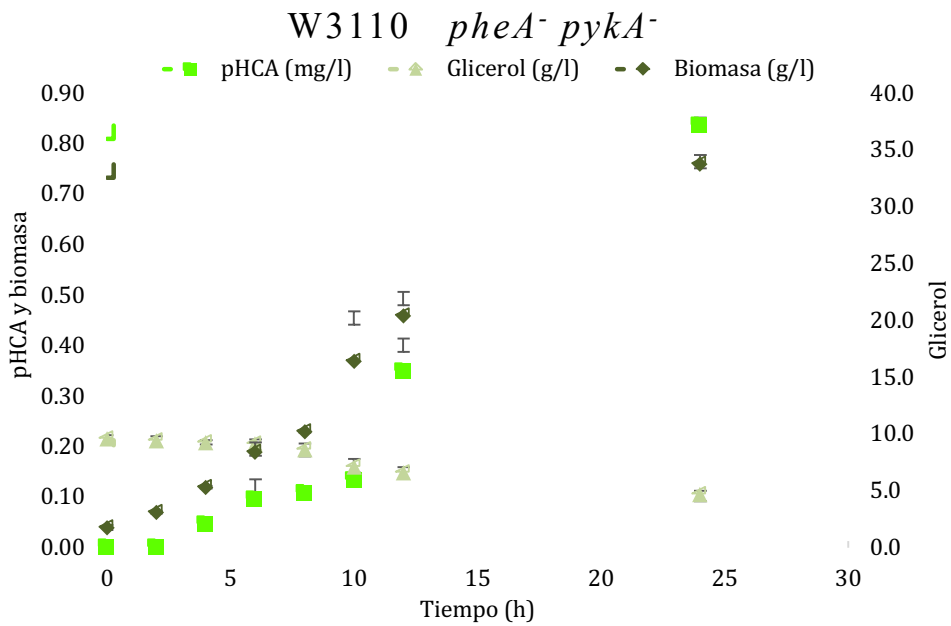


**GRÁFICA 9 , Títulos de producción de pHCA:** En esta gráfica se muestran los títulos de las cuatro cepas creadas, tomando las muestras a las 24 h. Se puede observar que las mutantes sencillas (A<sup>-</sup> o F<sup>-</sup>) muestran un aumento de 247.6% y 232% respectivamente, mientras que la doble mutante (A<sup>-</sup> y F<sup>-</sup>), mejora en 28% el título de la WT a pesar de su bajo crecimiento.

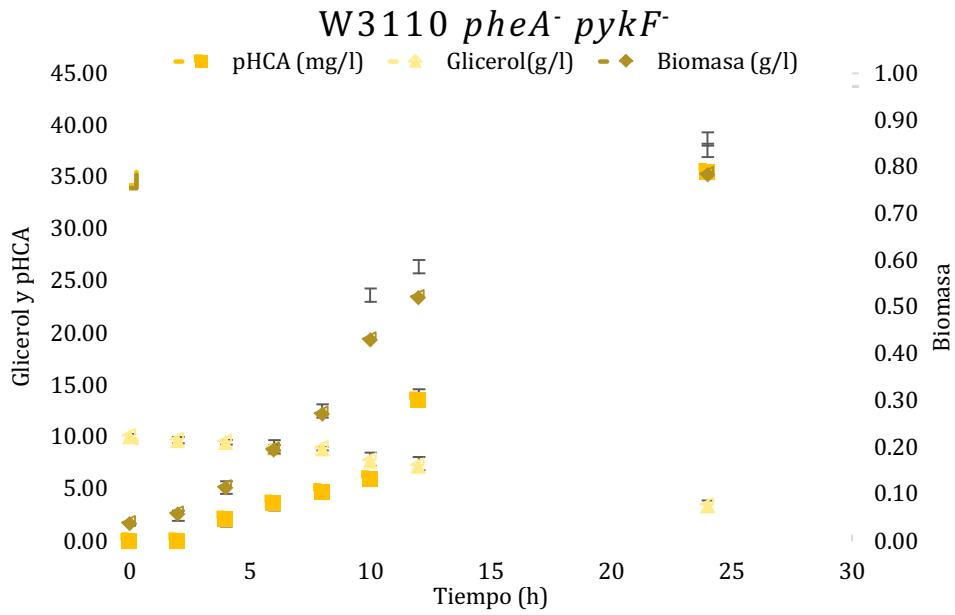
Para calcular los parámetros cinéticos, se midió el consumo de la fuente de carbono (glicerol) y se graficó el crecimiento de la cepa, así como la producción del pHCA y el consumo del glicerol, los resultados se muestran en las gráficas siguientes:



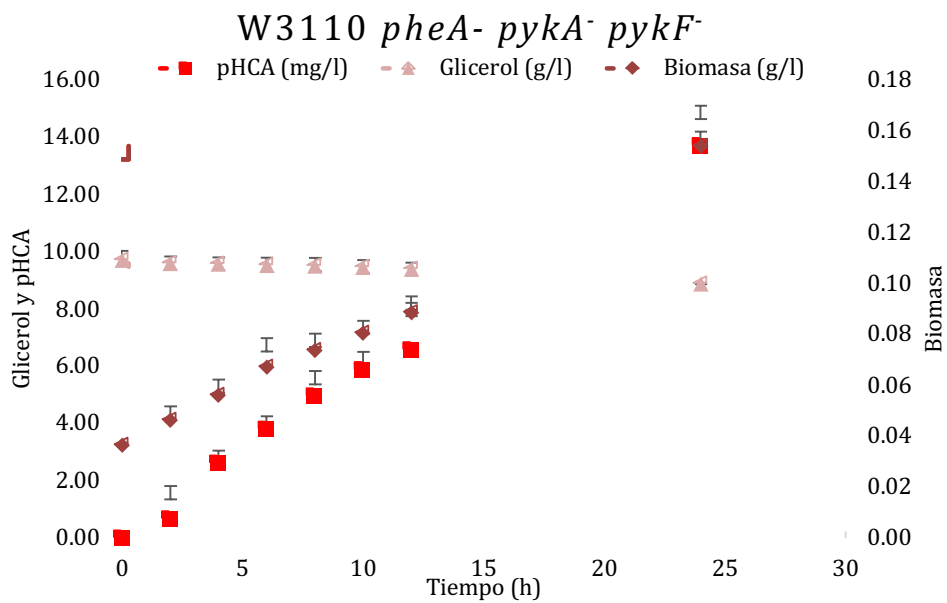
**GRÁFICA 10 , Comportamiento cinético de la cepa WT:** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento, de consumo de glicerol y de producción de pHCA de la cepa W3110 WT.



**GRÁFICA 11 , Comportamiento cinético de la cepa W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*:** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento, de consumo de glicerol y de producción de pHCA de la cepa mutante W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>* .



**GRÁFICA 12 , Comportamiento cinético de la cepa W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>:** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento, de consumo de glicerol y de producción de pHCA de la cepa mutante W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> .



**GRÁFICA 12 , Comportamiento cinético de la cepa W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>:** En esta gráfica se muestra la cinética de crecimiento, de consumo de glicerol y de producción de pHCA de la cepa mutante W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> .

Con los datos proporcionados con las gráficas anteriores, se pueden calcular los parámetros cinéticos de las cuatro cepas generadas, los resultados se muestran en las tablas siguientes:

**Tabla 6:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 WT.

<b>W3110 WT</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>SD</b>
Título (pHCA)	10.7	mg/L	0.2
$Y_{p/s}$	4.86	mg pHCA/g glicerol	0.009
$Y_{p/x}$	33.44	mg pHCA/g <i>E. coli</i>	0.003
$Q_{pHca}$	0.45	mg pHCA/Lh	0.008
$q_{p/s}$	0.20	mg pHCA/(g glicerol)(h)	0.005
$q_{p/x}$	1.39	mg pHCA/(g <i>E. coli</i> )(h)	0.001

**Tabla 7:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 *pheA*- *pykA*-.

<b><i>pheA</i>, <i>pykA</i></b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>SD</b>
Título (pHCA)	37.2	mg/L	5.37
$Y_{p/s}$	7.52	mg pHCA/g glicerol	0.27
$Y_{p/x}$	49.12	mg pHCA/g <i>E. coli</i>	0.1
$Q_{pHca}$	1.55	mg pHCA/Lh	0.2
$q_{p/s}$	0.31	mg pHCA/(g glicerol)(h)	0.01
$q_{p/x}$	2.04	mg pHCA/(g <i>E. coli</i> )(h)	0.004

**Tabla 8:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 *pheA*- *pykF*-.

<b><i>pheA</i> <i>pykF</i></b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>SD</b>
Título (pHCA)	35.53	mg/L	2.7
$Y_{p/s}$	5.34	mg pHCA/g glicerol	0.69
$Y_{p/x}$	45.37	mg pHCA/g <i>E. coli</i>	0.25
$Q_{pHca}$	1.48	mg pHCA/Lh	0.11
$q_{p/s}$	0.22	mg pHCA/(g glicerol)(h)	0.029
$q_{p/x}$	1.89	mg pHCA/(g <i>E. coli</i> )(h)	0.01

**Tabla 8:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 *pheA*- *pykA*- *pykF*-.

<b>Doble <i>pyk</i></b>	<b>Valor</b>	<b>Unidades</b>	<b>SD</b>
Título (pHCA)	13.7	mg/L	1.4
$Y_{p/s}$	16.86	mg pHCA/g glicerol	0.425
$Y_{p/x}$	88.86	mg pHCA/g <i>E. coli</i>	0.008
$Q_{pHca}$	0.57	mg pHCA/h	0.059
$q_{p/s}$	0.70	mg pHCA/(g glicerol)(h)	0.0177
$q_{p/x}$	3.70	mg pHCA/(g <i>E. coli</i> )(h)	0.0003

De esta caracterización cinética se puede observar que la doble mutante supera el título de la cepa WT (aumento del 28%), y en el caso de los rendimientos (tanto  $Y_{p/s}$  como  $Y_{p/x}$ ) se puede observar un aumento del 346.9% y del 265.730%, respectivamente. A pesar de este aumento en los valores de rendimientos, el título sigue siendo relativamente bajo, si se compara con el alcanzado por las mutantes sencillas; esto se explica por la baja biomasa alcanzada por la doble mutante.

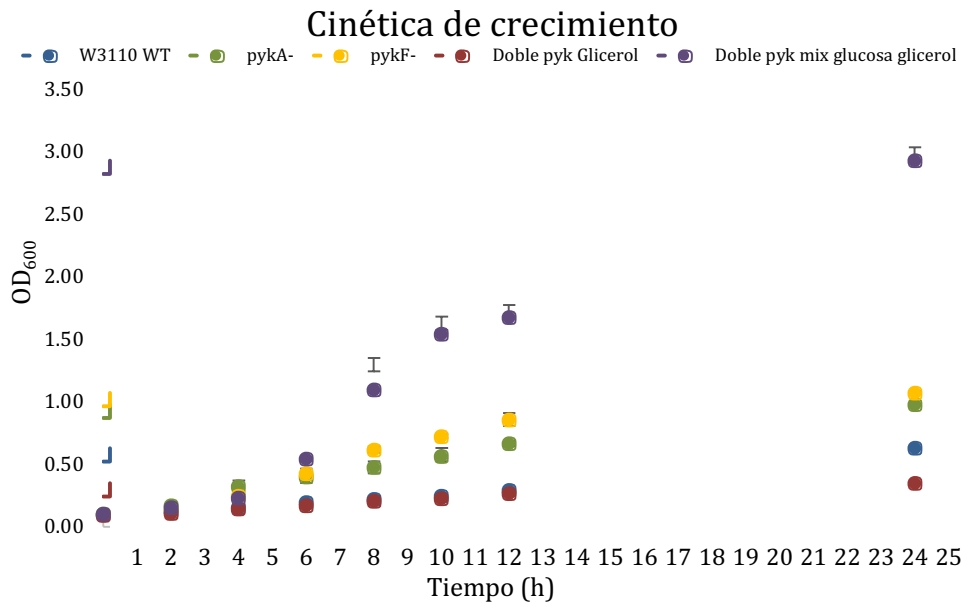
### **Estrategia de cultivo para mejorar los parámetros cinéticos en la cepa doble mutante**

Para aumentar el valor del título final (en la doble mutante), se decidió agregar al medio de cultivo glucosa a una concentración final de 2g/L, adicional a los 10g/L del medio original, esto con la finalidad de tener un cultivo en dos fases:

1. Glucosa: el sistema PTS proporcionará la mayoría del piruvato requerido, y se aumentará de manera considerable la biomasa.
2. Glicerol: una vez consumida la glucosa, el glicerol será utilizado como fuente de carbono para la producción del pHCA.

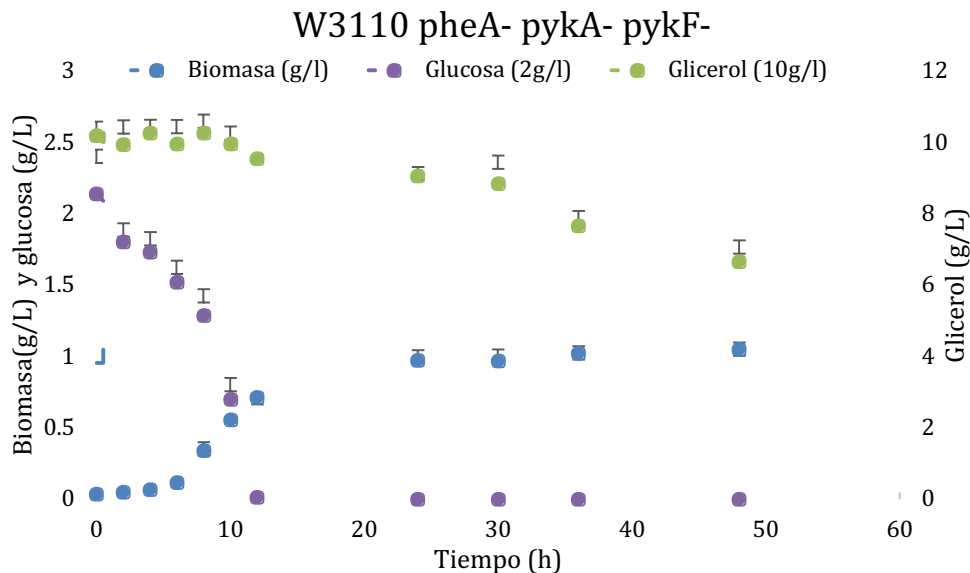
Las caracterizaciones del crecimiento de la doble mutante, las mutantes sencillas y la cepa WT, y la doble mutante con la estrategia de cultivo con la doble fuente de carbono, se muestran a continuación:



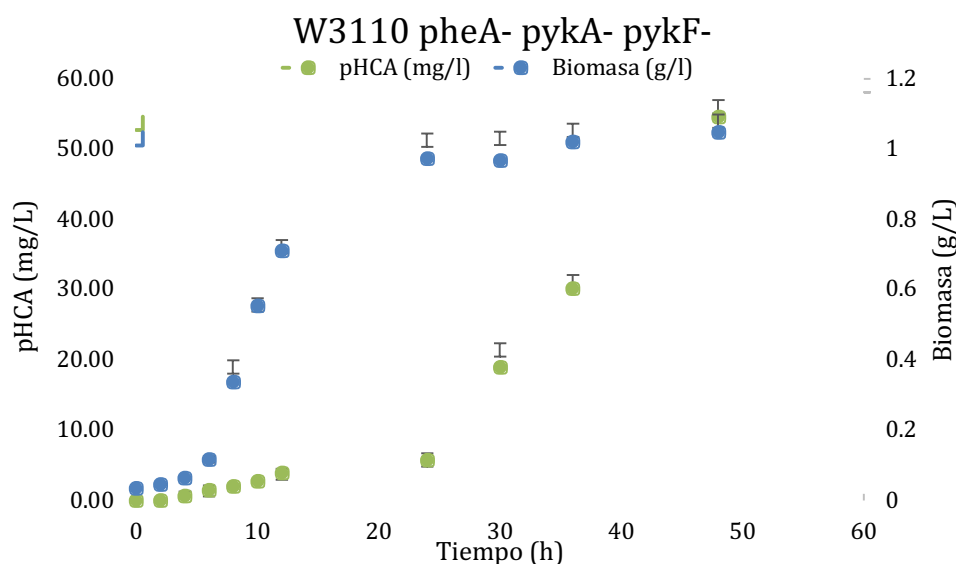


**GRÁFICA 13, Comportamiento de la doble mutante *pyk*:** En esta gráfica se muestra cómo se comporta, la doble mutante en un medio de cultivo con glucosa y glicerol, en comparación con las mutantes sencillas, la doble mutante solo en glicerol y la cepa WT.

Después de lograr aumentar de manera considerable la biomasa de la doble mutante, se hicieron los análisis, para todas las cepas, de consumo de fuente de carbono y producción de pHCA. Estos resultados se muestran en la gráfica siguiente:



**GRÁFICA 14, Consumo de las fuentes de carbono:** En esta gráfica se muestra el consumo de glucosa y glicerol de la doble mutante, se puede observar el efecto de la represión catabólica, ya que el consumo del glicerol comienza después de las 12h (al mismo tiempo que se agota la glucosa en el medio), adicionalmente se puede observar cómo la biomasa sigue aumentando al terminarse la glucosa.



**GRÁFICA 15, Producción de pHCA:** En esta gráfica se muestra como se produce el pHCA en relación con la biomasa. Se observa como durante la fase exponencial de crecimiento, no hay producción y se muestra la producción lineal después de las 24h.

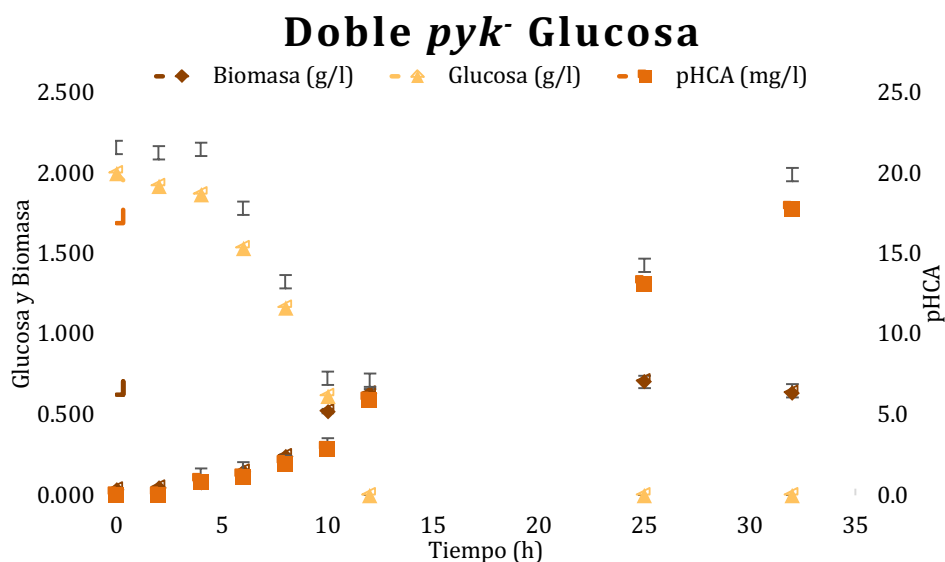
Con las gráficas anteriores se calcularon los parámetros cinéticos, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 9:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* con glucosa y glicerol.

Doble <i>pyk<sup>-</sup></i> Mix	Valor	Unidades	SD
Título (pHCA)	54.6	mg/L	3.88
$Y_{p/s}$	15.37	mg pHCA/g glicerol	0.858
$Y_{p/x}$	52.1	mg pHCA/g <i>E coli</i>	0.019
$Q_{pHca}$	2.28	mg pHCA/Lh	0.16
$q_{p/s}$	0.64	mg pHCA/(g glicerol)(h)	0.036
$q_{p/x}$	2.17	mg pHCA/(g <i>E coli</i> )(h)	0.007

En las graficas anteriores, se puede observar como existe represión catabólica entre el glicerol y la glucosa. Sumado a la represión catabólica, se observa que la producción del metabolito de interés comienza hasta las 12h del cultivo, es decir, al agotarse la glucosa. Debido a estos dos fenómenos, el cultivo puede ser separado en dos etapas independientes entre si: la primera (12h, consumiendo glucosa), en la cual la producción de pHCA es mínima. Y la segunda (12h, consumiendo glicerol), en la cual se minimiza el crecimiento, pero comienza la producción del pHCA.

Como se observa en la tabla anterior, con la estrategia de cultivo se logró aumentar el título final, manteniendo rendimientos altos. Adicionalmente, se decidió realizar un experimento con la doble mutante *pyk* y glucosa, los datos se muestran a continuación:



**GRÁFICA 16, Doble mutante *pyk* en glucosa:** esta gráfica muestra el comportamiento de la doble mutante *pyk* con glucosa como fuente de carbono, se puede observar cómo el título final es menos de la mitad que el de la misma cepa en la mezcla de fuentes de carbono. Adicionalmente se observa, como es esperado, una biomasa bastante mayor a la de las cepas con glicerol como fuente de carbono.

Con los resultados mostrados en la gráfica anterior, se calcularon los parámetros cinéticos de la cepa doble mutante con glucosa como fuente de carbono, estos datos se muestran en la tabla siguiente:

**Tabla 10:** Parámetros cinéticos de la cepa W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>, pykF<sup>-</sup>* con glucosa.

Doble <i>pyk</i> -glucosa	Valor	Unidades	SD
Título (pHCA)	17.7	mg/L	2.603
$Y_{p/s}$	8.85	mg pHCA/g glucosa	0.08
$Y_{p/x}$	27.7	mg pHCA/g <i>E coli</i>	0.139
$Q_{pHca}$	0.553	mg pHCA/Lh	0.108
$q_{p/s}$	0.28	mg pHCA/(g glucosa)(h)	0.003
$q_{p/x}$	0.87	mg pHCA/(g <i>E coli</i> )(h)	0.006

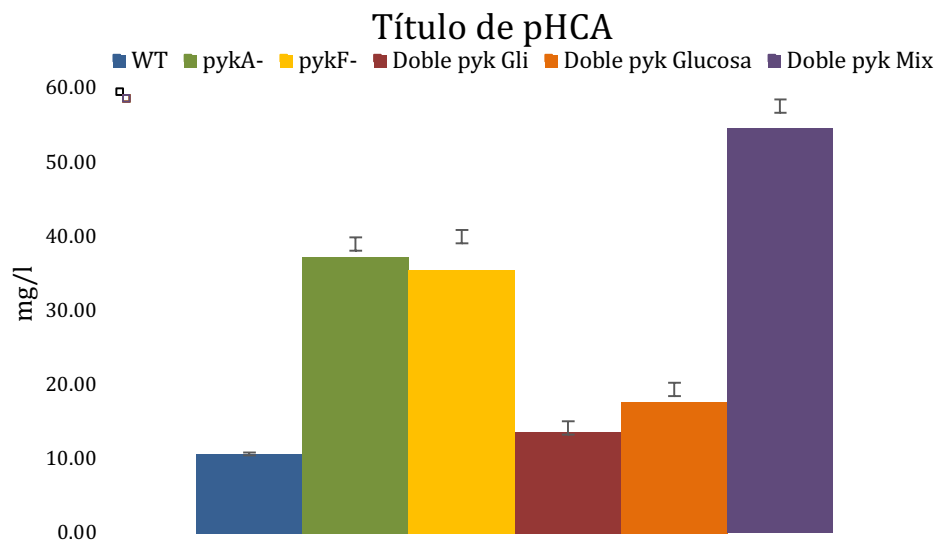
## Comparación de los resultados finales

Con los datos obtenidos a partir de las cinéticas de crecimiento de las cepas generadas, se calcularon los valores de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) mismas que se comparan en la tabla siguiente:

**Tabla 11:** comparación de las tasas específicas de crecimiento de las cepas generadas, comparando las cepas sin plásmido, con plásmido y sin inducir, y con plásmido e induciendo a 1h del cultivo.

$\mu$	Sin plásmido	Con plásmido	Induciendo
WT	0.345	0.31	0.1
<i>pykA</i> -	0.353	0.233	0.21
<i>pykF</i> -	0.325	0.239	0.22
Doble Glc	0.41	0.38	0.311
Doble Gli	0.13	0.08	0.08

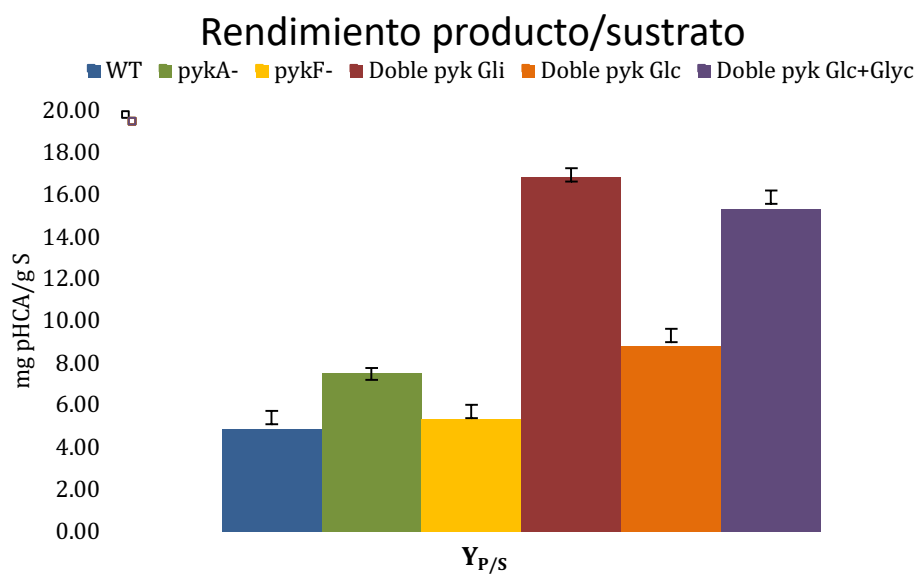
Con los datos cinéticos obtenidos, se compararon los resultados de producción de las cepas y las condiciones control, con las cepas resultantes de las estrategias de ingeniería genética y de cultivo, lo cual se muestra en las siguientes gráficas de barras:



**GRÁFICA 17, Concentración de pHCA:** esta gráfica es una comparativa de los títulos obtenidos al final de los cultivos.

Los resultados muestran que todas las cepas tienen un aumento en el título al compararse con la WT:

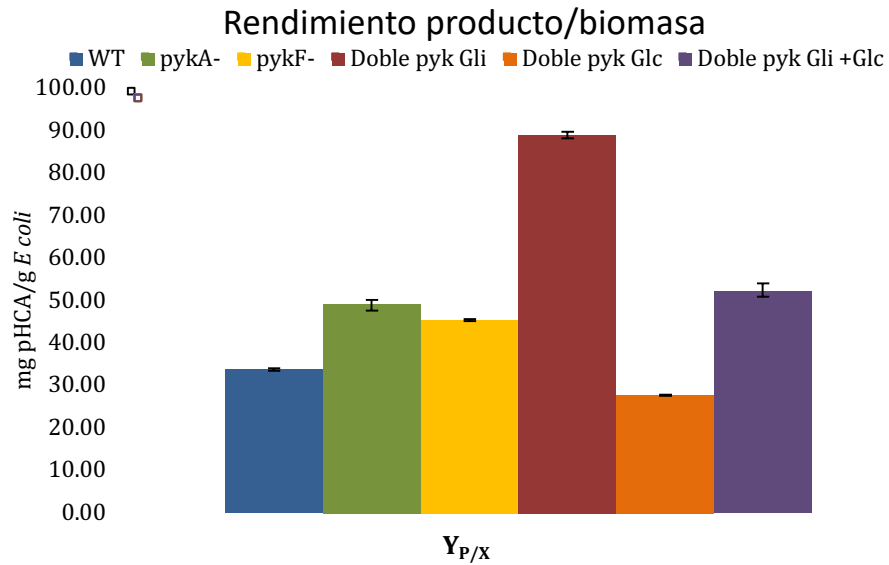
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: aumento del 247.66%
- W3110 *npheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: aumento del 232.1%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glicerol): aumento del 28%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa): aumento del 65.4%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa+ glicerol): aumento del 410.5%



**GRÁFICA 18, Rendimiento producto/sustrato:** esta gráfica es una comparativa de los mg de pHCA que se producen por g de fuente de carbono.

En la gráfica anterior se puede observar como todas las estrategias mejoran el rendimiento, al compararse con la cepa WT, siendo la doble mutante con glicerol la del mejor rendimiento.

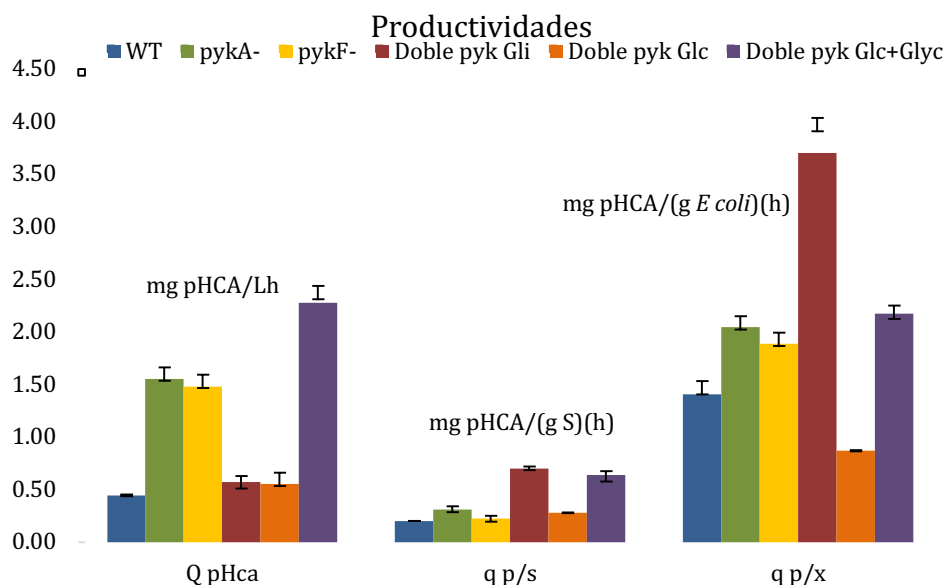
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: aumento del 54.7%
- W3110 *npheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: aumento del 10%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glicerol): aumento del 247%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa): aumento del 82%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa+ glicerol): aumento del 216%



**GRÁFICA 18, Rendimiento producto/biomasa:** esta gráfica es una comparativa de los mg de pHCA que se producen por g de *E. coli*.

En este caso ( $Y_{p/x}$ ) se observa que la única cepa con un rendimiento menor al de la WT es el control de la doble mutante con glucosa como fuente de carbono.

- W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup>: aumento del 46%
- W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>: aumento del 35%
- W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> (glicerol): aumento del 164%
- W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> (glucosa): disminución del 18%
- W3110 *pheA*<sup>-</sup> *pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> (glucosa+ glicerol): aumento del 55%



**GRÁFICA 19, Productividades:** Esta gráfica compara los valores de las productividades (específicas y volumétrica) así como los valores para cada cepa.

Al compararse con la cepa WT, se obtuvieron los siguientes aumentos en los valores de las productividades:

#### Q<sub>pHCA</sub>

- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: aumento del 244%
- W3110 *npheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: aumento del 229%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glicerol): aumento del 33.3%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa): aumento del 23%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa+ glicerol): aumento del 407%

#### q<sub>p/s</sub>

- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: aumento del 55%
- W3110 *npheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: aumento del 10%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glicerol): aumento del 250%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa): aumento del 40%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa+ glicerol): aumento del 220%

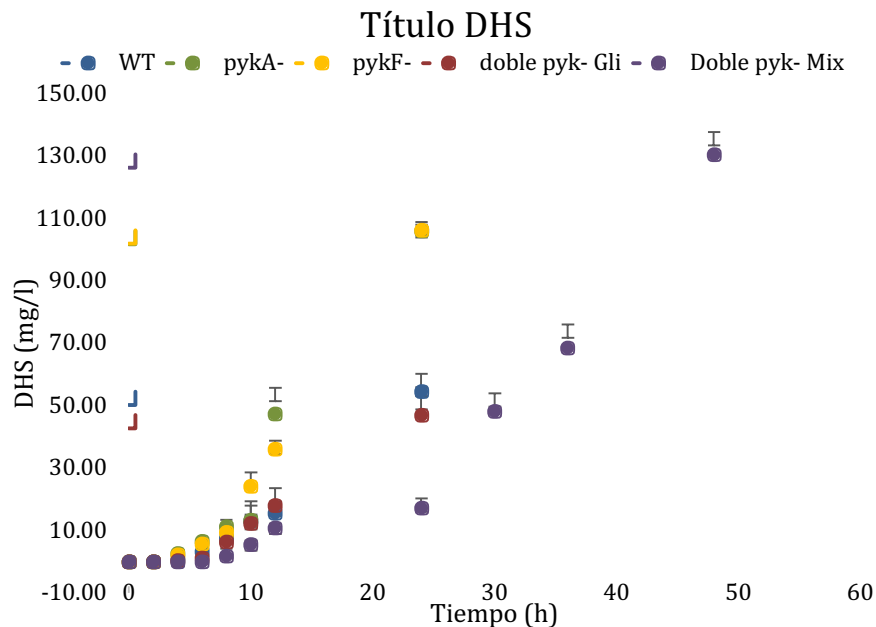
#### q<sub>p/x</sub>

- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: aumento del 45%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: aumento del 34%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glicerol): aumento del 164%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa): disminución del 38%
- W3110 *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa+ glicerol): aumento del 54%

Estos resultados muestran que, para los datos volumétricos, la cepa doble *pyk*<sup>-</sup> con la mezcla de glucosa y glicerol es la que tiene los mejores resultados, sin embargo, cuando se normaliza con respecto a la biomasa y a la cantidad de sustrato consumido, la cepa con mejores resultados es la doble mutante con glicerol como fuente única de carbono.

### Shikimato y 3-dehidroxishikimato

Al revisar los cromatogramas de producción de pHCA, se encontraron dos picos que daban señales muy intensas (áreas), y que aumentaban conforme se avanzaba en las cinéticas, al analizar los espectros de absorción de UV de estos picos, se encontró que correspondían a shikimato (SHK) y 3-dehidroxishikimato (DHS). Al descubrir esto se realizaron cuantificaciones por HPLC de estos intermediarios de la vía común de aminoácidos aromáticos; los resultados de las cuantificaciones se muestran en la gráfica siguiente.

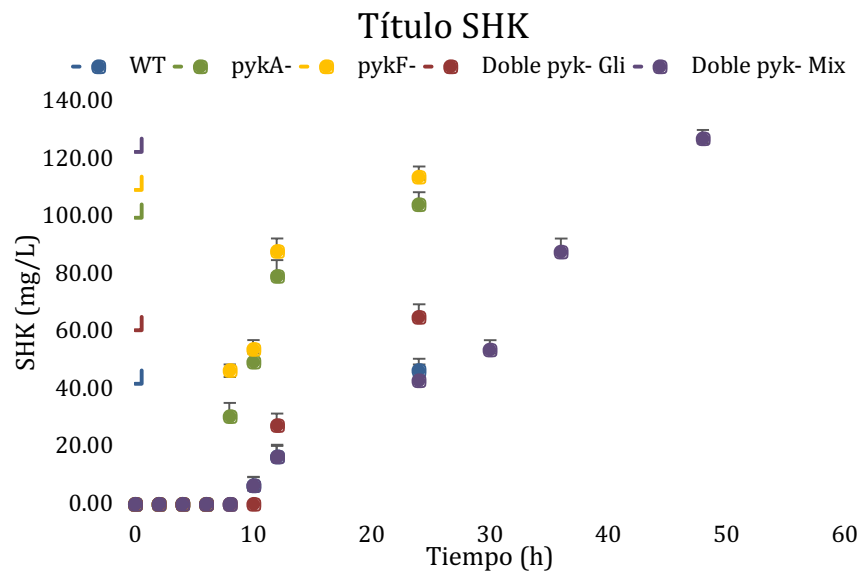


**GRÁFICA 19, Producción de DHS:** esta gráfica muestra las cinéticas de producción de DHS de las cepas productoras.

Como se puede observar en la gráfica, todas las cepas producen más del doble de DHS, que de pHCA. En la doble mutante con la doble fuente de carbono, se puede observar que la fase de producción inicia cuando se agota la glucosa del medio.

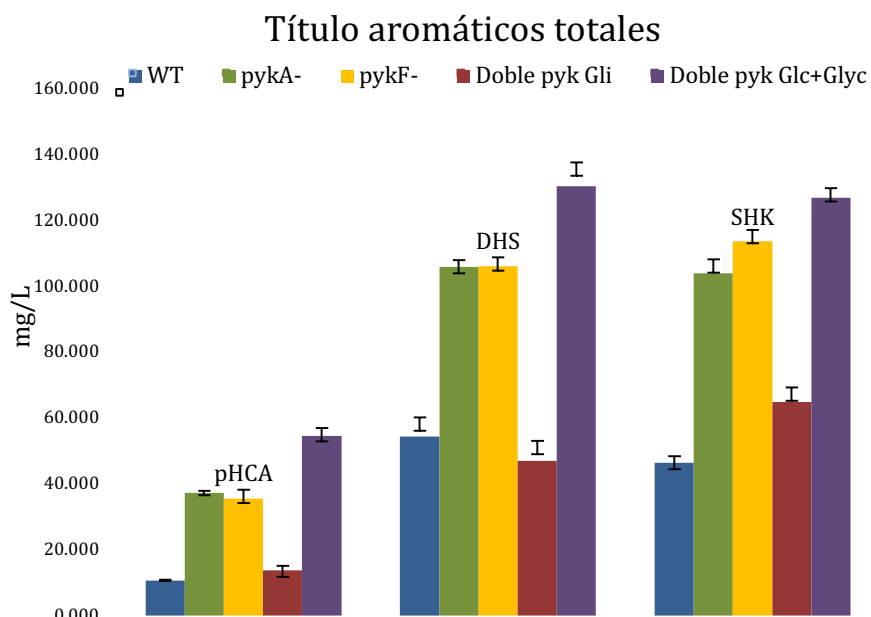


Al igual que el DHS, también se realizaron las cinéticas de producción de SHK, los resultados se muestran en la gráfica siguiente:



**GRÁFICA 20, Producción de SHK:** esta gráfica muestra las cinéticas de producción de SHK de las cepas productoras.

En la gráfica anterior se puede observar que a diferencia de la producción de pHCA o de DHS, el SHK parece alcanzar una fase estacionaria en las cepas *pykA-* *pykF-* y WT, mientras que mantienen un comportamiento exponencial las dobles mutantes.



**GRÁFICA 21, comparación cepas productoras:** en esta gráfica se muestran los títulos finales de pHCA, DHS y SHK (24h de producción) para las cinco cepas productoras.

Como se puede observar en la gráfica anterior, el título de DHS y SHK es de más del doble que el de pHCA, este comportamiento se observa en todas las cepas, así mismo se puede ver que no hay diferencia significativa entre los valores de DHS y SHK.

## DISCUSIÓN

Una vez obtenidas y caracterizadas las mutantes sencillas en las *pyk*, se decidió realizar la doble mutante, debido a la poca diferencia en la tasa crecimiento entre las dos cepas (*pykA*<sup>-</sup>, *pykF*<sup>-</sup>). La similitud entre las mutantes sencillas fue inesperado, ya que se sabe que la isoforma *pykF* es aproximadamente 16 veces más activa que su contraparte *pykA* (Meza et al. 2012). Asimismo, al utilizar una fuente de carbono no PTS y bloquear una de las dos enzimas implicadas en la síntesis de piruvato se esperaba encontrar diferencias en las tasas de crecimiento entre la cepa WT y las dos mutantes sencillas. Estos resultados parecen indicar que cualquiera de las dos isoformas del piruvato cinasa, tienen la actividad suficiente para permitir un crecimiento que equipara al de la cepa WT (utilizando glicerol como fuente única de carbono). Tomando en cuenta que la enzima *pykF* es regulada positivamente por la fructosa-1-6-bifosfato (FBP); y que, al utilizar glicerol, la concentración de este metabolito es mas baja que al utilizar glucosa (el glicerol requiere de la gluconeogénesis para formar la FBP) es probable que la enzima no tenga su actividad máxima en estas condiciones.

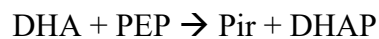
Una vez transformadas las cepas con los plásmidos de producción (sin inducir), se observó una disminución de la tasa de crecimiento de todas las cepas (aproximadamente 0.1 en la cepa WT y 0.2 en las mutantes sencillas), indicando que la carga metabólica del plásmido sin inducir afecta mas el crecimiento en las mutantes sencillas que en la cepa WT. Se sabe que las cepas de *E. coli* mutantes en *pyk* tienen un numero de copias mayor que las contrapartes WT (Cunningham et al. 2009) esto podría explicar por que las mutantes sencillas se ven mas afectadas por la transformación de estos plásmidos.

En las cinéticas de producción (induciendo a la hora uno del cultivo), se observó una caída drástica en la tasa de crecimiento de la cepa WT (aproximadamente 0.3), mientras que la disminución en las cepas mutantes no fue significativo (aproximadamente 0.02 para ambas cepas). En la cepa WT, la disminución en la tasa de crecimiento fue, por mucho, la más significativa. La explicación a este fenómeno no es obvia, sin embargo, se puede explicar si se toma en cuenta que la cepa WT, al no tener ningún tipo de mutación, es más robusta que las mutantes, es decir, puede replicar, transcribir y traducir de manera más eficaz los genes en los plásmidos de producción, esta hipótesis puede ser comprobada mediante el análisis de los

mensajeros de los plásmidos, y de las concentraciones de las enzimas de producción (DHAPS<sup>fbr</sup>, Tkta y PAL Rg).

Una vez obtenida la cepa doble mutante, se planeaba comprobar el fondo genético de la cepa de manera genotípica (PCR) y fenotípica (aprovechando la característica reportada de que la doble mutante no puede crecer en fuentes de carbono no PTS). Sin embargo, se observó crecimiento en medio mínimo y glicerol como fuente única de carbono. Después de descartar que el crecimiento en glicerol fuera causado por alguna contaminación con algún otro microorganismo (comprobando genotípicamente por PCR, y fenotípicamente, aprovechando que la mutación en *pheA* genera cepas con auxotrofia de L-Phe), y de repetir los cultivos (cinco veces, en cinéticas de punto final). Se decidió buscar alguna vía que explicara el crecimiento, para esto se utilizaron herramientas *in silico*. Se acordó utilizar un modelo a escala genómica, en el cual se imitaran las condiciones de cultivo (medio mínimo y glicerol) y las características genotípicas de la cepa (las características del modelo se describen en el apartado de metódica, y el código completo se encuentra en el anexo).

El modelo utilizado predecía el crecimiento de la cepa, obteniendo piruvato de la desaminación de dos aminoácidos (dos vías distintas), la serina y el aspartato. Adicional a este experimento, se buscó una explicación al crecimiento en tres modelos adicionales (iEC134, iML1515 y iJO1366), debido a que estos modelos son mas recientes que el modelo anterior. Estos nuevos modelos también predicen la desaminación de la serina y del aspartato como una posible fuente de piruvato; siembargo, predicen una reacción nueva, la cual, según los modelos, es prioritaria a las reacciones anteriores. Los modelos predicen como fuente principal de piruvato la siguiente reacción:



En cuanto a la reacción de desaminación de la serina, las bases de datos muestran como evidencia, la inferencia de función por ortología de secuencia y también existe evidencia experimental de la actividad de esta enzima (Alföldiet al., 1968; Cicchillo et al. 2004).

En cuanto a la segunda reacción predicha por el modelo (desaminación del aspartato) las bases de datos muestran evidencia computacional (inferencia de función por ortología de secuencia) y evidencia experimental (Fromm et al.,1971).

La reacción predicha por los modelos mas nuevos (dihidroxiacetona cinasa), tiene como evidencia experimental de su actividad los trabajos de Gutknecht et al. 2001 y Jin and Lin 1984.

Después de la caracterización de la doble mutante en glicerol, se midieron los parámetros de producción y consumo, con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos. Como era esperado, la doble mutante mostró un crecimiento menor al de las demás cepas, pero rendimientos ( $Y_{p/s}$  y  $Y_{p/x}$ ) mucho mayores, esto debido al aumento de la disponibilidad del PEP. El aumento en la disponibilidad de este precursor puede ser explicado por el uso de una fuente de carbono no PTS y por la eliminación de ambas *pyks*.

A pesar de que los rendimientos mejoraron considerablemente, el título seguía siendo bajo, al compararse con el obtenido con las mutantes sencillas. Para mejorar esto se decidió diseñar un proceso dinámico de crecimiento y consumo, adicionando glucosa a una concentración final de 2 g/L. Debido a la represión catabólica, se sabía que mientras hubiera glucosa en el medio (se sabe que el límite de concentración para la represión catabólica por glucosa es de, aproximadamente, 1 g/L) no se utilizaría el glicerol, esto se comprueba con los resultados de la gráfica 14.

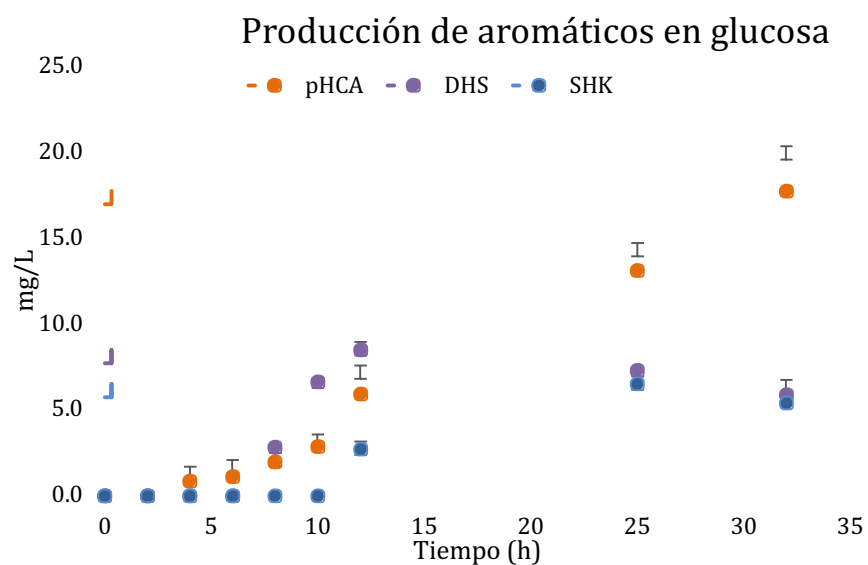
Con la estrategia de la doble fuente de carbono se logró aumentar el título, y la  $Q_{pHCA}$ ; no obstante, los demás parámetros cinéticos ( $Y_{p/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $q_{p/s}$  y  $q_{p/x}$ ) seguían siendo mayores para la doble mutante con únicamente glicerol. El bioproceso de la doble mutante puede ser dividido en dos, una fase de generación de biomasa (consumiendo glucosa), durante la cual, la producción del metabolito de interés es prácticamente cero y no hay consumo de glicerol y la segunda fase, que inicia al agotarse la glucosa y se caracteriza por la producción del metabolito de interés y la poca generación de biomasa. Los parámetros cinéticos reportados se calcularon tomando los datos de la segunda fase, esto debido a que el objetivo del proyecto es evaluar al glicerol como fuente única de producción, y tomando en cuenta la represión catabólica, adicionalmente, el poco pHCA producido durante la primera fase, fue restado del total.

Para un proceso de aplicación industrial los parámetros cinéticos más importantes son el título y el tiempo requerido para llegar a ese valor ( $Q_p$ ). Tomando en cuenta que el proceso de la doble mutante en glicerol duró 24 h y la misma cepa en la mezcla de glucosa y glicerol duró 48 h, parecería no ser válida la comparación, sin embargo, la producción del pHCA, en glicerol sigue un comportamiento lineal (con una  $R^2 > 0.99$ ). La producción del metabolito está descrita por la siguiente ecuación:

$$pHCA_{\left(\frac{mg}{L}\right)} = 0.5706(t) + 0.0637$$

Si sustituimos el valor de  $t$  por las 48h que dura el proceso con la mezcla de fuentes de carbono, resulta que el título alcanzado sería de 27.45 mg/L, es decir menor que los 54.62 mg/L alcanzados con la otra estrategia. Es decir, para una posible aplicación industrial, la cepa con los mejores valores cinéticos es la doble mutante con la mezcla de glucosa y glicerol (aunque los valores de rendimientos siguen siendo mayores para la doble mutante en glicerol).

La cepa doble mutante en glucosa como fuente de carbono, muestra que la producción del pHCA, continúa incluso 20h después de haberse agotado la fuente de carbono. Así mismo, se puede observar cómo la concentración del DHS disminuye hasta después de las 24h y la concentración del SHK comienza a disminuir hasta las 24h (ver gráfica 22). Si se toma en cuenta que la estequiometría entre el DHS, el SHK y el pHCA es 1:1:1, y que al final de la cinética todavía existen los intermediarios de la vía medidos, se puede calcular la cantidad de pHCA que se podría alcanzar al dejar que los intermediarios continuaran al final de la vía.



**GRÁFICA 22, producción de aromáticos:** en esta gráfica se muestran las cinéticas de producción de pHCA, DHS y SHK para la doble mutante en glucosa.

Al revisar las demás cepas, se puede observar que la doble mutante en glucosa es la única que tiene un título de pHCA mayor al de SHK o DHS, todas las demás cepas producen aproximadamente tres veces más de los intermediarios. Como se menciona en el párrafo anterior, se puede calcular el título de pHCA que se podría alcanzar de convertirse estos intermediarios en el producto deseado los resultados serían los siguientes:

- WT: 111.51 mg/L  $\pm$  2.66
- *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup>*: 247.2 mg/L  $\pm$  2.31
- *pheA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*: 255.4 mg/L  $\pm$  2.95
- *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*(glicerol): 125.63 mg/L  $\pm$  3.95
- *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*(glucosa): 28.96 mg/L  $\pm$  4.17
- *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>* (glucosa + glicerol): 312 mg/L  $\pm$  1.36

Se puede encontrar posible explicación a la acumulación de los intermediarios SHK y DHS al recordar que la conversión de DHS a SHK requiere de NADPH y el paso de SHK a SHK-3-P requiere de ATP (Escalante et al., 2010; Huccetogullari et al., 2019). Las mutaciones en las piruvato cinasas, sumado a la carga metabólica del plásmido implican una depleción de los niveles de ATP.

El glicerol es una fuente de carbono gluconeogénica, es decir, es necesario que, a partir de dos moléculas de glicerol, se formen dos moléculas de DHAP y con las actividades de las enzimas triosa fosfato isomerasa y la aldolasa, se inicie la vía gluconeogénesis. Esta vía genera la glucosa requerida para alimentar la vía de las pentosas fosfato, que en su fase oxidativa proporciona el NADPH requerido por la célula. Este NADPH es requerido para procesos vitales como la síntesis de ácidos grasos, contender con el estrés oxidativo, entre otros; como se menciona anteriormente el NADPH también es requerido para la bioconversión de DHS a SHK.

El plásmido pJLBaroG<sup>fbr</sup> *tktA*, contiene una variante de la enzima DHAP sintasa (*aroG*) resistente a la inhibición por productos (*fbr*), esto con la finalidad de tener un flujo constante de carbono a la vía de aromáticos, sin embargo, un estudio (Sprenger 2007), muestra que la variante *fbr* de la enzima DHAP sintasa (en su isoforma *aroF*), muestra una pérdida importante de la actividad a partir de las 13h, perdiéndola por completo a las 30h, “indicando una inestabilidad severa de la enzima”, este descubrimiento va en contra del conocimiento clásico de la ingeniería de vías metabólicas. En el mismo estudio, se cambia la variante *fbr* por una enzima WT, con esto mejoraron el título en más del 21%.

Como se menciona en párrafos anteriores, los resultados del título final de los intermediarios DHS y SHK, apuntan a que existen flujos muy distintos en las diferentes reacciones de la vía del shikimato, esto resulta en cuellos de botella que reducen, a un mismo tiempo de la cinética, los títulos máximos de pHCA. Una posible solución a este problema es la sobreexpresión completa de la vía de aromáticos. Actualmente en nuestro laboratorio contamos con un plásmido derivado del pAcyc184, que contiene todas las enzimas de la vía, sin embargo, el tamaño del plásmido lo hace inestable y no puede ser replicado y expresado en todas las cepas de *E. coli* (incluida la W3110, que fue la cepa elegida para este estudio).



La enzima PALRg, la cual proviene del hongo *Rhodotorula glutinis*, y que se encuentra en el plásmido pTrcPALRg, contiene la secuencia original del gen, es decir, no ha tenido sustitución para el uso armónico de codones en *E. coli*. El realizar este cambio, podría no solo mejorar la expresión de la enzima, sino disminuir la carga metabólica del plásmido, ya que con la secuencia WT es posible que se estén usando tRNAs poco abundantes, afectando la síntesis de proteínas requerida para el crecimiento óptimo.

Todos los resultados provienen de experimentos realizados en matraces bafleados de 250 ml. Si bien la agitación (300 rpm) y los baffles de los matraces permiten una buena aireación, se sabe que el escalar el proceso a biorreactor permite aumentar la biomasa de manera importante, debido al control del pH y de la tensión de oxígeno disuelto (TOD).

Una alternativa a las estrategias ya mencionadas es el uso de asRNAs, una cepa WT con los plásmidos de producción (ya mencionados) y un plásmido adicional con la información requerida para la transcripción de los asRNAs, podría crecer de manera similar a la cepa WT (al no agregar inductor al inicio) y después de alcanzar la biomasa deseada, agregar el inductor, esto cambiaría el fenotipo al de la cepa de mejor producción (*pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup>*). Adicionalmente, como se menciona en los antecedentes, se sabe que la proteína TyrR, regula de manera negativa la vía del shikimato, por lo que es un blanco potencial para el uso de asRNAs (fenotipo final *pheA<sup>-</sup> pykA<sup>-</sup> pykF<sup>-</sup> tyrR<sup>-</sup>*).

## CONCLUSIONES

El objetivo general de diseñar y generar una cepa de *Escherichia coli* que contenga las eliminaciones cromosomales de las enzimas PykA y PykF y que utilice glicerol como fuente de carbono para la producción de pHCA se cumplió satisfactoriamente. Se obtuvieron tres cepas (mutantes sencillas en *pykA* o *pykF* y una doble mutante) con características distintas. Asimismo, se realizó una caracterización cinética, fenotípica y genotípica de todas las cepas generadas. Adicionalmente se realizó un análisis *in silico* para determinar rutas de síntesis de Pir que permitan el crecimiento de la cepa doble mutante en glicerol. Una vez completados estos objetivos, se diseñaron dos estrategias de control dinámico que permitieran la mejora de los parámetros cinéticos. Si bien la estrategia de control dinámico utilizando dos fuentes de carbono fue exitosa en el diseño y la ejecución, no se logró mejorar todos los parámetros cinéticos de producción, ya que los valores de  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $q_{p/x}$  y  $q_{p/s}$ , seguían siendo más altos en la cepa doble mutante con glicerol como única fuente de carbono. No obstante, pensando en una posible aplicación a nivel industrial, los parámetros volumétricos, de  $Q_p$  y título final, fueron mejorados con la estrategia. Finalmente, el plan de utilizar asRNAs no pudo ser completado debido a la limitación del tiempo para concluir el proyecto. Sin embargo, se dejan sentadas las bases para poder finalizar con ese objetivo.

Los resultados obtenidos, adicionalmente a que cumplieron con los objetivos de manera satisfactoria, dejan las bases para poder realizar proyectos subsecuentes, en los cuales se puedan ampliar los objetivos y profundizar la información relacionada con las cepas obtenidas y los procesos diseñados, así como la optimización de los parámetros cinéticos de producción.

## PERSPECTIVAS

Comprobar que las vías metabólicas predichas por el modelo a escala genómica sean verdaderas, esto se puede lograr suplementando el medio con los precursores (los aminoácidos), esperando un aumento en la velocidad de crecimiento de la cepa y, adicionalmente, generando mutaciones en las vías predichas por el modelo, esperando que la mutante en estas vías tenga un fenotipo de no crecimiento en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono única.

Analizar las posibles combinaciones de fuentes de carbono (tanto en concentraciones como en número y tipos de fuentes de carbono) para una estrategia de cultivo que permita la producción de pHCA utilizando medio mínimo y más de una fuente de carbono. Como parte del estudio y caracterización de la doble mutante, se probó el crecimiento de la cepa con los carbohidratos: xilosa, arabinosa y ribosa (curvas de crecimiento mostradas en el anexo). Con estos resultados se abre la posibilidad del empleo de las cepas generadas en cultivos a partir de desechos lignocelulósicos.

Realizar una optimización del proceso de cultivo, estudiando el efecto que tiene el cambio de tiempos de inducción y la concentración del IPTG, así como el uso de biorreactores.

Utilizar un plásmido con la secuencia de codones armonizada para *E. coli* del gen de la enzima PAL-Rg, así mismo, probar la versión no *fbr* de *aroG* y analizar la compatibilidad de las cepas generadas con el plásmido que contiene todas las enzimas de la vía del shikimato (esto con la finalidad de aumentar el flujo y disminuir los cuellos de botella en los pasos de DHS y SHK).

Adicional al trabajo presentado, se comenzó un experimento que pretende utilizar un control dinámico mediante el uso de RNAs anti-sentido (asRNAs), que regulen la expresión genes importantes para la producción de pHCA, los avances de este proyecto adicional se muestran a continuación.

Adicional a los genes *pheA*, *pykA* y *pykF*, un gen importante, involucrado en la regulación de la vía del shikimato es el gen *tyrR*. La proteína TyrR, codificada por el gen con el mismo nombre, regula la expresión de ocho unidades transcripcionales que conforman el regulon TryR; estas unidades transcripcionales están implicadas en la regulación de la biosíntesis y el transporte de aminoácidos aromáticos. Este regulon actúa como represor de los genes: *AroF*, *tyrA*, *aroLM*, *tyrP*, *aroP*, *tyrR* y *aroG*, todos involucrados en la síntesis de aminoácidos aromáticos y regula positivamente a *mtr* (involucrado en el transporte de L-Trp). La actividad de TyrR está regulada positivamente por ATP y tirosina, y se sabe que la actividad de la proteína es mediada por la unión a las cajas TyrR (TGTAAN6TTTACA) (A. J. Pittard, et al., 1991; Cornish E.C., et al., 1986).

### **RNAs Antisentido**

Además de eliminación de los genes, otra posibilidad para prescindir de la actividad de alguna proteína es mediante el uso de RNAs antisentido, (asRNAs). De manera natural estos RNAs, son moléculas pequeñas, de cadena sencilla, no traducibles, que tienen complementariedad con algún mensajero (mRNA) (Maureen Thomason & Gisela Storz, 2010). Esta característica les permite regular la expresión de proteínas a un nivel postranscripcional, ya que los RNAs hibridados son degradados rápidamente.

Un subgrupo de los asRNAs son los del tipo *trans*, que están codificados en las regiones intergénicas y son los principales reguladores de los mensajeros. Se sabe que un asRNA-*trans* puede tener más de un mensajero blanco, hibridando cerca al sitio Shine-Dalgarno (Fatemeh Saberi & Mehdi Kamali, 2016).

Para las construcciones de los RNAs antisentido (asRNAs), se buscó la región 5' UTR de los genes a inactivar, utilizando la plataforma en línea: <http://operons.ibt.unam.mx/gctNG/>. Una vez obtenida la secuencia de la región 5', se diseñó un RNA que hibridara río arriba del codón de inicio del mensajero, calculando aproximadamente 20 nt y una Tm mayor a 50° C; a la región 3' de este asRNA se le adicionó una estructura tipo hairpin y una cola de poli U, estas dos estructuras funcionan como terminador.

A la región 5' se le incorporó una región reguladora (doble operador lac), la cual fue tomada directamente del trabajo de Rolf Lutz y Hermann Bujard (Rolf Lutz & Hermann Bujard, 1996)

A los extremos 5' y 3' de cada una de las construcciones, se les adicionó un sitio de corte, compatible con el polilinker del plásmido pCL1920 (ver mapa en el anexo). Las interacciones del asRNA con el mensajero y todos los componentes ya descritos se muestran en la figura 8.

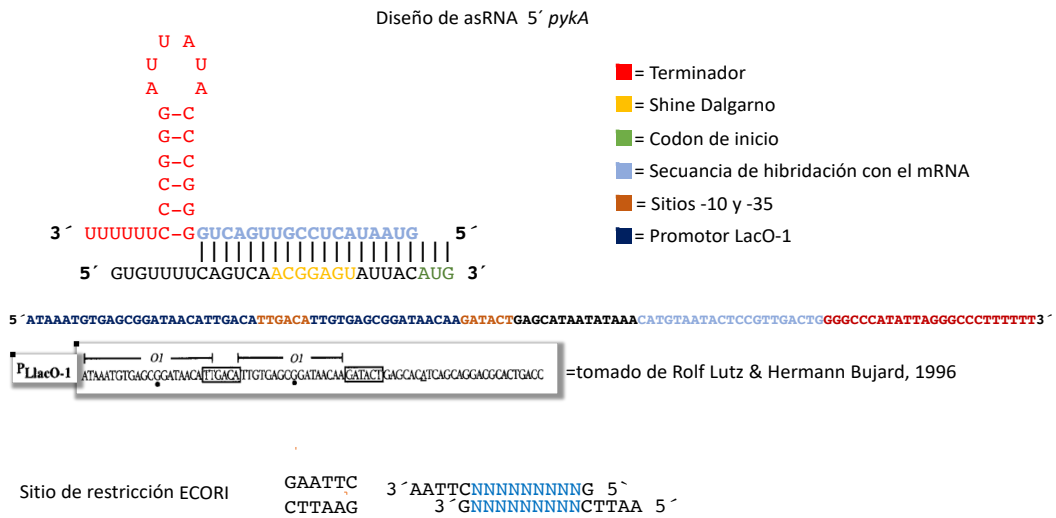
Para permitir el corte enzimático, al diseño se le adicionaron 7 nt, las construcciones finales para todos los genes se muestran en la figura 9.

Este diseño se utilizará para bloquear la traducción de los mRNAs de *pykA*, *pykF*, *pheA* y *tyrR*. Estas construcciones podrán ser clonadas en un plásmido pCL1920, Ori *pSC101* (híbrido entre el oriC de *E. coli* y el ori del fago G4), número de copias  $\approx 5$ , Sp<sup>r</sup> y control por la proteína represora Rep 101; resultando en tres construcciones diferentes:

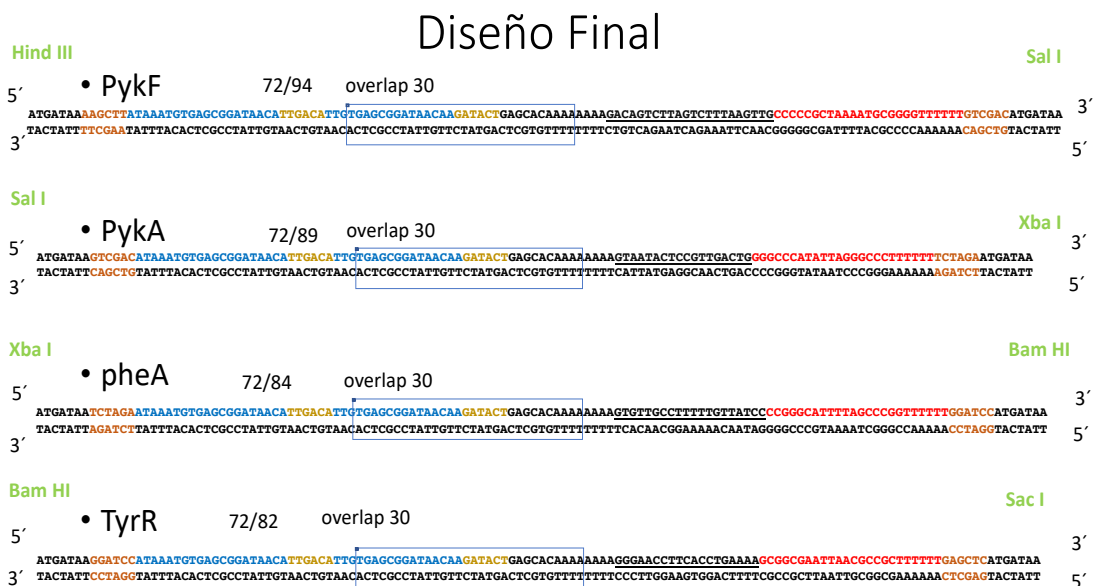
- pCL1920/*pykA*,*pykF*
- pCL1920/*pykA*,*pykF*,*pheA*
- pCL1920/*pykA*,*pykF*,*pheA*,*tyrR*

Con estas de clonaciones en el plásmido pCL1920 se podrá transformar una cepa W3110 pJLBaroG<sup>br</sup> *tktA*/pTRCPALRg, obteniendo como resultado las siguientes cepas:

- W3110/pJLBaroG<sup>br</sup> *tktA*/pTRCPALRg
- W3110/pJLBaroG<sup>br</sup> *tktA*/pTRCPALRg/p1920*pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup>
- W3110/pJLBaroG<sup>br</sup> *tktA*/pTRCPALRg/p1920*pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> *pheA*<sup>-</sup>
- W3110/pJLBaroG<sup>br</sup> *tktA*/pTRCPALRg/p1920*pykA*<sup>-</sup> *pykF*<sup>-</sup> *pheA*<sup>-</sup> *TyrR*<sup>-</sup>



**FIGURA 15:** En esta imagen se muestra un ejemplo de la construcción de un asRNA, en este caso para el gen *pykA*, la figura muestra el sitio de hibridación entre el mRNA y el asRNA, así como los componentes funcionales y reguladores de la construcción final del asRNA. Adicionalmente se ejemplifica la adición de un sitio de corte EcoRI en ambos extremos de la construcción.



**FIGURA 16 construcciones de los asRNAs:** en esta figura se muestran las cuatro construcciones para los asRNAs, se muestran los blancos y los sitios de corte para ser clonados en el plásmido pCL190.

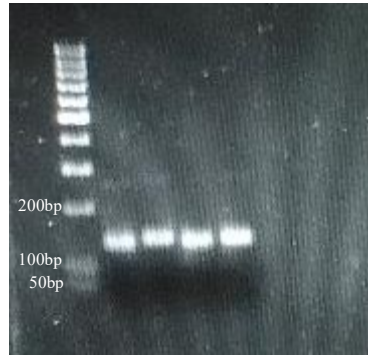
Debido a la longitud de las construcciones (mayores a 120nt), la síntesis se tuvo que hacer en dos fragmentos (con homología entre sí de 30 nt) y amplificados por PCR (utilizando la polimerasa de alta fidelidad Phusion, Thermo-Fisher).

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados por PCR, serán digeridos por las enzimas de restricción correspondientes (ver figura 16) y unidos por una ligasa T4 (para dar lugar a los fragmentos:

- *pykA-pykF*
- *pykA-pykF-pheA*
- *pykA-pykF-pheA-tyrR*

Una vez unidos los fragmentos, se clonarán en el vector pCL1920, utilizando los sitios del polilinker compatibles con los extremos de la construcción.

Una segunda estrategia de control dinámico propuesta fue, como se menciona anteriormente, el uso de asRNAs, que bloqueen la traducción de los mRNAs propuestos como blanco (*pheA*, *pykA*, *pykF* y *tyrR*), debido a que el tiempo para desarrollar el proyecto fue limitado, no se pudo concluir el estudio de esta estrategia, no obstante, se realizaron avances, los cuales es importante ponderar. Una vez realizado el análisis *in silico* (descrito en los párrafos anteriores), se realizó el pedido de los primers a la unidad de síntesis del instituto. Una vez obtenidos y debido al tamaño, los primers fueron purificados en geles de poliacrilamida. Posterior a la purificación, se realizaron las reacciones de extendido (PCR, condiciones descritas en el anexo) para obtener las construcciones individuales (*pheA*, *pykA*, *pykF* y *tyrR*), los resultados de las PCRs se muestran a continuación.



**FIGURA 17, Construcción de los asRNAs:** gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra la construcción para *pykA*, en el carril 2, la construcción para *pykF*, en el carril 3, la construcción para *pheA* y en el carril 4, la construcción para *tyrR*.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aerni, Philipp, Florabelle Gagalac, and Joachim Scholderer. 2016. "The Role of Biotechnology in Combating Climate Change: A Question of Politics?" *Science and Public Policy* 43(1): 13–28.
2. Alföldi, L., I. Raskó, and E. Kerekes. 1968. "L-Serine Deaminase of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 96(5): 1512–18.
3. Aslan, Selçuk, Elad Noor, and Arren Bar-Even. 2017. "Holistic Bioengineering: Rewiring Central Metabolism for Enhanced Bioproduction." *Biochemical Journal* 474(23): 3935–50.
4. Bachmann, Barbara J. 1972. "Pedigrees of Some Mutant Strains of Escherichia Coli K-12." *Bacteriol Rev* 36(4): 525–57.
5. Chuah, Lai Fatt et al. 2017. "A Review of Cleaner Intensification Technologies in Biodiesel Production." *Journal of Cleaner Production* 146: 181–93.
6. Cicchillo, Robert M. et al. 2004. "Escherichia Coli L-Serine Deaminase Requires a [4Fe-4S] Cluster in Catalysis." *Journal of Biological Chemistry* 279(31): 32418–25.
7. Cunningham, Drew S. et al. 2009. "Pyruvate Kinase-Deficient Escherichia Coli Exhibits Increased Plasmid Copy Number and Cyclic AMP Levels." *Journal of Bacteriology*.
8. Datsenko, Kirill A, and Barry L Wanner. 2000. *One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia Coli K-12 Using PCR Products*.
9. Escalante, Adelfo, Rocío Calderón, Araceli Valdivia, Ramón De Anda, et al. 2010. "Metabolic Engineering for the Production of Shikimic Acid in an Evolved Escherichia Coli Strain Lacking the Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase System." : 1–12.
10. Escalante, Adelfo, Rocío Calderón, Araceli Valdivia, Ramón de Anda, 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.
11. Fromm, J. 1971. "The Purification and Properties of Aspartase from Escherichia Coli." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 147: 92–98.
12. G., F. 1906. "Cutting a Round Cake on Scientific Principles." *Nature* 75(1938): 173–173. <http://www.nature.com/doi/10.1038/075173c0>.

13. Gutknecht, Regula et al. 2001. "The Dihydroxyacetone Kinase of Escherichia Coli Utilizes a Phosphoprotein Instead of ATP as Phosphoryl Donor." *EMBO Journal* 20(10): 2480-86.
14. Hill, C W, and Barbara Wallis Harnish. 1981. "Inversions between Ribosomal RNA Genes of Escherichia Coli." 78(11): 7069–72.
15. Huccetogullari, Damla, Zi Wei Luo, and Sang Yup Lee. 2019. "Metabolic Engineering of Microorganisms for Production of Aromatic Compounds." *Microbial cell factories*
16. Jin, R. Z., and E. C C Lin. 1984. "An Inducible Phosphoenolpyruvate:Dihydroxyacetone Phosphotransferase System in Escherichia Coli." *Journal of General Microbiology* 130(1): 83–88.
17. Lee, Ming Yi, Wen Pin Hung, and Shu Hsien Tsai. 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): 1–8.
18. Long, Christopher P. et al. 2017. "Enzyme i Facilitates Reverse Flux from Pyruvate to Phosphoenolpyruvate in Escherichia Coli." *Nature Communications* 8(May 2016): 1–8. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14316>.
19. Meza, Eugenio et al. 2012. "Consequences of Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotranferase System and Pyruvate Kinase Isozymes Inactivation in Central Carbon Metabolism Flux Distribution in Escherichia Coli." *Microbial Cell Factories*.
20. Nicol, R W, K Marchand, and W D Lubitz. 2012. "Bioconversion of Crude Glycerol by Fungi." *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(5): 1865–75.
21. Olvera, Leticia et al. 2009. "Transcription Analysis of Central Metabolism Genes in Escherichia Coli. Possible Roles of  $\Sigma 38$  in Their Expression, as a Response to Carbon Limitation." *PLoS ONE*.
22. 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): 5719–22.
23. Pontrelli, Sammy et al. 2018. "Escherichia Coli as a Host for Metabolic Engineering." *Metabolic Engineering* 50(April): 16–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>.
24. Ramseier, Tom M. et al. 1995. "The Global Regulatory Protein FruR Modulates the

- Direction of Carbon Flow in Escherichia Coli.” *Molecular Microbiology* 16(6): 1157–69.
25. Soini, Jaakko, Kaisa Ukkonen, and Peter Neubauer. 2008. “High Cell Density Media for Escherichia Coli Are Generally Designed for Aerobic Cultivations - Consequences for Large-Scale Bioprocesses and Shake Flask Cultures.” *Microbial Cell Factories* 7: 1–11.
  26. Sprenger, Georg A. 2007. “From Scratch to Value: Engineering Escherichia Coli Wild Type Cells to the Production of L-Phenylalanine and Other Fine Chemicals Derived from Chorismate.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(4): 739–49.
  27. Vannelli, Todd et al. 2007. “Functional Expression in Escherichia Coli of the Tyrosine-Inducible Tyrosine Ammonia-Lyase Enzyme from Yeast *Trichosporon Cutaneum* for Production of p-Hydroxycinnamic Acid.” *Enzyme and Microbial Technology* 41(4): 413–
  28. Vargas-Tah, Alejandra et al. 2015. “Production of Cinnamic and -Hydroxycinnamic Acid from Sugar Mixtures with Engineered Escherichia Coli.” *Microbial Cell Factories* 14(1): 1–1
  29. Vargas-Tah, Alejandra, and Guillermo Gosset. 2015. “Production of Cinnamic and P-Hydroxycinnamic Acids in Engineered Microbes.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3(August): 1–10.
  30. Vogt, Thomas. 2010. “Phenylpropanoid Biosynthesis.” *Molecular Plant* 3(1): 2–20.
  31. Weiner, M., Albermann, C., Gottlieb, K., Sprenger, G. A., & Weuster-Botz, D. (2014). Fed-batch production of l-phenylalanine from glycerol and ammonia with recombinant Escherichia coli. *Biochemical Engineering Journal*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.12.001>
  32. Zhu, Li Wen, and Ya Jie Tang. 2017. “Current Advances of Succinate Biosynthesis in Metabolically Engineered Escherichia Coli.” *Biotechnology Advances* 35(8): 1040–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.007>.
  33. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (2007). Regulation of Metabolic Pathways. In *Metabolic Engineering* (pp. 147–202).
  34. Pontrelli, S., Chiu, T. Y., Lan, E. I., Chen, F. Y. H., Chang, P., & Liao, J. C. (2018). Escherichia coli as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 50(April), 16–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>

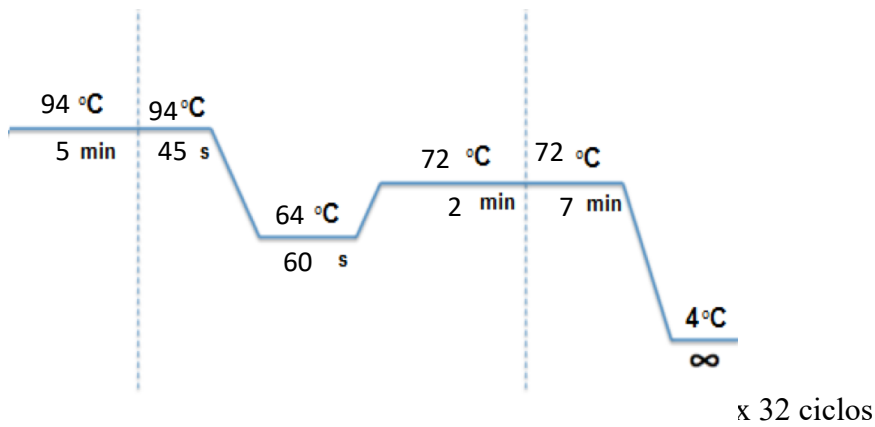
35. Na, D., Yoo, S. M., Chung, H., Park, H., Park, J. H., & Lee, S. Y. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nature Biotechnology*, *31*(2), 170–174. <https://doi.org/10.1038/nbt.2461>
36. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., & Nielsen, J. (2007). The Essence of Metabolic Engineering. In *Metabolic Engineering* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.1016/b978-012666260-3/50002-9>
37. Venayak, N., Anesiadis, N., Cluett, W. R., & Mahadevan, R. (2015). Engineering metabolism through dynamic control. *Current Opinion in Biotechnology*, *34*, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.022>
38. Aslan, S., Noor, E., & Bar-Even, A. (2017). Holistic bioengineering: rewiring central metabolism for enhanced bioproduction. *Biochemical Journal*, *474*(23), 3935–3950. <https://doi.org/10.1042/bcj20170377>
39. Varma, A., Boesch, B. W., & Palsson, B. O. (1993). Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(1), 59–73. <https://doi.org/10.1002/bit.260420109>
40. Hucetogullari, D., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2019). Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1090-4>

## ANEXOS

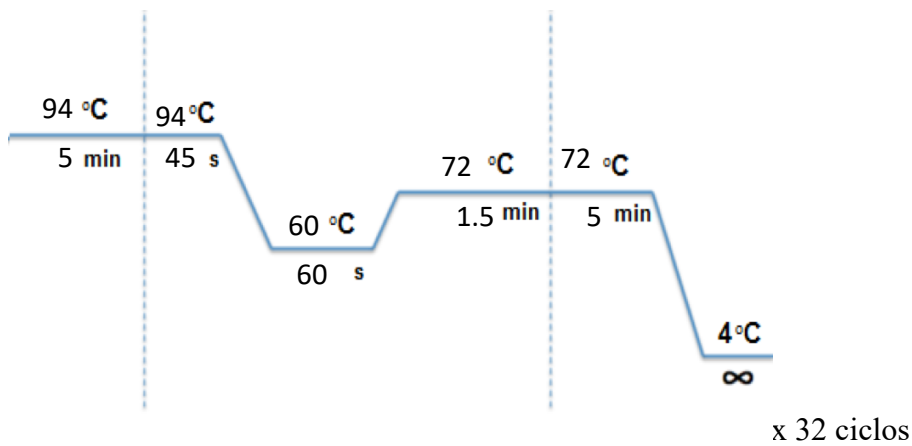
### Condiciones de PCR

Todas las PCRs mostradas a continuación se realizaron con polimerasa Taq de Thermo.

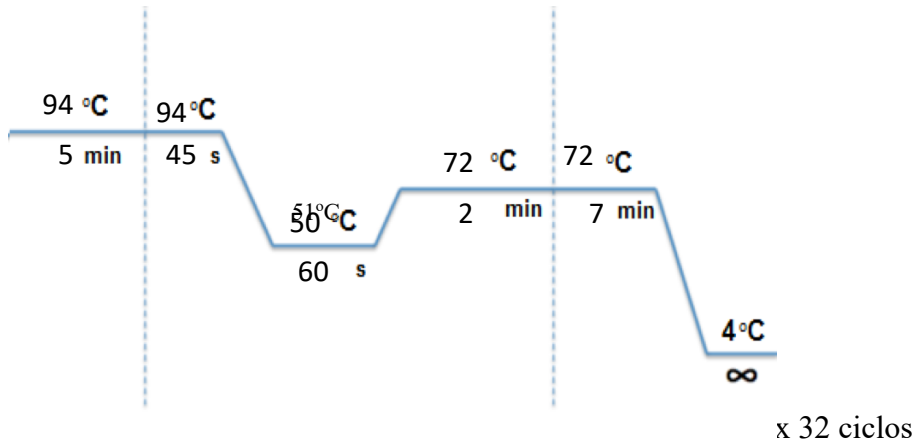
- Para la comprobación del fondo genético (W3110):



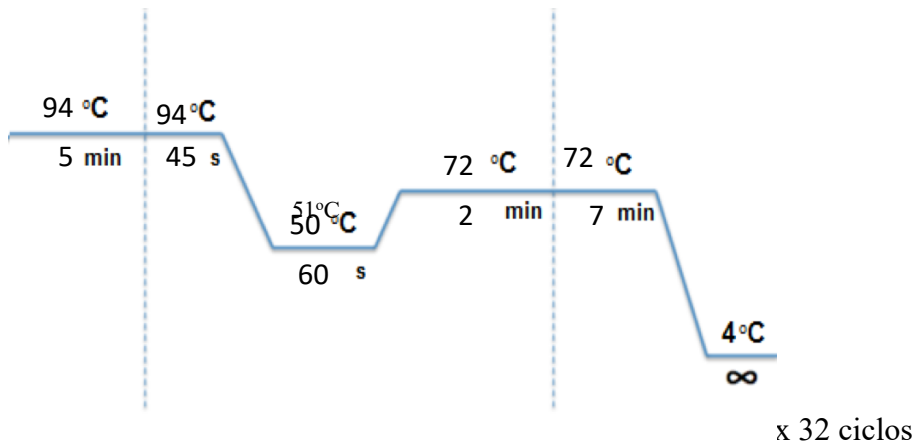
- Para comprobación de *pheA*



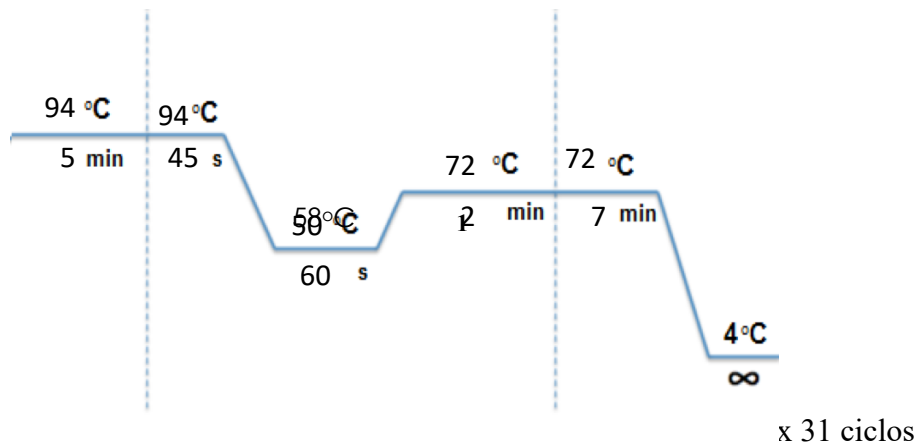
- Para la comprobación de *pykA*



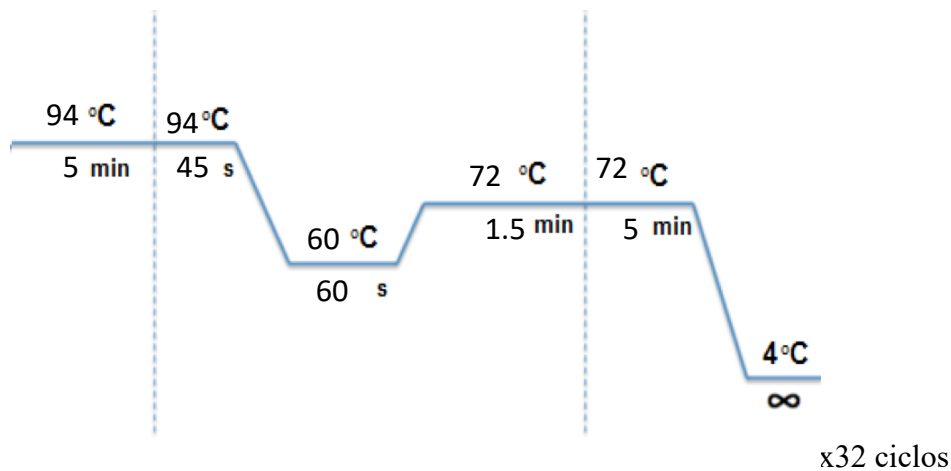
- Para la comprobación de *pykF*



- Para la comprobación de sitios internos de casete de resistencia a Kanamicina (K1,K2)



- Para producto de amplificación pKD3 o pKD4 *pykA* o *pykF* (método de Datsenko)



## Primers y tamaños esperados

### Para la eliminación de los genes *pykA* y *PykF* (método de Datsenko)

- *pykA*:

5´ TTTCATGTTCAAGCAACACCTGGTTGTTTCAGTCAACGGAGTATTACATG 3´

5´ TGGCGTTTTTCGCCGCATCCGGCAACGTACTTACTCTACCGTTAAAATACG 3´

Tamaño esperado (a partir de pKD3 o pKD4): 1519 pb.

- *pykF*:

5´ GAAAGCAAGTTTCTCCCATCCTTCTCAACTTAAAGACTAAGACTGTCATG 3´

5´ GATATACAAATTAATTCACAAAAGCAATATTACAGGACGTGAACAGATGC 3´

Tamaño esperado (a partir de pKD3 o pKD4): 1489 pb.

Para las comprobaciones genotípicas

- W3110

5´ ACAACGCGACCGCTCATCAG 3´

5´ CGTCACATGCCGGTTCCACA 3´

Tamaños esperados: 1858pb para cepas W3110, 667pb para cepas no W3110 (ej.MG1655).

- *pheA*

5´ GACGCCACAATCAATACACC 3´

5´ CGTCGAGCACGATCAGAATA 3´

Tamaños esperados: 2042pb para el gen nativo, 2367pb para *pheA::Km*, 850pb para *pheA::FRT*.

- *pykA*

5´ TCTTATACGACATCCGAATGAGATT 3´

5´ GGATACTAAAATTGCTGAAAACCTCG 3´

Tamaños esperados: 1759pb para el gen nativo, 1349pb para *pykA::Cm*, 1817pb para *pykA::Km*.

- *pykF*

5´ TGTAGAACTCAACGACTCAAAAACA 3´

5´ AAAATTGAGAGAAAACAGGATGCTT 3´

Tamaños esperados: 1773pb para el gen nativo, 1400pb para *pykF::Cm*.

- *K1*

5´ CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3´

Tamaño esperado: 608pb para *pykA::Km*.

- *K2*

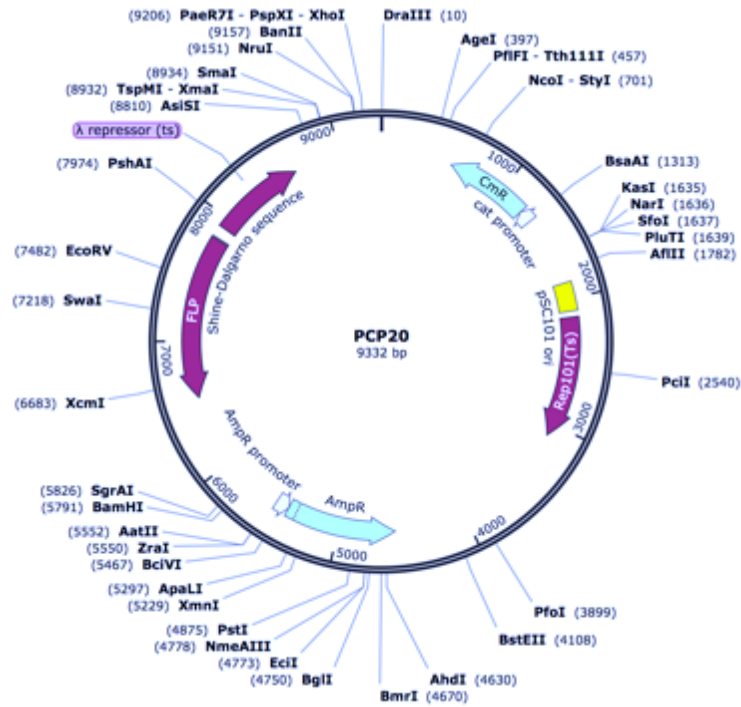
• 5´ CGGTGCCCTGAATGAACTGC 3´

Tamaño esperado: 1119pb para *pykA::Km*.

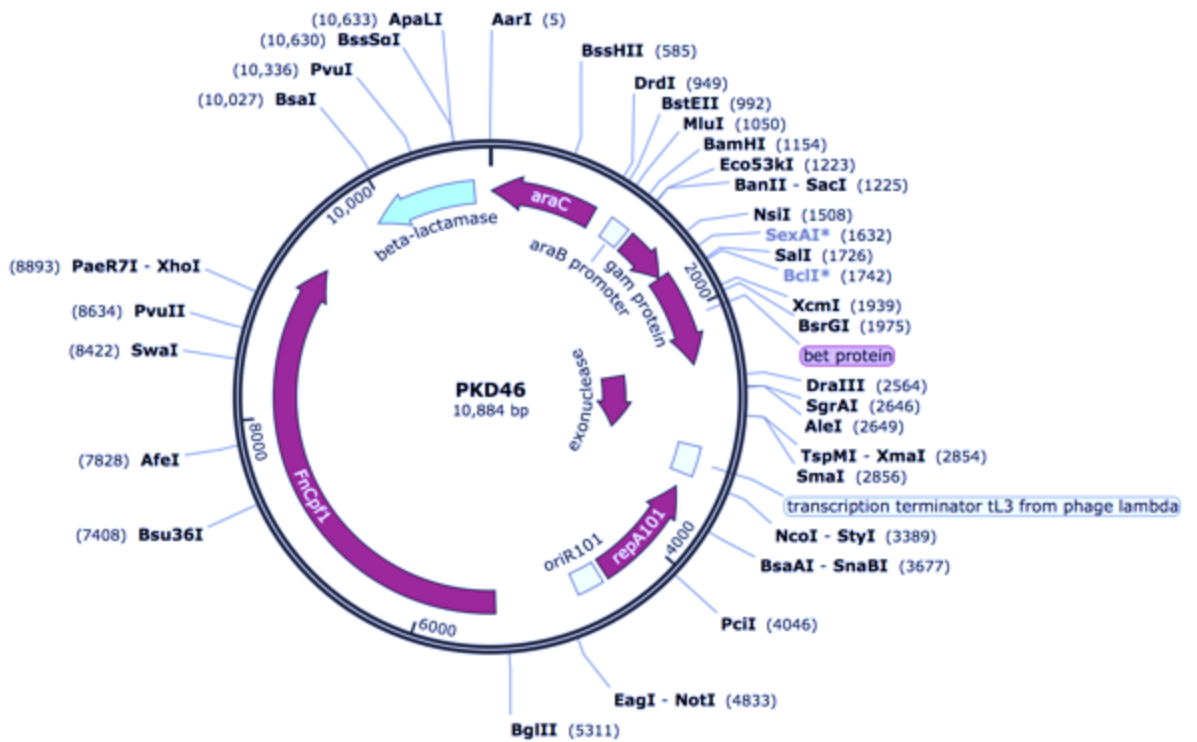


## Mapas de plásmidos

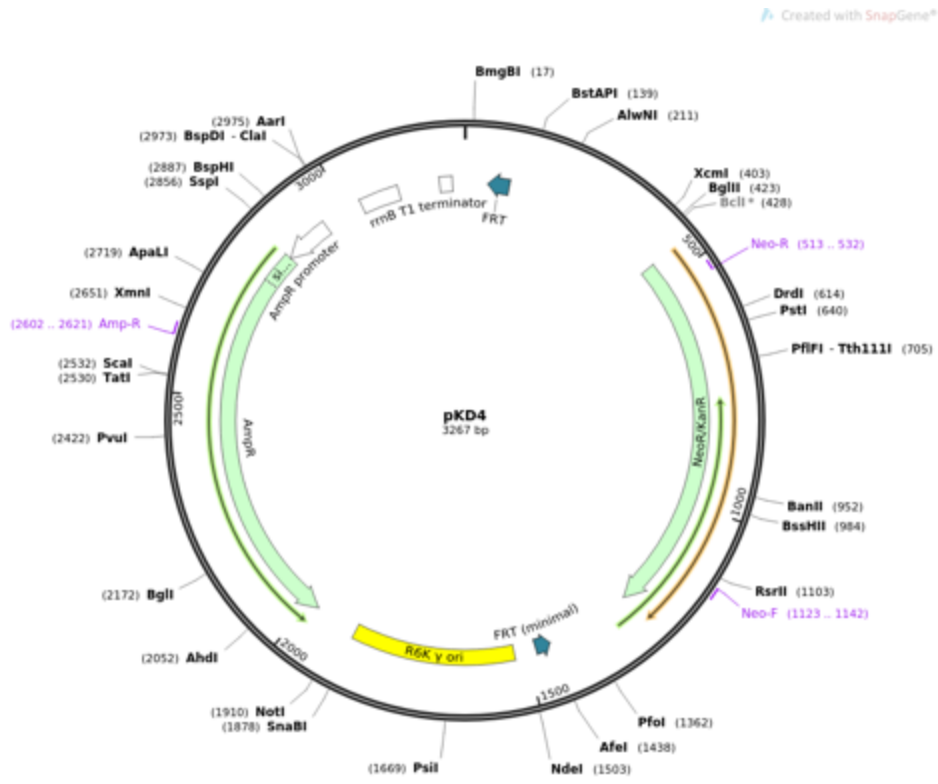
- pCP-20



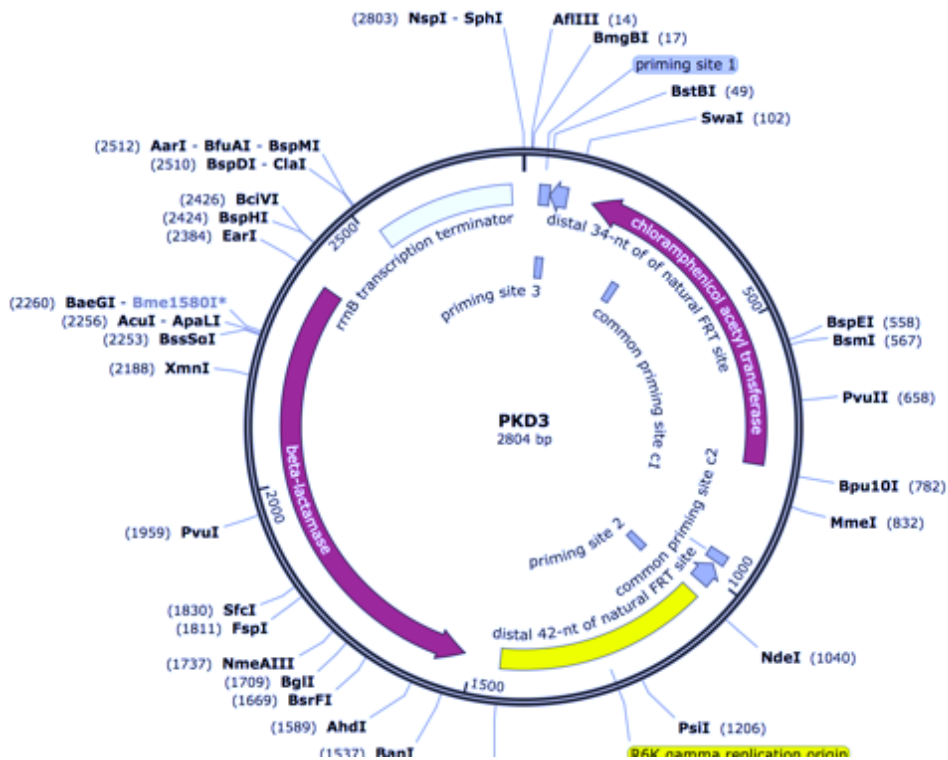
- pKD46



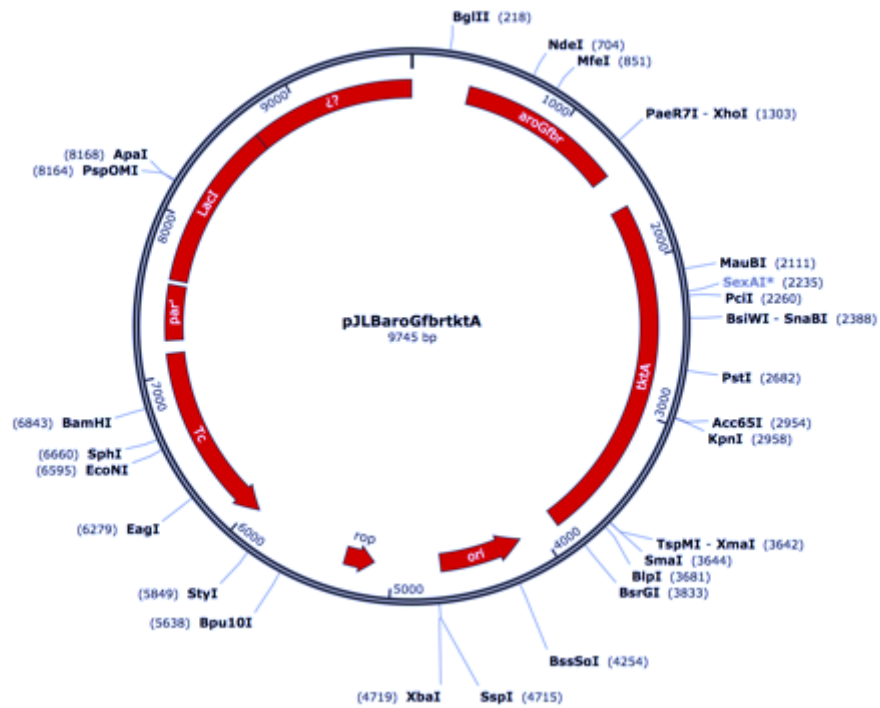
- pKD4



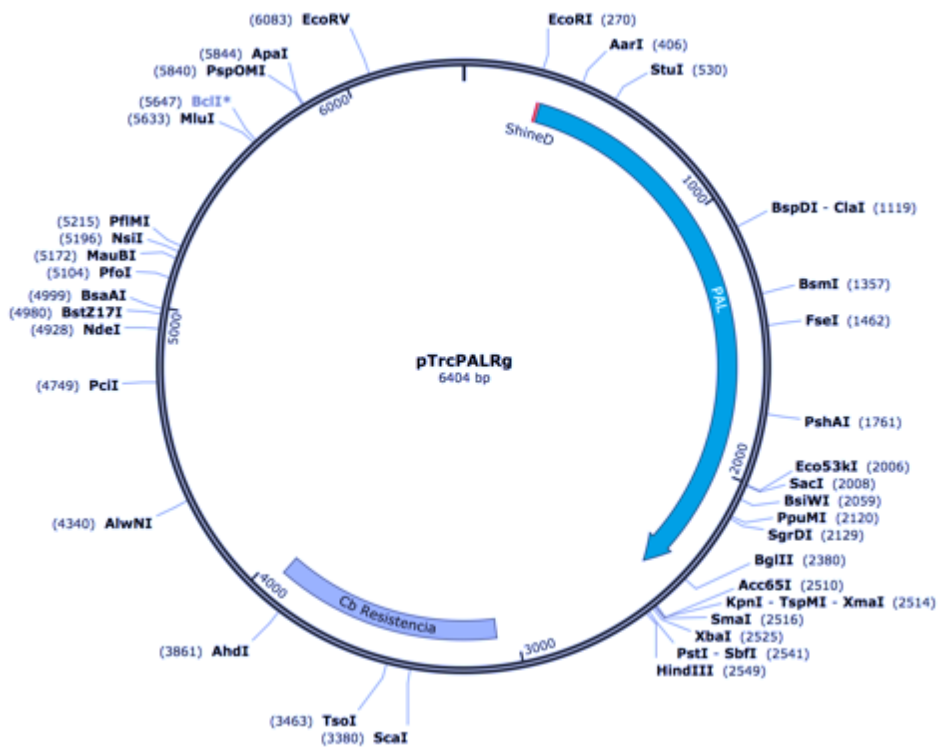
- pKD3



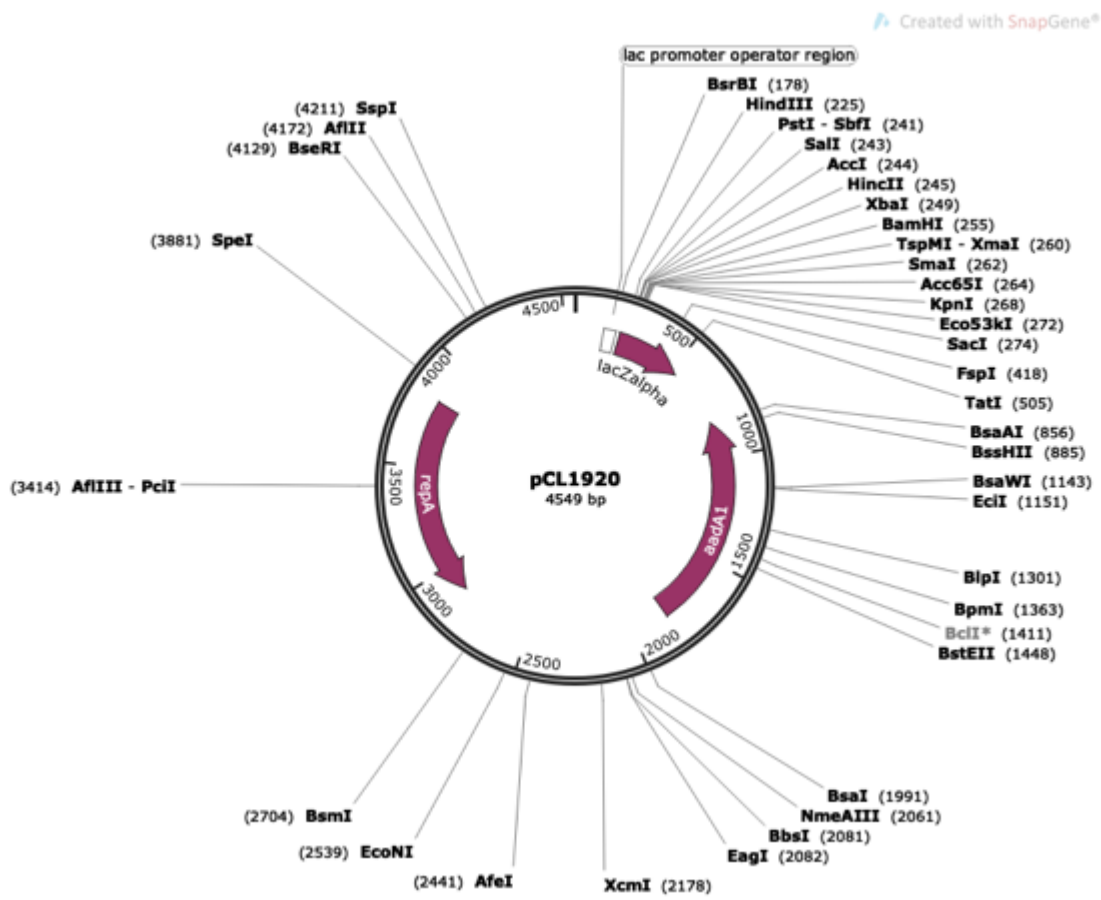
- pJLBaroG<sup>br</sup> tkta



- pTrcPALRg



- pCL1920



## Medios de cultivo

### *Medio mineral M9 (solución 5x)*

- 33.9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 15 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- 5 g/L NH<sub>4</sub>Cl.
- 2.5 g/L NaCl.

### *Caldo Lisogenia (LB)*

- 10 g/L Peptona 140
- 5 g/L Extracto de levadura
- 5 g/L NaCl

### *Medio SOC*

- 20 g/L Triptona
- 5 g/L Extracto de levadura
- 4.8 g/L MgSO<sub>4</sub>
- 3.603 g/L Dextrosa
- 0.186 g/L KCl

## Condiciones para cromatografía (HPLC y GC)

HPLC (intercambio iónico). Se llevó a cabo en un equipo Waters, consistente de una bomba mod 600E, automuestreador Mod 717, detectores de índice de refracción (Mod. 2410) y de arreglo de diodos (Mod. 996).

Se empleó una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8mm; 9um), de Bio Rad (Watford, UK) a 60° C. La fase móvil isocrática, consistió en 5% acetonitrilo en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM a 0.5 ml/min, en 20 min de tiempo de corrida. Se usó el detector de arreglo de diodos a 210 nm para la cuantificación ácido acético, DHS y SHK. y de índice de refracción (IR) para la cuantificación de glicerol y glucosa.

- HPLC (fase reversa). Se empleó un equipo Agilent modelo 1100, con detector de arreglo de diodos.

Se utilizó una columna Synergi Hydro RP (150 X 4.6mm, 4um) de Phenomenex (CA, USA). La fase móvil A 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O y B 0.1% TFA en CH<sub>3</sub>OH, se emplearon en un gradiente escalonado de 5 a 60% B en 14'. La detección y cuantificación de pHCA se efectuó a 280 nm.

- GC. Se empleó un equipo Agilent modelo 6850, con detector FID. Se empleó He como gas acarreador y una columna Columna HP-INNOWax de polietilenglicol (30m de largo, 0.25mm de diámetro), con 5 min a 110°C y una rampa de 8° C por min y un hold de 3 min a 220° C. y tiempo de corrida total de 22 min.

## Modelo a escala genómica

- Modelo: BiGG Models, iAF1260b (<http://bigg.ucsd.edu/models/iAF1260b>).
- Organismo: *Escherichia coli* cepa K-12 sub. MG1655.
- Genoma: NC\_000913.3.
- Componentes: 1668 metabolitos, 2388 reacciones, 1261 genes.

Código:

```
import cobra
```

In [3]:

```
model=cobra.io.read_sbml_model('Downloads/iJO1366.xml')
```

In [4]:

```
model.reactions.EX_glc__D_e
```

Out[4]:

<b>Reaction identifier</b>	EX_glc__D_e
<b>Name</b>	D-Glucose exchange
<b>Memory address</b>	0x013227cb2e8
<b>Stoichiometry</b>	glc__D_e <=> D-Glucose <=>
<b>GPR</b>	
<b>Lower bound</b>	-10.0
<b>Upper bound</b>	1000.0

```
model.reactions.EX_glc__D_e.lower_bound=0
```

```
#quitar glucosa
```

In [5]:

In [18]:

```
model.reactions.EX_glyc_e
```

Out[18]:

<b>Reaction identifier</b>	EX_glyc_e
<b>Name</b>	Glycerol exchange
<b>Memory address</b>	0x013227cbdd8
<b>Stoichiometry</b>	glyc_e <=> Glycerol <=>
<b>GPR</b>	
<b>Lower bound</b>	-5
<b>Upper bound</b>	1000.0

In [19]:

```
model.reactions.EX_glyc_e.lower_bound=-5 #poner glicerol
```

In [8]:

```
model.summary()
```

```
IN FLUXES          OUT FLUXES          OBJECTIVES
-----
o2_e      5.64          h2o_e    16          BIOMASS_Ec_i...  0.275
glyc_e    5              co2_e    3.73
nh4_e     2.97          h_e      2.52
pi_e      0.265
so4_e     0.0693
k_e       0.0536
fe2_e     0.00441
mg2_e     0.00238
ca2_e     0.00143
cl_e      0.00143
cu2_e     0.000195
mn2_e     0.00019
zn2_e     9.37e-05
ni2_e     8.87e-05
mobd_e    3.54e-05
```

In [33]:

```
model.genes.b1854
```

Out[33]:

<b>Gene identifier</b>	b1854
<b>Name</b>	b1854
<b>Memory address</b>	0x013226af940
<b>Functional</b>	True
<b>In 1 reaction(s)</b>	PYK

In [34]:

```
model.genes.b1854.knock_out()
```

In [35]:

```
model.genes.b1854 #KO de pykA
```

Out[35]:

<b>Gene identifier</b>	b1854
<b>Name</b>	b1854
<b>Memory address</b>	0x013226af940
<b>Functional</b>	False
<b>In 1 reaction(s)</b>	PYK

In [36]:

```
model.genes.b1676
```

Out[36]:

<b>Gene identifier</b>	b1676
------------------------	-------



<b>Name</b>	b1676
<b>Memory address</b>	0x013226afb70
<b>Functional</b>	False
<b>In 1 reaction(s)</b>	PYK

In [37]:

```
model.genes.b1676.knock_out()
```

In [38]:

```
model.genes.b1676          #KO de pykF
```

Out[38]:

<b>Gene identifier</b>	b1676
<b>Name</b>	b1676
<b>Memory address</b>	0x013226afb70
<b>Functional</b>	False
<b>In 1 reaction(s)</b>	PYK

In [39]:

```
model.summary()
```

```

IN FLUXES          OUT FLUXES          OBJECTIVES
-----
o2_e      6.18      h2o_e    16.2      BIOMASS_Ec_i...  0.262
glyc_e    5          co2_e     4.24
nh4_e     2.83      h_e       2.41
pi_e      0.253
so4_e     0.0661
k_e       0.0512
fe2_e    0.00421
mg2_e    0.00227
ca2_e    0.00136
cl_e     0.00136
cu2_e    0.000186
mn2_e    0.000181
zn2_e    8.94e-05
ni2_e    8.47e-05
mobd_e   3.38e-05

```

In [40]:

```
model.metabolites.pyr_c.summary()
```

```
PRODUCING REACTIONS -- Pyruvate (pyr_c)
```

```

-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
90%   2.77   SERD_L   ser__L_c --> nh4_c + pyr_c
5%    0.153  ME2     mal__L_c + nadp_c --> co2_c + nadph_c + pyr_c
4%    0.111  VPAMTr  3mob_c + ala__L_c <=> pyr_c + val__L_c
1%    0.0404  CYSTL   cyst__L_c + h2o_c --> hcys__L_c + nh4_c + pyr_c

```

CONSUMING REACTIONS -- Pyruvate (pyr\_c)

```

-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
70%   2.15   PDH      coa_c + nad_c + pyr_c --> accoa_c + co2_c + nadh_c
15%   0.458  ACLS     h_c + 2.0 pyr_c --> alac__S_c + co2_c
9%    0.263  ALATA_L  akg_c + ala__L_c <=> glu__L_c + pyr_c
3%    0.0973 DHDPS    aspsa_c + pyr_c --> 23dhdp_c + 2.0 h2o_c + h_c
2%    0.0762 ACHBS    2obut_c + h_c + pyr_c --> 2ahbut_c + co2_c
1%    0.0285 POR5     coa_c + 2.0 flxso_c + pyr_c <=> accoa_c + co2_c...

```

In [41]:

```
model.reactions.SERD_L      #fuente de pyr= desaminación de la serina
```

Out[41]:

<b>Reaction identifier</b>	SERD_L
<b>Name</b>	L-serine deaminase
<b>Memory address</b>	0x01323adcef0
<b>Stoichiometry</b>	ser__L_c --> nh4_c + pyr_c L-Serine --> Ammonium + Pyruvate
<b>GPR</b>	b2797 or b4471 or b1814 or b3708
<b>Lower bound</b>	0.0
<b>Upper bound</b>	1000.0

In [42]:

```
model.reactions.SERD_L.upper_bound=0
```

In [43]:

```
model.reactions.SERD_L      #quitar desaminación de serina
```

Out[43]:

<b>Reaction identifier</b>	SERD L
<b>Name</b>	L-serine deaminase
<b>Memory address</b>	0x01323adcef0
<b>Stoichiometry</b>	ser__L_c --> nh4_c + pyr_c L-Serine --> Ammonium + Pyruvate
<b>GPR</b>	b2797 or b4471 or b1814 or b3708
<b>Lower bound</b>	0.0
<b>Upper bound</b>	0

In [44]:

```
model.summary()
```

```

IN FLUXES          OUT FLUXES          OBJECTIVES
-----

```

```

o2_e      6.18      h2o_e    16.2    BIOMASS_Ec_i...  0.262
glyc_e    5          co2_e    4.24
nh4_e     2.83      h_e      2.41
pi_e      0.253
so4_e     0.0661
k_e       0.0512
fe2_e     0.00421
mg2_e     0.00227
ca2_e     0.00136
cl_e      0.00136
cu2_e     0.000186
mn2_e     0.000181
zn2_e     8.94e-05
ni2_e     8.47e-05
mobd_e    3.38e-05

```

In [47]:

```

model.metabolites.pyr_c.summary()          #otra fuente de pyr
PRODUCING REACTIONS -- Pyruvate (pyr_c)
-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
95%    2.91   ME2     mal__L_c + nadp_c --> co2_c + nadph_c + pyr_c
4%     0.111  VPAMTr  3mob_c + ala__L_c <=> pyr_c + val__L_c
1%     0.0404  CYSTL   cyst__L_c + h2o_c --> hcys__L_c + nh4_c + pyr_c

```

```

CONSUMING REACTIONS -- Pyruvate (pyr_c)
-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
70%    2.15   PDH     coa_c + nad_c + pyr_c --> accoa_c + co2_c + nadh_c
15%    0.458  ACLS    h_c + 2.0 pyr_c --> alac__S_c + co2_c
9%     0.264  ALATA_L akg_c + ala__L_c <=> glu__L_c + pyr_c
3%     0.0973  DHDPS   aspsa_c + pyr_c --> 23dhdp_c + 2.0 h2o_c + h_c
2%     0.0762  ACHBS   2obut_c + h_c + pyr_c --> 2ahbut_c + co2_c

```

In [48]:

```

model.reactions.ME2      #malato deshidrogenasa

```

Out[48]:

<b>Reaction identifier</b>	ME2
<b>Name</b>	Malic enzyme (NADP)
<b>Memory address</b>	0x01323559048
<b>Stoichiometry</b>	mal__L_c + nadp_c --> co2_c + nadph_c + pyr_c L-Malate + Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate --> CO2 CO2 + Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - reduced + Pyruvate
<b>GPR</b>	b2463

Lower bound

0.0

Upper bound

1000.0

In [51]:

```
model.metabolites.mal__L_c.summary() #fuente del malato
```

```
PRODUCING REACTIONS -- L-Malate (mal__L_c)
```

```

-----
%          FLUX  RXN ID  REACTION
-----
100%      2.91  FUM      fum_c + h2o_c <=> mal__L_c

```

```
CONSUMING REACTIONS -- L-Malate (mal__L_c)
```

```

-----
%          FLUX  RXN ID  REACTION
-----
100%      2.91  ME2      mal__L_c + nadp_c --> co2_c + nadph_c + pyr_c

```

In [53]:

```
model.metabolites.fum_c.summary ()
```

```
PRODUCING REACTIONS -- Fumarate (fum_c)
```

```

-----
%          FLUX  RXN ID  REACTION
-----
53%      1.6     ASPT      asp__L_c --> fum_c + nh4_c
38%      1.13    SUCDi     q8_c + succ_c --> fum_c + q8h2_c
4%       0.117   ADSL2r    25aics_c <=> aicar_c + fum_c
3%       0.0784  ADSL1r    dcamp_c <=> amp_c + fum_c
3%       0.0776  ARGSL     argsuc_c <=> arg__L_c + fum_c

```

```
CONSUMING REACTIONS -- Fumarate (fum_c)
```

```

-----
%          FLUX  RXN ID  REACTION
-----
97%      2.91    FUM      fum_c + h2o_c <=> mal__L_c
3%       0.0867  DHORDfum  dhor__S_c + fum_c --> orot_c + succ_c

```

In [54]:

```
model.reactions.ASPT #aspartato amonia lyasa
```

Out[54]:

<b>Reaction identifier</b>	ASPT
<b>Name</b>	L-aspartase
<b>Memory address</b>	0x0132277e198
<b>Stoichiometry</b>	asp__L_c --> fum_c + nh4_c L-Aspartate --> Fumarate + Ammonium
<b>GPR</b>	b4139
<b>Lower bound</b>	0.0

Upper bound

1000.0

In [55]:

```
model.reactions.ME2.upper_bound=0      #sin malato deshydrogenasa
```

In [56]:

```
model.summary()
```

```
IN FLUXES          OUT FLUXES          OBJECTIVES
-----
o2_e      6.18      h2o_e  16.2  BIOMASS_Ec_i...  0.262
glyc_e    5      co2_e   4.24
nh4_e     2.83      h_e     2.41
pi_e      0.253
so4_e     0.0661
k_e       0.0512
fe2_e     0.00421
mg2_e     0.00227
ca2_e     0.00136
cl_e      0.00136
cu2_e     0.000186
mn2_e     0.000181
zn2_e     8.94e-05
ni2_e     8.47e-05
mobd_e    3.38e-05
```

In [57]:

```
model.metabolites.pyr_c.summary()
```

```
PRODUCING REACTIONS -- Pyruvate (pyr_c)
```

```
-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
52%   1.6    SERD_D  ser__D_c --> nh4_c + pyr_c
43%   1.31   ME1     mal__L_c + nad_c --> co2_c + nadh_c + pyr_c
4%    0.111  VPAMTr  3mob_c + ala__L_c <=> pyr_c + val__L_c
1%    0.0404  CYSTL   cyst__L_c + h2o_c --> hcys__L_c + nh4_c + pyr_c
```

```
CONSUMING REACTIONS -- Pyruvate (pyr_c)
```

```
-----
%      FLUX  RXN ID  REACTION
-----
70%   2.15   PDH     coa_c + nad_c + pyr_c --> accoa_c + co2_c + nadh_c
15%   0.458  ACLS    h_c + 2.0 pyr_c --> alac__S_c + co2_c
9%    0.264  ALATA_L akg_c + ala__L_c <=> glu__L_c + pyr_c
3%    0.0973  DHDPS   aspsa_c + pyr_c --> 23dhdp_c + 2.0 h2o_c + h_c
2%    0.0762  ACHBS   2obut_c + h_c + pyr_c --> 2ahbut_c + co2_c
1%    0.0285  POR5    coa_c + 2.0 flxso_c + pyr_c <=> accoa_c + co2_c...
```

In [ ]:

## Curvas de crecimiento en fuentes de carbono alternativas

Como complemento a los experimentos de la doble mutante, se probaron los carbohidratos no PTS: xilosa, ribosa y arabinosa, en las cepas W3110 silvestre, PB25 (MG1655 *pykA* *pykF*) (Olvera et al. 2009) y la doble mutante (de este trabajo). Los experimentos se realizaron por triplicado en microplaca, con 150ul de cultivo, leyendo la Do cada 20min, al se puede observar, que entre la doble mutante de este trabajo y la PB25, existen diferencias fenotípicas, a pesar de tener las mismas mutaciones en *pykA* y *pykF*.

